

# INTERAKTION VON PSYCHOPHARMAKA MIT HUMANEN ORGANISCHEN KATIONENTRANSPORTERN

**SONJA UTNER**



**INAUGURAL-DISSERTATION** zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**  
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2011

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2011

© 2011 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Betreuer: Prof. Dr. med. vet. Ernst Petzinger  
und  
dem Institut für Anatomie und Zellbiologie I  
der Julius-Maximilian-Universität Würzburg  
Betreuer: Prof. Dr. med. Hermann Koepsell

# **Interaktion von Psychopharmaka mit humanen organischen Kationentransportern**

**INAUGURAL-DISSERTATION**  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**Sonja Utner**

Tierärztin aus Kitzingen

Gießen, 2011

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. med. vet. Martin Kramer

Gutachter:

Prof. Dr. med. vet. Ernst Petzinger

Prof. Dr. med. Hermann Koepsell

Tag der Disputation: 7.06.2011

Wer sich der Praxis hingibt ohne Wissenschaft ist wie ein Steuermann, der ein Schiff ohne Ruder und Kompass besteigt und nie weiß, wohin er fährt.

Leonardo da Vinci

## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	6
1.1. Proteine für den Transport von Neurotransmittern und Arzneistoffen	6
1.2. Die Familie der organischen Kationentransporter	7
1.3. Charakteristika und Lokalisation von OCT1/2/3	10
1.4. Funktionelle und pharmakologische Eigenschaften	16
1.5. Fragestellung der Arbeit	18
1.6. Untersuchte Substrate und Psychopharmaka	19
1.7. Bedeutung der Psychopharmaka	21
1.7.1. Trizyklische Antidepressiva	22
1.7.2. Selektive Serotonin-Wiederaufnahme-Hemmer (SSRI)	23
1.7.3. Atypische Antidepressiva	23
1.7.4. Antipsychotika/Neuroleptika	23
2. Material und Methoden	24
2.1. Verwendete Lösungen und Substanzen	24
2.2. Zellzucht und Subkultivierung der CHO- und HEK-Zellen	27
2.3. Untersuchung der zellulären Aufnahme von Substanzen	28
2.4. Proteinbestimmung	30
2.5. Statistik und Versuchsauswertungen der Transportmessungen	31
3. Ergebnisse	33
3.1. Charakterisierung des <sup>3</sup> H-MPP Transports an Zellen	33
3.2. Interaktion von Psychopharmaka mit hOCTs	34
3.2.1. Messung der Hemmung durch Desipramin	35
3.2.2. Messung der Hemmung durch Doxepin	37
3.2.3. Messung der Hemmung durch Imipramin	39
3.2.4. Messung der Hemmung durch Citalopram	41
3.2.5. Messung der Hemmung durch Mirtazapin	45
3.2.6. Messung der Hemmung durch Amisulprid	47
3.2.7. Messung der Hemmung durch Quetiapin	49
3.2.8. Übersicht über die ermittelten IC <sub>50</sub> -Werte	52

3.3. Versuch Transport radioaktiv markierter Psychopharmaka nachzuweisen	53
3.3.1. Desipramin	53
3.3.2. Doxepin	56
3.3.3. Imipramin	60
3.3.4. Citalopram	63
3.3.5. Untersuchung des endogenen Transports	65
4. Diskussion	67
5. Zusammenfassung	77
6. Summary	79
7. Literaturverzeichnis	81
Abkürzungsverzeichnis	114
8. Erklärung	117
9. Danksagung	118

# **1. Einleitung**

## **1.1. Proteine für den Transport von Neurotransmittern und Arzneistoffen**

Das ZNS dient zur schnellen und gezielten Übertragung von Informationen. In den einzelnen Neuronen erfolgt die Reizleitung durch fortgeleitete Aktionspotentiale elektrisch. Die Reizweiterleitung zu den nachfolgenden Neuronen oder Erfolgsorganen erfolgt an spezifischen Kontaktzonen, den Synapsen. Als Botenstoffe agieren chemische Verbindungen, die als Neurotransmitter bezeichnet werden. Ihre Freisetzung erfolgt durch das Verschmelzen von Speichervesikeln mit der Plasmamembran der entsprechenden Neuronen. Die Neurotransmitter werden bei der Informationsweiterleitung in den synaptischen Spalt freigesetzt und interagieren mit den postsynaptischen Rezeptoren. Nach erfolgter Reizweiterleitung ist eine rasche Elimination des Neurotransmitters aus dem synaptischen Spalt essentiell, um eine erneute Informationsübertragung zu ermöglichen. Diese Elimination kann durch enzymatische Spaltung (z. B. Acetylcholin durch Acetylcholinesterase), Abdiffusion und insbesondere durch Aufnahme via Transporter in prä- und postsynaptische Membranen oder extraneuronale Zellen (z. B. Gliazellen) erfolgen.

Medikamente werden in der Regel nicht an ihrem Wirkungsort appliziert. Um zu ihrem Zielort zu gelangen müssen sie vielfach zelluläre Barrieren (z. B. Epi- und/oder Endothelien) durchdringen. Für einige (vorzugsweise kleine lipophile) Wirkstoffe kann dies mittels Diffusion geschehen. Andere (v. a. größere oder hydrophile) Wirkstoffe sind auf spezifische Transportmechanismen wie spezielle Transport-Proteine angewiesen. Viele dieser Arzneistoffe gehören zur chemischen Gruppe der Kationen; organische Kationen sind durch ihre positive Ladung bei physiologischem pH gekennzeichnet. Wegen ihrer positiven Ladung können sie Membranen nicht ohne weiteres überwinden. Für ihren Transport sind integrale Membranproteine verantwortlich, folglich sind die Erforschung des Aufbaus, der Funktion und Regulation dieser Transportproteine von essentiellern Wert (Drewe J. 2000; Daniel und Kottra 2004). Bei der Beurteilung der Wirksamkeit von Medikamenten ist die Untersuchung ihrer Sekretion und Reabsorption im Körper sehr wichtig, daher liegt die klinische Bedeutung dieser Proteine neben der Verteilung/Elimination von



Arzneistoffen vor allem auch im möglichen Auftreten von Arzneistoffinteraktionen, wenn verschiedene Arzneistoffe und auch endogene Substrate mit demselben Transport-Protein interagieren.

In Bezug auf die Entwicklung von Medikamenten und deren Wirkung ist jedoch auch ihre Verteilung und somit ihr konkreter Wirkungsort bedeutend. Funktionell sind verschiedene Transportsysteme in Dünndarm, Leber, Niere und ZNS bereits charakterisiert (Alnouti *et al* 2006; Inazu *et al* 2006; Iseki *et al* 1993; Jonker *et al* 2004; Karbach *et al* 2000; Kato *et al* 2004; Kim *et al* 2006; Kimura *et al* 2002; Koepsell *et al* 2007; Müller und Jansen 1997; Prasad *et al* 1992; Pritchard und Miller 1993,1996; Streich *et al* 1996; Ullrich K. J. 1997). Zwei in letzter Zeit gut untersuchte Transportproteinklassen sind die organischen Kationentransporter und die multidrug-resistance-Proteine (MDR) (Busch *et al* 1998; Koepsell *et al* 2000, 2007; Koepsell H. 1998; Marger und Saier 1993; Rappa *et al* 1999). Organische Kationentransporter sind polyspezifisch und haben daher überlappende Substratspezifitäten; sie transportieren also auch kationische Arzneistoffe und tragen zur Ausscheidung in Niere, Leber und Plazenta bei. Andererseits spielen sie wahrscheinlich eine wichtige Rolle für die Homöostase von Neurotransmittern und zentralnervös wirksamen Medikamenten im Gehirn. Beispielsweise transportieren OCT1 und OCT2 eine Reihe von Neurotransmittern einschließlich Serotonin, Noradrenalin und Acetylcholin (Braidert *et al* 1998; Busch *et al* 1996, 1998; Gründemann *et al* 1998; Lips *et al* 2005; Wessler *et al* 2001). Der OCT3 trägt zur Inaktivierung freigesetzter Katecholamine im Gehirn und im Körper bei (Inazu *et al* 2003; Wu *et al* 1998; Zwart *et al* 2001).

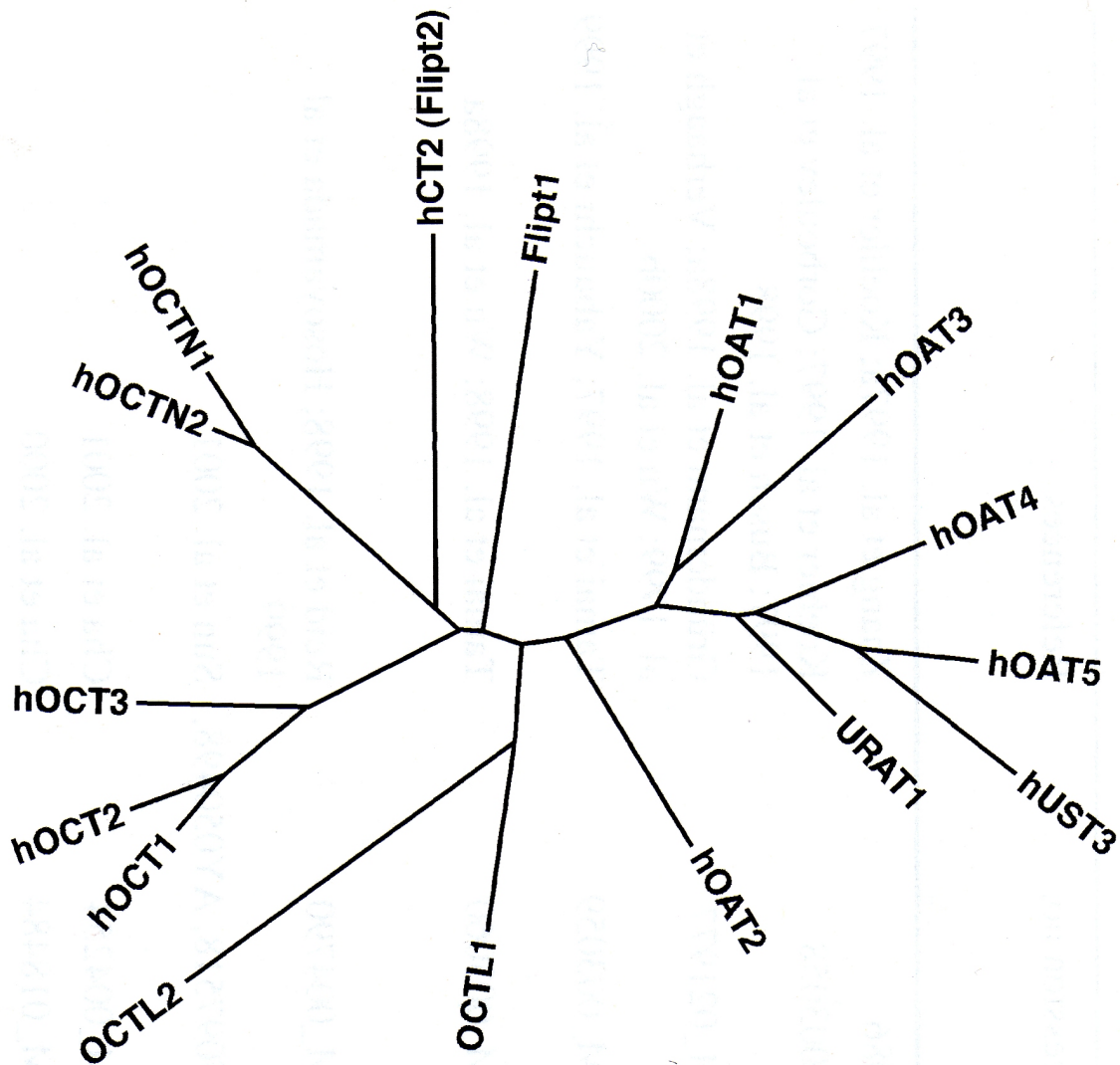
## **1.2. Die Familie der organischen Kationentransporter**

Zur Elimination von Xenobiotika, Stoffwechselprodukten und anderen endogenen Substanzen ist der Organismus mit einer ganzen Reihe von Transportproteinen unterschiedlichster Spezifität ausgerüstet. Während die Mehrzahl der Transporter hochspezialisiert sind und vorwiegend Nährstoffe wie Glukose, Aminosäuren, Nucleoside oder Fettsäuren transportieren, und auch als oligospezifisch benannt werden, gibt es daneben einige Transporter, die eine größere Bandbreite an Substraten aufweisen. Zwei Gruppen der SLC-Familie transportieren strukturell verschiedene Substanzen und werden daher als polyspezifisch bezeichnet (Jonker *et*

*al* 2004; Koepsell *et al* 2007). Eine solche ist die SLC22-Genfamilie, die beim Menschen aus 12 Mitgliedern besteht, darunter Transporter für organische Anionen (OAT, organic anion transporters), der Carnitintransporter (OCTN2) und auch die organischen Kationentransporter hOCT1, hOCT2 und hOCT3. OCT1, OCT2 und OCT3 bilden innerhalb dieser Familie eine Gruppe phylogenetisch nah verwandter Proteine.

Organische Kationentransporter (organic cation transporter, OCT) sind polyspezifische Transmembranproteine und werden mit den organischen Anionentransportern (organic anion transporter, OAT) und den Kationen/Zwitterionentransportern OCTN aufgrund ihrer genetischen Ähnlichkeiten der SLC22 (solute-carrier-family-22) Transporterfamilie zugeordnet (Humane Genome Nomenclature Committee, HGNC). Koehler und Mitarbeiter bewiesen die Lokalisation der Gene von hOCT1 und hOCT2 auf demselben Chromosom 6q26 (1997). Die SLC22-Familie wiederum ist ein Teil der MFS-Superfamilie (major facilitator superfamily, Gründemann *et al* 1998; Koepsell *et al* 1998, 1999; 2003; Koepsell und Endou 2003, 2004; Marger und Saier 1993).

Die Transportproteine OCT1, OCT2 und OCT3 wurden sowohl aus menschlicher DNA (hOCTs) als auch vom Schwein, Ratte, Maus oder Kaninchen kloniert, wobei hinsichtlich Substratspezifität und Gewebeverteilung teilweise Unterschiede zwischen den Spezies bestehen (Dresser *et al* 2000; Suhre *et al* 2005; Tahara *et al* 2005). Substrate der OCTs sind neben pharmakologisch relevanten Substanzen die permanenten Kationen TEA und MPP (Tabelle 2), es wird aber diskutiert, ob sie auch anionische, zwitterionische und ungeladene Substanzen transportieren.



**Abb.1: Phylogenetischer Stammbaum der beim Menschen zur SLC22 Familie gehörenden Transporter (aus Koepsell *et al* 2003)**

Organische Moleküle, die eine oder mehrere primäre, sekundäre, tertiäre oder quartäre Ammoniumgruppen besitzen, haben eine zeitweise oder permanente positive Ladung und gehören dadurch zu den organischen Kationen. Zu dieser Gruppe werden endogene organische Kationen, wie Cholin, N1-Methylnicotinamid (NMN) und die Monoamino-Neurotransmitter wie Dopamin, Serotonin, Histamin und Noradrenalin, sowie viele Xenobiotika gerechnet. Pharmaka vieler klinischer Klassen, einschließlich Antihistaminika, Skelettmuskelrelaxantien, Antiarrhythmika, Psychopharmaka und  $\beta$ -adrenerge Rezeptorblocker gehören ebenfalls zu den organischen Kationen (Koepsell H. 1998; Koepsell *et al* 1999; Lips *et al* 2005; Zhang *et al* 1998). 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 von verschiedenen polyspezifischen Transportern vermittelt (Koepsell H. 1998, Koepsell *et al* 1999). In Dünndarm, Leber und Niere sind diese Na<sup>+</sup>-unabhängigen Transporter für die Absorption und Ausscheidung organischer Kationen verantwortlich. Bei dem Transport durch hOCT1, hOCT2 und hOCT3 handelt es sich um eine erleichterte Diffusion von unter physiologischen Bedingungen positiv geladenen, kleineren Verbindungen (Marger und Saier 1993). Antreibende Kraft ist der Konzentrationsgradient des jeweils zu transportierenden Substrats und das Membranpotential der Zellen. Zu den Substraten gehören Xenobiotika, Nukleoside und biogene Amine (Übersicht Jonker und Schinkel 2004). Absorption und Ausscheidung erfolgt in zwei Schritten: Der erste Schritt besteht in einer Translokation der organischen Kationen aus dem Extra- in den Intrazellulärraum, meist unter Ausnutzung des elektrochemischen Gradienten. Als zweiter Schritt folgt ein Transport der Kationen aus der Zelle heraus, diesmal aber gegen das Membranpotential (Holohan *et al* 1980, 1981). Der Auswärtstransport gegen das Membranpotential konnte am Kationen-Protonen-Antiporter MATE, einem Transporter in der Plasmamembran, der inzwischen sowohl beim Menschen als auch bei Maus und Ratte kloniert werden konnte, inzwischen sehr gut charakterisiert werden. Die menschlichen klonierten Subtypen heißen MATE1, MATE2-B und MATE2-K, hier konnte der Protonen-Kationen-Antiport allerdings bis jetzt nur bei MATE1 und MATE2-K demonstriert werden. Das Gen für den MATE1 ist beim Menschen auf dem Chromosom 17p11.2 lokalisiert (Hiasa *et al* 2006; Masuda *et al* 2006; Ohta *et al* 2006; Oksuta *et al* 2005; Terada *et al* 2006).

### **1.3. Charakteristika und Lokalisation von OCT1/2/3**

Obwohl bereits 1947 die Existenz eines organischen Kationentransporters in der Niere postuliert wurde (Sperber I. 1947) gelang erst 1994 die Klonierung eines derartigen Transporters (Gründemann *et al* 1994). Es handelte sich um den organischen Kationentransporter OCT1 aus der Rattenniere. In den Jahren danach wurden viele Transporter mit ähnlicher Struktur identifiziert, die zur SLC22-Familie gehören (Gorboulev *et al* 1997; Green *et al* 1999; Gründemann *et al* 1998a; Kekuda *et al* 1998; Tamai *et al* 1997; Zhang *et al* 1997).

Alle Mitglieder der SLC22-Familie weisen 12 Transmembrandomänen mit einer großen extrazellulären und einer kleineren intrazellulären Schleife auf. Die Lokalisation der Schleifen sowie die des intrazellulär lokalisierten C-Terminus wurden für rOCT1 von Meyer-Wentrup und Mitarbeitern (1998) mittels Antigen-Antikörper-Reaktionen bewiesen.

Zur Identifizierung der Funktion der einzelnen OCT-Subtypen wurden knockout Mäuse gezüchtet mit defizientem OCT1, OCT2 oder OCT3 (Zwart *et al* 2001; Jonker *et al* 2001, 2003; Koepsell H. 2004). Diese sind fertil, lebensfähig, gesund und weisen keine phänotypischen Anomalitäten auf. Dies ist nicht überraschend, da viele Transporter eine sich überschneidende Gewebeverteilung haben und mit sich überlappendem Substratspektrum existieren, so dass sie gegenseitig die Funktion des anderen teilweise mit übernehmen können. Allerdings konnte bei den Tieren eine zum Teil stark veränderte Kinetik bestimmter Pharmaka nachgewiesen werden: Nach Injektion von TEA konnte bei OCT1 knockout Mäusen eine verminderte, bei OCT2 knockout Mäusen eine unveränderte, und bei OCT1 und OCT2 doppel-knockout Mäusen eine deutlich reduzierte TEA-Konzentration nachgewiesen werden (Horvarth *et al* 2006; Jonker *et al* 2001, 2003; Wang *et al* 2002). Der OCT3 übernimmt diese Transportfunktion nicht (Zwart *et al* 2001).

Die Charakteristika der einzelnen OCTs lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

OCT1: Der humane OCT1 wurde 1997 von zwei Arbeitsgruppen parallel aus der Leber kloniert (Gorboulev *et al* 1997; Zhang *et al* 1997) und er war in über 80% der Aminosäuren mit dem OCT1 der Ratte identisch. Trotzdem konnten Unterschiede in einigen Eigenschaften des hOCT1 gegenüber dem der Ratte, der Maus und des Kaninchen gezeigt werden (Dresser *et al* 2000; Tahara *et al* 2005). Beispielsweise wird der Transporter im menschlichen Organismus im Gegensatz zu den Nagetieren, bei denen OCT1 sowohl in der Leber als auch in der Niere lokalisiert ist, primär in der Leber exprimiert. Man findet ihn jedoch auch in Neuronen, oder einer Vielzahl von Organen wie Milz, Intestinum und Plazenta (Alcorn *et al* 2002; Gorboulev *et al* 1997; Hayer-Zillgen *et al* 2002; Koepsell H. 1998; Lips *et al* 2007; Müller *et al* 2005; Zhang *et al* 1997 / Tabelle 1). Der Transport kationischer Substrate wurde als pH-unabhängig und membranpotentialabhängig beschrieben (Gorboulev *et al* 1997;

Zhang *et al* 1997). Da Arzneistoffe aus den unterschiedlichen Klassen mit hOCT1 interagieren, ist dieser Transporter sehr wahrscheinlich in die hepatische Exkretion von Xenobiotika involviert. Die pharmakologische Relevanz dieses Transportproteins ergibt sich aus der postulierten, zuerst aber nur für Ratten nachgewiesenen Lokalisation in der Sinusoidalmembran von Hepatozyten (Meyer-Wentrup *et al* 1998). Bei homozygoten OCT1-defizienten Mäusen wurde gegenüber dem Wildtyp eine stark reduzierte Aufnahme organischer Kationen in der Leber festgestellt, gezeigt am Beispiel TEA (Jonker *et al* 2001; Wang *et al* 2002). Zusätzlich bewirkte das Fehlen von OCT1 in der Leber eine erhöhte renale Elimination, statt wie erwartet eine verminderte (Jonker *et al* 2001). Verschiedene Autoren berichten über das Vorkommen einer polymorphen genetischen Variabilität bei Mitgliedern der OCT-Familie (Kerb *et al* 2002; Lazar *et al* 2003; Leabman *et al* 2002, 2003; Shu *et al* 2003). Im Gencode des OCT1 konnten zahlreiche Polymorphismen einzelner Nukleotide (single-nucleotide-polymorphisms, SNPs) nachgewiesen werden, die zum Teil in der Substitution von Aminosäuren resultierten (Hoda *et al* 2004; Leabman *et al* 2000). Traten die Mutationen in der großen extrazellulären Schleife zwischen TMD 1 und 2 oder der intrazellulären Schleife zwischen TMD 6 und 7 bzw. in der kleineren intrazellulären Schleife zwischen TMD 10 und 11 und TMD 7 und 8 oder in der vierten TMD auf, zeigte sich eine erhebliche Reduktion der Transportaktivität und es ist wahrscheinlich, dass die betroffenen Individuen auch eine veränderte Arzneimittelkinetik aufweisen (Kerb *et al* 2002; Koepsell H. 2004). Diese veränderte Kinetik könnte zu erhöhten Medikamentenspiegeln im Serum und damit zu stärkeren Nebenwirkungen führen. Bekannte Beispiele für Nebenwirkungen sind die geistige Verwirrung durch den H<sub>2</sub>-Blocker Cimetidin oder die Laktatazidose durch das Antidiabetikum Metformin (Koepsell *et al* 2003). Ähnliche SNPs im genetischen Code bei hOCT1 und hOCT2, die beide beim Menschen in unmittelbarer Nähe zum hOCT3 auf Chromosom 6q26 lokalisiert sind (Koehler *et al* 1997; Gründemann *et al* 1998; Gründemann und Schömig 2000), wurden gefunden, beim hOCT3 wurden noch weitere SNPs festgestellt (Aoyama *et al* 2006; Lazar *et al* 2003; Leabman *et al* 2002). Basierend auf solchen genetischen Abweichungen, die die Pharmakokinetik von Medikamenten beeinflussen, lassen sich möglicherweise die individuell unterschiedlichen Reaktionen auf ein Medikament erklären.

OCT2: Gorboulev und Mitarbeiter (1997) klonierten hOCT2 aus der Niere. hOCT2 transportiert Kationen elektrogen sowie pH- und Na<sup>+</sup>-unabhängig. Die zunächst funktionell, dann immunhistochemisch nachgewiesene Lokalisation von hOCT2 in der basolateralen Membran humaner proximaler Tubuluszellen (Motohashi *et al* 2002; Pietig *et al* 2001) sowie die Interaktion mit verschiedenen pharmakologisch relevanten Substanzen unterstreichen die Bedeutung von hOCT2 bei der renalen Exkretion von Arzneistoffen. Cisplatin beispielsweise wird über den hOCT2 in die Tubuluszellen aufgenommen und induziert eine Nierenschädigung, da es als Zytostatikum wirksam ist (Ciarimboli *et al* 2005; Yonezawa *et al* 2005, 2006). Untersuchungen an diabetischen Ratten ergaben eine Abnahme der OCT2-Expression mit zunehmender Krankheitsdauer (Thomas *et al* 2004) bzw. eine gegenüber gesunden Tieren verminderte TEA-Aufnahme im Nierengewebe (Grover *et al* 2004). Das Fehlen von OCT2 hatte kaum Auswirkungen auf die Kinetik von TEA in Niere, Leber und Dünndarm (Jonker *et al* 2003), jedoch ist der OCT2 im Plexus choroideus an der Beseitigung von Cholin, einem endogenen Stoff, aus der Cerebrospinalflüssigkeit beteiligt. Ebenso ist die Cholinaufnahme durch OCT-Inhibitoren hemmbar (Sweet *et al* 2001). Bei OCT1 und OCT2 doppel-knockout Mäusen konnte keine vollständige Elimination der renalen Sekretion von TEA mit gleichzeitig gesteigener Plasmakonzentration des Moleküls beobachtet werden (Jonker *et al* 2003). Die menschliche Niere exprimiert im Gegensatz zur Nagerniere nur den OCT2 und nicht den OCT1 (Gründemann *et al* 1998), eine Deletion des OCT2 würde daher in der menschlichen Niere wahrscheinlich zu den Auswirkungen der Doppeldeletion OCT1 mit OCT2 der Ratte führen (Jonker *et al* 2004). Obwohl der hOCT2 beim Menschen eine weitaus höhere Gewebespezifität zum proximalen Tubulus der Niere aufweist, findet man ihn auch in der Nebenniere, Thymus, Plazentazellen, den epithelialen Zellen der Atemwege, den Neuronen und dem Plexus choroideus (Busch *et al* 1998; Gorboulev *et al* 1997; Lips *et al* 2005, 2007; Motohashi *et al* 2002; Sweet *et al* 2001;). Nach Urakami *et al* (1999; 2000) und Slitt *et al* (2002) ist die Expression des OCT2 in der Niere geschlechts- und altersabhängig, wodurch geschlechtsbedingte Unterschiede in der renalen Ausscheidung organischer Kationen auftreten (Jonker *et al* 2004). Nieren männlicher Ratten weisen eine signifikant höhere Expression von OCT2 mRNA auf als die Nieren weiblicher Ratten (Asaka *et al* 2006; Urakami *et al* 1999). Zusätzlich wird von einer altersabhängigen Expression des OCT2 in der Rattenniere berichtet (Slitt *et al*

2002): Während bis zum 30. Lebensjahr bei beiden Geschlechtern ähnliche Level an OCT2 mRNA messbar waren, zeigten männliche Ratten ab diesem Zeitpunkt im Vergleich zu den weiblichen einen starken Anstieg von OCT2 mRNA. Auf die Applikation der Sexualhormone Testosteron und Estradiol reagierten die männlichen und weiblichen Tiere mit unterschiedlicher OCT2-Expression (Urakami *et al* 2000), bei Untersuchungen mit kastrierten männlichen Ratten exprimierten die Nieren beider Geschlechter ungefähr gleiche OCT2-Zahlen (Slitt *et al* 2002).

OCT3: Unabhängig voneinander klonierten zwei Forschergruppen 1998 einen OCT3, die eine am Menschen (Gründemann *et al* 1998), die andere an der Ratte (Wu *et al* 1998). Der von Gründemann und Mitarbeitern (1998) klonierte hOCT3 weist eine ubiquitäre Verteilung im menschlichen Organismus auf. Starke Expression dieses Transporters findet man vor allem in der Leber, Skelett- und Herzmuskel und der Plazenta, aber auch in der Niere, Blutgefäßen und Gehirneuronen und andern Organen ist er zu finden (Alcorn *et al* 2002; Gründemann *et al* 1998; Jonker *et al* 2004; Koepsell *et al* 2004; Kummer *et al* 2006; Müller *et al* 2005; Sata *et al* 2005; Wessler *et al* 2001; Wu *et al* 2000 / Tabelle 1). Die physiologische Funktion von hOCT3 im Gehirn besteht aufgrund seiner Substratspezifität vermutlich in der Aufnahme von Neurotransmittern, die nicht durch hochaffine Transporter resorbiert wurden (Übersicht bei Eisenhofer G. 2001; Gründemann *et al* 1998; Koepsell *et al* 2003). Der OCT3 zeigt eine ähnliche Sensitivität gegenüber einigen Inhibitoren wie der früher charakterisierte extraneuronale Monoamintransport, daher wurde er als extraneuronaler Monoamintransporter (EMT) bezeichnet (Koepsell H. 2004). Aufgrund der Tatsache, dass der OCT3 jedoch nicht ausschließlich in extraneuronalen Geweben, sondern auch in Neuronen des Hippocampus und in Purkinjezellen des Kleinhirns nachgewiesen wurde (Wu *et al* 1998) und sowohl OCT1 als auch OCT2 ebenso Monoamine mit ähnlicher Affinität wie OCT3 transportieren, sollte die Bezeichnung EMT für den OCT3 nicht verwendet werden (Dresser H.J. 2001; Koepsell *et al* 2003; Koepsell H. 2004). OCT3-defiziente Mäuse sind gesund und fertil. Bei einer durchgeführten Studie zeigten OCT3 knockout Mäuse nach intravenöser Applikation des prototypischen organischen Kations MPP eine um 72% verminderte Aufnahme desselben im Herzen und signifikant weniger Aufnahme in Embryos als der Wildtyp (Zwart *et al* 2001). Daraufhin wurde auch in anderen Organen gemessen, jedoch ausser bei trächtigen Tieren zeigte das Fehlen



von OCT3 keine Auswirkungen auf andere Organe. Dies ist auf eine organspezifische Kompensation durch OCT1 und OCT2 zurückzuführen. Die Bedeutung des OCT3 für die ZNS-Funktion wurde ebenfalls untersucht: OCT3 wird u. a. in Neuronen der Area postrema exprimiert, welche an der Regulation der Salz- und Wasseraufnahme beteiligt ist (Vialou *et al* 2004); ein Knockout des OCT3 bei Mäusen führt zu einer veränderten Salz- und Wasseraufnahme. Da der OCT3 auch in die Noradrenalinaufnahme involviert ist, ist der OCT3 an der Beendigung sympathischer Vasokonstriktion beteiligt. Nach Blockade des OCT3 durch Kortikosteron steigt die extrazelluläre NoradrenalinKonzentration und infolge dessen entsteht eine Vasokonstriktion durch eine verlängerte Aktivierung von  $\alpha$ 1-Adrenorezeptoren (Horvath *et al* 2003). Der OCT3 im Gehirn und im Körper interagiert also mit freigesetzten Katecholaminen. Diese spielen nicht nur bei der Steuerung zahlreicher Körperfunktionen wie Blutdruck und Herzfrequenz eine wichtige Rolle, sondern werden auch mit psychischen Erkrankungen -beispielsweise Drogenabhängigkeit, Depressionen und aggressiven Verhalten- in Verbindung gebracht (Aoyama *et al* 2006). Neurotransmitter können allerdings auch über den hOCT2 transportiert werden.

**Tab. 1: Expression der humanen organischen Kationentransporter**

Transporter	Gewebe	Referenzen
hOCT1	Leber; Intestinum; Neuronen; Milz; Plazenta; Niere; Atemwege;	Gorboulev <i>et al</i> 1997; Zhang <i>et al</i> 1997,1998; Koepsell 1998; Hayer-Zillgen <i>et al</i> 2002; Lips <i>et al</i> 2005, 2007; Müller <i>et al</i> 2005;
hOCT2	Niere (proximaler Tubulus; basolateral); Hirn; Kapillarendothel; Plexus choroideus; Neuronen; Epithelzellen der Atemwege; Plazenta;	Gorboulev <i>et al</i> 1997; Busch <i>et al</i> 1998; Bleasby <i>et al</i> 2000; Sweet <i>et al</i> 2001; Motohashi <i>et al</i> 2002; Jonker <i>et al</i> 2004; Koepsell H. 2004; Lips <i>et al</i> 2005;
hOCT3	Leber; Niere; Plazenta; Herz; Lunge; Skelettmuskulatur; Hirn; Neuronen;	Gründemann <i>et al</i> 1998; Wu <i>et al</i> 1998, 2000; Wessler <i>et al</i> 2001; Martel <i>et al</i> 2001; Alcorn <i>et al</i>

	Plexus sympathische Gliazellen;	choroideus; Ganglien;	2002; Hayer-Zillgen <i>et al</i> 2002; Jonker <i>et al</i> 2004; Koepsell <i>et al</i> 2004; Müller <i>et al</i> 2005; Sata <i>et al</i> 2005;
--	---------------------------------------	--------------------------	---

#### **1.4. Funktionelle und pharmakologische Eigenschaften**

Organische Kationentransporter sind offensichtlich mitbeteiligt an der mehrere Schritte benötigenden Elimination verschiedenster Moleküle aus dem Organismus heraus, obgleich sie auch bei der Reabsorption einer Vielzahl an Substanzen eine Rolle spielen. Ebenso wie die OCT1-knockout Maus gesund und fertil ist, sind auch keine phänotypischen Erscheinungen am Menschen beschrieben, die durch einen OCT-Gendefekt bedingt sind. Allerdings wurde vor einigen Jahren bekannt, dass Mutationen in einem genetisch sehr nah verwandtem Protein, dem hOCTN2, für das klinische Bild des systemischen Carnitinmangels, einer autosomal rezessiven Erbkrankheit, verantwortlich sind (Burwinkel *et al* 1999; Koizumi *et al* 1999; Nezu *et al* 1999). Das Krankheitsbild, 1975 erstmals beschrieben (Karpati *et al* 1975), manifestiert sich durch Myopathie mit einer langsam progressiven, in der Kindheit ihren Anfang nehmenden Muskelschwäche vor allem der proximalen Extremitäten, des Nackens, des Kopfes und des Rumpfes. Schluck- und Atemmuskulatur sind meist mitbeteiligt. Häufig besteht zudem eine Hepatopathie, die sekundär zu einer Enzephalopathie mit möglichen Epilepsien und Psychosyndromen führen kann. Die Symptome entstehen durch verminderte zelluläre Aufnahme und erhöhte renale Ausscheidung von Carnitin (Scaglia *et al* 1998; Tein *et al* 1990; Treem *et al* 1988). Es wurden zahlreiche Mutationen des OCTN2-Gens beschrieben, die zum Teil selektiv mit einem verminderten Carnitintransport einhergehen. Es existieren beispielsweise Mutationen in der TMD4 und TMD11, die zu einer Inhibition des Carnitin-, nicht aber des TEA-Transports führen (Ohashi *et al* 2002; Seth *et al* 1999). Diese Mutationen liegen in den Regionen, die auch bei den OCTs entscheidend für die Proteinfunktion sind (Gorboulev *et al* 1999; Popp *et al* 2005).

Während für den hOCTN2 Carnitin als wichtigstes Substrat erwiesen scheint, wird immer noch spekuliert und nach Substraten der OCT-Familie gesucht, welche evolutionsbiologisch die Entstehung der Familie erklären könnten. Eine mögliche Erklärung wäre, dass der Mensch mit einem grossem Spektrum zum Teil toxischer

Xenobiotika konfrontiert ist und daher polyspezifische Eliminationsmechanismen sinnvoll sind (Ballestro *et al* 2006).

In diesem Hinblick interessant erscheint die Vielzahl stoffwechselaktiver Substanzen und Neurotransmitter oder biogener Amine, die von den OCT transportiert werden (Breidert *et al* 1998; Busch *et al* 1996,1998; Gorboulev *et al* 1997; Gründemann *et al* 1998; Harlfinger *et al* 2005; Jonker *et al* 2004; Ogasawara *et al* 2006; Wessler *et al* 2001; Wright *et al* 2004). MPP<sup>+</sup> ist ein sehr gutes Substrat für die OCTs (Russ *et al* 1992, 1993; Shang *et al* 2003), als Neurotoxin kommt es allerdings physiologischerweise nicht im Organismus vor. Trotz sich breit überschneidender Substratspezifitäten der organischen Kationentransporter zeigen sich sowohl zwischen den drei Subtypen als auch zwischen den Spezies untereinander Unterschiede in Affinität und Transportrate. So weisen zum Beispiel hOCT1 und hOCT2 im Gegensatz zum hOCT3 eine höhere Affinität für das organische Modellkation Tetraethylammonium (TEA) auf (Koepsell H. 2004). Für die halbmaximale Inhibition mit dem Inhibitor Kortikosteron sind beim Menschen Konzentrationen von ca. 10µM für OCT1, ca. 30µM für OCT2 und ca. 0,1µM für OCT3 nötig, wohingegen bei der Ratte die halbmaximale Inhibition für OCT3 mit ca. 5µM erreicht wird (Koepsell H. 2004). Ähnliche Affinität zu allen drei OCT-Subtypen besitzen dagegen MPP und die körpereigenen Substanzen Serotonin, Noradrenalin, Histamin.

Da sich unter den Substraten und Hemmstoffen der OCT eine ganze Reihe von Medikamenten finden, welche häufig und auch zur Dauermedikation eingesetzt werden, müssen v. a. bei der Entwicklung neuer kationischer Pharmaka Wechselwirkungen bedacht werden. Wenn ein Patient zwei Medikamente einnehmen muss, die beide mit den OCTs interagieren, kann es zu erhöhten Wirkstoffspiegeln von einem kommen, was wiederum gesundheitliche Schäden für den Patienten nach sich ziehen kann. Beispiele sind das häufig eingesetzte Antidiabetikum Metformin, welches in den letzten Jahren auch häufig zur Therapie des Syndroms polyzystischer Ovarien eingesetzt wird (Velazquez *et al* 1994), der Calciumkanalblocker Verapamil oder das teilweise bereits beschriebene Antidepressivum Imipramin (Koepsell *et al* 2003). Bei Ratten mit induziertem Diabetes mellitus wurde eine Herunter-Regulation von rOCT1 und rOCT2 beschrieben (Grover *et al* 2004). Derartige oder ähnliche

Mechanismen können sicher auch bei Menschen mit Psychosen zu einer veränderten Pharmakokinetik führen.

Neben einer Erhöhung von Wirkspiegeln und damit von Nebenwirkungen ist aber auch der umgekehrte Fall denkbar. Mutationen in den OCT-Genen bzw. Wechselwirkungen mit anderen Medikamenten können auch zu einer verminderten Resorption von Pharmaka und einer reduzierten Aufnahme in ihre Zielorgane führen. Die dadurch ausbleibende Wirkung kann mehr oder weniger schwerwiegende Folgen haben. An der bereits erwähnten knockout Maus konnte beispielsweise gezeigt werden, dass das Biguanid Metformin nur noch stark vermindert in Dünndarmmukosa und Hepatozyten aufgenommen wird (Wang *et al* 2002). Ausserdem wurde beschrieben, dass die Exkretionsrate des Metformin beim Menschen sehr viel höher als die glomeruläre Filtrationsrate ist (Pentikainen *et al* 1979), was für eine OCT-vermittelte Sekretion von Metformin spricht.

### **1.5. Fragestellung der Arbeit**

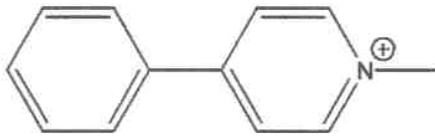
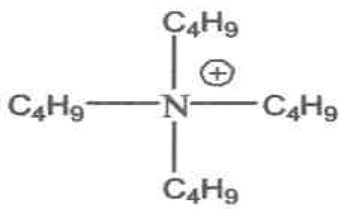
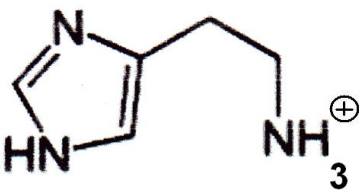
Um festzustellen, welche zentralnervös wirksamen Medikamente von organischen Kationentransportern transportiert werden oder diese hemmen, wurden kationische Pharmaka auf Interaktionen mit den menschlichen OCT-Transportern untersucht. Mit ersten Übersichtsversuchen mit etwa 50 zentralnervös wirkenden Medikamenten wurde getestet, ob sie den durch OCT1, OCT2 und OCT3 vermittelten Transport des OCT-Modellsubstrats MPP hemmen. Für Medikamente, die humane OCT-Transporter hemmen, wurden dann im gleichen Testsystem mit Zellen Hemmkinetiken erstellt. Für die am interessantesten erscheinenden Medikamente wurde dann eine genauere Charakterisierung der Transporteigenschaften durchgeführt. Die Spezifität und Affinität der organischen Kationentransporter gegenüber Psychopharmaka wurde beschrieben, um die physiologische und pharmakologische Relevanz dieser Proteine diskutieren zu können.

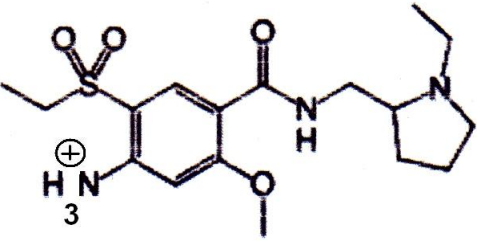
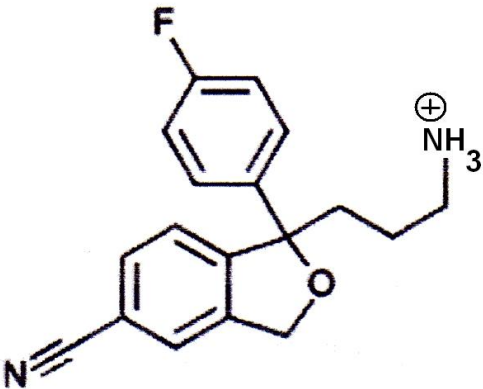
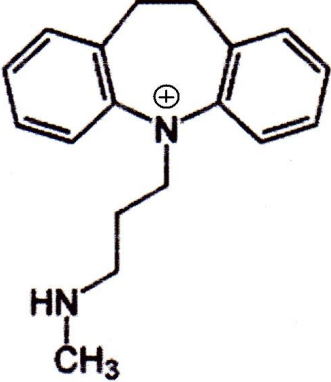
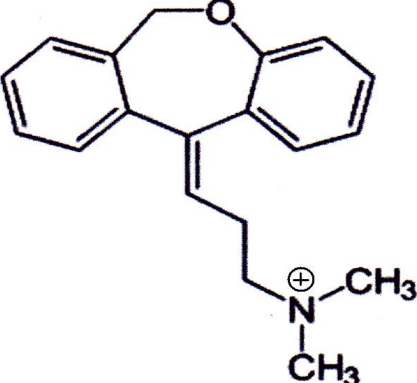
## 1.6. Untersuchte Substrate und Psychopharmaka

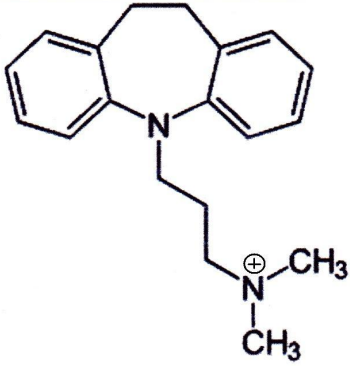
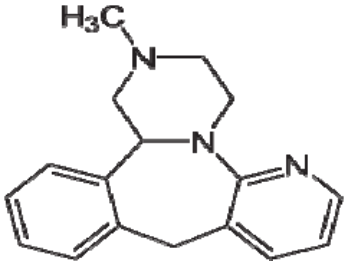
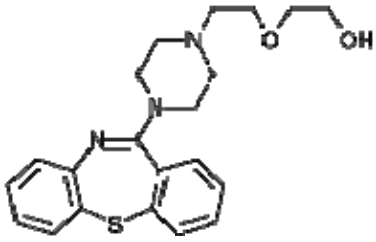
Die für die vorliegende Arbeit genauer untersuchten Arzneistoffe beziehungsweise endogenen organischen Kationen und Modellsubstrate sind in Tabelle 2 nach pharmakologischen Gesichtspunkten gegliedert dargestellt. Als physikochemische Parameter sind die molare Masse und die Säure- bzw. Basenkonstante  $pK_A$  bzw.  $pK_B$  (Hansch C. 1990) aufgeführt. Die molaren Massen liegen alle in dem Bereich bereits beschriebener Substrate oder darunter. Da viele der untersuchten Arzneistoffe Basen mit  $pK_A$ -Werten von 8-10 sind, liegen sie bei physiologischem pH-Wert als Kationen vor und werden daher in der vorliegenden Arbeit als kationische Arzneistoffe bezeichnet.

Das Modellsubstrat zum Studium des organischen Kationentransports, welches hier verwendet wurde ist MPP (1-Methyl-4-Phenylpyridinium).

Tab. 2: Untersuchte OCT-Substrate und Psychopharmaka

physikochemische Parameter	Strukturformel, Ladung bei pH 7	pharmakologische Eigenschaften
<p><i>N-Methyl-4-Phenyl-Pyridinium (MPP<sup>+</sup>)</i></p> <p>M = 170,2 permanent geladen</p>		Modell-hOCT-Substrat
<p><i>Tetrabutylammonium (TBuA)</i></p> <p>M = 252,48 permanent geladen</p>		Modell- hOCT-Inhibitor, teilweise auch Substrat
<p><i>Histamin</i></p> <p>M = 111, 15 <math>pK_{A1}</math> 9,4 <math>A_2</math> 5,8</p>		Gewebehormon/Mediator, Neurotransmitter

<p><i>Amisulprid</i></p> <p>M = 369,49 pK<sub>A</sub> 9,37</p>		<p>Antipsychotikum</p>
<p><i>Citalopram</i></p> <p>M = 324,392 pK<sub>A</sub> 9,6</p>		<p>Selektiver Serotonin- Wiederaufnahme-Hemmer (SSRI)</p>
<p><i>Desipramin</i></p> <p>M = 266,38 pK<sub>A</sub> 9,5</p>		<p>Trizyklisches Antidepressivum (AD)</p>
<p><i>Doxepin</i></p> <p>M = 279,376 pK<sub>A</sub> 9,0</p>		<p>Trizyklisches Antidepressivum (AD)</p>

<p><i>Imipramin</i></p> <p>M = 280,42 pK<sub>A</sub> 9,4 B4,5</p>		<p>Trizyklisches. Antidepressivum (AD)</p>
<p><i>Mirtazapin</i></p> <p>M = 265,35 pK<sub>A</sub> 7,1</p>		<p>Atypisches Antidepressivum (AD)</p>
<p><i>Quetiapin</i></p> <p>M = 383,51 pK<sub>A</sub> 6,83</p>		<p>Antipsychotikum</p>

### 1.7. Bedeutung von Psychopharmaka

Die Depression ist eine häufige, schwerwiegende und oft lebenslange Erkrankung und bis zu 20% der Erwachsenen erleiden sie in ihrem Leben zumindest zeitweise. In dieser Patientengruppe gehen bis zu 15% der Todesfälle auf Suizid zurück, hinzu kommt, dass depressive Erkrankungen ein Hauptrisikofaktor für die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen sind (s.o.). So vermutet die Weltgesundheitsorganisation (WHO), dass sich depressive Erkrankungen zu einer häufigen Ursache für vorzeitige Todesfälle und vorzeitige Arbeitsunfähigkeit entwickeln werden. Im Gegensatz zu anderen neuropsychiatrischen Krankheiten wie Morbus Parkinson oder Alzheimer, denen pathophysiologische Veränderungen in definierten Hirnregionen zugrunde liegen, ist die Depression keiner bestimmten Hirnregion zuzuordnen. Die verbreitetste theoretische Erklärung für Depressionen ist die Monoamin-Mangel-Hypothese: Sie basiert auf der klinischen Beobachtung, dass Substanzen, welche die extrazelluläre Monoamin-Konzentration senken, depressive Verstimmungen auslösen, auch zeigen Untersuchungen, dass zwischen dem

noradrenergen, serotonergen und dopaminergen System Interaktionen bestehen. Auf der anderen Seite haben Substanzen, welche die Konzentration von Monoaminen im synaptischen Spalt chronisch erhöhen einen antidepressiven Effekt.

Die Monoamin-Mangel-Hypothese kann die antidepressive Wirkung all dieser Substanzen jedoch nicht restlos erklären. Widersprüchlich ist insbesondere das Fehlen einer zeitlichen Korrelation zwischen der nach wenigen Minuten eintretenden Wirkung der Antidepressiva auf die Monoaminhomöostase und der erst nach Wochen einsetzenden antidepressiven Wirkung. So wie die Rolle der organischen Kationentransporter bei der Signalübertragung durch Neurotransmitter, so konnte auch ihre Rolle bei der Wirkung von Medikamenten, welche regulierend auf psychische Vorgänge oder auf das Bewusstsein wirken, in ihren Wirkungsmechanismen noch nicht vollständig geklärt werden.

### **1.7.1. Trizyklische Antidepressiva**

Trizyklische Antidepressiva waren die ersten synthetischen Antidepressiva (AD), sind am bekanntesten und werden am häufigsten eingesetzt. Ihr Name leitet sich von ihrer chemischen Struktur ab, in der sich drei konjugierte Ringe und eine Seitenkette finden (trizyklisch (griech.): drei Ringe). Sie wirken auf mehrere Neurotransmittersysteme gleichzeitig, indem sie die Wiederaufnahme von Serotonin, Noradrenalin und Dopamin hemmen. Trizyklische Antidepressiva sind gut wirksam, jedoch treten bei ihrer Anwendung relativ häufig Nebenwirkungen auf, die zumeist aus ihrer anticholinergen Wirkkomponente resultieren.

Folgende Trizyklische Antidepressiva wurden untersucht:

- Desipramin: Wirksames Standard-AD mit teilweiser Noradrenalin-Rückaufnahme-Hemmung, geringere Nebenwirkungen
- Doxepin: Wirksames AD mit ausgeprägten sedierenden und anticholinergen Eigenschaften
- Imipramin: Bewährtes Standard-AD mit deutlichen anticholinergen Eigenschaften



### **1.7.2. Selektive Serotonin-Wiederaufnahme-Hemmer (SSRI) (selective serotonin reuptake inhibitors)**

Diese Medikamente hemmen recht selektiv die Wiederaufnahme von Serotonin aus dem synaptischen Spalt, d. h. sie blockieren nur die Transporter, die für die Wiederaufnahme eines einzigen Botenstoffes, des Serotonins, zuständig sind. Dadurch sind die Nebenwirkungen entsprechend geringer als bei anderen Antidepressiva.

Es wurde Citalopram als wirksames, nicht sedierendes AD untersucht.

Analog zu den SSRI gibt es auch selektive Noradrenalin-Serotonin-Wiederaufnahme-Hemmer (NSRI): Diese hemmen sowohl die Aufnahme von Serotonin als auch Noradrenalin aus dem synaptischen Spalt. Möglicherweise ergibt sich durch die zusätzliche Wirkung auf das Noradrenalin ein schnellerer Wirkungseintritt.

### **1.7.3. Atypische Antidepressiva**

Die relativ neue Klasse der atypischen Antidepressiva unterscheidet sich von o. a. Gruppen durch einen andersartigen Wirkungsmechanismus. Wird Serotonin ausgeschüttet, registrieren die Nervenzellen dies gewöhnlich durch spezielle Rezeptoren an der äußeren Zellwand und stellen anschließend die Ausschüttung ein. Die atypischen AD wirken, indem sie diese Rezeptoren blockieren und so die Zelle zu einer Fortsetzung der Ausschüttung bewegen. So erhöht sich der Serotoninspiegel am synaptischen Spalt, was mit einer stimmungsaufhellenden Wirkung einhergeht.

Mirtazapin, ein AD mit serotonerger und noradrenerger Wirkung, sedierenden Eigenschaften und nahezu keinen anticholinergen Wirkungen wurde untersucht.

### **1.7.4. Antipsychotika/Neuroleptika**

Der Wirkungsmechanismus von Neuroleptika beruht auf einem Eingreifen in die synaptische Erregungsübertragung innerhalb des Gehirns, wobei alle als Dopaminantagonisten wirken. Bei den meisten von ihnen korreliert die antipsychotische Potenz mit ihrer Fähigkeit, die Übertragung an D2-Rezeptoren zu

hemmen. Hieraus erklärt sich auch die Verbindung von extrapyramidalen Nebenwirkungen und Potenz bei den klassischen Antipsychotika. Zusätzlich können Neuroleptika mit Rezeptoren für Serotonin, Acetylcholin, Histamin und Noradrenalin interagieren.

Als „Atypische“ werden Neuroleptika bezeichnet, die im Vergleich zu anderen eine erhöhte antagonistische Wirksamkeit an 5-HT-2-Rezeptoren besitzen. Sie verbinden eine gute antipsychotische Wirkung mit einer geringen Rate an extrapyramidalen Nebenwirkungen.

Aus dieser Arzneimittelgruppe wurden Amisulprid und Quetiapin untersucht.

Wie bei den Antidepressiva wird auch bei den Neuroleptika diskutiert, dass ihr Effekt weniger durch ihre direkte Wirkung auf ein einzelnes Neurotransmittersystem (dopaminerges System), sondern eher auf eine daraus kaskadenartig folgende Wirkung auf das Gleichgewicht des Gesamtsystems zu Stande kommt. Eine wichtige Rolle könnte auch ihre Wirkung auf die Genexpression verschiedener Systeme spielen, zu denen auch die humanen organischen Kationentransporter gehören.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Verwendete Lösungen und Substanzen**

**Chemikalien und Zellen für die Transportmessungen in den Laboratorien des Anatomischen Institutes der Universität Würzburg:**

Amisulprid	Probe von Prof. Koepsell
Amitryptilin	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, D
BSA, Albumin V	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Calciumchlorid CaCl <sub>2</sub>	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Chinin	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, D
CHO-K1 Zelllinie	ATCC, Manassas, USA
Citalopram	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, D
<sup>3</sup> H-Citalopram (77Ci/mmol)	Amersham Biosciences, UK
Clozapin	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, D
Desipramin	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, D

<sup>3</sup> H-Desipramin (80 Ci/mmol)	PerkinElmer Life Sciences, Boston, USA
DMSO	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, D
Dopamin	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, D
<sup>3</sup> H-Dopamin (48 Ci/mmol)	Amersham Life Sciences, UK
Doxepin	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, D
<sup>3</sup> H-Doxepin (80Ci/mmol)	ARC, St. Louis, USA
EDTA	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
F-12 Nutrient Mixture (HAM) + L-Glutamin	Invitrogen, UK
FCS	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, D
Geneticin	PAA Laboratories GmbH, Pasching, A
Gentamycin 590µgBase/mg	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, D
L-Glutamin 200mM	PAA Laboratories GmbH, Pasching, A
GTC	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
HEK-Zelllinie	ATCC, Manassas, USA
HEPES	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Histamin	Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, D
<sup>3</sup> H-Histamin (51 Ci/mmol)	Amersham Biosciences, UK
Hygromycin	Calbiochem EMD Biosciences INc, USA
Imipramin	Sigma-Aldrich, GmbH, Steinheim, D
<sup>3</sup> H-Imipramin (80 Ci/mmol)	ARC, St. Louis, USA
L-Noradrenalin	Fluka Biochemka, Neu-Ulm, D
<sup>3</sup> H-Noradrenalin (10,9 Ci/mmol)	ARC, St.Louis, USA
Mirtazapin	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, D
MPP	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, D
<sup>3</sup> H-MPP (85 Ci/mmol)	ARC Inc, USA
NaHCO <sub>3</sub>	Merck KGaA, Darmstadt, D
Penicillin Streptomycin 100ml-Fertiglsg	PAA Laboratories GmbH, Pasching, A
PBS	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, D
Quetiapin	AstraZeneca UK Limited, Macclesfield, Cheshire, UK
Serotonin	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, D

<sup>3</sup> H-Serotonin (106 Ci/mmol)	Amersham Biosciences, UK
Szintillationsflüssigkeit	Lumac LSC B.V., NL
TBuA	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, D
TEA	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
TPeA	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, D
Tris	Fluka-Biochemka, Buchs, Schweiz

#### Geräte und Arbeitsmaterialien:

Brutschrank (Zellen)	HeraCell240, ThermoElectron Co, Langensfeld, D
Einweg- Plastikgefäße	Eppendorf, Hamburg, Greiner, Frickenhausen, Sarstedt AG & Co, Nürnberg, D
Filter und Filterpapier zum Sterilfiltrieren	Hartenstein, Würzburg, D
Küvetten	Sarstedt AG & Co, Nürnberg, D
Kulturflaschen	Greiner bio-one GmbH, D
Rüttelmaschine	Typ 4020, Köttermann KG, Hänigsen, D
Spektralphotometer	Ultraspec III, Pharmacia LKB Biochrom, Schweden
Szintillationsgefäße	Sarstedt AG & Co, Nürnberg, D
Szintillationszähler	LS6500; Beckmann Coulter Inc, USA
Umkehrmikroskop	Axiovert 25, Zeiss, D
Wasserbad	1038, GFL, Burgwedel, D
Zentrifuge	5415C, Eppendorf GmbH, Engelsdorf, D

#### Software für schriftliche und graphische Auswertung, Bearbeitung sowie Tabellenkalkulation:

GraphPadPrism4	GraphPad Software Inc, USA
Excel	Microsoft Co, USA
Word	Microsoft Co, USA

## **2.2. Zellzucht und Subkultivierung der verwendeten Zellkulturen**

Eine stabile Transfektion, bei der Fremd-DNA ins Genom integriert wird, ermöglicht die dauerhafte Expression der Fremd-DNA. Für die Untersuchungen der Regulation der humanen organischen Kationentransporter wurden diese in chinese hamster ovary (CHO) und humane embryonic kidney Nierenzelllinien (HEK293) exprimiert. Dies sind Zelllinien, die häufig als Expressionssysteme für klonierte Proteine benutzt werden (Breidert *et al* 1998; Burkardt *et al* 2000; Busch *et al* 1996; Gründemann D. 1994).

Chinese hamster ovary (CHO) Zellen der Zelllinie CHO-K1 wurden sowohl mit den humanen organischen Kationentransportern (hOCT) hOCT1, hOCT2, hOCT3, als auch mit dem Leervektor pcDNA5 transfiziert (Lips *et al* 2005). Das Nährmedium für diese Zellen bestand aus HAMs (F-12 Nutrient Mixture + L-Glutamin), dem 10% fetales Kälberserum (FCS) und 50 mg/ml Hygromycin zugesetzt waren.

Zellen der HEK-Zelllinie (human embryonic kidney) wurden zur Untersuchung der endogenen Expression von Transportern verwendet. Die Zelllinie war mit dem Leervektor CMV stabil transfiziert. Das Nährmedium für diese Zellen bestand aus Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM with low glucose), dem 10% fetales hitzedenaturiertes (30 Minuten, 56°C) Kälberserum (FCS), 0,6 mg/ml Geneticin, 1% Penicillin-Streptomycin-Glutamin und 2mM Glutamin zugesetzt waren.

Bei der Untersuchung von Transportvorgängen durch ein bestimmtes Protein ist es ungünstig, wenn die untersuchte Substanz bereits durch einfache Diffusion oder durch andere nicht heterolog exprimierte Transportsysteme in die Zelle gelangt. Die o. a. verwendeten CHO- und HEK293-Zellen weisen eine ausgesprochen geringe endogene Aufnahme für das OCT-Substrat MPP auf. Für die Transportversuche waren die zu untersuchenden Substrate radioaktiv markiert.

Die verwendeten Zelllinien wurden in 75 oder 175 cm<sup>2</sup>-Plastikflaschen in einem Inkubator in wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei 37°C unter 5% CO<sub>2</sub>-Begasung gezüchtet und während der Kultivierung unter aseptischen Bedingungen in einer Reinraumwerkbank versorgt. Bei Wechsel des Nährmediums, der alle ein bis zwei Tage erfolgte, bildeten die Zelllinien einen adhären Zellrasen auf dem Boden der Plastikflasche aus. Die Entwicklung bis zum Monolayer (konfluentes Wachstum) für die Versuche wurde mit Hilfe eines Umkehrmikroskops beobachtet.

### **2.3. Untersuchung der zellulären Aufnahme von Substanzen**

Sobald sich ein Monolayer mit einem gleichmäßig konfluenten Zellrasen ausgebildet hatte, konnte gemessen werden. Dann wurden die Zellen mit Phosphat gepufferter Salzlösung (Phosphate Buffered Saline, PBS) gewaschen und mit einer PBS-Lösung, die 0,02% EDTA (Ethyldiamintetraacetat), 10mM HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazin-Ethansulfonsäure) und 28mM  $\text{NaHCO}_3$  (Natriumhydrogencarbonat) enthielt („Ablöse-PBS“), von dem Boden der Kulturflaschen abgelöst. Die Zellsuspensionen von zwei Flaschen wurden in einem 50ml-Glasröhrchen vereinigt und zentrifugiert. Nach Zentrifugation bei 1000g für 10 Minuten wurde das entstandene Zellen-Pellet in 1ml PBS mit 0,9 % Calciumchlorid ( $\text{CaCl}_2$ ) und 0,5 % Magnesiumchlorid ( $\text{MgCl}_2$ ) („Transport-PBS“) gelöst und portioniert (je 90 $\mu\text{l}$  Zellsuspension pro Versuchsröhrchen) im 37°C temperierten Schüttelwasserbad ca. 10 Minuten vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation der Zellen mit den Kontroll- und Messlösungen.

Um die Passage eines Stoffes von der einen Seite der Zellmembran zur anderen detektieren zu können, werden radioaktiv markierte Substanzen mit hoher spezifischer Aktivität verwendet. Die Hemmversuche wurden mit MPP durchgeführt, da MPP von hOCT1-3 transportiert wird und die CHO-Zellen selbst keine endogene Aufnahme von MPP haben.

Mit 1mg/ml Albumin (BSA, Bovines Serum Albumin) angereichertes PBS bildete dabei die Grundlage für die in den Versuchen verwendeten Lösungen. Um die Transportlösung herzustellen wurden zusätzlich 0,12 $\mu\text{molar}$   $^3\text{H}$ -MPP und 0,88 $\mu\text{molar}$  nicht radioaktiv markiertes MPP zugesetzt. Die Messung mit dieser Lösung bei einer Endkonzentration an MPP von 0,1 $\mu\text{M}$  ergab die Positivkontrolle - also ein Maß für die Aufnahme von  $^3\text{H}$ -MPP über die organischen Kationentransporter in die Zellen (Gorboulev *et al* 1997; Wu *et al* 2000; Zhang *et al* 1998). Die Positivkontrolle wurde sowohl am Anfang als auch am Ende der Versuchsreihe gemessen, um evtl. Veränderungen der Fähigkeit der Zellen zu transportieren, rechnerisch ausgleichen zu können. Die Hemmlösungen mit den Psychopharmaka bestanden aus der Transportlösung und den in (überwiegend) destilliertem Wasser gelösten Medikamenten. Nur gelegentlich waren Ethanol oder DMSO (Dimethylsulfoxid) die

verwendeten Lösungsmittel. Für die  $IC_{50}$ -Bestimmungen wurde bei konstanter Substratkonzentration ( $0,1\mu\text{M}$  MPP) die InhibitorKonzentration verändert. Für die Hemmkinetiken wurde, von einer Stammlösung ausgehend, eine Verdünnungsreihe mit jeweils acht Lösungen mit aufsteigenden Arzneimittelkonzentrationen von  $0,01\mu\text{M}$  bis  $5\text{mM}$  angesetzt. Als Referenz für einen komplett blockierten Transport der hOCTs wurde eine Negativkontrolle verwendet. Diese bestand aus der Transportlösung, der zusätzlich  $2\text{mM}$  bzw.  $5\text{mM}$  MPP zugegeben waren, um durch das damit überproportional höhere Angebot an unmarkiertem MPP die Aufnahme von  $^3\text{H}$ -MPP kompetitiv zu hemmen.

Da man nicht davon ausgehen sollte, dass Hemmstoffe eines Transportproteins auch entsprechend von diesem transportiert werden, wurden die Eigenschaften der Psychopharmaka als Substrate getestet. Für die Transportmessungen mit diesen wurden analoge Transportlösungen mit  $^3\text{H}$ -markierten Substanzen hergestellt, die erzielte Endkonzentration betrug ebenfalls  $0,1\mu\text{M}$ . Diesen wurden als OCT-Inhibitoren die Substanz selbst (Selbsthemmung), MPP und TBuA in jeweils  $5\text{mM}$  Konzentration zugegeben. Zur Bestimmung der Substrataufnahme und damit deren halbmaximale Transportkonzentration ( $K_m$ -Wert) wurden analoge  $0,1\mu\text{M}$  Lösungen hergestellt und diesen das zu untersuchende Substrat in den jeweils angegebenen Verdünnungsreihen zugesetzt. All diesen Transportmessungen mit den Psychopharmaka war die Positivkontrolle mit  $^3\text{H}$ -MPP als Kontrolle vorangestellt, um zu zeigen, dass die OCTs effizient exprimiert waren und die Zelllinien funktionieren.

Für die Versuchsdurchführung wurden zu  $90\mu\text{l}$  Zellsuspension  $10\mu\text{l}$  der zu untersuchenden Lösung gegeben ( $t=0$ ), dann wurden die Zellen eine Sekunde lang mittels Vortexen ( $200\text{ U/min}$ ) mit dem radioaktiven Substrat bei Raumtemperatur vereint (Reaktionszeit,  $1\text{sek}$ ). Für die Bestimmung des  $K_m$ -Wertes wird die Aufnahme bei steigender Substratkonzentration gemessen. Hierbei ist es wichtig, dass echte Anfangsgeschwindigkeiten gemessen werden, da eine Substratanreicherung in der Zelle die Transportgeschwindigkeit vermindern kann. Für MPP konnte verifiziert werden, dass nach einer Sekunde Reaktionszeit das elektrochemische Gleichgewicht noch nicht erreicht ist. Die Aufnahme verläuft in dieser Zeitspanne noch linear. Die Aufnahme des  $^3\text{H}$ -Substrates wurde mit  $1\text{ml}$  eisgekühltem,  $200\mu\text{M}$  Chinin und  $100\mu\text{M}$  TPeA (Tetrapentylammonium) enthaltendem PBS gestoppt („Stopp-Puffer“). Chinin und TPeA sind etablierte Hemmstoffe aller organischen

Kationentransporter (Gorboulev *et al* 1997; Koepsell *et al* 2003; Zhang *et al* 1999). Anschließend wurden die Zellen dreimal im Wechsel mit Zentrifugationsschritten (1min, 8000g) mit 1ml Stopp-Puffer gewaschen, um überschüssige, nichtspezifisch gebundene Radioaktivität zu entfernen. Die fertigen Proben wurden mit 100µl 4M Guanidin-Thiocyanat (GTC) versetzt und eine Stunde bei Raumtemperatur auf einer Rüttelmaschine stehen lassen. Dies diente dazu, die Zellen zu lysieren. Nach dieser Behandlung wurden die lysierten Zellen in Szintillationsgefäße überführt, 1ml Szintillationsflüssigkeit zugegeben und noch einmal kurz auf dem Schüttler homogenisiert. Zur Quantifizierung der Aufnahmezeiten der radioaktiv markierten Substrate wurde die Flüssigszintillationsspektrometrie eingesetzt, hierbei wird der Beta-Zerfall in den Proben detektiert. Notwendig für die Detektion ist die sogenannte Szintillationsflüssigkeit. Sie enthält ein organisches Lösungsmittel und eine leicht zur Fluoreszenz anzuregende Verbindung, den sogenannten Szintillator. Das organische Lösungsmittel wird durch die Energie des radioaktiven Zerfalls angeregt, überschüssige Energie wird von den Lösungsmittelmolekülen auf die Szintillatoren transferiert. Diese werden ebenfalls angeregt und gehen unter Emission von Licht schnell wieder in den Grundzustand über. Die Lichtblitze werden von einem Photomultiplier in ein elektrisches Signal umgewandelt und detektiert. Die Lösungsmittelmoleküle emittieren bei ihrem Übergang in den Grundzustand selbst kein Licht. Von den Zählraten wurde die sogenannte Nullrate abgezogen, d. h. die Messungen in einem nur mit Szintillationslösung gefülltem Röhrchen.

## **2.4. Proteinbestimmung**

Der Proteingehalt der Aufnahmezeiten wurde nach der sogenannten Bradford-Methode bestimmt. Die Methode beruht auf der Tatsache, dass Proteine mit Bradford-Reagenz einen Coomassie Brilliant Blue Farbkomplex bilden (Bradford M. M. 1976). Dieser Farbkomplex existiert in drei Formen: Kationisch ist er rot, neutral grün und anionisch ist er blau (Compton und Jones 1985). Unter sauren Bedingungen liegt der Farbkomplex überwiegend in der protonierten roten kationischen Form vor (messbar im Photometer bei 470nm). Wenn er jedoch an ein Protein bindet, wandelt er sich in die unprotonierte blaue Form um (messbar bei 595nm). Diese Färbung ist stabil und nimmt über einen weiten Bereich proportional mit der Proteinkonzentration zu.



Die Bradford-Methode wurde zur Proteinbestimmung der Zellysate eingesetzt, die durch Lyse der Zellen mit 0,1% (v/v) Triton X-100-Lösung 1:1 erhalten wurde. Mit den Transportmessungen wurden je 10µl Zellsuspension und 10µl Triton vermischt und eingefroren. Für die Eiweißbestimmungen wurde zunächst eine fertige Bio-RAD-Protein-Assay Fertiglösung, welche Phosphorsäure und Methanol enthält, 1:5 verdünnt. Anschließend wurden die Aufnahmeproben aufgetaut und mit 40µl destilliertem Wasser, d. h. 1:6 ebenfalls verdünnt. Von diesen Probenverdünnungen wurden wiederum 10µl in einem Eppendorfgefäß mit 90µl Wasser verdünnt und dieser Mischung 900µl der 1:5 Bio-RAD-Protein-Assay-Lösung zugegeben. Die Hütchen mit den reagierenden Flüssigkeiten wurden geschwenkt und fünf Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen. Anschließend wurde der blaue Farbkomplex bei 595nm im Photometer gemessen. Anhand einer Eichkurve aus Rinder-Serum-Albumin (BSA) konnte die Proteinkonzentration der unbekanntenen Proben bestimmt werden. Es wurde jeweils ein Doppelansatz gemacht.

## **2.5. Statistik und Versuchsauswertungen**

Die bei den Versuchen eingesetzten radioaktiven Substanzen waren meistens mit Tritium, selten mit Kohlenstoff-14 markiert. Der Zerfall dieser  $\beta$ -Strahler wurde als dpm (desintegrations per minute) registriert. Damit später die Hemmung der organischen Kationentransporter durch die Psychopharmaka bzw. deren Substrateigenschaft charakterisiert werden konnte, wurden zunächst Hemmkinetiken und halbmaximale Hemmwerte ( $IC_{50}$ -Werte) anhand dieser im Szintillationszähler registrierten radioaktiven Zerfälle pro Minute (dpm) berechnet. Die dpm-Werte sind direkt proportional zu der Menge des von den Zellen aufgenommenen radioaktiven Substrats.

Aufgrund der von Versuch zu Versuch variierenden Zellkonzentration und der von Substrat zu Substrat unterschiedlichen Radioaktivitätsaufnahme fiel auch die Anzahl der gemessenen Zerfälle unterschiedlich hoch aus. Daher wurden die dpm-Werte für jede Messung in Prozent der Positivkontrolle bzw. bei den Psychopharmaka in Prozent der Transportkontrolle, umgerechnet. In jedem Versuch wurde der Mittelwert der dpm der Positivkontrolle als maximaler Transport (100%) definiert. Die unter Einfluss von unterschiedlichen Arzneistoff- und Hemmstoffkonzentrationen gemessenen Werte konnten dann in Prozent dieses maximal erreichbaren

Transportes ausgedrückt werden. Somit war eine Basis dafür geschaffen, verschiedene Zellkonzentrationen unterschiedlicher Zelllinien miteinander vergleichen zu können.

Für die Erstellung von Kinetiken wurde die Substrataufnahme in die Zellen berechnet; die Hemmkinetiken spiegeln die Substrataufnahme in Abhängigkeit von der Hemmstoffkonzentration wieder. Da der Hemmmechanismus von Liganden der OCTs nicht geklärt ist, haben wir die Hill-Gleichung zur Berechnung der IC<sub>50</sub>-Werte eingesetzt. Unter dem IC<sub>50</sub>-Wert versteht man diejenige Hemmstoffkonzentration, bei der die Substrataufnahme bei einer bestimmten Substratkonzentration auf die Hälfte reduziert wird. Die verwendete Gleichung zur Berechnung des IC<sub>50</sub>-Wertes lautet:

$$V_H = (\text{Bottom} +) V_o - ([S]^n \times V_o) / (IC_{50}^n + [s]^n)$$

Viele Hemmstoffe der OCTs hemmen den Transport nur teilweise (Volk *et al* 2009). Wenn dies der Fall war, wurde ein nicht hemmbarer Anteil („Bottom“) abgezogen.

V<sub>H</sub> bezeichnet die in Gegenwart des Hemmstoffes erhaltene Transportrate, V<sub>o</sub> die maximale Transportrate, [S] die Substratkonzentration und IC<sub>50</sub> die Konzentration bei der der Transport zur Hälfte gehemmt ist. In der Enzymkinetik wird die Potenz n auch als Hill-Koeffizient bezeichnet. Ihr Wert steigt mit dem Ausmaß der Kooperativität eines Enzyms an.

Man wählt bei der Erstellung der Hemmkurve eine Substratkonzentration, die wesentlich kleiner ist als der K<sub>m</sub>-Wert des Substrats, da dann der IC<sub>50</sub> näherungsweise mit dem K<sub>i</sub> identisch ist.

Für den statistische Vergleich von IC<sub>50</sub>-Werten wurden die in den Messungen erhobenen Mittelwerte der Einzelwerte nach dem one-way-ANOVA-Testverfahren und dem Tukey-Test miteinander verglichen. Die Ergebnisse wurden als statistisch oder signifikant unterschiedlich betrachtet, wenn sie sich mindestens auf einem 95%igen Konfidenzintervall (p<0,05) unterschieden.

Es wurden Versuchsreihen von bis zu zehn voneinander unabhängigen Experimenten durchgeführt. Jeder Messpunkt in den Einzelversuchen wurde durch

vier Einzelmessungen bestimmt. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte mit Standardfehlern angegeben.

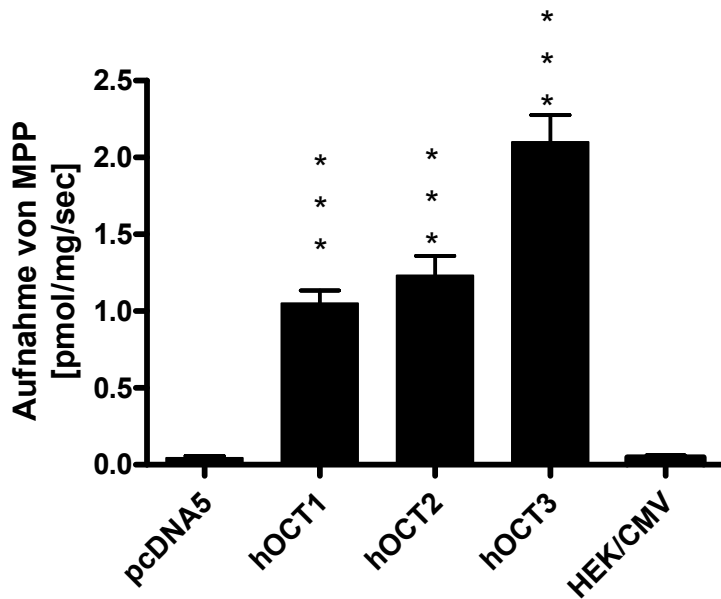
### **3. Ergebnisse**

#### **3.1. Charakterisierung des $^3\text{H}$ -MPP-Transportes an Zellen**

In den meisten Untersuchungen zum organischen Kationentransport wurden radioaktive Substanzen als Substrate verwendet (Boom *et al* 1992). N-Methyl-4-Phenylpyridinium ( $\text{MPP}^+$ ) gilt als prototypisches Substrat für die organischen Kationentransporter, das von allen drei hOCTs mit vergleichbaren Affinitätskonstanten ( $K_t$ ) transportiert wird (Koepsell *et al* 2007). Da der Transport von MPP durch hOCT1, hOCT2 und hOCT3 gut charakterisiert war (Bleasby *et al* 2000; Russ *et al* 1992, 1993; Shang *et al* 2003), wurde  $\text{MPP}^+$  in den Untersuchungen sowohl an den CHO (chinese hamster ovary)-Zellen als auch an den HEK (human embryonic kidney)-Zellen als kationisches Referenzsubstrat gewählt.

Da in vielen Zelllinien neben den exprimierten organischen Kationentransportern auch endogene Transportsysteme vorkommen, war es wichtig, ein Substrat zu finden, für das es in CHO-Zellen und HEK-Zellen keinen endogenen Transporter gibt. Dies trifft für MPP zu (Martell *et al* 2001).

Für die Versuche wurden die Zelllinien CHO- und HEK-Zellen eingesetzt, die mit dem menschlichen organischen Kationentransportern hOCT1, hOCT2 oder hOCT3 stabil transfiziert waren. Als Kontrolle wurden Zellen benutzt, die stabil mit dem bei der Transfektion mit den Transportern verwendeten Vektoren transfiziert waren (CHO-pcDNA5 oder HEK-CMV). Die in den Versuchen gemessenen Gesamtaufnahmen von  $^3\text{H}$ -MPP [ $\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{sec}$ ] in den einzelnen Zelltypen bei ungehemmtem Transport in den CHO-Zelllinien hOCT1, hOCT2, hOCT3 und pcDNA5 und dem Wildtyp HEK/CMV ist in Abb. 2 dargestellt. Die Ergebnisse zeigen, dass in den CHO-Zellen durch hOCT1, hOCT2 und hOCT3 hohe Aktivitäten der MPP-Aufnahme exprimiert waren und dass die endogene Aufnahme von MPP in CHO- und HEK293-Zellen vernachlässigt werden kann.



**Abb. 2.: Gesamtaufnahme von  $^3\text{H}$ -MPP in den einzelnen Zelltypen:**

Vergleich der von den Zellen aufgenommenen Radioaktivitätsmenge von  $0,1\mu\text{M}$   $^3\text{H}$ -MPP bei ungehemmten Transport in den CHO-Zelllinien hOCT1, hOCT2, hOCT3 mit dem Wildtyp pcDNA5 und dem Wildtyp HEK/CMV. \*\*\* =  $p < 0,001$

### **3.2. Interaktion von Psychopharmaka mit hOCTs**

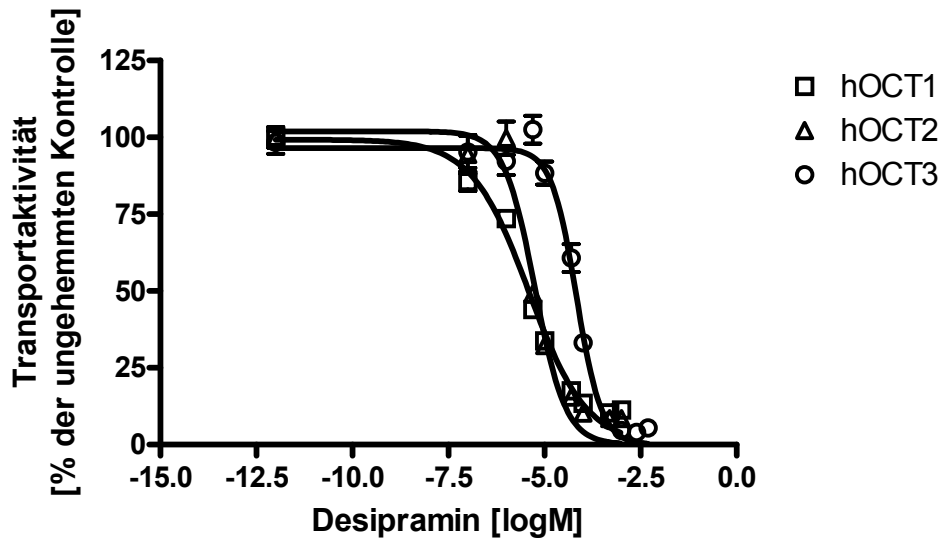
Die Wirkung von Psychopharmaka beruht auf eine Interaktion mit Neurotransmitter-Rezeptoren oder auf einer Hemmung von Transportern, die die zerebrale Konzentration von Neurotransmittern beeinflussen. Gleichzeitig sind schätzungsweise 50% der klinisch bedeutsamen Pharmaka organische Kationen oder bei physiologischem pH protonierte Basen (Dresser *et al* 2000). Da die organischen Kationentransporter in Nervenzellen (OCT2, OCT3) und der Blut-Hirn-Schranke (OCT1, OCT2) exprimiert sind (Lin *et al* 2010), untersuchte ich, ob bekannte Psychopharmaka mit organischen Kationentransportern interagieren und ob sie von diesen transportiert werden. Aufgrund der komplexen Struktur der Substratbindungsstelle der organischen Kationentransporter kann es sein, dass die gemessenen Affinitäten von Hemmstoffen von dem für die Transportmessungen eingesetzten Substrat abhängig sind. Im Falle des humanen Transporters OCT3 wurden deshalb einige Hemmmessungen mit zwei Substraten (MPP und Histamin) durchgeführt. In meiner Arbeit wurden die Psychopharmaka Desipramin, Doxepin,

Imipramin (trizyklische Antidepressiva), Citalopram (selektiver Serotonin-Wiederaufnahme-Hemmer), Mirtazapin (atypisches Antidepressivum) sowie Amisulprid und Quetiapin (Antipsychotika) untersucht.

### **3.2.1. Messung der Hemmung durch Desipramin**

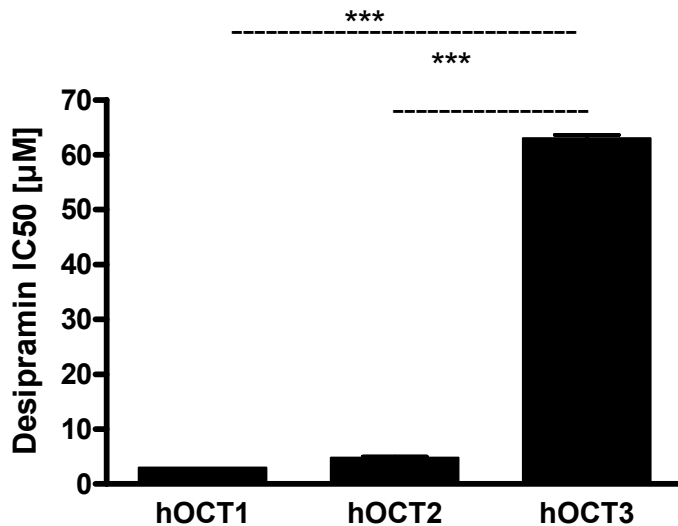
Um die Spezifität und Affinität von hOCT1, hOCT2 und hOCT3 gegenüber Desipramin zu vergleichen, wurden Hemmkinetiken der Hemmung der MPP-Aufnahme durch Desipramin an den drei Transportern erstellt. Dabei wurde eine MPP-Konzentration von  $0,1\mu\text{M}$  eingesetzt und Desipramin wurde in den Konzentrationen von  $0,1\mu\text{M}$  bis  $5\text{mM}$  dazugegeben.

Von dem trizyklische Antidepressivum (Inhibitor des Serotonintransporters) Desipramin wurden bereits zu früheren Zeiten Aufnahmeuntersuchungen für die humanen organischen Kationentransporter gemacht und veröffentlicht (Gorboulev *et al* 1997; Koepsell *et al* 2003; Wu *et al* 2000; Zhang *et al* 1998). In dieser Arbeit wurde für den  $^3\text{H}$ -MPP-Transport an stabil mit hOCT1 transfizierten Zellen unter Desipramin eine halbmaximale Hemmkonzentration von  $3,0 \pm 0,4\mu\text{M}$  ermittelt. Diese bestätigt den bereits in früheren Zeiten bestimmten  $K_i$  von  $5,4\mu\text{M}$  (Gorboulev *et al* 1997; Wu *et al* 2000; Zhang *et al* 1998), die Werte sind näherungsweise gleich. An stabil mit hOCT2 transfizierten Zellen ergab sich ein  $\text{IC}_{50}$  von  $4,8 \pm 0,4\mu\text{M}$ . Das ist zwar etwa nur ein Drittel des früher bestimmten  $K_i$  von  $16\mu\text{M}$  (Gorboulev *et al* 1997; Wu *et al* 2000; Zhang *et al* 1998), jedoch liegen beide Werte im gleichen Größenbereich. An stabil mit hOCT3 transfizierten Zellen ist der hier ermittelte  $\text{IC}_{50}$   $63,1 \pm 6,0\mu\text{M}$ , der  $K_i$  aus Veröffentlichungen  $14\mu\text{M}$  (Wu *et al* 2000; Zhang *et al* 1998), damit ist dieser Wert gut das Vierfache des früher bestimmten Wertes. Abb. 3.1. zeigt die Hemmkinetiken für hOCT1, hOCT2 und hOCT3.



**Abb. 3.1.: Konzentrationsabhängigkeit der Hemmung des durch hOCT1, hOCT2 oder hOCT3 vermittelten Kationentransports durch Desipramin:** Aufnahme von  $0,1\mu\text{M } ^3\text{H-MPP}$  in Abhängigkeit zur Hemmstoffkonzentration von Desipramin für hOCT1/2/3. Dargestellt sind die Mittelwerte der gemessenen Konzentrationen aus den Transportmessungen mit Standardfehler (SEM) bei 3-8 unabhängigen Einzelmessungen.

Die Testung der  $\text{IC}_{50}$ -Werte nach ANOVA (Abb. 3.2.) zeigte, dass sich die Hemmung des hOCT1 und hOCT2 durch Desipramin nicht signifikant unterscheidet. Vergleicht man jedoch sowohl den hOCT1 als auch den hOCT2 mit dem hOCT3 unterscheidet sich die Hemmung auf einem Signifikanzniveau von  $p < 0,001$ . Die höchste Affinität besitzt Desipramin zu hOCT1, die niedrigste zum hOCT3. Bemerkenswert ist, dass die Affinität von Desipramin zu hOCT1 und hOCT2 hoch ist.



**Abb. 3.2.: Vergleich der für die Hemmung des Transports von MPP durch Desipramin errechneten IC<sub>50</sub>-Werte.** Die Balkendiagramme zeigen die Mittelwerte aus 8-12 Einzelmessungen mit ihren Standardfehlern (SEM). \*\*\* = p<0,001

Obwohl die gemessenen IC<sub>50</sub>-Werte von Desipramin niedrig sind, werden sie im Patienten nie erreicht: Die Normwerte von Desipramin im Serum sind 0,1-1,1µM.

### **3.2.2. Messung der Hemmung durch Doxepin**

Die Interaktion des Psychopharmakons Doxepin mit den organischen Kationentransportern wurde bisher noch nicht untersucht. Abb. 4.1. zeigt die Hemmung der durch die Transporter hOCT1, hOCT2 oder hOCT3 vermittelten Aufnahme von 0,1µM MPP durch verschiedene Konzentrationen von Doxepin. Die Transporter wurden stabil in CHO-Zellen exprimiert.

Die Hemmkinetik der hOCT1 exprimierenden Zellen unter Doxepin ergab einen IC<sub>50</sub> von 9,5 +/- 1,3µM. Für die hOCT2 exprimierenden Zellen ergab sich ein IC<sub>50</sub> für Doxepin von 1,3 +/- 0,2µM. An den hOCT3 exprimierenden Zellen ergab sich ein IC<sub>50</sub> für Doxepin von 19,6 +/- 3,4µM.

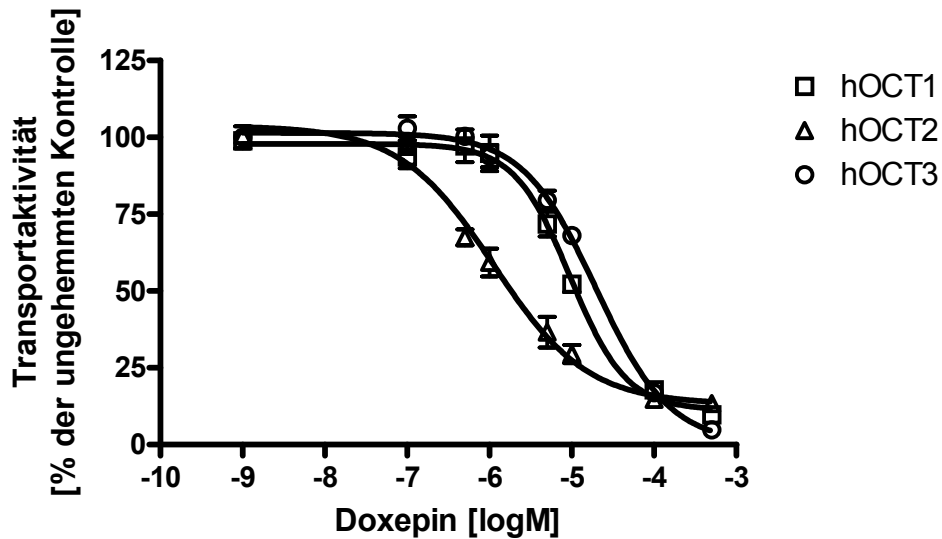


Abb. 4.1.: Konzentrationsabhängigkeit der Hemmung des durch hOCT1, hOCT2 oder hOCT3 vermittelten Kationentransports durch Doxepin: Aufnahme von  $0,1\mu\text{M}$   $^3\text{H-MPP}$  in Abhängigkeit zur Doxepinkonzentration für den hOCT1/2/3. Dargestellt werden die Mittelwerte der gemessenen Konzentrationen aus den Transportmessungen mit Standardfehler (SEM) bei  $n=3-8$ .

Die Testung der  $\text{IC}_{50}$ -Werte auf signifikante Unterschiede (ANOVA mit Tukey-Vergleich) zeigte, dass sich die  $\text{IC}_{50}$ -Werte für die drei Transporter signifikant unterscheiden (Abb. 4.2.). Die höchste Affinität besitzt Doxepin zum hOCT2 ( $K_i$   $1,3\mu\text{M}$ ), die niedrigste zum hOCT3 ( $K_i$   $19,6\mu\text{M}$ ).

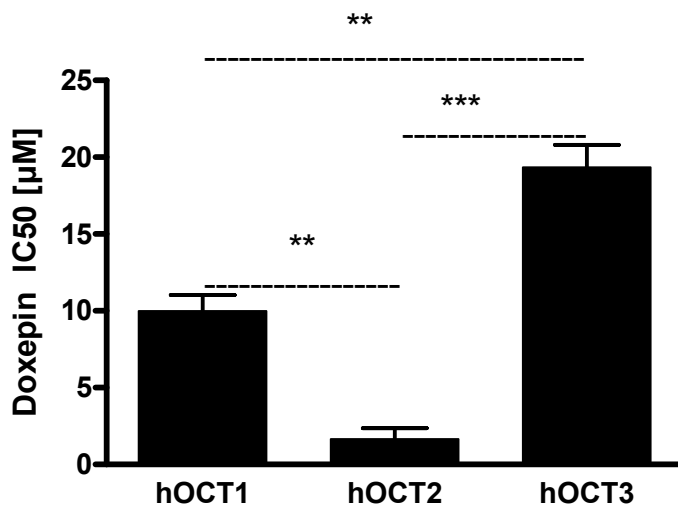


Abb. 4.2.: Vergleich der für die Hemmung des Transportes von MPP durch Doxepin errechneten  $\text{IC}_{50}$ -Werte. Die Balkendiagramme zeigen die Mittelwerte 3-4 Versuchen mit je vier Einzelmessungen mit ihren Standardfehlern (SEM). \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$

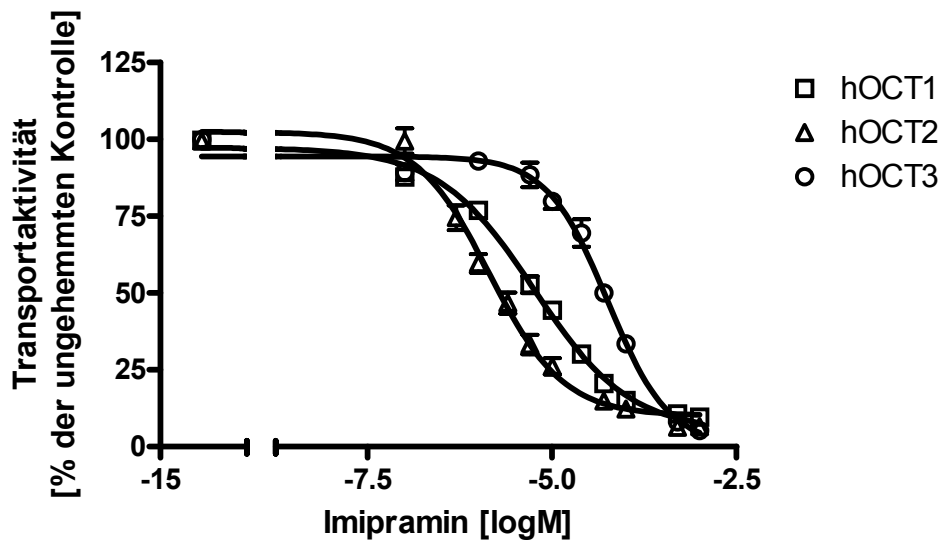


Die Normwerte von Doxepin im Serum des Menschen betragen 0,035-0,717 $\mu$ M. Es könnte bei regelmäßiger Einnahme und/oder Überdosierung dieses Medikamentes also höchstens der hOCT2 blockiert werden, da bei diesem ein  $K_i$  von 1,3 $\mu$ M ermittelt wurde.

### **3.2.3. Messung der Hemmung durch Imipramin**

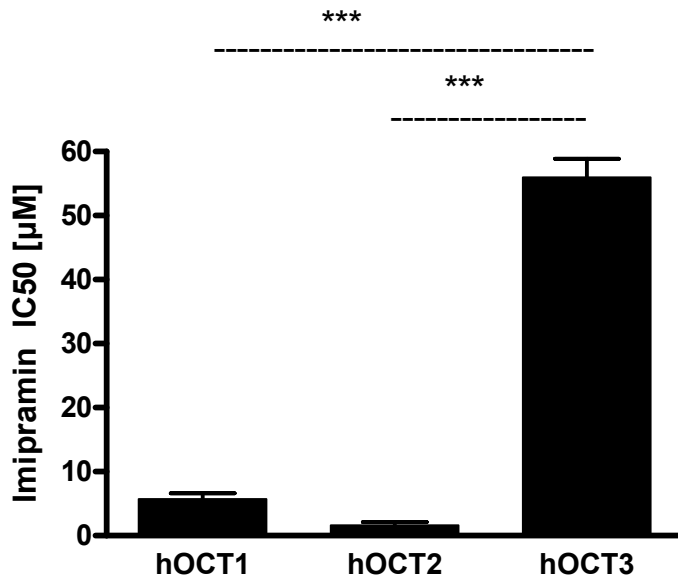
Für die Interaktion von Imipramin, das bei pH 7 positiv geladen ist, mit hOCT3 wurde in früheren Untersuchungen ein  $IC_{50}$  von 42 $\mu$ M bestimmt (Wu *et al* 2000). Um die Interaktion des Imipramin mit organischen Kationentransportern hOCT1, hOCT2 und hOCT3 unter identischen Bedingungen zu vergleichen, wurden für alle drei Transporter Hemmkinetiken erstellt. Wieder wurde die Hemmung des Transports von 0,1 $\mu$ M MPP gemessen (Abb. 5.1.). Die Konzentrationen des Imipramin, die auf den  $^3$ H-MPP Transport einwirkten, reichen von 0,1 $\mu$ M bis 5mM.

Für hOCT1-Zellen wurde ein  $IC_{50}$  von 5,7 +/- 0,7 $\mu$ M ermittelt. Für hOCT2 exprimierende Zellen wurde ein noch niedrigerer  $IC_{50}$ -Wert von 1,4 +/- 0,2 $\mu$ M bestimmt. Die Affinität dieses trizyklischen Antidepressivums zu hOCT2 ist also 4-fach höher als zu hOCT1. Für hOCT3 bestimmten wir einen  $IC_{50}$ -Wert von 56,8 +/- 5,1 $\mu$ M (n=4). Dieser Wert unterscheidet sich nicht signifikant von dem von Wu und Mitarbeitern ermitteltem  $K_i$ -Wert.



**Abb. 5.1.: Konzentrationsabhängigkeit der Hemmung des durch hOCT1, hOCT2 oder hOCT3 vermittelten Kationentransports durch Imipramin:** Aufnahme von  $0,1\mu\text{M}$   $^3\text{H}$ -MPP in Abhängigkeit zur Imipraminkonzentration für hOCT1/2/3. Dargestellt werden die Mittelwerte der bei unterschiedlichen Hemmkonzentrationen gemessenen Transportraten von 12-16 Einzelmessungen aus 3-4 Versuchen.

Die Testung der Unterschiede der  $\text{IC}_{50}$ -Werte der Transporter (ANOVA mit post hoc Tukey-Test) zeigte, dass sich die Hemmung des hOCT1 und hOCT2 durch Imipramin nicht signifikant unterscheidet (Abb. 5.2.). Die Hemmung von hOCT1 und hOCT3 unterscheidet sich auf einem Signifikanzniveau von  $p < 0,001$ , ebenso die Hemmung von hOCT2 und hOCT3.



**Abb. 5.2.: Vergleich der für die Hemmung des Transportes von MPP durch Imipramin errechneten IC<sub>50</sub>-Werte.** Die Balkendiagramme zeigen die Mittelwerte der 12-16 Einzelmessungen mit ihren Standardfehlern (SEM). \*\*\* = p<0,001

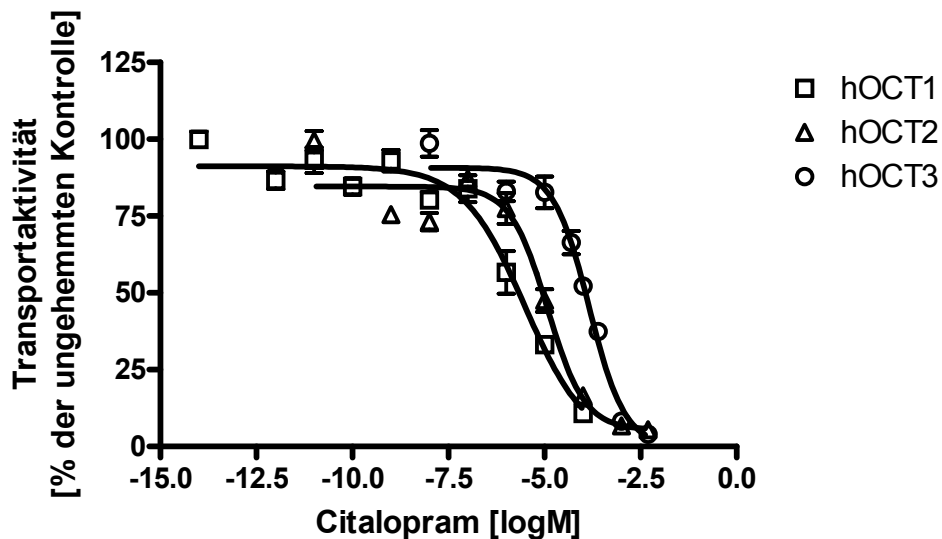
Bei regelmäßiger Einnahme von Imipramin beträgt beim Menschen die Serumkonzentration dessen 0,178-0,536µM. Der niedrigste IC<sub>50</sub> von Imipramin wurde am hOCT2 mit 1,4 +/- 0,2µM ermittelt, eine Blockade des hOCT2 wäre also fast nur bei regelmäßiger Medikamentenüberdosierung möglich.

### **3.2.4. Messung der Hemmung durch Citalopram**

Citalopram gehört zu den „Selektiven Serotonin-Wiederaufnahme-Hemmern, selective serotonin reuptake inhibitors, SSRI“ und ist bei pH 7 positiv geladen. Aus dieser Wirkstoffgruppe wurden bisher noch keine Medikamente bezüglich der Interaktion mit organischen Kationentransportern untersucht. Nach einigen Vorversuchen, die eine Affinität des Citalopram zu den hOCT vermuten liessen, wurden Hemmkinetiken auf die oben beschriebene Weise erstellt. Zur Hemmung der Aufnahme von 0,1µM MPP wurden Citalopramkonzentrationen von 1pM bis 5mM eingesetzt (Abb. 6.1.).

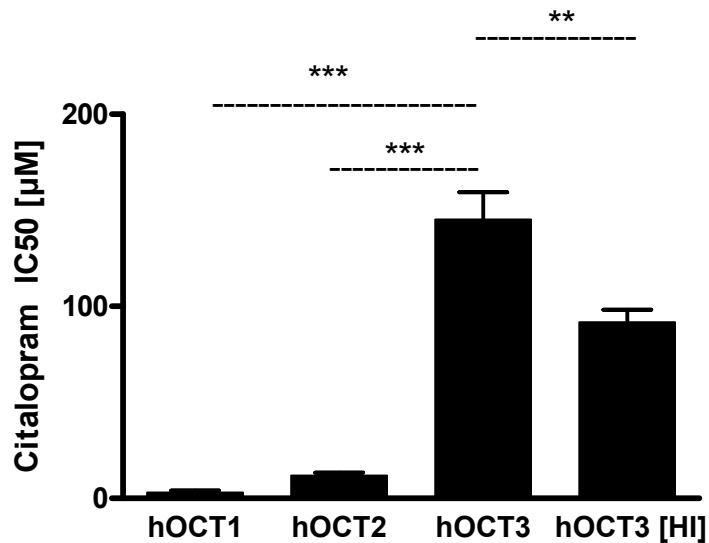
Die Ergebnisse der Experimente mit Citalopram an hOCT1-Zellen ergaben nach der Hillberechnung einen IC<sub>50</sub>-Wert von 3,1 +/- 1,8µM. Im Vergleich hierzu ist die Affinität

des Citaloprams zum hOCT2 um ein etwa vierfaches geringer als zum hOCT1; der hier ermittelte  $IC_{50}$ -Wert beträgt  $11,9 \pm 2,6 \mu\text{M}$ . Die niedrigste Affinität besitzt Citalopram mit einem  $IC_{50}$ -Wert von  $145,2 \pm 24,7 \mu\text{M}$  zu hOCT3.



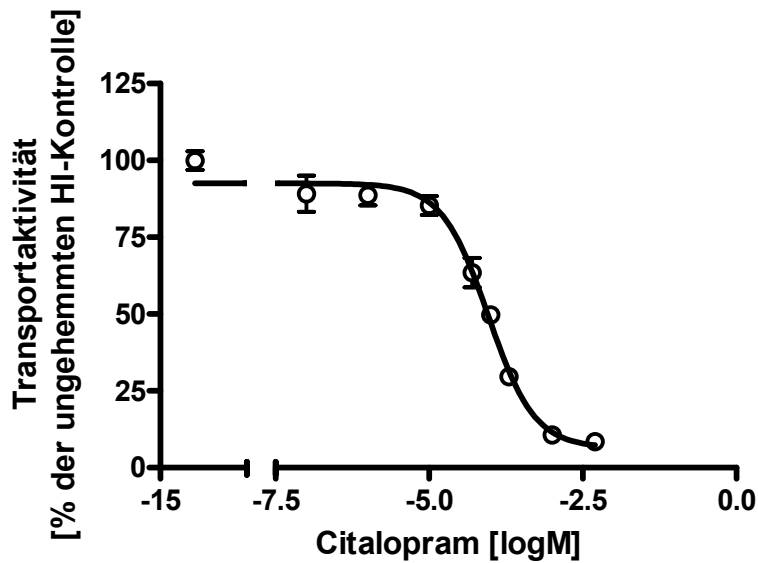
**Abb. 6.1.:** Konzentrationsabhängigkeit der Hemmung des durch hOCT1, hOCT2 oder hOCT3 vermittelten Kationentransportes durch Citalopram: Aufnahme von  $0,1 \mu\text{M}$   $^3\text{H}$ -MPP in Abhängigkeit zur Citalopramkonzentration für hOCT1/2/3. Dargestellt werden die Mittelwerte der gemessenen Konzentrationen aus den Transportmessungen mit Standardfehler (SEM) bei  $n=3-8$ .

Der Vergleich der  $IC_{50}$ -Werte (ANOVA mit post hoc Tukey-Test) zeigte, dass sich die Hemmung des hOCT1 und hOCT2 durch Citalopram nicht signifikant unterscheidet ( $p > 0,05$ ). Vergleicht man jedoch die Affinitäten von hOCT1 oder hOCT2 mit hOCT3, so findet man hochaffine Unterschiede ( $p < 0,001$  / Abb. 6.2.).

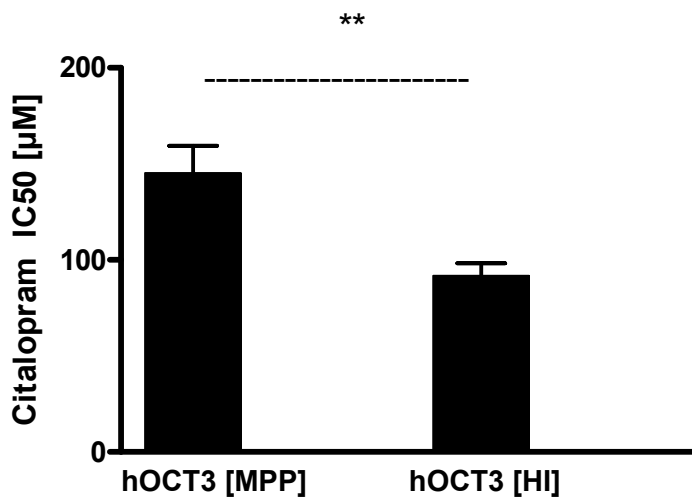


**Abb. 6.2.: Vergleich der für die Hemmung des Transportes von MPP durch Citalopram errechneten IC<sub>50</sub>-Werte.** Die Balkendiagramme zeigen die Mittelwerte der einzelnen Versuche mit ihren Standardfehlern (SEM). \*\*\* = p<0,001

Als nächstes wurde untersucht, ob Citalopram die Aufnahme von Histamin durch hOCT3 mit der gleichen Affinität hemmt wie die Aufnahme von MPP. Dabei wurde für Histamin ähnlich wie für MPP eine Konzentration gewählt, die weit unter dem K<sub>m</sub>-Wert des Substrats liegt und keine messbare kompetitive Interaktion mit dem Hemmstoff erwarten lässt (Koepsell *et al* 2007). Für die Hemmung der hOCT3 vermittelten Aufnahme von 0,1µM Histamin wurde ein IC<sub>50</sub>-Wert von 91,7 +/- 11,4µM erhalten. Dieser Wert unterscheidet sich signifikant (p<0,01) von dem IC<sub>50</sub>-Wert der Citalopramhemmung des durch hOCT3 vermittelten Transportes von 0,1µM MPP (145,2 +/- 24,7µM). Dieses Ergebnis ist ein Beispiel für die Substratabhängigkeit der Affinität von Inhibitoren.



**Abb. 6.3.: Konzentrationsabhängigkeit der Hemmung des durch hOCT3 vermittelten Histamin-Transports durch Citalopram:** Aufnahme von  $0,1\mu\text{M}$   $^3\text{H}$ -Histamin durch hOCT3 exprimierende CHO-Zellen bei verschiedenen Citalopramkonzentrationen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Versuchen mit jeweils vier Parallelmessungen mit Standardfehler (SEM).

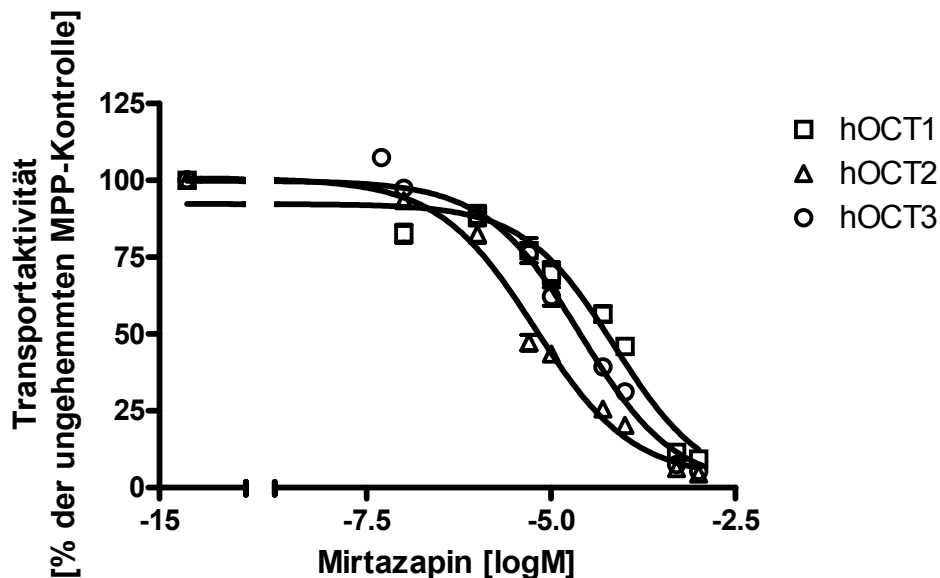


**Abb. 6.4.: Vergleich der für die Hemmung des durch hOCT3 vermittelten Transportes von MPP bzw. Histamin durch Citalopram errechneten IC<sub>50</sub>-Werte.** Die Balkendiagramme zeigen die Mittelwerte der einzelnen Versuche mit ihren Standardfehlern (SEM). \*\* =  $p < 0,01$

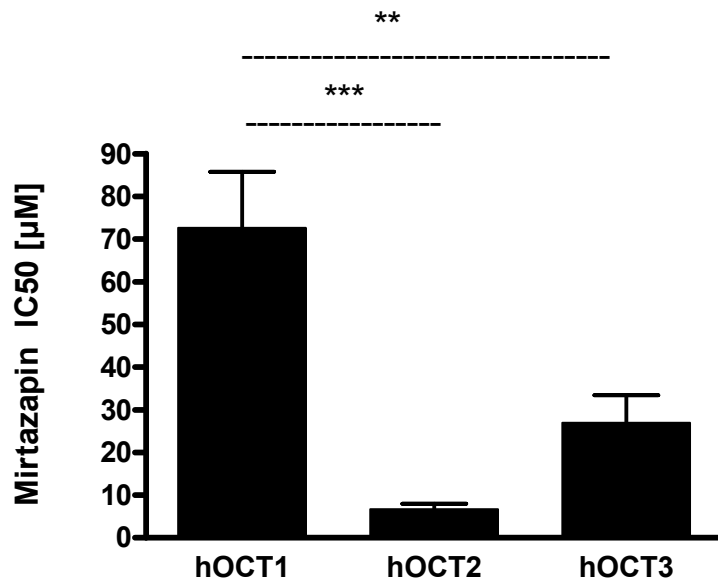
Die Normwerte von Citalopram beim Menschen im Serum liegen bei  $0,093\text{-}0,4\mu\text{M}$ . Die gemessenen IC<sub>50</sub>-Werte liegen in einem Bereich von  $3\text{-}145\mu\text{M}$ , eine Blockade eines organischen Kationentransporters ist also nicht zu erwarten.

### 3.2.5. Messung der Hemmung durch Mirtazapin

Mirtazapin ist ein atypisches Antidepressivum mit einem Molekulargewicht von 265, welches im Plasma zu etwa 50% geladen vorkommt. In Abb. 7.1. wurde die Hemmung der humanen organischen Kationentransporter bei verschiedenen Konzentrationen von Mirtazapin gemessen. Wie in den oben beschriebenen Versuchen wurden stabil mit hOCT1, hOCT2 oder hOCT3 transfizierte Zellen eingesetzt und die Aufnahme von 0,1 $\mu$ M MPP analysiert. Die erhaltenen IC<sub>50</sub>-Werte (Abb. 7.1.) betragen 71,8 +/- 24,1 $\mu$ M (hOCT1), 6,0 +/- 0,8 $\mu$ M (hOCT2) und 24,9 +/- 3,2 $\mu$ M (hOCT3). Die Affinitäten von hOCT2 und hOCT3 sind signifikant unterschiedlich zu der von hOCT1, während sich die Affinitäten von hOCT2 und hOCT3 nicht signifikant unterscheiden (Abb. 7.2.).



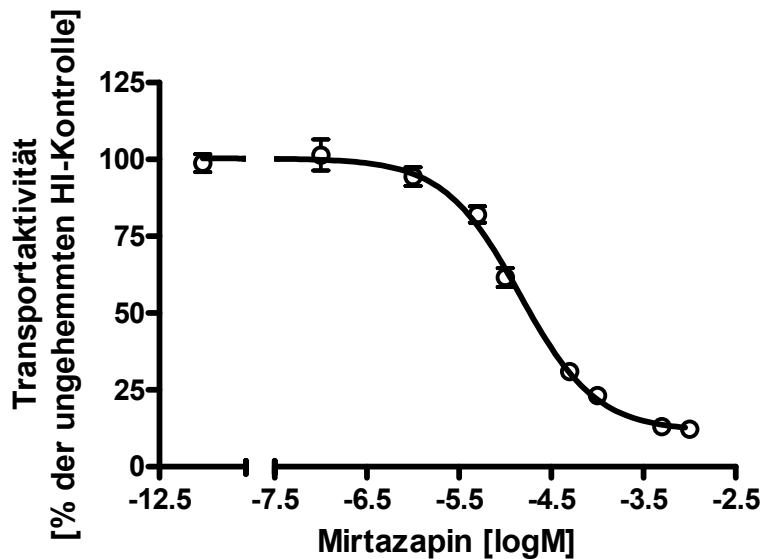
**Abb. 7.1.: Konzentrationsabhängigkeit der Hemmung des durch hOCT1, hOCT2 oder hOCT3 vermittelten Kationentransports durch Mirtazapin:** Aufnahme von 0,1 $\mu$ M <sup>3</sup>H-MPP in Abhängigkeit zur Mirtazapinkonzentration für hOCT1/2/3. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3-8 Versuchen mit vier Parallelmessungen. Der Standardfehler (SEM) ist angegeben.



**Abb. 7.2.: Vergleich der für die Hemmung des Transportes von MPP durch Mirtazapin errechneten IC<sub>50</sub>-Werte.** Die Balkendiagramme zeigen die Mittelwerte der 4-6 Versuche mit je vier Parallelmessungen mit ihren Standardfehlern (SEM). ). \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$

Es wurde zusätzlich untersucht, ob die Hemmung von hOCT3 durch Mirtazapin durch das für die Transportmessung eingesetzte Substrat beeinflusst wird. In Abb. 7.3. wurde die Aufnahme von 0,1µM Histamin in hOCT3 exprimierenden CHO-Zellen in Gegenwart von verschiedenen Mirtazapinkonzentrationen gemessen. Dabei wurde ein IC<sub>50</sub>-Wert von 15,6 +/- 1,3µM bestimmt (n=4). Dieser Wert unterscheidet sich nicht signifikant von dem IC<sub>50</sub>-Wert der Hemmung der Aufnahme von 0,1µM MPP durch Mirtazapin (24,9 +/- 3,2µM,  $p > 0,05$ ).



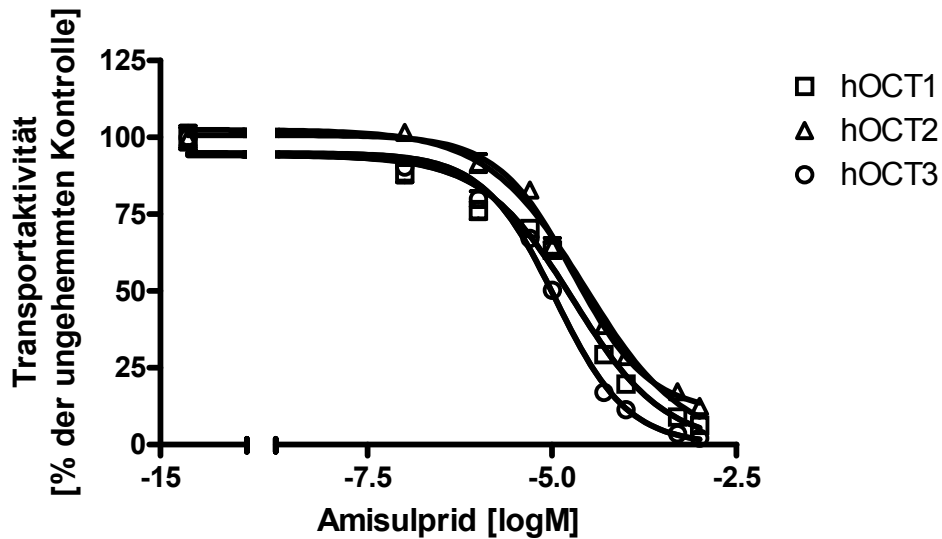


**Abb. 7.3.: Konzentrationsabhängigkeit der Hemmung des durch hOCT3 vermittelten Histamin-Transportes durch Mirtazapin:** Aufnahme von  $0,1\mu\text{M}$   $^3\text{H}$ -Histamin in Abhängigkeit zur Mirtazapinkonzentration für den hOCT3. Dargestellt sind die Mittelwerte der gemessenen Konzentrationen aus den Transportmessungen mit Standardfehler (SEM) bei  $n=3-8$ .

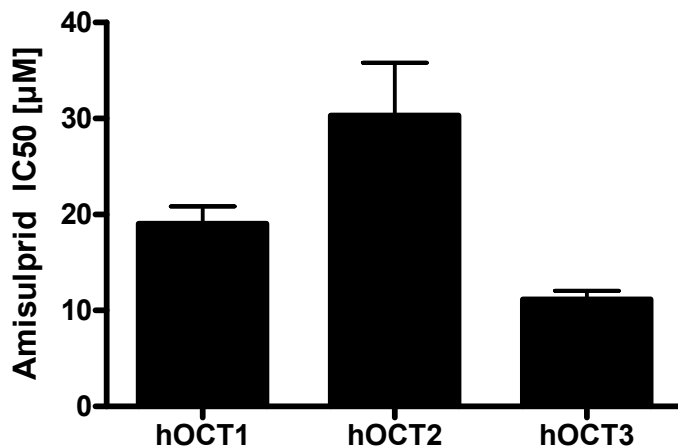
Die Normwerte von Mirtazapin beim Menschen im Serum liegen bei  $0,038-0,38\mu\text{M}$ . Die gemessenen  $\text{IC}_{50}$ -Werte liegen in einem Bereich von  $6-71\mu\text{M}$ , eine Blockade eines organischen Kationentransporters beim Patienten ist hier ebenfalls nicht zu erwarten.

### 3.2.6. Messung der Hemmung durch Amisulprid

Amisulprid und Quetiapin gehören zu den Antipsychotika und Neuroleptika, die in der Regel alle als Dopaminantagonisten wirken. Die relative molare Masse von Amisulprid beträgt 369 und bei pH 7 ist Amisulprid positiv geladen. In Abb. 8.1. sind die durchgeführten Versuche der Aufnahme von  $0,1\mu\text{M}$  MPP in CHO-Zellen, die stabil mit hOCT1, hOCT2 oder hOCT3 transfiziert waren, zusammengefasst. Für die drei Transporter werden ähnliche  $\text{IC}_{50}$ -Werte bestimmt (hOCT1  $19,3 \pm 2,1\mu\text{M}$ , hOCT2  $27,8 \pm 2,4\mu\text{M}$ , hOCT3  $11,1 \pm 0,9\mu\text{M}$ ). In Abb. 8.2. werden die  $\text{IC}_{50}$ -Werte verglichen.



**Abb. 8.1.: Konzentrationsabhängigkeit der Hemmung des durch hOCT1, hOCT2 oder hOCT3 vermittelten Kationentransports durch Amisulprid:** Aufnahme von  $0,1\mu\text{M } ^3\text{H-MPP}$  in Abhängigkeit von der Amisulpridkonzentration. Die Mittelwerte aus 3-8 Versuchen mit Vierfachbestimmungen pro Konzentration sind gezeigt. Die Standardfehler waren kleiner als die Symbole.



**Abb. 8.2.: Vergleich der für die Hemmung des Transports von MPP durch Amisulprid errechneten IC<sub>50</sub>-Werte.** Die Balkendiagramme zeigen die Mittelwerte der jeweils drei Einzelversuche bestehend aus je vier Parallelmessungen mit ihren Standardfehlern (SEM). \*=  $p < 0,05$

Amisulprid als Antipsychotikum hat einen Normwert von  $0,27-1,08\mu\text{M}$  im Patientenserum. Die Konzentrationen der ermittelten IC<sub>50</sub>-Werte liegen alle darüber, eine Blockade eines organischen Kationentransporters ist bei regelmäßiger und regelrechter Einnahme dieses Medikamentes nicht zu erwarten.

### 3.2.7. Messung der Hemmung durch Quetiapin

Als nächstes wurde die Interaktion von Quetiapin mit den organischen Kationentransportern untersucht. Quetiapin besitzt eine relative molekulare Masse von 383 und ist bei pH 7 teilweise positiv geladen. Abb. 9.1. zeigt eine Zusammenfassung der durchgeführten Versuche. Auch hier wurde die Hemmung der Aufnahme von 0,1µM MPP in stabil mit hOCT1, hOCT2 oder hOCT3 transfizierten Zellen gemessen. Die Affinität von Quetiapin mit hOCT2 (41,0 +/- 4,1µM) ist signifikant niedriger als die Affinität von Quetiapin gegenüber hOCT1 (13,5 +/- 1,1µM) und hOCT3 (11,7 +/- 0,7µM / Abb. 9.2.).

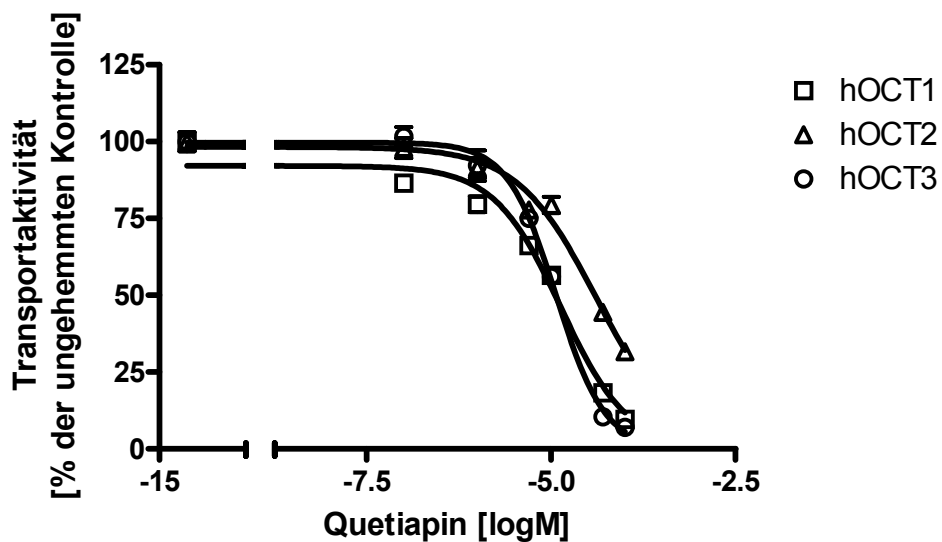


Abb. 9.1.: Konzentrationsabhängigkeit der Hemmung des durch hOCT1, hOCT2 oder hOCT3 vermittelten Kationentransports durch Quetiapin: Aufnahme von 0,1µM <sup>3</sup>H-MPP in Abhängigkeit von der Quetiapinkonzentration für den hOCT1/2/3. Dargestellt sind die Mittelwerte der gemessenen Konzentrationen aus den Transportmessungen mit Standardfehler (SEM) bei n=3-8.

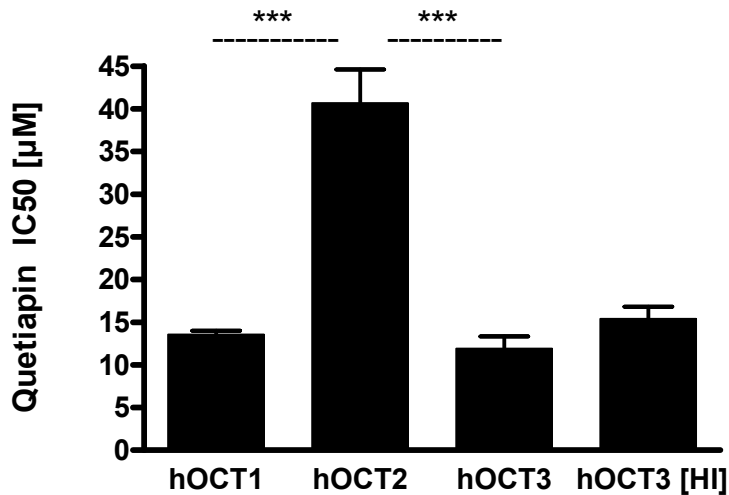


Abb. 9.2.: Vergleich der für die Hemmung des Transportes von MPP durch Quetiapin errechneten IC<sub>50</sub>-Werte. Die Balkendiagramme zeigen die Mittelwerte der 4-5 Versuche aus je vier Einzelmessungen mit ihren Standardfehlern (SEM). \*\*\* = p<0,001

Auch für Quetiapin wurde der IC<sub>50</sub>-Wert der Hemmung der Aufnahme von 0,1µM Histamin an stabil mit hOCT3 transfizierten Zellen gemessen (Abb. 9.3.). Dabei wurde ein Wert erhalten (14,9 +/- 1,7µM), der sich nicht signifikant von dem IC<sub>50</sub>-Wert der Hemmung der MPP-Aufnahme durch Quetiapin unterscheidet (11,7 +/- 0,7µM; p>0,5 / Abb. 9.4).

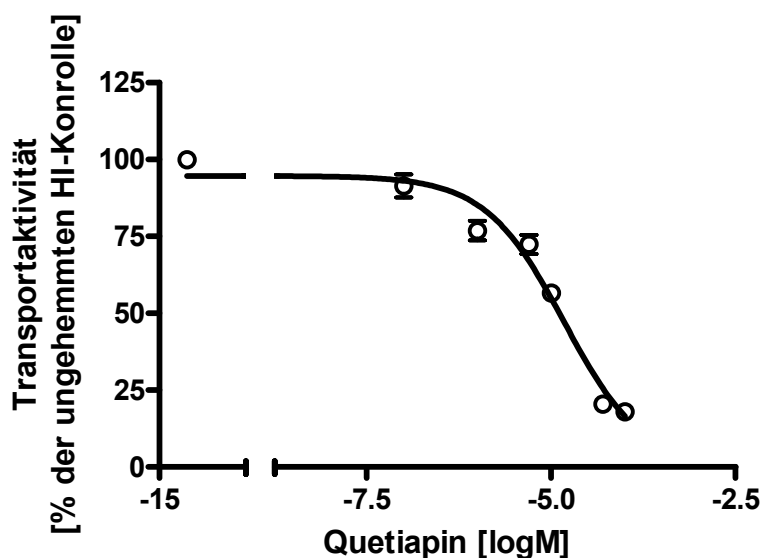
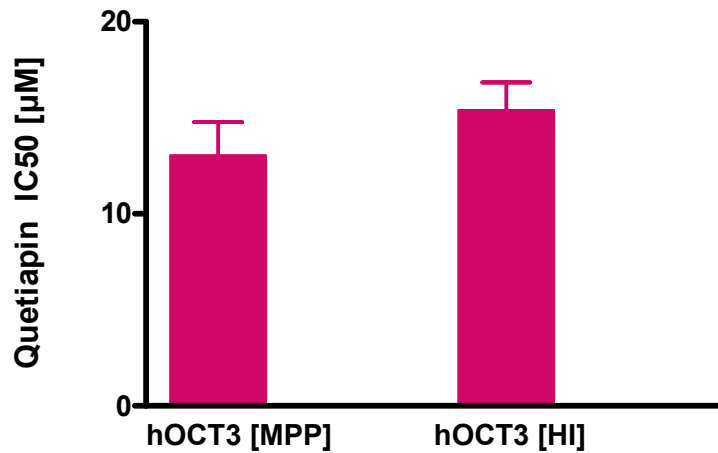


Abb. 9.3.: Konzentrationsabhängigkeit der Quetiapin-Hemmung des durch hOCT3 vermittelten Transportes von Histamin: Aufnahme von 0,1µM <sup>3</sup>H-Histamin in Abhängigkeit zur Quetiapinkonzentration für den hOCT3. Dargestellt sind die Mittelwerte Transportmessungen von drei Versuchen mit jeweils vier Einzelmessungen. Die Standardfehler (SEM) sind angegeben.



**Abb. 9.4.: Vergleich der für die Hemmung des Transportes von MPP und Histamin durch Quetiapin am hOCT3 errechneten IC<sub>50</sub>-Werte.** Die Balkendiagramme zeigen die Mittelwerte der Einzelmessungen mit ihren Standardfehlern (SEM).

Obwohl die gemessenen IC<sub>50</sub>-Werte von Quetiapin niedrig sind, werden sie im Patienten nie erreicht: Die Normwerte von Quetiapin im Serum betragen 0,196-1,3µM.

### 3.2.8. Übersicht über die ermittelten IC<sub>50</sub>-Werte

In nachfolgenden Tabellen 3 und 4 sind die IC<sub>50</sub>-Werte der untersuchten Psychopharmaka im Überblick zusammengefasst.

**Tab. 3: IC<sub>50</sub>-Werte der Hemmung der Aufnahme von 0,1µM MPP durch Psychopharmaka in µM:**

\*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 Signifikanz der Unterschiede zu hOCT1

°p<0,05, °°p<0,01, °°°p<0,001 Signifikanz der Unterschiede zwischen hOCT2 und hOCT3

ANOVA Test mit post hoc Tukey Vergleich.

Psychopharmakon	hOCT1	hOCT2	hOCT3
Desipramin	3,0 +/- 0,4	5,0 +/- 0,4 °°°	64,0 +/- 6,0 ***
Doxepin	9,5 +/- 1,3	1,3 +/- 0,2 ** °°°	19,6 +/- 3,4 **
Imipramin	5,7 +/- 0,7	1,4 +/- 0,2 °°°	56,8 +/- 5,1 ***
Citalopram	3,1 +/- 1,8	11,9 +/- 2,6 °°°	145,2 +/- 24,7 ***
Mirtazapin	71,8 +/- 24,1	6,0 +/- 0,8 ***	24,9 +/- 3,2 **
Amisulprid	19,3 +/- 2,1	27,8 +/- 2,4 °	11,1 +/- 0,9
Quetiapin	13,5 +/- 1,1	41,0 +/- 4,1 *** °°°	11,7 +/- 0,7

**Tab. 4: Vergleich der IC<sub>50</sub>-Werte der Hemmung der Aufnahme von 0,1µM MPP oder 0,1µM Histamin in stabil mit hOCT3 transfizierten CHO-Zellen.** Die IC<sub>50</sub>-Werte sind in µM angegeben.

\*\*p<0,01, Signifikanz der Unterschiede zwischen Histamin- und MPP-Transport; Student t-Test.

Psychopharmakon	MPP	Histamin
Citalopram	145,2 +/- 24,7 **	91,7 +/- 11,4
Mirtazapin	24,9 +/- 3,2	15,6 +/- 1,3
Quetiapin	11,7 +/- 0,7	14,9 +/- 1,7

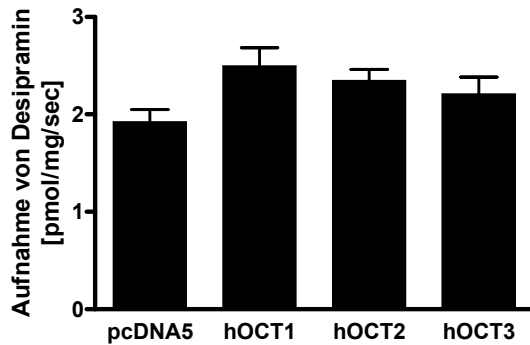
### **3.3. Versuch den Transport von radioaktiv markierten Psychopharmaka nachzuweisen**

Nachdem die Interaktion der oben beschriebenen neuen Psychopharmaka mit den drei Transportern hOCT1, hOCT2 und hOCT3 nachgewiesen war, wurde der Frage nachgegangen, welche dieser Arzneimittel von den organischen Kationentransportern transportiert werden und bei welchen Medikamenten es sich um nicht transportierte Hemmstoffe handelt. Diese Frage kann am besten mit radioaktiv markierten Substanzen beantwortet werden, da nicht radioaktive Nachweismethoden viel unempfindlicher sind und häufig keine Messungen der initialen Transportraten erlauben. Transportmessungen wurden deshalb mit den vier Psychopharmaka, die kommerziell in radioaktiv markierter Form erhältlich waren, gemacht. Dabei handelt es sich um Desipramin, Doxepin, Imipramin und Citalopram. Um die durch einen Transporter vermittelte Aufnahme einer Substanz zu bestimmen, kann man stabil mit dem jeweiligen Transporter transfizierte Zellen mit Kontrollzellen vergleichen, die mit dem zur Transfektion verwendeten Leervektor stabil transfiziert sind. Signifikante Unterschiede zwischen mit den Transportern transfizierten Zellen und den Kontrollzellen deuten auf eine Transporter-vermittelte Aufnahme hin. Da es aber sein kann, dass endogene Transporter in den beiden Zelllinien unterschiedlich stark exprimiert werden, empfiehlt sich eine zweite Kontrolle. Diese Kontrolle kann in dem Nachweis bestehen, dass die in mit den Transportern transfizierten Zellen gemessene Aufnahme durch einen spezifischen Hemmstoff blockierbar ist. Da die organischen Kationentransporter eine komplexe Bindungstasche besitzen und ein bestimmtes transportiertes Substrat nicht durch jedes andere Substrat blockierbar sein muss, müssen mehrere Hemmstoffe eingesetzt werden.

#### **3.3.1. Desipramin**

In Abb. 10.1. wurde die Aufnahme von  $0,1\mu\text{M}$   $^3\text{H}$ -Desipramin in Kontroll-CHO-Zellen, die mit dem Leervektor pcDNA5 stabil transfiziert waren, mit der in den CHO-Zellen verglichen, die stabil mit hOCT1, hOCT2 oder hOCT3 in den pcDNA5-Vektor transfiziert waren. In der Abbildung sind die Mittelwerte der drei unabhängigen Versuche gezeigt. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Zellen nachgewiesen werden. In den mit dem pcDNA5-Vektor

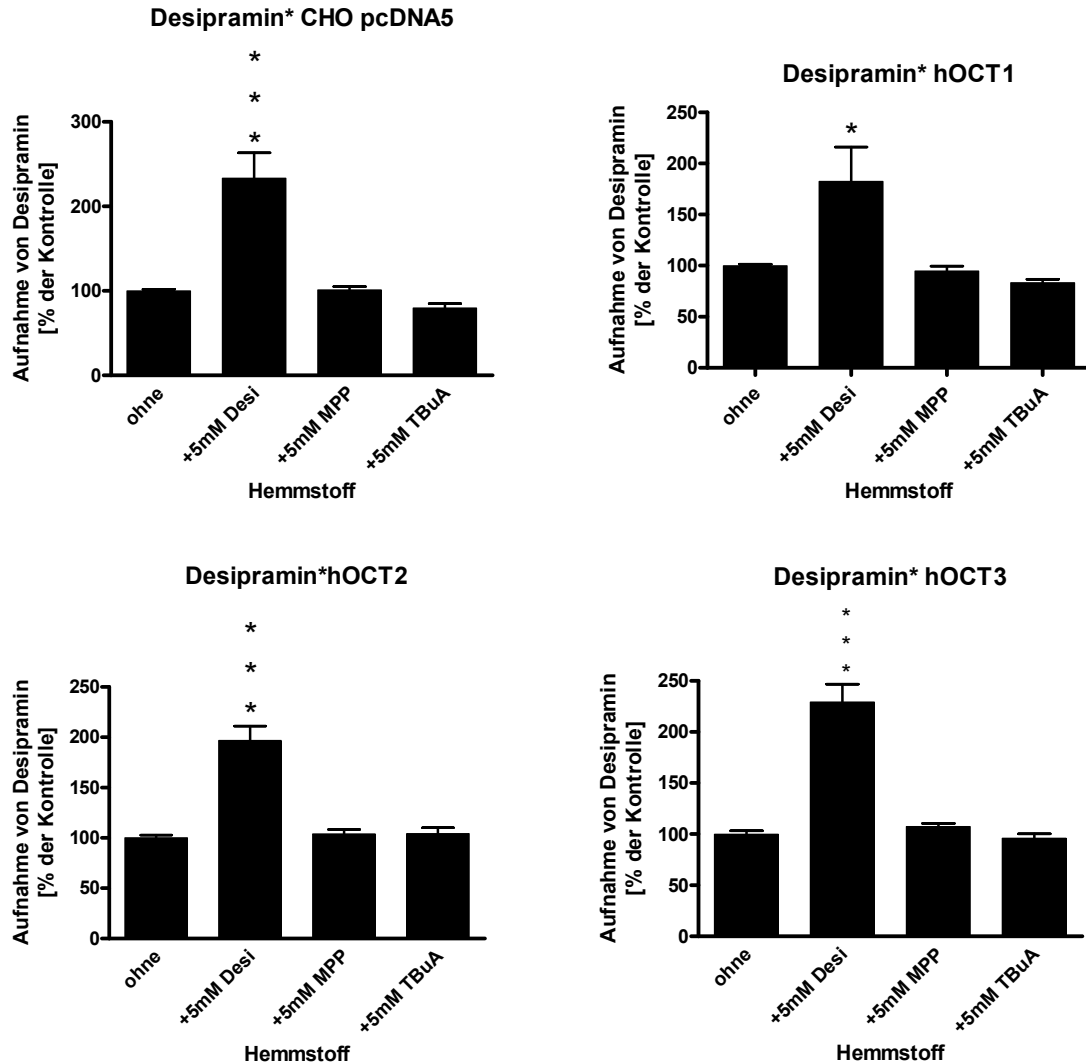
transfizierten CHO-Zellen wurde eine mittlere Aufnahme von 2,3 pmol/mg/sec gemessen. Die Aufnahme von 0,1µM MPP an den mit den organischen Kationentransportern transfizierten Zellen war im Gegensatz zu Desipramin viel höher als in den Kontrollzellen (hOCT1 0,84 pmol/mg/sec, hOCT2 1,25 pmol/mg/sec, hOCT3 1,90 pmol/mg/sec, Kontrollzellen 0,03 pmol/mg/sec).



**Abb. 10.1.: Aufnahme von 0,1µM <sup>3</sup>H-Desipramin in Zellen, die stabil mit dem Vektor pcDNA5, hOCT1, hOCT2 oder hOCT3 transfiziert waren.** Die Mittelwerte und Standardfehler aus drei unabhängigen Versuchen mit jeweils vier Parallelmessungen sind angegeben.

Um festzustellen, ob die in den Kontrollzellen beobachtete Aufnahme von Desipramin durch passive Diffusion entsteht oder über ein sättigbares Transportsystem erfolgt und um herauszufinden, ob mit spezifischen Hemmstoffen ein über die organischen Kationentransporter erfolgter Transport nachzuweisen ist, wurden die in Abb. 10.2. gezeigten Hemmversuche durchgeführt.

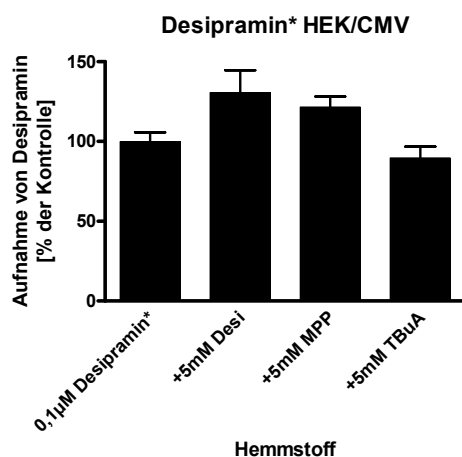




**Abb. 10.2.:** Hemmung der Aufnahme von  $^3\text{H}$ -Desipramin in CHO-Zellen, die stabil mit dem Vektor pcDNA5, hOCT1, hOCT2 oder hOCT3 transfiziert waren, durch Überschuss an Desipramin, MPP oder TBuA. Die Aufnahme von  $0,1\mu\text{M}$   $^3\text{H}$ -Desipramin wurde in Abwesenheit von Hemmstoffen, in Gegenwart von 5mM Desipramin, 5mM MPP oder 5mM TBuA gemessen. Die Mittelwerte und ihre Standardfehler aus drei Versuchen mit vier Parallelmessungen pro Bedingung sind dargestellt.

Die vier untersuchten Zelllinien zeigen das gleiche Verhalten. Während die Aufnahme von  $0,1\mu\text{M}$   $^3\text{H}$ -Desipramin durch 5mM nicht-markiertes Desipramin signifikant stimuliert wurde, wurde sie durch 5mM MPP oder 5mM TBuA nicht verändert. Die Daten bestätigen den in Abb. 10.1. erhobenen Befund, dass Desipramin nicht durch die organischen Kationentransporter transportiert wird. Die beobachtete Stimulation durch 5mM Desipramin deutet darauf hin, dass die endogene Aufnahme von  $^3\text{H}$ -Desipramin in die CHO-Zellen nicht passiver Natur ist, sondern durch ein kooperativ geregeltes Transportsystem vermittelt wird.

Um festzustellen, ob die in den CHO-Zellen beobachtete hohe endogene Aufnahme von Desipramin auch in humanen HEK293-Zellen beobachtet wird, wurde die Aufnahme von  $0,1\mu\text{M}$   $^3\text{H}$ -Desipramin in diesen Zellen gemessen. Diese HEK293-Zellen waren stabil mit dem Vektor CMV transfiziert. Dieser Vektor wurde in anderen Versuchen benutzt, um organische Kationentransporter stabil zu transfizieren. In den HEK293 Kontrollzellen wurde eine ähnlich hohe Aufnahme von  $0,1\mu\text{M}$   $^3\text{H}$ -Desipramin gemessen wie in den CHO-Zellen. Die Desipraminaufnahme war weder durch 5mM MPP noch durch 5mM TBuA hemmbar. Im Gegensatz zu den CHO-Zellen wurde sie nicht durch 5mM Desipramin stimuliert.



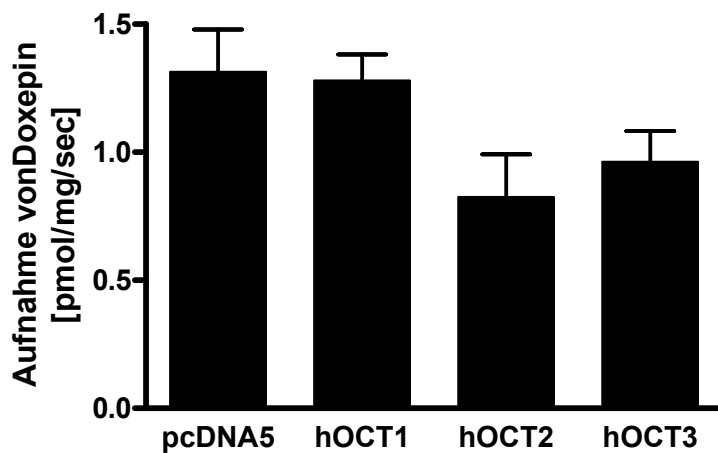
**Abb. 10.3.: Aufnahme von  $^3\text{H}$ -Desipramin in HEK293-Zellen, die stabil mit dem Vektor CMV transfiziert waren.** Die Aufnahme von  $0,1\mu\text{M}$  Desipramin wurde in Abwesenheit von Hemmstoffen oder in Gegenwart von 5mM Desipramin, 5mM MPP oder 5mM TBuA gemessen. Die Mittelwerte mit Standardfehlern aus drei Versuchen mit vier Parallelmessungen sind gezeigt.

Bei hohen endogenen Transportraten in den zur Expression verwandten Zelllinien besteht die Gefahr, dass ein wenig aktiver Transport des exprimierten Systems nicht nachzuweisen ist zumal die endogenen Transportraten je nach Zustand der Zellen schwanken können.

### 3.3.2. Doxepin

Auch für Doxepin wurde der Versuch unternommen, mit Hilfe von stabil transfizierten CHO-Zellen herauszufinden, ob diese Substanz von den organischen Kationentransportern mittransportiert wird. Abb. 11.1. zeigt, dass die Aufnahme von  $0,1\mu\text{M}$  Doxepin in den Vektor pcDNA5 stabil transfizierter CHO-Zellen ähnlich hoch

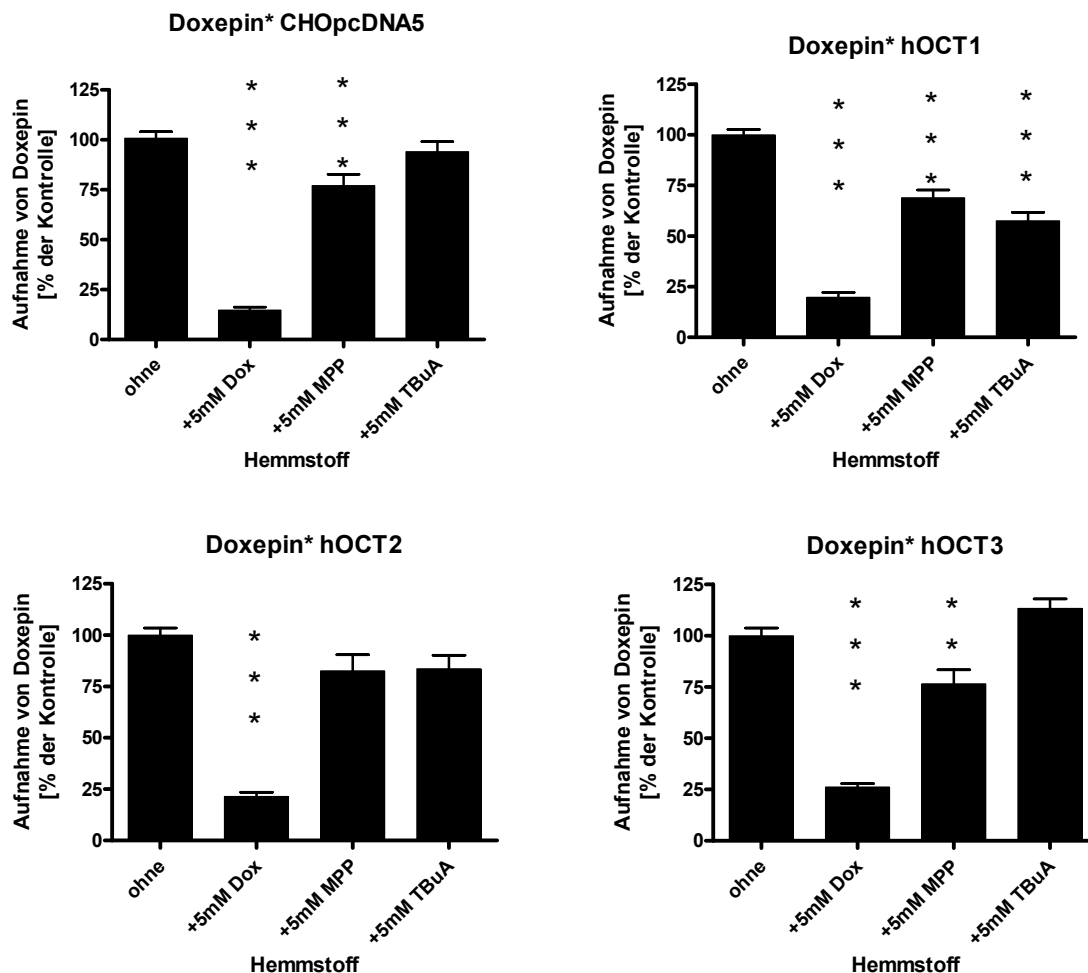
war wie die Doxepinaufnahme in stabil mit hOCT1, hOCT2 oder hOCT3 transfizierten Zellen.



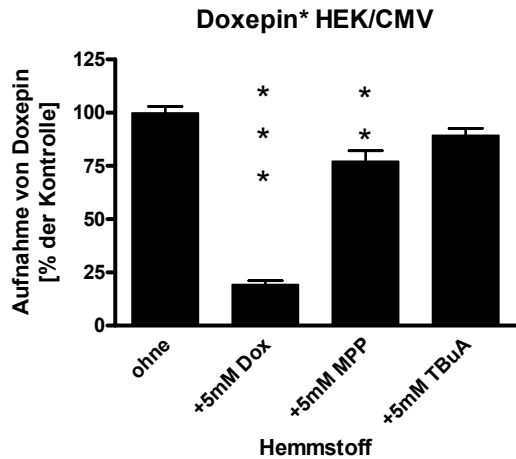
**Abb. 11.1.: Aufnahme von 0,1µM <sup>3</sup>H-Doxepin in stabil transfizierten CHO-Zellen.** Die Doxepinaufnahme wurde in CHO-Zellen gemessen, die mit dem Vektor pcDNA5, mit hOCT1, hOCT2 oder hOCT3 stabil transfiziert waren. Die Mittelwerte und Standardfehler von drei Versuchen mit je vier Parallelmessungen sind gezeigt. Die Aufnahme der mit dem pcDNA5-Vektor transfizierten Zellen von 0,1µM Doxepin betrug 1,32 pmol/mg/sec.

Als nächstes wurde versucht mit Hilfe von bekannten Hemmstoffen organischer Kationentransporter herauszufinden, ob auf dem Hintergrund des hohen endogenen möglicherweise variablen Doxepintransportes doch ein durch spezifische Hemmstoffe differenzierbarer Doxepintransport durch die organischen Kationentransporter nachzuweisen ist. Abb. 11.2. zeigt, dass die endogene Aufnahme von 0,1µM Doxepin in den mit dem mit dem Leervektor transfizierten CHO-Zellen durch 5mM Doxepin zu etwa 90% gehemmt wurde. Sie ist also sättigbar und erfolgt deshalb offensichtlich über ein endogenes Transportsystem. Die Doxepinaufnahme konnte außerdem teilweise durch 5mM MPP gehemmt werden. Mit CHO-Zellen, die stabil mit hOCT1, hOCT2 oder hOCT3 transfiziert waren, wurden ähnliche Ergebnisse erhalten. Die Aufnahme von 0,1µM Doxepin war sättigbar und konnte teilweise durch 5mM MPP gehemmt werden. Bei den mit hOCT1 transfizierten Zellen wurde die Doxepinaufnahme im Gegensatz zu den anderen Zelllinien außerdem durch 5mM TBuA gehemmt. Die Bedeutung dieses Befundes ist unklar. Als nächstes untersuchte ich, ob der an CHO-Zellen sättigbare Doxepintransport auch in der menschlichen Zelllinie HEK293 zu beobachten ist. Abb. 11.3. zeigt die endogene Aufnahme von 0,1µM Doxepin in HEK293-Zellen, die stabil

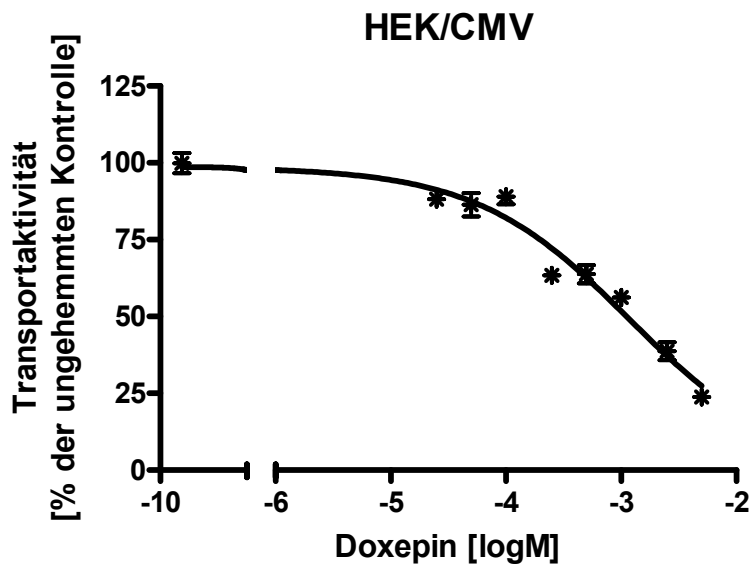
mit dem Vektor CMV transfiziert waren und die wie an den CHO-Zellen durch 5mM Doxepin um mehr als 80% und durch 5mM MPP um mehr als 20% gehemmt wurde. Um die Substratabhängigkeit der in HEK293-Zellen beobachteten endogenen sättigbaren Transportsysteme für Doxepin zu bestimmen, wurde die Aufnahme von 0,1µM <sup>3</sup>H-Doxepin in Gegenwart von unterschiedlichen Konzentrationen an nicht radioaktiv markierten Doxepin gemessen. Die Michaelis Menten Gleichung wurde an die Verdrängungskurve angepasst und eine apparente Michaelis Menten Konstante ( $K_m$ ) von 1,17 +/- 0,7mM berechnet (Abb. 11.4). Der  $K_m$ -Wert für die endogene Doxepinaufnahme ist 70 bis 900 mal höher als die  $IC_{50}$ -Werte für die Hemmung der hOCT1, hOCT2 oder hOCT3 vermittelten MPP-Aufnahme. Dieses Ergebnis zeigt, dass das endogene humane Aufnahmesystem in den HEK-Zellen nicht mit hOCT1, hOCT2 oder hOCT3 identisch ist.



**Abb. 11.2.:** Aufnahme von <sup>3</sup>H-Doxepin durch CHO-Zelllinien, die stabil mit dem Vektor pcDNA5, hOCT1, hOCT2 oder hOCT3 transfiziert worden waren. Die Aufnahme von 0,1µM <sup>3</sup>H-Doxepin wurde ohne Hemmstoff und in Gegenwart von 5mM Doxepin, 5mM MPP oder 5mM TBuA gemessen. Die Mittelwerte und Standardwerte von 4-5 Versuchen mit je vier Parallelmessungen sind angegeben.



**Abb. 11.3.: Aufnahme von  $^3\text{H}$ -Doxepin durch stabil mit dem CMV-Vektor transfizierten HEK-Zellen.** Der Versuch wurde wie in Abb. 11.2. durchgeführt Die Mittelwerte und Standardwerte von einem Versuch mit je vier Parallelmessungen sind angegeben.



**Abb. 11.4.: Substratabhängigkeit des Transportes von Doxepin in HEK293-Zellen:** Die Aufnahme von  $0,1\mu\text{M}$   $^3\text{H}$ -Doxepin in stabil mit dem CMV-Vektor transfizierten HEK293-Zellen wurde in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen von nicht radioaktiv markiertem Doxepin gemessen. Mittelwerte und Standardfehler aus drei Versuchen mit je vier Messungen pro Bedingung sind gezeigt. Eine kompetitive Hemmung entsprechend der Michaelis Menten Gleichung wurde an die Messwerte der Verdrängungskurve angepasst. Die Anpassung ergab einen apparenten  $K_m$ -Wert von  $1,17 \pm 0,7\text{mM}$ .

### 3.3.3. Imipramin

In Abb. 12.1. wurde untersucht, ob die Aufnahme von  $0,1\mu\text{M}$   $^3\text{H}$ -Imipramin in stabil mit humanen organischen Kationentransportern transfizierten CHO-Zellen höher ist als in den Kontrollzellen, die stabil mit dem Expressionsvektor pcDNA5 transfiziert waren. Die endogene Aufnahme in den Kontrollzellen war hoch ( $2,31 \pm 0,6$  pmol/mg/sec) und unterschied sich nicht von den hOCT1, hOCT2 oder hOCT3 exprimierenden CHO-Zellen. In allen vier Zelllinien wurde die Aufnahme von Imipramin durch 5mM Imipramin um mehr als 50% gehemmt, war also partiell sättigbar (Abb. 12.2.). Für die organischen Kationentransporter spezifischen Hemmstoffe zeigte sich kein signifikanter Effekt. Die Daten sprechen für die Existenz eines endogenen Transportsystems für Imipramin und deuten darauf hin, dass Imipramin weder von hOCT1 noch von hOCT2 noch von hOCT3 transportiert wird.

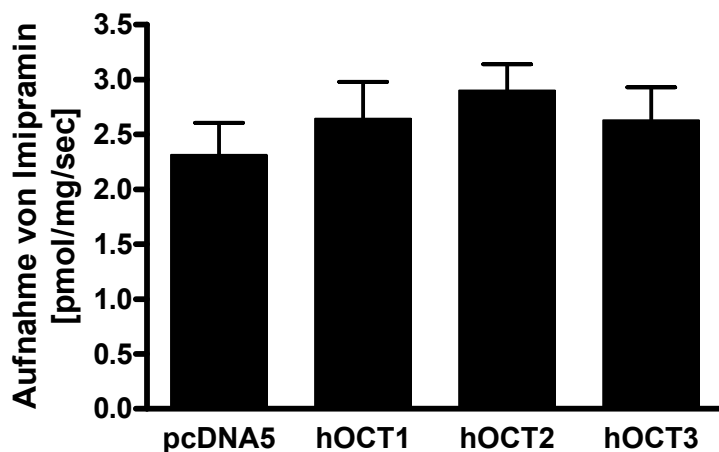
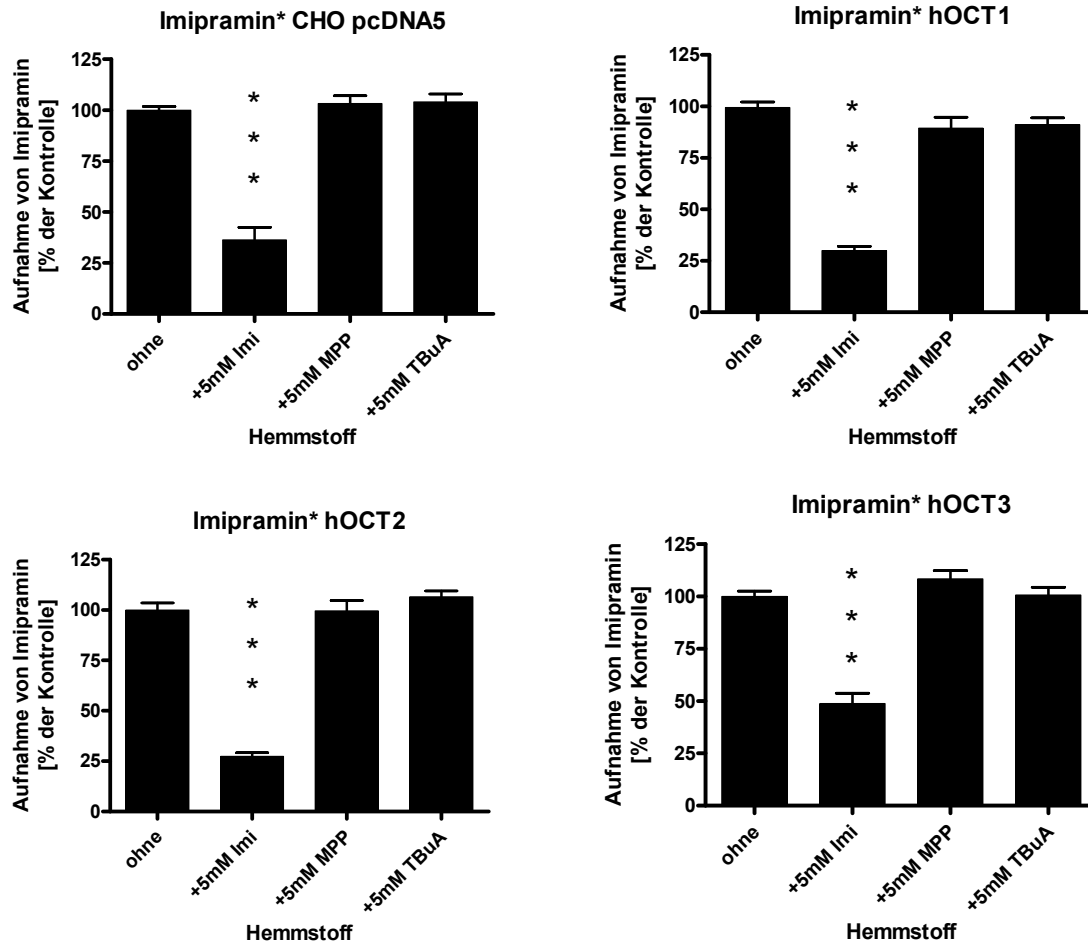
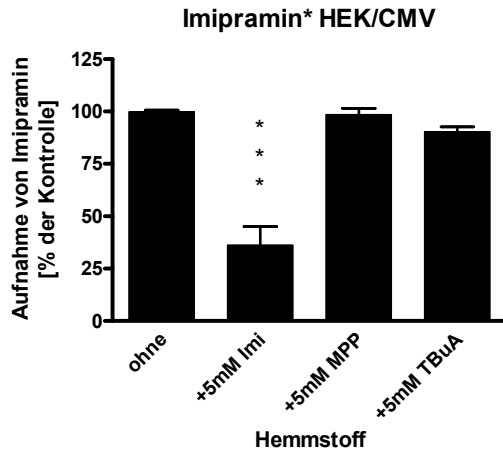


Abb. 12.1.: Aufnahme von  $^3\text{H}$ -Imipramin in CHO-Zelllinien, die stabil mit dem Kontrollvektor pcDNA5, hOCT1, hOCT2 oder hOCT3 transfiziert waren. Die Aufnahme von  $0,1\mu\text{M}$   $^3\text{H}$ -Imipramin wurde gemessen. Die Mittelwerte und Standardfehler von drei Versuchen mit jeweils vier Messungen sind gezeigt.



**Abb. 12.2.:** Aufnahme von  $^3\text{H}$ -Imipramin in Gegenwart eines Überschusses von nicht radioaktivem Substrat, MPP oder TBuA. Die Aufnahme von  $0,1\mu\text{M}$   $^3\text{H}$ -Imipramin wurde ohne Zugabe von Hemmstoffen oder in Gegenwart von 5mM Imipramin, 5mM MPP oder 5mM TBuA gemessen. Die Mittelwerte mit Standardfehlern aus 3-4 Versuchen mit je vier Messungen sind gezeigt. \*\*\* $p < 0,001$

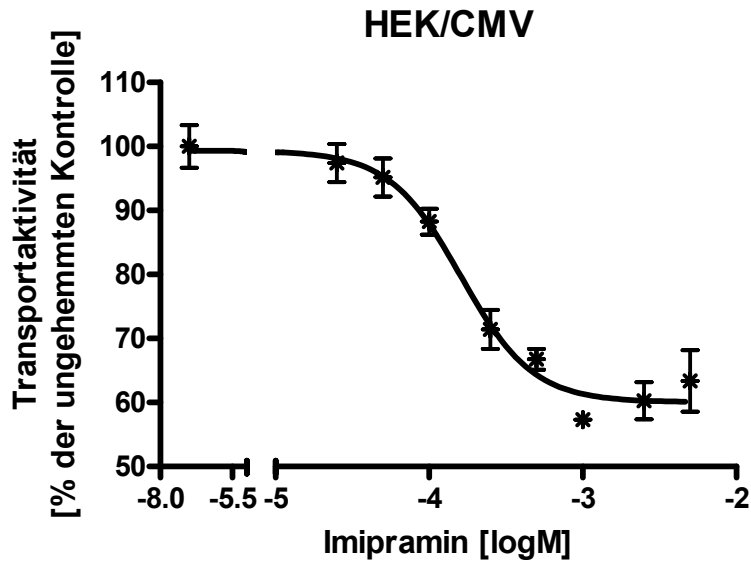
Ich untersuchte ausserdem, ob der bei CHO-Zellen beobachtete sättigbare Imipramintransport auch bei den menschlichen HEK293-Zellen zu beobachten ist. Abb. 12.3. zeigt die endogene Aufnahme von  $0,1\mu\text{M}$  Imipramin in HEK293-Zellen, welche stabil mit dem Vektor CMV transfiziert waren und die wie in den CHO-Zellen mit 5mM deutlich gehemmt wurde.



**Abb. 12.3.: Aufnahme von  $^3\text{H}$ -Imipramin durch stabil mit dem CMV-Vektor transfizierten HEK-Zellen.** Der Versuch wurde wie in Abb. 12.2. durchgeführt Die Mittelwerte und Standardfehler von einem drei Versuchen mit je vier Parallelmessungen sind angegeben. \*\*\* $p < 0,001$

Um die Substratabhängigkeit der in HEK293-Zellen beobachteten endogenen sättigbaren Transportsysteme für Imipramin zu bestimmen, wurde die Aufnahme von  $0,1\mu\text{M}$   $^3\text{H}$ -Imipramin in Gegenwart von unterschiedlichen Konzentrationen von nicht radioaktiv markierten Imipramin gemessen. Die Michaelis Menten Gleichung wurde an die Verdrängungskurve angepasst und eine apparente Michaelis Menten Konstante ( $K_m$ ) von  $161,4 \pm 25,6\mu\text{M}$  berechnet (Abb. 12.4). Der  $K_m$ -Wert für die endogene Imipraminaufnahme ist ca. 10mal höher als die  $\text{IC}_{50}$ -Werte für die Hemmung der hOCT1, hOCT2 oder hOCT3 vermittelten MPP-Aufnahme. Dieses Ergebnis zeigt, dass das endogene humane Aufnahmesystem in den HEK-Zellen wahrscheinlich durch einen endogenen Transporter begründet ist, der nicht mit hOCT1, hOCT2 oder hOCT3 identisch ist.

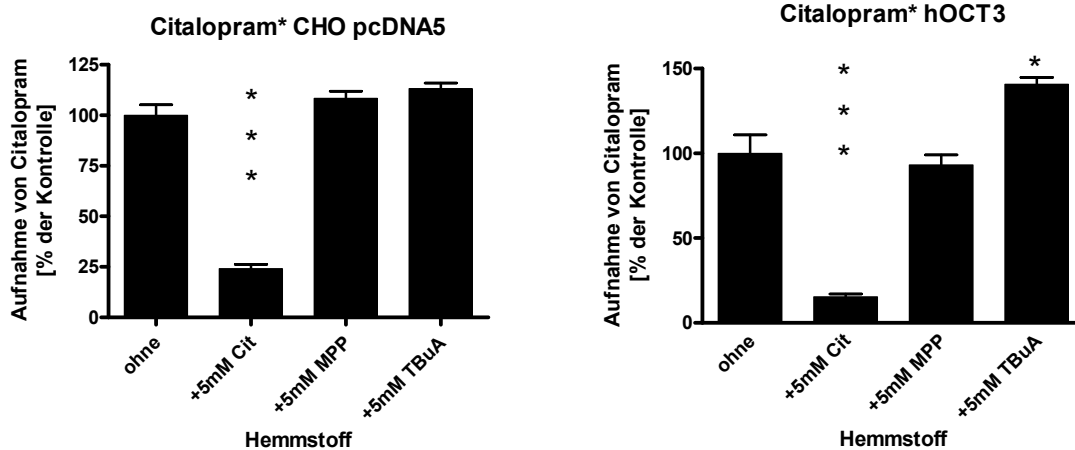




**Abb. 12.4.: Substratabhängigkeit des Transportes von Imipramin in HEK293-Zellen:** Die Aufnahme von  $0,1\mu\text{M}$   $^3\text{H}$ -Imipramin in stabil mit dem CMV-Vektor transfizierten HEK293-Zellen wurde in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen von nicht radioaktiv markiertem Imipramin gemessen. Die Mittelwerte und Standardfehler aus drei Versuchen mit je vier Messungen pro Bedingung sind gezeigt. Die Michaelis Menten Gleichung wurde an die Messwerte angepasst und ergab einen Wert von  $161,4 \pm 25,6\mu\text{M}$ .

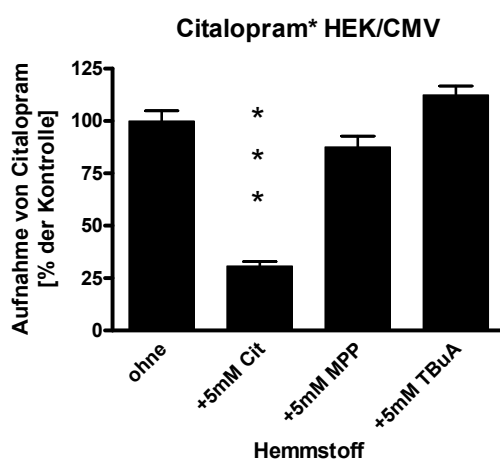
### 3.3.4. Citalopram

Mitarbeiter aus dem Labor hatten gezeigt, dass die Aufnahme von  $0,1\mu\text{M}$   $^3\text{H}$ -Citalopram in mit Leervektoren transfizierten CHO- und HEK293-Zellen sich nicht signifikant von der Aufnahme durch CHO-Zellen unterscheiden, die mit hOCT1, hOCT2 oder hOCT3 transfiziert waren. Ich untersuchte, ob die endogene Citalopram-Aufnahme in mit pcDNA5 transfizierten CHO-Zellen oder in mit hOCT3 transfizierten CHO-Zellen sättigbar ist und durch MPP oder TBuA gehemmt werden kann. Die Aufnahme von  $^3\text{H}$ -Citalopram wurde durch  $5\text{mM}$  nicht radioaktiv markiertes Citalopram gehemmt, durch  $5\text{mM}$  MPP wurde sie nicht gehemmt. In Gegenwart von  $5\text{mM}$  TBuA kam es bei den mit hOCT3-transfizierten Zellen zu einer leichten Stimulation. Die Bedeutung dieser Effekte ist unklar.



**Abb. 13.1.: Hemmung der Aufnahme von <sup>3</sup>H- Citalopram in CHO-Zellen, die stabil mit dem Vektor pcDNA5 oder hOCT3 transfiziert waren, durch Überschuss an Citalopram, MPP oder TBuA.** Die Aufnahme von 0,1µM <sup>3</sup>H-Citalopram wurde in Abwesenheit von Hemmstoffen, in Gegenwart von 5mM Citalopram, 5mM MPP oder 5mM TBuA gemessen. Die Mittelwerte und ihre Standardfehler aus drei Versuchen mit vier Parallelmessungen pro Bedingung sind dargestellt. \*p<0,05; \*\*\*p<0,001

Um herauszufinden, ob die in den CHO-Zellen beobachtete endogene Aufnahme von Citalopram auch in humanen HEK293-Zellen beobachtet wird, wurde die Aufnahme von 0,1µM <sup>3</sup>H-Citalopram in diesen Zellen gemessen (Abb. 13.2.). Diese HEK293-Zellen waren stabil mit dem Vektor CMV transfiziert. Die Citalopramaufnahme war wieder durch 5mM Citalopram deutlich, nicht aber durch 5mM MPP oder 5mM TBuA hemmbar.

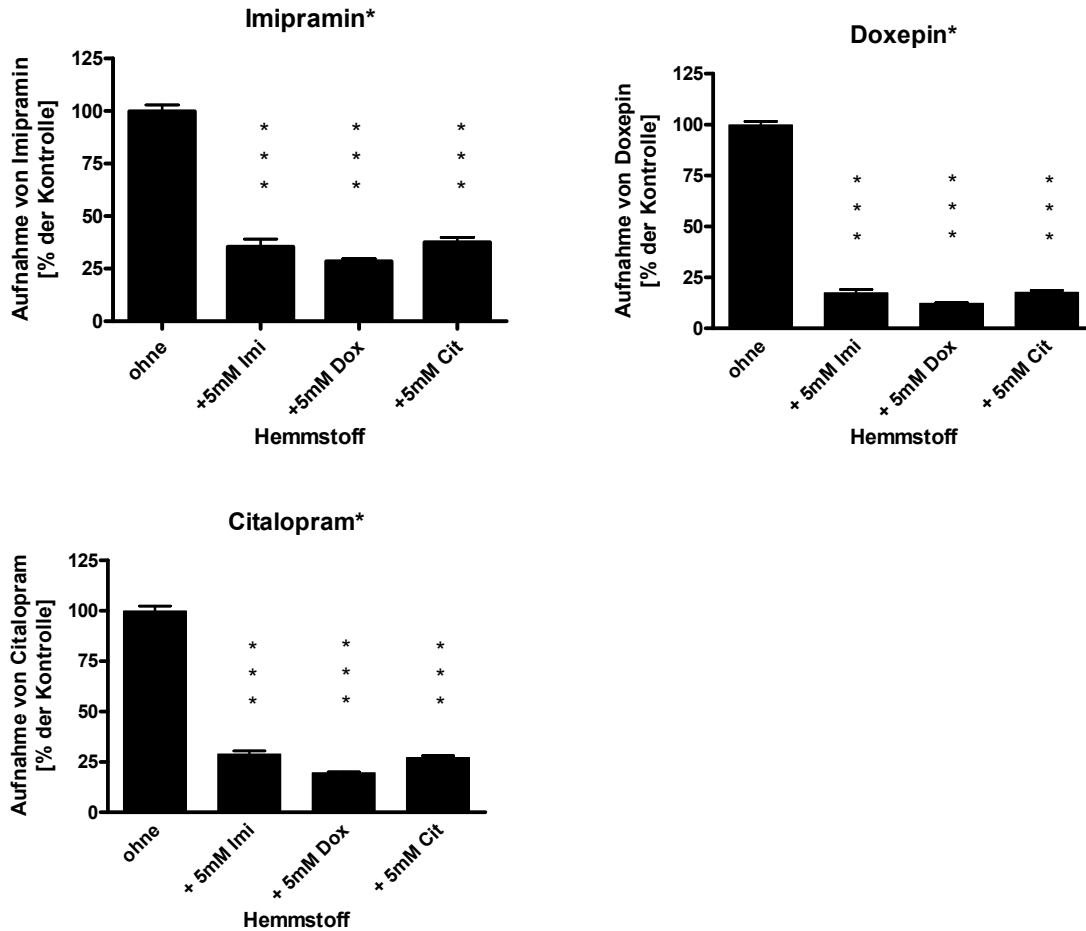


**Abb. 13.2.: Aufnahme von <sup>3</sup>H-Citalopram in HEK293-Zellen, die stabil mit dem Vektor CMV transfiziert waren.** Die Aufnahme von 0,1µM Citalopram wurde in Abwesenheit von Hemmstoffen oder in Gegenwart von 5mM Citalopram, 5mM MPP oder 5mM TBuA gemessen. Die Mittelwerte mit Standardfehlern aus drei Versuchen mit vier Parallelmessungen sind gezeigt. \*\*\*p<0,001

In vorangegangenen Versuchen (siehe oben) konnte der Transport des radioaktiv markierten Citaloprams mit der Konzentration von 0,1µM nur durch sich selbst in 5mM Konzentration gehemmt werden, die klassischen OCT-Hemmstoffe MPP und TBuA in 5mM Konzentration bewirkten keine Veränderung des Citalopramtransports. Diese Ergebnisse lassen Rückschlüsse auf einen endogenen Citalopram-Transport zu, der jedoch nicht OCT-vermittelt ist.

### **3.3.5. Untersuchung des endogenen Transports**

Nachdem offensichtlich war, dass die Psychopharmaka Imipramin, Doxepin und Citalopram über ein endogenes Transportsystem transportiert werden, welches jedoch nicht OCT-vermittelt ist, sollte noch untersucht werden, ob der hohe endogene Transport bei allen Psychopharmaka über ein und denselben Transporter erfolgt oder ob jedes Psychopharmakon über einen eigenen endogenen Transporter verfügt. Abb. 14 zeigt die Aufnahme des jeweiligen <sup>3</sup>H-Psychopharmakons ungehemmt und mit 5mM Eigensubstanz und den jeweiligen anderen Psychopharmaka in 5mM Konzentration als Hemmstoffe. Imipramin, Doxepin und Citalopram hemmten sich gegenseitig. Der nachgewiesene endogene, nicht OCT-vermittelte Transport von Imipramin, Doxepin und Citalopram beruht also auf demselben Transporter.



**Abb. 14.: Hemmung der Aufnahme von <sup>3</sup>H-Psychopharmaka in HEK293-Zellen, die stabil mit dem Vektor CMV transfiziert waren, durch Überschuss an Imipramin, Doxepin und Citalopram.** Die Aufnahme von 0,1µM <sup>3</sup>H-Psychopharmakon wurde in Abwesenheit von Hemmstoffen, in Gegenwart von 5mM Imipramin, 5mM Doxepin oder 5mM Citalopram gemessen. Die Mittelwerte und ihre Standardfehler aus drei Versuchen mit vier Parallelmessungen pro Bedingung sind dargestellt. \*\*\*p<0,001

## 4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die zentralnervös wirksamen Medikamente Desipramin, Doxepin, Imipramin, Citalopram, Mirtazapin, Amisulprid und Quetiapin die organischen Kationentransporter hOCT1, hOCT2 und hOCT3 hemmen. In dieser Arbeit wurden als Expressionssystem Zelllinien verwendet: Sie sind permanent und stabil mit den humanen organischen Kationentransportern transfiziert, lassen sich in der Kultur bei guter Pflege sehr einfach vermehren und wurden bereits in vielen Studien für derartige Zwecke verwendet (Breidert *et al* 1998; Busch *et al* 1996,1998; Martel *et al* 1996; Tamai *et al* 1997,1998). Für die Versuche wurden die Zelllinien CHO (chinese hamster ovary) und HEK (human embryonic kidney) eingesetzt, in denen die mRNA aller drei OCTs exprimiert war. Der Kontrolltyp dieser Zellen (CHO-pcDNA5 und HEK-CMV, Leervektoren) weist eine geringe Transportaktivität für MPP auf und exprimiert die organischen Kationentransporter nicht (Martel *et al* 2001). Die HEK293-Zellen stammen aus menschlichen embryonalen Nierenzellen, welche durch den menschlichen Adenovirus 5 transformiert wurden (Graham *et al* 1977), die CHO-Zellen von chinesischen Hamsterovarien. N-Methyl-4-Phenylpyridinium ( $MPP^+$ ) gilt als prototypisches Substrat für die organischen Kationentransporter, das von allen drei hOCTs mit vergleichbaren Affinitätskonstanten ( $K_t$ ) transportiert wird (Koepsell *et al* 2007); die Aufnahme von  $MPP^+$  an transfizierten Zellen wurde ausführlich beschrieben (Bleasby *et al* 2000; Russ *et al* 1992, 1993; Shang *et al* 2003). Deshalb wurden die Hemmversuche und die Kontrollen mit diesem Neurotoxin als Modellsubstrat gemacht. Bei der hier angewandten Messmethode ist die Aufnahme der zu untersuchenden Substanzen nur kurze Zeit linear, so dass Kurzzeitmessungen an den dissoziierten Zellen gemacht wurden. In anderen Publikationen werden die Messungen über längere Zeiten und an Monolayern durchgeführt (Bleasby *et al* 2000; Müller *et al* 2002; Neuhoff *et al* 2003). Der Vorteil der Kurzzeitmessungen liegt darin, dass hierbei noch keine Sättigung eingetreten ist, so dass auch initiale Raten messbar sind. Daher wurde für diese Arbeit diese Messmethode bevorzugt.

Die OCT-Subtypen überschneiden sich hinsichtlich ihrer Substratspektren stark und in vielen Organen sind mehrere Subtypen exprimiert. Daher ist es möglich, dass bei

fehlender Funktion einer der Transporter verwandte Transporterproteine bei ein und derselben Spezies die Funktion mit übernehmen (Arndt *et al* 2001; Urakami *et al* 2001). OCT1 und OCT2 besitzen eine sehr nahe verwandtschaftliche Beziehung bzgl. der Nukleinsäuresequenz mit dem OCT3 (Fukushima-Uesaka *et al* 2004; Itoda *et al* 2004), pharmakologisch stehen sich jedoch OCT2 und OCT3 näher (Gründemann *et al* 1999, 2000, 2003; Kerb *et al* 2002; Martel *et al* 1999; Wu *et al* 1998). Daher wurden in dieser Arbeit die Hemmkinetiken der Psychopharmaka (möglichst) jeweils an allen drei Transportern hOCT1, hOCT2 und hOCT3 gemacht und die  $IC_{50}$ -Werte bestimmt. Für die Hemmkinetiken wurden auch weitere Substrate gesucht. Obwohl Histamin keine strukturelle Ähnlichkeit mit dem Modellsubstrat MPP hat, wurden bei manchen Psychopharmaka Hemmkinetiken an mit hOCT3 transfizierten Zellen mit Histamin bestimmt, denn es gilt als physiologisches OCT-Substrat (Gründemann *et al* 1999). Die  $K_m$ -Werte dieser Substrate für hOCT3 waren bereits in vorherigen Untersuchungen bestimmt worden und betragen für das Histamin  $180\mu M$  (Busch *et al* 1998; Gründemann *et al* 1999) und für MPP  $47\mu M$  (Gorboulev *et al* 1997; Wu *et al* 2000; Zhang *et al* 1997,1998). Histamin ist ein wichtiger Neurotransmitter und Gewebehormon/Mediator, bei physiologischen Bedingungen positiv geladen und somit auf ein spezielles Transportsystem angewiesen. Im Gegensatz zu den anderen Neurotransmittern gibt es für Histamin jedoch keinen spezifischen Transporter, es sind nur die organischen Kationentransporter (OCT2 und OCT3) als spezielles Transportsystem für Histamin bekannt. Dieses funktioniert bei der Ratte gleichermaßen gut wie beim Menschen (Amphoux *et al* 2006).

Da viele Psychopharmaka nicht passiv membrangängig sind, ist insbesondere das Überschreiten der Blut-Hirn-Schranke und damit das Erreichen spezifischer Zielregionen im ZNS von Transportproteinen abhängig. Auch die Konzentration vieler Neurotransmitter wie z. B. der Monoamine, ist vom Vorhandensein spezifischer Transportsysteme abhängig. Je nach Wirkort der Monoamine wird ein veränderter Transportmechanismus mit verschiedenen Krankheitsbildern wie Depression, Morbus Parkinson oder Schizophrenie in Verbindung gebracht (Mössner *et al* 2001, 2002; Ogasawara *et al* 2006). Der vor allem phylogenetisch bedingt verschiedenartige Aufbau einzelner ZNS-Abschnitte und die tierartabhängig verschiedenen Qualitäten und Quantitäten der Neurotransmitter sowie ihre

Verteilungsunterschiede führen zu speziesspezifisch unterschiedlichen Antwortreaktionen auf die Applikation der gleichen Dosis eines ZNS-wirksamen Pharmakons. Im Gehirn befinden sich spezielle Transporter (SERT, DAT, NAT), die allesamt Neurotransmitter transportieren (siehe Abschnitt 1.3.), gleichzeitig wird ein Neurotransmittertransport durch die OCTs beschrieben (Amphoux *et al* 2006; Busch *et al* 1998; Gründemann *et al* 1998; Okabe *et al* 2005; Suhre *et al* 2005). Die physiologische Bedeutung von OCT1, OCT2 und OCT3 als Monoamintransporter wird angesichts des überlappenden Substratspektrums durch ihre Lokalisation bestimmt (Breidert *et al* 1998). Während eine Expression von OCT1 neben Organen wie Leber, Niere und Darm (Gorboulev *et al* 1997; Gründemann *et al* 1994; Kim *et al* 2006) in Endothelzellen von Hirnkapillaren, die an der Blut-Hirn-Schranke beteiligt sind, nachgewiesen wurde (Lin *et al* 2010), lässt sich der hOCT2 in den Pyramidenzellen des Gehirns nachweisen (Busch *et al* 1998). Der hOCT3 hingegen ist in sehr vielen anderen Zelltypen finden: Im Gehirn in der Area Postrema (Hirnareal; Haag *et al* 2004), Gehirneuronen, sympathischen Ganglien, Gliazellen und dem Plexus choroideus (Jonker *et al* 2004; Koepsell H. 2004; Koepsell *et al* 2004), ebenso wie am Herz, in der Leber (Gründemann *et al* 1998) und in späteren Untersuchungen auch in Aorta, Skelettmuskulatur, Prostata, Drüsen, Plazenta und fetaler Lunge (Kekuda *et al* 1998). Eine Expression organischer Kationentransporter ist also in vielen Bereichen des Gehirns vorhanden. Obwohl der hOCT3 neben den bekannten Transportern DAT, NET, SERT, nicht als alleiniger zusätzlicher Monoamintransporter angesehen wird, spricht unter anderem gerade diese sehr breite Gewebeverteilung für seine Rolle als „zweite Verteidigungslinie“ für Katecholamine, die der neuronalen Wiederaufnahme an der Synapse entkommen sind (Amphoux *et al* 2006; Gasser *et al* 2006; Vialou *et al* 2004). In anderweitigen Untersuchungen wurden die Levels von Serotonin, Dopamin, Noradrenalin und Histamin bei sowohl Wildtyp als auch knockout Mäusen mittels HPLC bestimmt: es konnte gezeigt werden, dass die Abwesenheit von OCT3 mit einer signifikanten regionsspezifischen Erhöhung dieser Katecholamine verbunden ist. Der OCT3 spielt also eine wichtige Rolle in der Monoamin-Clearance (Kitaichi *et al* 2005; Nakayama *et al* 2007). OCT3-knockout Mäuse zeigten unterschwellige Verhaltensänderungen, des Weiteren war nach Inkorporation von Amphetaminen und Kokain bei den OCT3-knockout Mäusen eine deutliche Anreicherung dieser Drogen im Organismus festzustellen (Vialou *et al* 2008). Durch die Hemmung der Aufnahme von 5-HT durch

Kokain und Amphetamine beispielsweise lässt sich deren zentrale euphorisierende Wirkung erklären (Inazu *et al* 2001), gleichzeitig ist die Aufnahme von 5-HT jedoch durch SERT-selektive Inhibitoren nicht beeinflussbar (Chen *et al* 2001; Schmitt *et al* 2003). Daraus ergibt sich, dass Psychopharmaka die gesamten Wirkungssysteme der physiologischen Überträgerstoffe beeinflussen können. Die Neurotransmitter-Systeme sind also Zielstruktur der Psychopharmaka und die Neurone Angriffspunkt für Psychostimulantien (Vialou *et al* 2008).

Die  $IC_{50}$ -Werte des trizyklischen Antidepressivums (Inhibitor des Serotonintransporters) Desipramin am hOCT1 und hOCT2 sind relativ niedrig und unterscheiden sich kaum (hOCT1 3,0 $\mu$ M, hOCT2 4,8 $\mu$ M), die Hemmung des hOCT3 vermittelten Transports ist vergleichsweise hierzu relativ niederaffin (63,1 $\mu$ M) und unterscheidet sich deutlich von den beiden anderen Hemm-Konzentrationen. Die zu früheren Zeiten bestimmten  $IC_{50}$ -Werte aus veröffentlichten Aufnahmeuntersuchungen (Gorboulev *et al* 1997; Wu *et al* 2000; Zhang *et al* 1998) konnten somit auch nur teilweise bestätigt werden (hOCT1 5,4 $\mu$ M, hOCT2 16 $\mu$ M, hOCT3 14 $\mu$ M). Obwohl die gemessenen  $IC_{50}$ -Werte von Desipramin niedrig sind, werden sie im Patienten nie erreicht: Die Normwerte von Desipramin im Serum sind 0,1-1,1 $\mu$ M.

Bei den Transportversuchen mit 0,1 $\mu$ M  $^3$ H-markiertem Desipramin zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Zelltypen, es wurde eine mittlere Aufnahme von 2,27 pmol/mg/sec gemessen. Auch die Hemmstoffe Desipramin, MPP und TBuA bewirkten in 5mM Konzentration keine Hemmung des Desipramin-Transports, im Gegenteil, die Zugabe von 5mM Desipramin bewirkte sogar stets eine signifikante Steigerung der Transportrate an den CHO-Zellen. An den HEK/CMV-Zellen fand mit den Hemmstoffen nie eine signifikante Änderung der Transportrate statt. Obgleich früher ein Transport von Desipramin über die organischen Kationentransporter beschrieben wurde (Gorboulev *et al* 1997; Koepsell *et al* 2003; Wu *et al* 2000; Zhang *et al* 1998), konnte er hier nicht bestätigt werden. Die beobachtete Stimulation durch 5mM Eigensubstanz deutet jedoch darauf hin, dass die endogene Aufnahme von  $^3$ H-Desipramin in den CHO-Zellen nicht passiver Natur ist, sondern über ein kooperativ geregeltes Transportsystem vermittelt wird.



Bei dem ebenfalls trizyklischen Antidepressivum Doxepin wurden zur Hemmung des  $^3\text{H}$ -MPP Transports ebenfalls sehr niedrige  $\text{IC}_{50}$ -Werte ermittelt (hOCT1 9,5 $\mu\text{M}$ , hOCT2 1,3 $\mu\text{M}$ , hOCT3 19,6 $\mu\text{M}$ ). Es könnte nur bei regelmäßiger Einnahme und/oder Überdosierung dieses Medikamentes höchstens der hOCT2 blockiert werden, denn die Normwerte von Doxepin im Serum des Menschen betragen 0,035-0,717 $\mu\text{M}$ . Beim Versuch den Transport von radioaktiv markiertem Doxepin nachzuweisen, wurden bei den OCT-transfizierten CHO-Zellen und bei dem Kontrollvektor keine signifikanten Unterschiede in der Transportrate festgestellt ( $\emptyset$  1,06 pmol/mg/sec). Bei den Versuchen mit den klassischen OCT-Hemmstoffen war die Selbsthemmung im Gegensatz zum ungehemmten Transport hoch signifikant, die mit den Hemmstoffen MPP und TBuA nicht. Lediglich bei stabil mit hOCT1 transfizierten Zellen konnten alle Hemmstoffe eine signifikante Hemmung hervorrufen, der hOCT1 könnte also Doxepin transportieren. Die Aufnahme des Doxepin ist also größer als die Diffusion, aber diese ist -ausser beim hOCT1- nicht OCT-vermittelt, sondern erfolgt über einen endogenen Transporter.

Mittels Hemmkinetik wurden für das Psychopharmakon Imipramin die  $\text{IC}_{50}$ -Werte 5,7 $\mu\text{M}$  (hOCT1), 1,4 $\mu\text{M}$  (hOCT2) und 56,8 $\mu\text{M}$  (hOCT3) ermittelt. Der im Jahr 2000 von Wu *et al* am hOCT3 gefundene  $K_i$ -Wert von 42 $\mu\text{M}$  wurde somit bestätigt. Bei regelmäßiger Einnahme von Imipramin beträgt beim Menschen die Serumkonzentration 0,178-0,536 $\mu\text{M}$ , eine Blockade des hOCT2 wäre also fast nur bei regelmäßiger Medikamentenüberdosierung möglich.

Bei dem Versuch den Transport von radioaktiv markiertem Imipramin nachzuweisen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen OCT-transfizierten Zellen und Kontrollen und es wurde in allen CHO-Zellsystemen eine mittlere Aufnahme rate von 2,66 pmol/mg/sec ermittelt. Die OCT-Hemmstoffe MPP und TBuA zeigten keine Hemmung, die Hemmung mit 5mM Eigensubstanz war stets deutlich signifikant, auch in den HEK/CMV-Zellen. Diese Ergebnisse sprechen für die Existenz eines endogenen, nicht OCT-vermittelten Transportsystems für Imipramin.

Bei den Transportmessungen wurde der Selektive Serotonin-Wiederaufnahme-Hemmer (SSRI) Citalopram als starker Inhibitor des MPP-Transportes identifiziert. Die Affinität von Citalopram zu den organischen Kationentransportern hOCT1 ( $\text{IC}_{50}$  3,1 $\mu\text{M}$ ) und hOCT2 ( $\text{IC}_{50}$  11,9 $\mu\text{M}$ ) ist hoch, die zu hOCT3 ( $\text{IC}_{50}$  145 $\mu\text{M}$ ) niedriger. Die Normwerte von Citalopram beim Menschen im Serum liegen bei 0,093-0,4 $\mu\text{M}$ , eine

Blockade eines organischen Kationentransporters ist also nicht zu erwarten. Ein weiterer  $IC_{50}$ -Wert des Citalopram für den humanen OCT3 konnte aus einem Hemmexperiment abgeleitet werden, bei dem die Histaminaufnahme über den hOCT3 mit steigenden Citalopramkonzentrationen in der Aufnahmelösung gehemmt wurde. Der hier ermittelte  $IC_{50}$  für Citalopram beim Histamintransport ist  $91,7\mu M$ , beim MPP-Transport  $145,2\mu M$ , die Affinität des hOCT3 für Citalopram ist demnach beim Histamintransport deutlich höher als beim MPP-Transport ( $p < 0,01$ ). Dies könnte in unterschiedlichen Bindungsstellen für Histamin und MPP begründet sein. Ergebnisse früherer Arbeiten legen nahe, dass die OCTs komplexe Substratbindungstaschen besitzen (Popp *et al* 2005). Innerhalb dieser Bindungstasche gibt es vermutlich unterschiedliche Interaktionsdomänen für verschiedene Substrate. Dafür spricht vor allem, dass bei rOCT1 ein Austausch des Aspartat 475 durch Glutamat die Bindung von TEA oder TBuA stark verändert, die von MPP hingegen nicht (Gorboulev *et al* 1999). Es besteht die Vermutung, dass verschiedene Substrate und Inhibitoren erstens an unterschiedlichen, sich teilweise überlappenden Stellen der Bindungsregion binden können und dass die Bindungsregion zweitens gleichzeitig mit mehreren Liganden besetzt sein kann. Dies bedeutet die Liganden der Substratbindungstasche haben teilweise überlappende Interaktionsdomänen und können sich teilweise oder vollständig verdrängen (Popp *et al* 2005). Liganden mit kaum oder nicht überlappenden Interaktionsdomänen können sich dabei nicht wie kompetitive Hemmstoffe verhalten.

Bei dem Versuch OCT-vermittelten Transport von Citalopram nachzuweisen, wurde das radioaktiv markierte Citalopram in allen Zelltypen nur mit 5mM Eigensubstanz signifikant gehemmt. Die klassischen OCT-Substrate MPP und TBuA zeigten keine Veränderung der Transporteffizienz. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass Citalopram endogen transportiert wird (deutliche Selbsthemmung), jedoch nicht über die organischen Kationentransporter.

Mirtazapin ist ein „Atypisches“ und ein gängig verwendetes Antidepressivum, welches durch Blockierung von Rezeptoren an der äußeren Zellwand eine weitere Serotoninausschüttung bewirkt. Die mittels MPP-Hemmung ermittelte Affinität des Mirtazapin zu hOCT2 ( $IC_{50}$   $6,0\mu M$ ) war hoch, die zu hOCT1 ( $IC_{50}$   $71,8\mu M$ ) und hOCT3 ( $IC_{50}$   $24,9\mu M$ ) geringer. Für den Histamin-Transport an mit hOCT3 transfizierten Zellen wurde ein  $IC_{50}$  von  $15,6\mu M$  bestimmt, beide Substrate lassen

sich also gleichermaßen gut durch Mirtazapin hemmen ( $p > 0,5$ ). Die Normwerte von Mirtazapin beim Menschen im Serum liegen bei  $0,038-0,38\mu\text{M}$ . Die gemessenen  $\text{IC}_{50}$ -Werte liegen in einem Bereich von  $6-71\mu\text{M}$ , damit ist eine Blockade eines organischen Kationentransporters beim Patienten nicht zu erwarten.

Amisulprid und Quetiapin gehören zu den Antipsychotika bzw. Neuroleptika, die in der Regel alle als Dopaminantagonisten wirken. Es wird diskutiert, dass sie nicht nur direkt das dopaminerge System beeinflussen, sondern kaskadenartig das Gleichgewicht der Neurotransmitter möglicherweise über Einwirkung organischer Kationentransporter. Quetiapin als Neuroleptikum hat eine erhöhte antagonistische Wirksamkeit an 5-HT-2-Rezeptoren. Die experimentell und rechnerisch ermittelten  $\text{IC}_{50}$ -Werte des Amisulprid bei der Hemmung des  $^3\text{H}$ -MPP-Transports waren bei allen drei Transportern im gleichen niedrigen Größenbereich (hOCT1  $19,3\mu\text{M}$ , hOCT2  $27,8\mu\text{M}$ , hOCT3  $11,1\mu\text{M}$ ). Amisulprid als Antipsychotikum hat einen Normwert von  $0,27-1,08\mu\text{M}$  im Patientenserum. Die Konzentrationen der ermittelten  $\text{IC}_{50}$ -Werte liegen alle darüber, daher ist eine Blockade eines organischen Kationentransporters bei regelmäßiger und regelrechter Einnahme dieses Medikamentes nicht zu erwarten.

Die Hemmung der MPP-Aufnahme durch das Antipsychotikums Quetiapin an hOCT2 transfizierten Zellen ( $\text{IC}_{50}$   $41\mu\text{M}$ ) ist dreimal niedriger affin wie an hOCT1 ( $\text{IC}_{50}$   $13,5\mu\text{M}$ ) und wie an hOCT3 transfizierten Zellen ( $\text{IC}_{50}$   $11,7\mu\text{M}$ ). Für Quetiapin wurde ebenfalls der  $\text{IC}_{50}$  am hOCT3 mit Histamin als Substrat bestimmt ( $14,9\mu\text{M}$ ). Die Werte von MPP und Histamin liegen in der gleichen Größenordnung, die Beeinflussung von Quetiapin auf die Funktion des hOCT3 verläuft gleichermaßen. Obwohl die gemessenen  $\text{IC}_{50}$ -Werte von Quetiapin niedrig sind, werden sie im Patienten nie erreicht: Die Normwerte von Quetiapin im Serum betragen  $0,196-1,3\mu\text{M}$ .

Die meisten getesteten Psychopharmaka kennzeichnen sich durch sehr niedrige  $\text{IC}_{50}$ -Werte für die Hemmung des MPP-Transports, ebenso wie für den Histamintransport. Substanzen mit noch höheren Affinitäten zu den hOCTs wurden bisher nur wenige entdeckt, der überwiegende Teil der bisher getesteten Substanzen ist weit weniger affin zu den drei organischen Kationentransportern. Als hochaffin anzuführen wäre der Inhibitor Decynium 22 mit  $\text{IC}_{50}$  Werten von  $0,1\mu\text{M}$  für hOCT2

und 0,09µM für hOCT3 (Gorboulev *et al* 1997; Hayer-Zillgen *et al* 2002) und Disprocynium mit einem IC<sub>50</sub> von 0,015µM für den hOCT3 (Gründemann *et al* 1998; Minuesa *et al* 2009). Trotz der sehr niedrigen ermittelten IC<sub>50</sub>-Werte war die Affinität der Hemmung der Aufnahme von 0,1µM MPP im Vergleich zu den bei der Behandlung mit diesen Medikamenten errechneten Blutkonzentrationen (Drs. Hermann/Holzer, 11/2010) relativ gering (siehe Tabelle), so dass aufgrund dieser Daten kein Effekt auf den Neurotransmittertransport von hOCT2 und hOCT3 im Gehirn zu erwarten wäre.

**IC<sub>50</sub>-Werte der Hemmung der Aufnahme von 0,1µM MPP durch Psychopharmaka und die Normwerte derer im Serum der Patienten [µM]:**

<b>Psychopharmakon</b>	<b>hOCT1</b>	<b>hOCT2</b>	<b>hOCT3</b>	<b>NW i.S.</b>
<b>Desipramin</b>	<b>3,0 +/- 0,4</b>	<b>5,0 +/- 0,4</b>	<b>64,0 +/- 6,0</b>	<b>0,1-1,1</b>
<b>Doxepin</b>	<b>9,5 +/- 1,3</b>	<b>1,3 +/- 0,2</b>	<b>19,6 +/- 3,4</b>	<b>0,035-0,717</b>
<b>Imipramin</b>	<b>5,7 +/- 0,7</b>	<b>1,4 +/- 0,2</b>	<b>56,8 +/- 5,1</b>	<b>0,178-0,536</b>
<b>Citalopram</b>	<b>3,1 +/- 1,8</b>	<b>11,9 +/- 2,6</b>	<b>145,2 +/- 24,7</b>	<b>0,093-0,4</b>
<b>Mirtazapin</b>	<b>71,8 +/- 24,1</b>	<b>6,0 +/- 0,8</b>	<b>24,9 +/- 3,2</b>	<b>0,038-0,38</b>
<b>Amisulprid</b>	<b>19,3 +/- 2,1</b>	<b>27,8 +/- 2,4</b>	<b>11,1 +/- 0,9</b>	<b>0,27-1,08</b>
<b>Quetiapin</b>	<b>13,5 +/- 1,1</b>	<b>41,0 +/- 4,1</b>	<b>11,7 +/- 0,7</b>	<b>0,196-1,3</b>

Aus zwei Gründen ist jedoch nicht auszuschliessen, dass hOCT2 und hOCT3 im Gehirn in vivo doch durch diese Medikamente gehemmt wird. Erstens könnte es sein, dass die beschriebenen Psychopharmaka den Transport von Neurotransmittern durch hOCT2 und hOCT3 mit höherer Affinität als der von MPP hemmen. Zweitens ist beschrieben worden, dass die organischen Kationentransporter mit sehr hoher Affinität durch bestimmte Hemmstoffe gehemmt werden, wenn sehr geringe Substratkonzentrationen für die Hemmung eingesetzt wurden (Koepsell *et al* 2011; Nies *et al* 2011). Beispiel hierfür ist Lamivudine (Minuesa *et al* 2009). Der Grund für diesen Effekt ist bisher nicht verstanden. Offensichtlich besitzen die organischen Kationentransporter niederaffine und hochaffine Kationenbindungsstellen, die wahrscheinlich beide am Transportmechanismus beteiligt sind (Koepsell 2010).

Bei meinen Untersuchungen konnte ich keinen Transport von Desipramin, Imipramin und Citalopram durch hOCT1, hOCT2 und hOCT3 feststellen. Doxepin könnte

möglicherweise durch hOCT1 transportiert werden, ein Transport durch hOCT2 und hOCT3 war nicht festzustellen. Publierte Daten unterstreichen den Aspekt, dass Substratbindung und Substrattransport auf grundsätzlich unterschiedlichen Mechanismen beruhen können. Am rOCT2 konnte ein Modell für OCTs vorgeschlagen werden, das neben der in zwei Konformationen vorliegenden Substratbindungsregion zusätzlich einen Selektivfilter annimmt, welchen die Substrate beim Transport passieren müssen (Schmitt und Koepsell 2005). Cholin beispielsweise hat mit etwa 400µM eine niedrige Affinität, aber eine hohe Wechselzahl. Die negativen Befunde meiner Versuche können jedoch nicht ausschliessen, dass die untersuchten Psychopharmaka doch mit geringer Transportrate transportiert werden. Während der Untersuchungen stellte sich nämlich heraus, dass die HEK293- und CHO-Zellen die zur Expression der untersuchten organischen Kationentransporter benutzt wurden, einen hochaktiven endogenen Transporter besitzen, welcher Imipramin, Doxepin und Citalopram transportiert. Da die Expressionshöhe der endogenen Transporter stark von den Kultivierungsbedingungen abhängig sind und deshalb von Versuch zu Versuch schwanken, ist es nicht möglich die Expression eines wenig aktiven Transportes von Doxepin, Imipramin und Citalopram durch OCTs auf dem Hintergrund des hochaktiven endogenen Transporters nachzuweisen. Daher muss für diese Substanzen ein Expressionssystem ohne endogene Transporter benutzt werden wie beispielsweise *Xenopus laevis* Oozyten (Oozyten des südafrikanischen Krallenfrosches). Weiterführende Untersuchungen mit solchen Expressionssystemen sollten durchgeführt werden, um abschliessend zu klären, ob ein geringgradiger Transport dieser Psychopharmaka durch OCTs stattfindet.

Bei der Untersuchung, ob der hohe endogene aber nicht OCT-vermittelte Transport der Psychopharmaka Imipramin, Doxepin und Citalopram über einen oder mehrere endogene Transporter erfolgt, konnte ermittelt werden, dass es sich immer um den gleichen Transporter handelt. Sowohl die Aufnahme von Imipramin als auch die Aufnahme von Doxepin als auch die Aufnahme von Citalopram konnten sowohl durch sich selbst als auch durch die anderen Psychopharmaka deutlich gehemmt werden.

Durch die Charakterisierung der am Arzneimittelmetabolismus beteiligten Transporter könnte es irgendwann möglich werden, z. B. durch Drug Design, den Metabolismus

von Medikamenten selektiv zu modifizieren, um damit eine bessere Wirkung oder geringere Nebenwirkungen zu erreichen (Ballestro *et al* 2006; Bednarczyk *et al* 2003; Ganapathy *et al* 2000; Ohsiro *et al* 2000; Wright *et al* 2004). Damit könnte z. B. vorausgesagt werden, wie ein Medikament aussehen muss, damit es entweder nicht von der Niere aufgenommen wird (Verhinderung der Nierenschädigung) oder von der Niere ausgeschieden werden kann (schnelle Elimination). Cisplatin beispielsweise induziert eine Nierenschädigung, da es über den hOCT2 in die Tubuluszellen aufgenommen wird und als Zytostatikum wirksam diese schädigt (Ciarimboli *et al* 2005; Yonezawa *et al* 2005, 2006). Bei manchen Medikamenten wäre auch eine längere Bioverfügbarkeit wünschenswert. Es gibt nur wenige Beispiele für die derzeitige klinische Anwendung dieses Konzepts. Möglicherweise kann auch der Einsatz von Psychopharmaka selektiver werden, wenn man genauer differenzieren kann, ob diese nicht nur mit organischen Kationentransportern interagieren, sondern von diesen auch transportiert werden.

## **5. Zusammenfassung**

In nahezu allen Organen und Geweben des Organismus kommt Transportsystemen eine wichtige physiologische Bedeutung zu. Aufgrund der Kompartimentierung ist es für den Stoffwechsel essentiell, dass es schlecht oder nicht permeablen Substanzen ermöglicht werden kann, Biomembranen zu überwinden. Die humanen organischen Kationentransporter hOCT1, hOCT2 und hOCT3 aus der SLC22-Genfamilie transportieren sowohl endogene als auch pharmakologisch relevante exogene Substanzen. Diese Proteine werden in verschiedenen Geweben exprimiert, u. a. im Gehirn, wo sie in Neuronen, Gliazellen und im Plexus choroideus zu finden sind. Defekte der hOCTs werden mit bei Patienten differierenden Plasmamedikamentenspiegeln und starken Nebenwirkungen bei der Einnahme von Medikamenten assoziiert.

Seit der Entdeckung und Erstbeschreibung der hOCT sind bereits sehr viele Substrate auf ihre Wechselwirkungen mit diesen Transportern untersucht worden. Zu den Substraten gehören endogene Substanzen wie Cholin oder Monoamin-Neurotransmitter, Xenobiotika wie MPP oder TEA, so wie kationische Pharmaka wie Metformin oder Cisplatin. Darüber hinaus gibt es zahlreiche Stoffe, die zwar nicht transportiert werden, aber die Aktivität der hOCTs hemmen. Dieses ist auch pharmakokinetisch relevant, da beispielsweise die Gabe eines hOCT-hemmenden Medikamentes (z. B. Glukokortikoide) die Ausscheidung eines anderen Pharmakons hemmen kann und damit zu erhöhten Plasmaspiegel führt, was für etwaige Nebenwirkungen mitverantwortlich sein kann.

Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, ob Psychopharmaka (Desipramin, Doxepin, Imipramin, Citalopram, Mirtazapin, Amisulprid, Quetiapin) Substrate der hOCTs darstellen, was aufgrund ihrer Struktur (kationisch bei physiologischem pH, Molekulargewicht < 500) möglich wäre oder ob sie als Inhibitoren dieser Transporter wirken können. Dies ist zum einen zum genaueren Verständnis der Pharmakokinetik von Bedeutung, zum anderen könnte eine Hemmung der hOCTs möglicherweise auch für die Wirkung dieser Pharmaka mitverantwortlich sein. So wird beispielsweise vermutet, dass hOCTs an der Elimination extrazellulärer Neurotransmitter im Gehirn beteiligt sind, ihre Hemmung könnte also einen erhöhten Neurotransmitterspiegel hervorrufen.

Zur Durchführung dieser Untersuchungen wurden die hOCTs in transfizierten CHO- und HEK293 Zellen heterolog exprimiert und die Aktivität der Transporter durch die szintigraphische Messung der Aufnahme radioaktiv markierter Substrate bestimmt.

Bei den getesteten Psychopharmaka ließ sich -ausser bei Doxepin über hOCT1- kein hOCT-vermittelter Transport nachweisen. Es ist jedoch nicht auszuschliessen, dass dieser durch die hohe endogene Transportaktivität überdeckt wird und dadurch mit der hier angewandten Messmethode nicht nachweisbar ist. Alle Psychopharmaka hemmten jedoch die Aktivität aller drei hOCT-Subtypen. Die ermittelten IC<sub>50</sub>-Werte lagen hierbei im mikromolaren Bereich. Die höchsten Affinitäten wurden für die Interaktion von Doxepin und Imipramin mit hOCT2 bestimmt (1,3µM bzw. 1,4µM). Alle ermittelten Werte liegen jedoch über den therapeutischen Werten im Serum des Menschen.

Diese Arbeit soll einen kleinen Beitrag zum näheren Verständnis von Struktur, Funktionsmechanismen, Regulation und Arbeitsweisen von Transportproteinen, insbesondere der OCT-Familie leisten. Bis zur definitiven Aufklärung muss noch sehr viel Forschung betrieben werden, die weiteren Ergebnisse und daraus erwachsenden Fragestellungen bleiben spannend.



## **6. Summary**

In almost all organs and tissues of the organism transport systems play a vital physiological role. Due to compartmentation it is essential for metabolism that poorly permeable or impermeable substances are enabled to overcome biomembranes. The human organic cation transporters hOCT1, hOCT2 and hOCT3 belonging to the SLC22 gene family transport endogenous as well as exogenous pharmacologically relevant substances. These proteins are expressed in various tissues, among others in the brain where they can be found in neurons, glia cells as well as in the plexus choroideus. Defects of the hOCTs are associated with differing plasma drug levels of patients and severe side effects when on medication.

Since the discovery and first description of hOCTs a lot of substrates have already been examined with regard to their interactions with these transporters. The substrates comprise endogenous substances such as choline or monoamine neurotransmitters, xenobiotics such as MPP or TEA as well as cationic pharmaceuticals such as metformin or cisplatin. In addition to these there are numerous substances not being transported but inhibiting the activity of hOCTs. This is also of pharmacokinetic relevance as for example the administration of a hOCT inhibiting drug (e. g. glucocorticoids) can inhibit the elimination of another pharmaceutical thus leading to an elevated plasma level, which may be partly responsible for possible side effects.

The aim of this thesis was to examine whether psychotropic drugs (Desipramin, Doxepin, Imipramin, Citalopram, Mirtazapin, Amisulprid, Quetiapan) represent substrates of the hOCTs, which would be possible due to their structure (cationic at physiological pH, molecular weight < 500), or whether they can act as inhibitors of these transporters. On the one hand this is of importance for a more precise understanding of pharmacokinetics, on the other hand an inhibition of the hOCTs could possibly also be partly responsible for the effect of these pharmaceuticals. For example it is supposed that hOCTs play a role in the elimination of extracellular neurotransmitters in the brain. Thus their inhibition could evoke an elevated neurotransmitter level.

For the carrying out of these examinations the hOCTs were heterologously expressed in transfected CHO- and HEK293 cells and the transporters' activity was determined by scintigraphic measurement of the uptake of radiolabeled substrates.

With none of the tested psychotropic drugs -except in the case of Doxepin via hOCT1- a hOCT-mediated transport could be established. However, it cannot be excluded that such transport might be masked by the high endogenous transport activity and therefore cannot be established with the measuring method applied in this study. All the psychotropic drugs however inhibited the activity of all three hOCT subtypes. The  $IC_{50}$  values obtained were within the micromolar range. The highest affinities were determined for the interaction of Doxepin and Imipramin with hOCT2 (1.3 $\mu$ M, 1.4 $\mu$ M respectively). However, all the values obtained are above human therapeutic serum values.

This thesis shall make a small contribution to a closer understanding of the structure, functional mechanisms, regulation and mode of operation of transport proteins, especially those belonging to the OCT-family. For a complete and definitive understanding a lot of research work has yet to be undertaken. Further findings and arising questions remain exciting.

## **7. Literaturverzeichnis**

Alcorn J., Moscow J. A. and McNamara P. J.

“Transporter gene expression in lactating and non- lactating human mammary epithel cells using real- time reverse transcription- polymerase chain reaction”

J. Pharmacol. Exp. Ther., 303, 487-496, 2002

Alnouti Y., Petrick J. S. and Klaasen C. D.

“Tissue distribution and ontogeny of organic cation transporters in mice”

Drug Metab. Dispos., 34, 477-482, 2006

Amphoux A., Vialou V., Drescher E., Brüß M., La Cour C. M., Rochat C., Millan M. J., Giro B., Bönisch H. and Gautron S.

„Differential pharmacological in vitro properties of organic cation transporters and regional distribution in rat brain”

Neuropharmacology, 50, 941-952, 2006

Aoyama N., Takahashi N., Kitaichi K., Ishihara R., Saito S., Maeno N., Ji X., Takagi K., Sekine Y., Iyo M., Harano M., Komiyama T., Yamada M., Sora I., Ujike H., Iwata N., Inada T. and Ozaki N.

“Association between gene polymorphisms of SLC22A3 and methamphetamine use disorder”

Alcohol Clin. Exp. Res., 30, 1644-1649, 2006

Arndt P., Gorboulev V., Nagel G., Friedrich T., Gambaryan S., Volk C. and Koepsell H.

“Functional properties of the polyspecific rat organic cation transporter rOCT2”

Nova Acta Leopoldina NF 78, 306, 347-348, 1997

Arndt P., Volk C., Gorboulev V., Budiman T., Popp C., Ulzheimer- Teuber I., Akhoundova A., Koppatz S., Bamberg E., Nagel G. and Koepsell H.

“Interaction of cations, anions and weak base quinine with rat renal cation transporter rOCT2 compared with rOCT1”

Am. J. Physiol. Renal Physiol., 281, F454- F468, 2001

Asaka J.-I., Terada T., Okuda M., Katsura T. and Inui K. I.

„Androgen receptor is responsible for rat organic cation transporter 2 gene regulation but not for rOCT1 or rOCT3“

Pharm. Res., 1-8, 2006

Augustine L. M., Markelewicz R. J., Boekelheide K. and Cherrington N. J.

„Xenobiotic and endobiotic transporter mRNA expression in the blood-testis barrier“

Drug Metab. Dispos., 33, 182-189, 2005

Ballestro M. R., Monte M. J., Briz O., Jimenez F., Gonzales San Martin F. and Marin J. J. G.

“Expression of transporters potentially involved in the targeting of cytostatic bile acid derivatives to colon cancer and polyps”

Biochem. Pharmacol., 72, 729-738, 2006

Barendt W. M. and Wright S. H.

“The human organic cation transporter (hOCT2) recognizes the degree of substrate ionization”

J. Biol. Chem., 277, 22491-22496, 2002

Bednarczyk D., Ekins S., Wikel J. H. and Wright S. H.

“Influence of the molecular structure on substrate binding to the human organic cation transporter hOCT1”

Mol. Pharmacol., 63, 489-498, 2003

Bleasby K., Chauhan S. and Brown C. D.

“Characterisation of MPP<sup>+</sup> secretion across human intestinal Caco-2 cell monolayers: role of P-glycoprotein and a novel Na<sup>+</sup>-dependent organic cation transport mechanism”

Br. J. Pharmacol., 129, 619-625, 2000

Bönisch H.

“Extraneuronal transport of catecholamines”

Pharmacology, 21, 93-108, 1980

Boom S. P. A., Gribnau F. W. J. and Russell F. G. M.

“Organic cation transport and cationic drug interactions in freshly isolated proximal tubular cells of the rat”

J. Pharmacol. Exp. Ther., 263, 445-450, 1992

Bottalico B., Larsson I., Brodzki J., Hernandez-Andrade E., Casslen B., Marsal K. and Hansson S. R.

“Norepinephrine transporter (NET), serotonin transporter (SERT), vesicular monoamine transporter (VMAT2) and organic cation transporters (OCT1, 2 and EMT) in human placenta from pre-eclamptic and normotensive pregnancies”

Placenta 25, 518-529, 2004

Bradford M. M.

„A rapid and sensitive for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding“

Anal. Biochem., 72, 248-254, 1976

Breidert T., Spitzenberger F., Gründemann D. and Schömig E.

„Catecholamine transport by the organic cation transporter type 1 (OCT1)“

Brit. J. Pharmacol., 125, 218-224, 1998

Brockmöller J., Kirchmeier J., Meisel C. and Roots I.

„Pharmacogenetic diagnostics of cytochrome P450 polymorphisms in clinical drug development and drug treatment. “

Pharmacogenomics, 1, 125-151, 2000

Budiman T., Bamberg E., Koepsell H. and Nagel G.

“Mechanism of electrogenic cation transport by the cloned organic cation transporter 2 from rat“

Biol. Chem., 275, 29413- 29420, 2000

Burkardt G. and Wolff N. A.

“Structure of renal anion and cation transporters”

Am. J. Physiol., 278, F853-F866, 2000

Burwinkel B., Kreuder J., Schweitzer S., Vorgerd M., Gempel K., Gerbitz K. D. and Kiliman M. W.

„Carnitine transporter OCTN2 mutations in systemic primary carnitine deficiency: a novel Arg169Gln mutation and a recurrent Arg282ter mutation associated with an unconventional splicing abnormality”

Biochem. Biophys. Res. Commun., 261, 484-487, 1999

Busch A. E., Quester S., Ulzheimer J. C., Gorboulev V., Akhoundova A., Waldegger S., Lang F. and Koepsell H.

“Monoamine neurotransmitter transport mediated by the polyspecific cation transporter rOCT1”

FEBS Lett., 395, 153-156, 1996a

Busch A. E., Quester S., Ulzheimer J. C., Waldegger S., Gorboulev V., Arndt P., Lang F. and Koepsell H.

„Electrogenic properties and substrate specificity of the polyspecific rat cation transporter rOCT1“

J. Biol. Chem., 271, 32599-32604, 1996b

Busch A. E., Karbach U., Miska D., Gorboulev V., Akhoundova A., Volk C., Arndt P., Ulzheimer J. C., Sonders M. S., Baumann C., Waldegger S., Lang F. and Koepsell H.

„Human neurons express the polyspecific cation transporter hOCT2, which translocates monoamine neurotransmitters, amantadine and memantine”

Mol. Pharmacol., 54, 342-352, 1998

Caspary W. F. and Creutzfeld W.

“Analysis of the inhibitory effect of biguanides on glucose absorption: inhibition of active sugar transport”

Diabetologia, 7, 379-385, 1971

Cetinkaya I., Ciarimboli G., Yalcinkaya G., Mehrens T., Velic A., Hirsch J. R., Gorboulev V., Koepsell H. and Schlatter R.

“Regulation of human organic cation transporter hOCT2 by PKA, PI3K and calmodulin-dependent kinases”

Am. J. Physiol. Renal Physiol., 284, F293-302, 2003

Chen J. J., Li Z., Pan H., Murphy D. L., Tamir H., Koepsell H. and Gershon M. D.

„Maintenance of serotonin in the intestinal mucosa and ganglia of mice that lack the high-affinity serotonin transporter: abnormal intestinal motility and the expression of cation transporters“

J. Neurosci., 21, 6348-6361, 2001

Cheng Y. and Prusoff W. H.

“Relationship between the inhibition constant ( $K_1$ ) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition ( $IC_{50}$ ) of the enzymatic reaction”

Biochem. Pharmacol., 22, 3099-3108, 1973

Ciarimboli G., Struwe K., Arndt P., Gorboulev V., Koepsell H., Schlatter E. and Hirsch J. R.

“Regulation of the human organic cation transporter hOCT1”

J. Cell. Physiol., 201, 420-428, 2004

Ciarimboli G. and Schlatter E.

„Regulation of organic cation transport“

J. Physiol., 449, 423-441, 2004

Ciarimboli G., Ludwig T., Lang D., Pavenstädt H., Koepsell H., Piechota H.-J., Haier J., Jeahde U., Zisowsky J. and Schlatter E.

„Cisplatin nephrotoxicity is critically mediated via the human organic cation transporter 2“

Am. J. Pathol., 167, 1477-1484, 2005

Ciarimboli G., Koepsell H., Iordanova M., Gorboulev V., Dürner B., Lang D., Edemir B., Schröter R., VanLe T. and Schlatter E.

„Individual PKC-phosphorylation sites in the organic cation transporter 1 determine substrate selectivity and transport regulation”

J. Am. Soc. Nephrol., 16, 1562-1570, 2005

Daniel H. and Kottra G.

„The proton oligopeptide cotransporter family SLC15 in physiology and pharmacology“

Pflugers Arch., 447, 610-618, 2004

Denk G. U., Soroka C.J., Mennone A., Koepsell H., Beuers U. and Boyer J. L.

„Down-regulation of the organic cation transporter 1 of rat liver in obstructive cholestasis”

Hepatology, 39, 1382-1389, 2004

Dresser M. J., Gray A.T. and Giacomini K. M.

“Kinetic and selectivity differences between rodent, rabbit and human organic cation transporters (OCT1)”

J. Pharmacol., Exp. Ther., 292, 1146-1152, 2000

Dresser M. J., Lealman M. K. and Giacomini K. M.

“Transporters involved in the elimination of drugs in the kidney: Organic anion transporters and organic cation transporters”

J. Pharm. Sci., 90, 397-421, 2001

Dresser M. J., Xiao G., Leabman M. K., Gray A. T. and Giacomini K. M.

“Interactions of n-tetraalkylammonium compounds and biguanides with a human renal organic cation transporter (hOCT2)”

Pharm. Res., 19, 1244-1247, 2002

Drewe J.

“Klinische Pharmakologie: Proteine für den Transport von Arzneistoffen”

Schweiz. Med. Wochenschrift., 130, 727-731, 2000



Eisenhofer G. and Finberg J. P.

“Different metabolism of norepinephrine and epinephrine by catechol-O-methyltransferase and monoamine oxidase in rats“

J. Pharmacol. Exp. Ther., 268, 1242-1251, 1994

Eisenhofer G.

„The role of neuronal and extraneuronal plasma membrane transporters in the inactivation of peripheral catecholamines“

Pharmacol. Ther., 91, 35-62, 2001

Engel K. und Wang J.

„Interaction of organic cations with a newly identified plasma membrane monoamine transporter“

Pharmacol., 68, 1397-1407, 2005

Feng N., Mo B., Johnson P. L., Orchinik M., Lowry C. A. and Renner K. J.

“Local inhibition of organic cation transporters increases extracellular serotonin in the medial hypothalamus“

Brain Res., 1063, 69-76, 2005

Forth W., Henschler D., Rummel W. und Starke K.

„Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie“

Spektrum Akademischer Verlag, 7. Auflage, 1996

Frey Hans-Hasso und Löscher Wolfgang

„Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin“

Enke-Verlag, 106, 140-143, 1996

Fujita T., Urban T. J., Leabman M. K., Fujita K. and Giacomini K. M.

“Transport of drugs in the kidney by the human organic cation transporter OCT2 and its genetic variants“

Pharm. Sci., 95, 25-36, 2006

Fukushima-Uesaka H., Maekawa K., Ozawa S., Komamura K., Ueno K., Shibakawa M., Kamakura S., Kitakaze M., Tomoike H., Saito Y. and Sawada Y.

“Fourteen novel single nucleotide polymorphism in the SLC22A2 gene encoding human organic cation transporter (OCT2)”

Drug Metab. Pharmacokin., 19, 239-244, 2004

Ganapathy V., Prasad P. D., Ganapathy M. E. and Leibach F. H.

„Drugs of abuse and placental transport“

Adv. Drugs Deliv. Rev., 38, 99-110, 1999

Ganapathy V., Prasad P. D., Ganapathy M. E. and Leibach F. H.

“Placental transporters relevant to drug distribution across the maternal- fetal interface”

J. Pharmacol. Exp. Ther., 294, 413-420, 2000

Gasser P. J., Lowry C. A. and Orchinik M.

“Corticosterone sensitive monoamine transport in the rat dorsomedial hypothalamus: potential role for organic cation transporter 3 in the stress-induced modulation of monoaminergic neurotransmission”

J. Neurosci., 26, 8758-8766, 2006

Giacomini K. M.

“Membrane transporters in drug disposition”

J. Pharmacokin. Biopharm. , 25, 731-741, 1997

Gorboulev V., Ulzheimer J. C., Akhoundova A., Ulzheimer-Teuber I., Karbach U., Quester S., Baumann C., Lang F., Busch A. E., and Koepsell H.

“Cloning and characterization of two human polyspecific organic cation transporters”

DNA Cell Biol., 16, 871-881, 1997

Gorboulev V., Volk C., Arndt P., Akhoundova A. and Koepsell H.

“Selectivity of the polyspecific cation transporter rOCT1 is changed by mutation of aspartate 475 to glutamate”

Mol. Pharmacol., 56, 1254-1261, 1999

Gorboulev V., Shatskaya N., Volk C. and Koepsell H.

“Subtype-specific affinity for corticosterone of rat organic cation transporters rOCT1 and rOCT2 depends on three amino acids within the substrate binding region”

Mol. Pharmacol., 67, 1612-1619, 2005

Gorbounov D., Gorboulev V., Shatskaya N., Müller T., Bamberg E., Friedrich T. and Koepsell H.

“High-affinity cation binding to organic cation transporter 1 induces movement of helix 11 and blocks transport after mutations in a modelled interaction domain between two helices”

Mol. Pharmacol., 73, 50-61, 2008

Graham F. L., Smiley J., Russel W. C. and Nairn R.

“Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5”

J. Gen. Virol., 36, 59-74, 1977

Green R. N., Lo K., Sterrit C. and Beier D. R.

“Cloning and functional expression of a mouse liver organic cation transporter”

Hepatology, 29, 1556-1562, 1999

Grover B., Buckley D., Buckley A. R. and Cacini W.

“Reduced expression of organic cation transporters rOCT1 and rOCT2 in experimental diabetes”

J. Pharmacol. Exp. Ther., 308, 949-956, 2004

Gründemann D., Gorboulev V., Gambaryan S., Veyhl M. and Koepsell H.

“Drug excretion mediated by a new prototype of polyspecific transporter”

Nature, 372, 549-552, 1994

Gründemann D., Schechinger B., Rappold G. A. and Schömig E.

„Molecular identification of the corticosterone- sensitive extraneuronal catecholamine transporter“

Nat. Neurosci., 1, 349- 351, 1998a

Gründemann D., Köster S., Kiefer N., Breidert T., Engelhardt M., Spitzenberger F., Obermüller N. and Schömig E.

„Transport of monoamine transmitters by the organic cation transporter type 2 (OCT2)“

J. Biol. Chem., 273, 30915-30920, 1998b

Gründemann D., Liebich G., Kiefer N., Köster S. and Schömig E.

„Selective substrates for non-neuronal monoamine transporters“

Mol. Pharmacol., 56, 1-10, 1999

Gründemann D. and Schömig E.

„Gene structures of the human non-neuronal monoamine transporters EMT and OCT2“

Hum. Genet., 106, 627-635, 2000

Gründemann D., Hahne C., Berkels R. and Schömig E.

„Agmatine is efficiently transported by non-neuronal monoamine transporters extraneuronal monoamine transporter (EMT) and organic cation transporter 2 (OCT2)“

J. Pharmacol. Exp. Ther., 304, 810-817, 2003

Haag C., Berkels R., Gründemann D., Lazar A., Taubert D. and Schömig E.

„The localisation of the extraneuronal monoamine transporter (EMT) in the rat brain“

J. Neurochem., 88, 291-297, 2004

Hansch C. (Ed.)

“Comprehensive Medical Chemistry- The rational design, mechanistic study & therapeutic application of chemical compounds“

Volume 6-Cumulative Subject Index and Drug Compendium, Pergamon Press, Oxford, 1990

Harlfinger S., Fork C., Lazar A., Schömig E. and Gründemann D.

„Are organic cation transporters capable of transporting prostaglandins? “

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 372, 125-130, 2005

Hasannejad H., Takeda M., Narikawa S., Huang X. L., Enomoto A., Taki K., Niwa T., Jung S. H., Onozato M. L., Tojo A. and Endou H.  
“Human organic cation transporter 3 mediates the transport of antiarrhythmic drugs”  
Eur. J. Pharmacol., 499, 45-51; 2004

Hayer-Zillgen M., Brüss M. and Bönisch H.  
„Expression and pharmacological profile of the human organic cation transporters hOCT1, hOCT2 and hOCT3”  
Brit. J. Pharmacol., 136, 829-836, 2002

Hermann G., Hermann T., Hermann S., Holzer L.  
Ärztliche Laborgemeinschaft Franken (Laborarztpraxis)  
Normwerte im Patientenserum, Stand 11/2010

Hiasa M., Matsumoto T., Komatsu T. and Moriyama Y.  
“Wide variety of locations for rodent MATE 1, a transporter protein that mediates the final excretion step for toxic organic cations”  
Am. J. Physiol. Cell Physiol., 291, 678-686, 2006

Horvath G., Sutto Z., Torbati A., Conner G. E., Salathe M. and Wanner A.  
“Norepinephrine transport by the extraneuronal monoamine transporter in human bronchial arterial smooth muscle cells”  
Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol., 285, L829-L837, 2003

Horvarth G., Schmid N., Fragoso M. A., Schmid A., Conner G. E., Salathe M. and Wanner A.  
“Epithelial organic cation transporters ensure pH dependent drug absorption in the airway”  
Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. PMID: 16917073, 2006

Inazu M., Takeda H. and Matsumiya T.  
“Expression and functional characterization of the extraneuronal monoamine transporter in normal human astrocytes”  
J. Neurochem., 84, 43-52, 2003

Inazu M., Takeda H., Maehara K., Miyashita K., Tomoda A. and Matsumiya T.  
“Functional expression of the organic cation/carnitine transporter 2 in rat astrocytes”  
J. Neurochem., 97, 424-434, 2006

Iseki K., Sugawara M., Saitoh N. and Miyazaki K.  
“The transport mechanism of organic cations and their zwitterionic derivatives across rat intestinal brush-border membrane. - Comparison of the membrane potential effect on the uptake by membrane vesicles”  
Biochem. Biophys. Acta, 1152, 9-14, 1993

Itoda M., Saito Y., Maekawa K., Hichiya H., Komamura K., Kamakura S., Kitakaze M., Tomoike H., Ueno K., Ozawa S. and Sawada J.-I.  
“Seven novel single nucleotide polymorphisms in the human SLC22A1 gene encoding organic cation transporter 1 (OCT1)”  
Drug Metab. Pharmacokinet, 19, 308-312, 2004

Iversen L. L.  
“The uptake of catecholamines at high perfusion concentrations in the rat isolated heart: a novel catecholamine uptake process”  
Br. J. Pharmacol., 25, 18-33, 1965

Ji L., Masuda S., Saito H. and Inui K. J.  
“Down-regulation of rat organic cation transporter rOCT2 by 5/6 nephrectomy”  
Kidney Int., 62, 514-524, 2002

Jonker J. W., Wagenaar E., Mol C. A., Biutelaar M., Koepsell H., Smit J. W. and Schinkel A. H.  
“Reduced hepatic intake and intestinal excretion of organic cations in mice with a targeted disruption of the organic cation transporter 1 (OCT1 [SLC22a1]) gene”  
Mol. Cell. Biol., 21, 5471-5477, 2001

Jonker J. W., Wagenaar E., van Eijl S. and Schinkel A. H.

“Deficiency in the organic cation transporters 1 and 2 (OCT1/OCT2 [SLC22A1/SLC22A2]) in mice abolishes renal secretion of organic cations”

Mol. Cell. Biol., 23, 7902-7908, 2003

Jonker J. W. and Schinkel A. H.

“Pharmacological and physiological functions of the polyspecific organic cation transporters: OCT1, 2 and 3 (SLC22A1-3)”

J.Pharmacol. Exp.Ther., 308, 2-9, 2004

Karbach U., Kricke J., Meyer-Wentrup F., Gorboulev V., Volk C., Loffing-Cueni D., Kaissling B., Bachmann S. and Koepsell H.

“Localization of organic cation transporters OCT1 and OCT2 in rat kidney”

Am. J. Physiol. Renal. Physiol., 279, F679-F687, 2000

Karpati G., Carpenter S., Engel A. G., Watters G., Allen J., Rothmann S., Klassen G. and Mamer O. A.

„The syndrome of systemic carnitine deficiency - Clinical, morphologic, biochemical and pathophysiologic features”

Neurology, 25, 16-24, 1975

Kato Y., Yoshida K., Watanabe C., Sai Y. and Tsuji A.

“Screening of the interaction between xenobiotic transporters and the PDZ proteins”

Pharm. Res., 21, 1886-1894, 2004

Kekuda R., Prasad P. D., Wu X., Wang H., Fei Y. J., Leibach F. H. and Ganapathy V.

“Cloning and functional characterization of a potential-sensitive, polyspecific organic cation transporter (OCT3) most abundantly expressed in placenta”

J. Biol. Chem., 273, 15971-15979, 1998

Keller T., Elfeber M., Gorboulev V., Reiländer H. and Koepsell H.

„Purification and functional reconstitution of the rat organic cation transporter rOCT1”

Biochemistry, 44, 12253-12263, 2005

Kerb R., Brinkmann U., Chatskaia N., Gorbunov D., Gorboulev V., Mornhinweg E., Keil A., Eichelbaum M. and Koepsell H.

„Identification of genetic variations of the human organic cation transporter hOCT1 and their functional consequences“

Pharmacogenetics, 12, 591-595, 2002

Khamdang S., Takeda M., Noshiro R., Narikawa S., Enomoto A., Anzai N., Piyachaturawat P. and Endou H.

“Interactions of the human organic anion transporters and human organic cation transporters with nonsteroidal anti-inflammatory drugs”

J. Pharmacol. Exp. Ther., 303, 534-539, 2002

Kim M. K. and Shim C. K.

“The transport of organic cations in the small intestine: current knowledge and emerging concepts”

Arch. Pharm. Res., 29, 605-616, 2006

Kimura H., Takeda M., Narikawa S., Enomoto A., Ichida K. and Endou H.

“Human organic anion transporters and human organic cation transporters mediate renal transport of prostaglandins”

J. Pharmacol. Exp. Ther., 301, 293-298, 2002

Kitaichi K., Fukuda M., Nakayama H., Aoyama N., Ito Y., Fujimoto Y., Tagaki K. and Hasegawa T.

“Behavioral changes following antisense oligonucleotide-induced reduction of organic cation transporter 3 in mice”

Neurosci. Lett., 382, 195-200, 2005

Koehler M. R., Wissinger B., Gorboulev V., Koepsell H. and Schmid M.

„The two human organic cation transporter genes SLC22A1 and SLC22A2 are located on chromosome 6q26“

Cytogenet. Cell Genet., 79, 198-200, 1997



Koepsell H.

“Organic cation transporters in intestine, kidney, liver and brain”

Annu. Rev. Physiol., 60, 243-266, 1998

Koepsell H.

„Polyspecific organic cation transporters: their functions and interactions with drugs“

TIPS, 25, 375-381, 2004

Koepsell H.

“Substrate recognition und translocation by polyspecific organic cation transporters”

Biol. Chem., 392, 95-101, 2011

Koepsell H. and Endou H.

“The SLC22 drug transporter family”

Pflugers Arch., 447, 666-676, 2004

Koepsell H., Busch A., Gorboulev V. and Arndt P.

“Structure and function of renal organic cation transporters”

News Physiol. Sci., 13, 11-16, 1998a

Koepsell H., Meyer-Wentrup F., Arndt P., Karbach U., Nagel G. and Gorboulev V.

„Function and molecular structure of renal and hepatic cation transporters“

Nova Acta Leopoldina NF 78, 306, 211-212, 1998b

Koepsell H., Gorboulev V. and Arndt P.

“Molecular pharmacology of organic cation transporters in kidney”

J. Membr. Biol., 167, 103-117, 1999

Koepsell H., Schmitt B. M. and Gorboulev V.

“Organic cation transporters”

Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol., 150, 36-90, 2003

Koepsell H., Lips K. S. and Volk C.

“Polyspecific organic cation transporters: structure, function, physiological roles and biopharmaceutical implications”

Pharmaceutical Research, 24, 1227-1251, 2007

Koizumi A., Nozaki J., Ohura T., Kayo T., Wada Y., Nezu J., Ohashi R., Tamai I., Shoji Y., Takada G., Kibira S., Matsuishi T. and Tsuji A.

“Genetic epidemiology of the carnitine transporter OCTN2 gene in a Japanese population and phenotypic characterization in Japanese pedigrees with primary systemic carnitine deficiency”

Hum. Mol. Genet., 8, 2247-2254, 1999

Kopin I. J., Rundquist B., Friberg P., Lenders J; Goldstein D. S. and Eisenhofer G.

„Different relationships of spillover to release of norepinephrine in human heart, kidneys and forearm“

Am. J. Physiol., 275, R165-173, 1998

Kummer W., Wiegand S., Akinci S., Wessler I., Schinkel A. H., Wess J., Koepsell H., Haberberger R. V. and Lips K. S.

„Role of Acetylcholine and polyspecific cation transporters in Serotonin-induced bronchoconstriction in the mouse”

Respir. Res., 7, 65-77, 2006

Lazar A., Gründemann D., Berkels R., Taubert D., Zimmermann T. and Schömig E.

“Genetic variability of the extraneuronal monoamine transporter EMT (SLC22A3)”

J. Hum. Genet., 48, 226-230, 2003

Lazar A., Zimmermann T., Koch W., Gründemann D., Schömig A., Kastrati A. and Schömig E.

„Lower prevalence of the OCT2 Ser270 allele in patients with essential hypertension,,  
Clin. Exp. Hypertens, 28, 645-653, 2006

Leabman M. K., Huang C.C., Kawamoto M., Johns S. J., Stryke D., Ferrin T. E., De Young Y., Taylor T., Clark A. G., Herskowitz I. and Giacomini K. M.

“Polymorphisms in a human kidney xenobiotic transporter OCT2 exhibit altered function”

Pharmacogenetics, 12, 395-405, 2002

Leabman M. K., Huang C. C., De Young J., Carlson E. J., Taylor T., De La Cruz M., Johns S. J., Stryke D., Kawamoto M. and Urban T. J.

“Natural variation in human membrane transporter genes reveals evolutionary and functional constraints”

Proc. Natl. Acad Sci, USA, 100, 5896-5901, 2003

Lee G., Dallas Sh., Hong M. and Bendayan R.

“Drug transporters in the central nervous system: Brain barriers and brain parenchyma considerations”

Pharmacol. Rev., 53, 569-596, 2001

Lin Ch.-J., Tai Y., Huang M.-T., Tsai Y.-F., Hsu H.-J., Tzen K.-Y. and Liou H.-H.

„Cellular localization of the organic cation transporters, OCT1 and OCT2, in brain microvessel endothelial cells and its implication for MPTP transport across the blood-brain barrier and MPTP-induced dopaminergic toxicity in rodents”

Journal of Neurochemistry, 114, 717-727, 2010

Lips K. S., Volk C., Schmitt B. M., Pfeil U., Arndt P., Miska D., Ermert L., Kummer W. and Koepsell H.

„Polyspecific cation transporters mediate luminal release of Acetylcholine from bronchial epithelium”

Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol., 33, 79-88, 2005

Lips K. S., Wunsch J., Zarghooni S., Bschleipfer T., Schukowski K., Weidner W., Wessler I., Schwantes U., Koepsell H. und Kummer W.

„Acetylcholine and molecular compounds of its synthesis and release machinery in the urothelium”

Europ. Urol., 52, 1042-1053, 2007

Marger M. D. and Saier M. H. J. R.

“A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyse uniport, symport and antiport”

Trends Biochem.,Sci., 18, 13-20, 1993

Martel F., Vetter T., Gründemann D., Azevedo I., Koepsell H. and Schömig E.

„Transport of small organic cations in the rat liver: the role of the organic cation transporter OCT1”

Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol., 354, 320-326, 1999

Martel F., Gründemann D., Calhau C. and Schömig E.

„Apical uptake of organic cations by human intestinal Caco-2 cells: putative involvement of ASF transporters“

Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 363, 40-49, 2001

Martel F., Keating E., Calhau C., Gründemann D., Schömig E. and Azevedo I.

„Regulation of human extraneuronal monoamine transporter (hEMT) expressed in HEK293 cells by intracellular second messenger systems”

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 364, 487-495, 2001

Masuda S., Terada T., Yonezawa A., Tanihara Y., Kishimoto K., Katsura T., Ogawa O. and Inui K. I.

“Identification and functional characterization of a new human kidney-specific H<sup>+</sup>/organic cation antiporter, kidney-specific multidrug and toxin extrusion”

J. Am. Soc. Nephrol., 17, 2127-2135, 2006

Meyer-Wentrup F., Karbach U., Gorboulev V., Arndt P. and Koepsell H.

„Membrane localization of the electrogenic cation transporter rOCT1 in rat liver“

Biochem. Biophys. Res. Commun., 248, 673-678, 1998

Minuesa G., Volk C., Molina-Arcas M., Gorboulev V., Erkizia I., Arndt P., Clotet B., Pastor-Anglada M., Koepsell H. and Martinez-Picado J.

“Transport of Lamivudine [(-)-β-L-2',3'-dideoxy-3'-thiacytine] and high-affinity interaction of nucleoside reverse transcriptase inhibitors with human organic cation transporters 1,2 and 3”

JPET, 329, 252-261, 2009

Mössner R., Henneberg A., Schmitt A., Syagailo Y., Grässle M., Hennig T., Simantov R., Gerlach M., Riederer P. and Lesch K. P.

„Allelic variation of serotonin transporter expression is associated with depression in Parkinson`s disease”

Molecular Psychiatry 6, 350-352, 2001

Mössner R., Dringen R., Persico A., Janetzky B., Okladnova O., Albert D., Götz M., Benninghoff J., Schmitt A., Gerlach M., Riederer P. and Lesch K. P.

„Increased hippocampal DNA oxidation in serotonin transporter deficient mice“

Journal of Neural. Transmission, 109, 557-565, 2002

Motohashi H., Sakurai Y., Saito H., Masuda S., Urakami Y., Goto M., Fukatsu A., Ogawa O. and Inui K.-I.

“Gene expression levels and immunolocalization of organic ion transporters in the human kidney”

J. Am. Soc. Nephrol., 13, 866-874, 2002

Müller M. and Jansen P. L.

„Molecular aspects of hepatobiliary transport“

Am. J. Physiol., 272, G1285-G1303, 1997

Müller J., Neubert R. H. and Brandsch M.

„Transport of the cationic drugs etilephrine and diphenhydramine at placental cell monolayers“

“Transporters 2002”, Chiemsee, 69, ABS, 2002

Müller J., Lips K. S., Metzner L., Neubert R. H., Koepsell H. and Brandsch M.  
„Drug specificity and intestinal membrane localisation of human organic cation transporters”

Biochem. Pharmacol., 70, 1851-1860, 2005

Nakayama H., Kitaichi K. and Ito Y.

“The role of organic cation transporter 3 in methamphetamine disposition and its behavioural response in rats”

Brain Res., 1184, 260-269, 2007

Neuhoff S., Ungell A. L., Zamora I. and Artursson P.

“pH-dependent bidirectional transport of weakly basic drugs across Caco-2 monolayers: implications for drug-drug interactions”

Pharm. Res., 20, 1141-1148, 2003

Nezu J., Tamai I., Oku A., Ohashi R., Yabuuchi H., Hashimoto N., Nikaido H., Sai Y., Koizumi A., Shoji Y., Takada G., Matsuishi T., Yoshino M., Kato H., Ohura T., Tsujimoto G., Hayakawa J., Shimane M. and Tsuji A.

“Primary systemic carnitine deficiency is caused by mutations in a gene encoding sodium ion-dependent carnitine transporter”

Nat. Genet., 21, 91-94, 1999

Nies A. T., Koepsell H., Winter S, Burk O., Klein K., Kerb R., Zanger U. M., Keppler D., Schwab M., Schaeffeler E., Dr. Margarete Fischer-Bosch Institute of Clinical Pharmacology, Stuttgart, Germany

“Expression of organic cation transporters OCT1 (SLC22A1) and OCT3 (SLC22A3) is affected by genetic factors and cholestasis in human liver”

Hepatology, 50(4), 1014-1016, 2009

Nies A. T., Koepsell H., Damme K., Schwab M., Dr. Margarete Fischer-Bosch Institute of Clinical Pharmacology, Stuttgart, Germany

„Organic cation transporters (OCTs, MATEs), in vitro and in evidence for the importance in drug therapy”

Handb. Exp. Pharmacol., 201, 105-67, 2011

Ogasawara M., Yamauchi K., Satoh Y-I., Yamaji R, Inui K., Jonker J. W., Schinkel A.H. and Maeyama K.

“Recent advances in molecular pharmacology of the histamine systems: organic cation transporters as a histamine transporter and histamine metabolism”

J. Pharmacol. Sci., 101, 24-30, 2006

Ohashi R., Tamai I., Inano A., Katsura M., Sai Y., Nezu J. and Tsuji A.

“Studies on functional sites of organic cation/carnitine transporter OCTN2 (SLC22A5) using a Ser467Cys mutant protein”

J. Pharmacol. Exp. Ther., 302, 1286-1294, 2002

Ohsiro N., Kobayashi Y., Tokuyama S., Sekine T., Endou H. and Yamamoto T.

„Molecular mechanism of drug transport“

Jpn. J. Pharmacol., 82, 155, 2000

Ohta K. Y., Inoue K., Hayashi Y. and Yuasa H.

“Molecular identification and functional characterization of rat MATE1 as an organic cation H<sup>+</sup> antiporter in the kidney”

Drug Metab. Dispos., 34, 1868-1874, 2006

Okabe M., Unno M., Harigae H., Kaku M., Okitsu Y., Sasaki T., Mizoi T., Shiiba K., Takanaga H., Terasaki T., Matsuno S., Sasaki I., Ito S. and Abe T.

“Characterization of the organic cation transporter SLC22A16: a doxorubicin importer”

Biochem. Biophys. Res. Commun., 333, 754-762, 2005

Otsuka M., Matsumoto T., Morimoto R., Arioka S., Omote H. and Moriyama Y.

“A human transporter protein that mediates the final excretion step for toxic organic cations”

Proc. Natl. Acad. Sci USA, 102, 17923-17928, 2005

Pelis R. M., Zhang X., Danqprapai Y. and Wright S. H.

“Cysteine accessibility in the hydrophilic cleft of the human organic cation transporter 2”

J. Biol. Chem., 281, 35272-35280, 2006

Peltekowa V. D., Wintle R. F., Rubin L. A., Amos C. I., Huang Q., Gu X., Newman B., Van Oene M., Cescon D., Greenberg G., Griffiths A. M., George-Hyslop P. H. and Siminovitch K. A.

“Functional variants of OCTN cation transporter genes are associated with Crohn disease”

Nat. Genet., 36, 471-475, 2004

Pentikaian P. J., Neuvonen P. J. and Penttila A.

“Pharmacokinetics of metformin after intravenous and oral administration to man”

Eur. J. Clin. Pharmacol., 16, 195-202, 1979

Pietig G., Mehrens T., Hirsch J. R., Cetinkaya I., Piechota H. and Schlatter E.

„Properties and regulation of organic cation transport in freshly isolated human proximal tubules”

J. Biol. Chem., 276, 33741-33746, 2001

Popp C., Gorboulev V., Müller T., Gorbunov D., Shatskaya N. and Koepsell H.

„Amino acids critical for substrate affinity of a rat organic cation transporter 1 line the substrate binding region in a model derived from the tertiary structure of lactose permease“

Mol. Pharmacol., 67, 1600-1611, 2005

Prasad P. D., Leibach F. H., Mahesh V. B. and Ganapathy V.

“Human placenta as a target organ for cocaine action: interaction of cocaine with the placental serotonin transporter”

Placenta, 15, 267-278, 1994



Pritchard J. B. and Miller D. S.

“Intercellular compartmentation of organic anions and cations during renal secretion”  
Cell Physiol. Biochem., 6, 50-59, 1996

Rappa G., Finch R. A., Sartorelli A. C. and Lorico A.

“New insights into the biology and pharmacology of the multidrug resistance protein (MRP) from gene knockout models”  
Biochem. Pharmacol., 58, 557-562, 1999

Roch-Ramel F., Besseghir K. and Murer H., Windhager E. E. editors

“Renal excretion and tubular transport of organic anions and cations”  
In Windhager E. E. (ed) “Handbook of physiology”  
Oxford University Press, New York Oxford, 2189-2262, 1992

Russ H., Gliese M., Sonna J. and Schömig E.

“The extraneuronal transport mechanism for noradrenaline (uptake<sub>2</sub>) avidly transports 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>)”  
Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol., 346, 158-165, 1992

Russ H, Engel W. and Schömig E.

„Isocyanines and pseudoisocyanines as a novel class of potent noradrenaline transport inhibitors: synthesis, detection and biological affinity”  
J. Med. Chem., 36, 4208-4213, 1993

Russ H., Staust K., Martel F., Gliese M. and Schömig E.

„The extraneuronal transporter for monoamine transmitters exists in cells derived from human central nervous system glia”  
Eur. J. Neurosci., 8, 1256-1264, 1996

Sachs L.

“Angewandte Statistik”  
Springer Verlag, Berlin, 7.Auflage, 1992

Sata R., Ohtani H., Tsujimoto M., Murakami H., Koyabu N., Nakamura T., Uchiumi T., Kuwano M., Nagata H., Tsukumori K., Nakano H. and Sawada Y.

“Functional analysis of organic cation transporter 3 expressed in human placenta”

J. Pharmacol. Exp. Ther., 315, 880-895, 2005

Scaglia F., Wang Y., Singh R. H., Dembure P. P., Pasquali M., Fernhoff P. M. and Longo N.

“Defective urinary carnitine transport in heterozygotes for primary carnitine deficiency”

Genet. Med., 1, 34-39, 1998

Schinkel A. H. and Jonker J. W.

„Mammalian drug efflux transporters of the ABC binding cassette (ABC) family: an overview”

Adv. Drug Deliv. Rev., 55, 3-29, 2003

Schlatter E., Mönnich V., Cetinkaya I., Mehrens T., Ciarimboli G., Hirsch J. R., Popp C. and Koepsell H.

„The organic cation transporters rOCT1 and hOCT2 are inhibited by cGMP“

J. Membrane Biol., 189, 237-244, 2002

Schmitt A., Mössner R., Gossmann A., Fischer I. G., Gorboulev V., Murphy D. L., Koepsell H. and Lesch K. P.

“An organic cation transporter capable of transporting serotonin is upregulated in serotonin transporter-deficient mice”

J. Neurosci. Research, 71, 701-709, 2003

Schmitt B. M. and Koepsell H.

„Alkali cation binding and permeation in the rat organic cation transporter rOCT2“

Biol. Chem., 280, 24481-24490, 2005

Schmitt B. M., Gorbunov D., Schlachtbauer P., Egenberger B., Gorboulev V., Wischmeyer E., Müller T. and Koepsell H.

„Organic cation transporters OCT1, 2 and 3 mediate high-affinity transport of the mutagenic vital dye ethidium in the kidney proximal tubule”

Am. J. Physiol. Renal Physiol., 296, 709-722, 2009

Schneider E., Machavoine F., Pleau J.-M., Bertron A.-F., Thurmond R. L., Ohtsu H., Watanabe T., Schinkel A. H. and Dy M.

“Organic cation transporter 3 modulates murine basophil functions by controlling intercellular histamine levels”

J. Exp. Med., 202, 387-393, 2005

Schömig E., Russ H., Staudt K., Martel F., Gliese M. and Gründemann D.

„The extraneuronal monoamine transporter exists in human central nervous system glia”

Adv., Pharmacol., 42, 356-359, 1998

Seithel A., Karlsson J., Hilgendorf C., Björquist A. and Ungell A.-L.

„Variability in mRNA expression of ABC- and SLC-transporters in human intestinal cells: comparison between human segments and Caco-2-cells”

J. Pharm. Sci., 28, 291-299, 2006

Seth P., Wu X., Huang W., Leibach F. and Ganapathy V.

„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, 1999

Shang T., Uihlein A. V., Van Asten J., Kalyanaraman B. and Hillard C. J.

„1-Methyl-4-Phenylpyridinium accumulates in cerebellar granule neurons via organic cation transporter 3”

J. Neurochem., 85, 358-367, 2003

Shu Y., Bello C. L., Mangravite L. M., Feng B. and Giacomini K. M.

“Functional characteristics and steroid hormone-mediated regulation of an organic cation transporter in madin-darby canine kidney cells”

J. Pharmacol. Exp. Ther., 299, 392-398, 2001

Shu Y., Leabman M. K., Feng B., Mangravite L. M., Huang C. C., Stryke D., Kawamoto M., Johns S. J., DeYoung J., Carlson E., Ferrin T. E., Herskowitz I. and Giacomini K. M.

“Pharmacogenetics of membrane transporters investigators. Evolutionary conservation predicts function of variants of the human organic cation transporter OCT1”

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100, 5902-5907, 2003

Shu Y., Leabman M. K., Feng B., Mangravite L. M., Huang C. C., Stryke D., Kawamoto M., Johns S. J., De Young J. and Carlson E. J

“Evolutionary conservation predicts function of variants of the human organic cation transporter OCT1”

Proc. Natl. Acad. Sci USA, 100, 5902-5907, 2003

Sinclair C. J., Chi K. D., Subramanian V., Ward K. L. and Green R. M.

“Functional expression of a high affinity mammalian hepatic choline/organic cation transporter”

J. Lipid Res., 41, 1841-1848, 2000

Slitt A. L., Cherrington N. J., Hartely D. P., Leazer T. M. and Klaase C. D.

“Tissue distribution and renal developmental changes in rat organic cation transporter mRNA levels”

Drug Metab Dispos., 30, 212-219, 2002

Sperber I.

“The mechanism of renal excretion of some detoxication products in the chicken”

Proc. Int. Congr. Physiol., 17, 217-218, 1947

Streich S., Bruss M. and Bönisch H.

„Expression of the extraneuronal transporter (uptake2) in human glioma cells”

Naunyn Schmiedeberg`s arch. Pharmacol., 353, 328-333, 1996

Suhre W. M., Ekins S., Chang Ch., Swaan P. W. and Wright S. H.

“Molecular determinants of substrate/inhibitor binding to the human and rabbit organic cation transporters hOCT2 and rOCT2”

Mol. Pharmacol., 67, 1067-1077, 2005

Sweet D. H., Miller D. S. and Pritchard J. B.

“Ventricular choline transport – a role for organic cation transporter 2 expressed in choroid plexus”

J. Biol. Chem., 276 (45), 41611-41619, 2001

Tahara H., Kusuhara H., Endou H., Koepsell H., Imaoka T., Fuse E. and Sugiyama Y.

“A species difference in the transport activities of H2 receptor antagonists by rat and human renal organic anion and cation transporters”

J. Pharmacol. Exp. Ther., 315, 337-345, 2005

Takeda M., Khamdang S., Narikawa S., Kimura H., Kobayashi Y., Yamamoto T., Cha S. H., Sekine T. and Endou H.

“Human organic anion transporters and human organic cation transporters mediate renal antiviral transport”

J. Pharmacol. Exp. Ther., 300, 918-924, 2002

Tamai I., Yambuuchi H., Nezu J., Sai Y., Oku A., Shimane M. and Tsuji A.

“Cloning and characterization of a novel human pH-dependent organic cation transporter, OCTN1”

FEBS Lett., 419, 107- 111, 1997

Tamai I., Ohashi R., Nezu J., Yabuuchi H., Oku A., Shimane M., Sai Y. and Tsuji A.  
“Molecular and functional identification of sodium ion-dependent, high affinity human  
carnitine transporter OCTN2”

J. Biol. Chem., 273, 20378-20382, 1998

Tein I., De Vivo D. C., Bierman F., Pulver P., De Meileir L. J., Cvitanovic-Sojat L.,  
Pagon R. A., Bertini E., Dionisi-Vici C., Servidei S. and Dimauro S.

“Impaired skin fibroblast carnitine intake in primary systemic carnitine deficiency  
manifested by childhood carnitine-responsive cardiomyopathy”

Pediat. Res., 28, 247-255, 1990

Terada T., Masuda S., Asaka J.-I., Tsuda M. Katsura T. and Inui K.-I.

“Molecular cloning, functional characterization and tissue distribution of rat H<sup>+</sup>/organic  
cation antiporter MATE1”

Pharm. Res., 23, 1696-1701, 2006

Torres G. E., Gainetdinov R. R. and Caron M. G.

“Plasma membrane monoamine transporters: structure, regulation and function”

Nat. Rev. Neurosci., 4, 13-25, 2003

Thomas M., Tikellis C., Kantharidis P., Burns W., Cooper M. and Forbes J.

“The role of advanced glycation in reduced organic cation transport associated with  
experimental diabetes”

J. Pharmacol. Exp. Ther., 311, 456-466, 2004

Treem W. R., Stanley C. A., Finegold D. N., Hale D. E. and Coates P. M.

“Primary carnitine deficiency due to a failure of carnitine transport in kidney, muscle  
and fibroblasts”

New Eng. J. Med., 319, 1331-1336, 1988

Ullrich K. J.

“Renal transporters for organic anions and organic cations - structural requirements  
for substrates”

J. Membr., Biol., 158, 95-107, 1997

Urakami Y., Okuda M., Masuda S., Saito H. and Inui K.-J.

“Functional characteristics and membrane localization of rat multispecific organic cation transporters, OCT1 and OCT2, mediating tubular secretion of cationic drugs”  
J. Pharmacol. Exp. Ther., 287, 800-805, 1998

Urakami Y., Nakamura N., Takahashi K., Okuda M., Saito H., Hashimoto Y. and Inui K.

“Gender differences in expression of organic cation transporter OCT2 in rat kidney”  
FEBS Lett., 461, 339-342, 1999

Urakami Y., Okuda M., Saito H. and Inui K.-J.

“Hormonal regulation of organic cation transporter OCT2 expression in rat kidney”  
FEBS Lett., 473, 173-176, 2000

Urakami Y., Okuda M., Masuda S., Akazawa M., Saito H. and Inui K. I.

“Distinct characteristics of organic cation transporters, OCT1 and OCT2 in the basolateral membrane of renal tubules”  
Pharmaceutical Research, 18, 1528-1534, 2001

Urakami Y.

“Molecular diversity of organic cation transporter (OCT) mediating renal excretion of drugs”  
Yakugaku Zasshi, 122, 957-965, 2002

Van Montfoort J. E., Müller M., Groothuis G. M., Meijer D. K., Koepsell H. and Meier P. J.

“Comparison of “type I” and “type II” organic cation transport by organic cation transporters and organic anion-transporting polypeptides”  
J. Pharmacol. Exp. Ther., 298, 110-115, 2001

Van Montfoort J. E., Hagenbuch B., Groothuis G. M., Koepsell H., Meier P. J. and Meijer D. K. F.

“Drug uptake systems in liver and kidney”  
Curr. Drug Metab., 4, 185-211, 2003

Velazquez E. M., Mendoza S., Hamer T., Sosa F. and Glueck C. J.

“Metformin therapy in polycystic ovary syndrome reduces hyperinsulinemia, insulin resistance, hyperandrogenemia, and systolic blood pressure, while facilitating normal menses and pregnancy”

Metabolism, 43, 647-654, 1994

Vialou V., Amphoux A., Zwart R., Giros B. and Gautron S.

“Organic cation transporter 3 (SLC22A3) is implicated in salt-intake regulation”

J. Neurosci, 24, 2846-2851, 2004

Vialou V., Balasse L., Callebert J., Launay J.-M., Giros B. and Gautron S.

“Altered aminergic neurotransmission in the brain of organic cation transporter 3-deficient mice”

Journal of Neurochemistry, 106, 1471-1482, 2008

Volk C., Gorboulev V. Budiman T., Nagel G. and Koepsell H.

“Different affinities of inhibitors to the outwardly and inwardly directed substrate binding site of the organic cation transporter 2”

Mol. Pharmacol., 64, 1037-1047, 2003

Volk C., Gorboulev V., Kotzsch A., Müller T. and Koepsell H.

„Five amino acids in the intermost cavity of the substrate binding cleft of organic cation transporter 1 interact with the extracellular and intracellular corticosterone”

Mol. Pharmacol., 76, 275-289, 2009

Wang D. S., Jonker J. W., Kato Y., Kusuhara H., Schinkel A. H. and Sugiyama Y.

„Involvement of organic cation transporter 1 in hepatic and intestinal distribution of metformin“

Pharmacol. Exp. Ther., 302, 510-515, 2002



Wessler I., Roth E., Deutsch C., Brockerhoff P., Bittinger F., Kirkpatrick C. J. and Kilbinger H.

„Release of non- neuronal Acetylcholine from the isolated human placenta is mediated by organic cation transporters”

Brit. J. Pharmacol., 134, 951-956, 2001

Wessler I., Herschel S., Bittinger F. and Kirkpatrick C. J.

„Release of non-neuronal acetylcholine from the isolated human placenta is affected by antidepressants“

Life Sciences, 10, 1016-1020, 2007

Wright S. H. and Dantzer W. H.

“Molecular and cellular physiology of renal organic cation and anion transport”

Physiol. Rec. 84, 987-1042, 2004

Wu X., Kekuda R., Huang W., Fei Y.-J., Leibach F. H., Chen J., Conway S. J. and Ganapathy V.

“Identity of the organic cation transporter OCT3 as the extraneuronal monoamine transporter (uptake2) and the evidence for the expression of the transporter in the brain”

J. Biol. Chem., 273, 32776-32786, 1998a

Wu X., Prasad P. D., Leibach F. H. and Ganapathy V.

“cDNA sequence, transport function and genomic organization of human OCTN2, a new member of the organic cation transporter family”

Biochem. Biophys. Res. Commun., 246, 589-595, 1998b

Wu X., Huang W., Prasad P. D., Seth P., Rajan D. P., Leibach F. H., Chen J., Conway S. J. and Ganapathy V.

“Functional characteristics and tissue distribution pattern of organic cation transporter 2 (OCTN2), an organic cation/ carnitine transporter”

J. Pharmacol. Exp. Ther., 290, 1482-1492, 1999

Wu X., Huang W., Ganapathy M. E., Wang H., Kekuda R., Conway S. J., Leibach F. H. and Ganapathy V.

“Structure, function and regional distribution of the organic cation transporter hOCT3 in the kidney”

Am. J. Physiol. Renal Physiol., 279, 449-458, 2000a

Wu X., George R. L., Huang W., Wang H., Conway S. J., Leibach F. H. and Ganapathy V.

„Structural and functional characteristics and tissue distribution pattern of rat rOCTN1, an organic cation transporter, cloned from placenta”

Biochem. Biophys. Acta, 1466, 315-327, 2000b

Yonezawa A., Masuda S., Nishihara K., Yano I., Katsura T. and Inui K.-I.

“Association between tubular toxicity of cisplatin and expression of organic cation transporter rOCT2 (SLC22A2) in the rat”

Biochem Pharmacol., 70, 1823-1831, 2005

Yonezawa A., Masuda S., Yokoo S., Katsura T. and Inui K.-I.

“Cisplatin and oxaliplatin, but not nedaplatin, are substrates of human organic cation transporters (SLC22A1-3) and multidrug and toxin extrusion family”

J. Pharmacol. Exp. Ther., 319, 879-886, 2006

Zhang L., Dresser M. J., Gray A. T., Yost S. C., Terashita S. and Giacomini K. M.

“Cloning and functional characterization of a human liver organic cation transporter”

Mol. Pharmacol., 52, 913-921, 1997

Zhang L., Brett C. M., Giacomini K. M.

„Role of organic cation transporters in drug absorption and elimination”

Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 38, 431-460, 1998a

Zhang L., Schaner M. E. and Giacomini K. M.

„Functional characterization of an organic cation transporter (hOCT1) in a transiently transfected human cell line (HeLa)“

J. Pharmacol. Exp. Ther., 286, 354-361, 1998b

Zhang L., Gorset W., Dresser M. J. and Giacomini K. M.

„The interaction of n-tetraalkylammonium compounds with a human organic cation transporter, hOCT1”

J. Pharmacol. Exp. Ther., 288, 1192-1198, 1999

Zhang S., Lovejoy K. S., Shima J. E., Lagpacan L. L., Shu Y., Lapuk A., Chen Y., Komori T., Gray J. W., Chen X., Lippard S. J. and Giacomini J. M.

“Organic cation transporters are determinants of oxaliplatin cytotoxicity”

Cancer Res., 66, 8847-8857, 2006

Zhang X., Shirahatti N. V., Mahadevan D. and Wright S. H.

“A conserved glutamate residue in transmembrane helix 10 influences the substrate specificity of rabbit OCT2 (SLC22A2)”

Biol. Chem., 280, 34813-34822, 2005

Zwart R., Verhaagh S., Buitelaar M., Popp-Snijders C. and Barlow D. P.

„Impaired activity of the extraneuronal monoamine transporter system known as uptake-2 in rOCT3/SLC22A3-deficient mice“

Mol. Cell Biol., 21, 4188-4196, 2001

## Abkürzungsverzeichnis

A	Fläche
Abb	Abbildung
AchE	Acetylcholinesterase
ARC	American Radiolabeled Chemicals
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
Bq	Bequerel
CE	Kapillarelektrophorese
Ci	Curie ( $3,7 \times 10^{10}$ Bequerel)
cpm	counts per minute (gezählte radioaktive Zerfälle pro Minute)
DA	Dopamin
DMH	Dorsomedialer Hypothalamus
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dpm	desintegrations per minute
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMT	Extraneuronaler Monoamintransporter
EtOH	Ethanol
g	Gramm
GFL	Gesellschaft für Labortechnik
GTP	Guanosin-5'-Triphosphat
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
h	Stunde
H <sup>+</sup>	Proton
HEK293	human embryonic kidney cells
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Bicarbonat
HI	Histamin
hOCT(N)	humane organischer Kationentransporter
IC <sub>50</sub>	Konzentration eines Hemmstoffes bei halbmaximaler Inhibition/Halbhemmkonzentration
kDa	kiloDalton
k. A.	keine Angaben
K <sub>i</sub>	Inhibitionskonstante eines Hemmstoffes/Hemmkonstante
K <sub>m</sub>	Michaelis-Menten-Konstante
Konz	Konzentration
i.d. R.	in der Regel
M	molar
MBq	MegaBequerel
MDR	multidrug resistance protein

MEM	Minimal Essential Medium
MFS	major facilitator superfamily
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minute
mM	millimolar
mOCT	Organischer Kationentransporter der Maus
mRNA	messenger ribonucleic acid (Boten-Ribonukleinsäure)
MPP <sup>+</sup>	N-Methyl-4-Phenylpyridinium
MW +/- SEM	Mittelwert +/- Standardwert des Mittels
N	Anzahl der (Parallel)Bestimmungen/Experimente
NA	Noradrenalin
NaCl	Natriumchlorid
Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase	Natrium/Kalium-Adenosintriphosphatase
n. b.	nicht bestimmt
n. d.	nicht detektiert
NMN <sup>+</sup>	N-Methylnikotinamid
OAT	organischer Anionentransporter
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
P	Hillskoeffizient
p. a.	pro analysis (zur Analyse)
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Aciditätskonstante
pK <sub>A</sub>	Dissoziationskonstante, Säurekonstante
pK <sub>B</sub>	Basenkonstante
PNS	Peripheres Nervensystem
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
rOCT	organischer Kationentransporter der Ratte
RT	Raumtemperatur
S	Substratkonzentration
s	Sekunde
s. o.	siehe oben
SLC22-Familie	solute carrier family 22
SD	Standardabweichung (standard deviation)
S. E.	Standardfehler
SERT	Serotonintransporter
sog	sogenannte
Tab	Tabelle
TBuA	Tetrabutylammonium
TCA	Trichloressigsäure

TEA	Tetraethylammonium
TMA	Tetramethylammonium
TMD	Transmembrandomäne
TPeA	Tetrapentylammonium
Tris	Tris (hydroxymethyl)- Aminomethanchlorid
U	Units
u. a.	unter anderem
$V_{max}$	Maximalgeschwindigkeit des Transporters
vol	Volumen
WT	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil
5-HT	5-Hydroxytryptamin
5-HTT	Serotonintransporter
ZNS	Zentrales Nervensystem
zzgl	zuzüglich

$$K_i = IC_{50} / (1 + [S] / K_m)$$

## **8. Erklärung**

Nach §10 (5) der Promotionsordnung des Fachbereiches Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen:

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Sonja Utner

## **9. Danksagung**

Zum Abschluss meiner Dissertation möchte ich mich bei den Menschen bedanken, die mich bei meiner Arbeit unterstützt und mit gutem Rat und Hilfestellungen zur Seite gestanden haben.

Zu allererst möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. med. Hermann Koepsell bedanken, der mir dieses Thema überlassen und auch die Forschungsarbeit in seinem Institut für Anatomie und Zellbiologie der Julius-Maximilian-Universität Würzburg ermöglicht hat. Er hat meine Arbeit von Anfang an mit großem Interesse begleitet und mir Motivation und Hilfestellungen gegeben. Zudem durfte ich in seinem Forschungsteam, welches mich rasch integriert hatte, nähere Einblicke in wissenschaftliches Arbeiten und neue Fertigkeiten erlernen.

Aus seinem Team bedanke ich mich vor allem den MTAs Ursula Roth und Irina Schatz, die mich in die Techniken der Transportmessungen und der statistischen Auswertungen unterwiesen haben. Auch bei Problemen sind sie mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden. Doch auch bei allen anderen Mitarbeitern des Lehrstuhls möchte ich mich für die nette Zeit im Labor bedanken.

Besonders bedanken möchte ich mich ebenso bei Herrn Professor Dr. med. vet. Ernst Petzinger, der die Betreuung meiner Dissertation an der Tierärztlichen Fakultät der Justus-Liebig-Universität Gießen ohne zu zögern übernommen hat. Für dieses Engagement und das mir entgegengebrachte Vertrauen ein ganz herzliches Dankeschön!

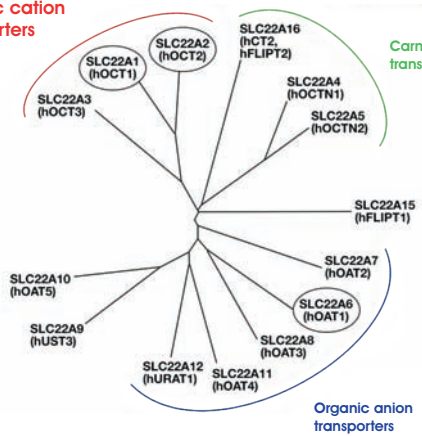
Zu guter Letzt danke ich Herrn Dr. Christopher Volk für seine vielen Diskussionen während des Zusammenschreibens dieser Dissertation.

Vielen Dank!

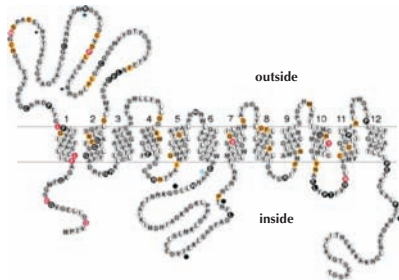




**Organic cation transporters**



Quelle: Koepsell unpublished data, Vortrag in Mannheim 2010



Quelle: Koepsell et al 2003



*edition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5766-4



© psdesign1 - Fotolia.com