

Transport kationischer Arzneistoffe an den Epithelien von Darm und Plazenta

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Frau Dipl.-Pharm. Johanna Müller
geb. am 27.09.1976 in Braunschweig

Gutachter:

1. Prof. Dr. R. Neubert, MLU Halle-Wittenberg
2. PD Dr. habil. M. Brandsch, MLU Halle-Wittenberg
3. Prof. Dr. H. Koepsell, Julius-Maximilians Universität Würzburg

Halle (Saale), 10.03.2005

urn:nbn:de:gbv:3-000008188

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000008188>]

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|------------|
| Abkürzungsverzeichnis | III |
| 1 Einleitung und Zielstellung | 1 |
| 2 Theoretischer Teil..... | 3 |
| 2.1 Darm- und Plazentaepithelien als physiologische Barrieren | 3 |
| 2.2 Transportmechanismen durch biologische Membranen | 5 |
| 2.3 Organische Kationentransporter | 6 |
| 2.3.1 Struktur..... | 7 |
| 2.3.2 Expression | 10 |
| 2.3.3 Substratspezifität..... | 10 |
| 2.4 Untersuchte kationische Arzneistoffe..... | 11 |
| 3 Material und Methoden..... | 16 |
| 3.1 Material..... | 16 |
| 3.2 Methoden | 17 |
| 3.2.1 Experimentelle Methoden | 17 |
| 3.2.1.1 Zellzucht und Subkultivierung der verwendeten Zell-Linien | 17 |
| 3.2.1.2 Untersuchung der zellulären Aufnahme radioaktiver und nichtradioaktiver Substanzen | 19 |
| 3.2.1.3 Bestimmung transepithelialer Fluxe durch Caco-2-Monolayer | 22 |
| 3.2.1.4 Präparation von Caco-2-Zellen für Immunocytochemie | 23 |
| 3.2.2 Analytische Methoden..... | 23 |
| 3.2.3 Mathematische Methoden | 26 |
| 4 Ergebnisse..... | 30 |
| 4.1 Verträglichkeit und Stabilität der untersuchten Arzneistoffe..... | 30 |
| 4.2 Transport am Dünndarmepithel | 33 |
| 4.2.1 Charakterisierung des [³ H]MPP ⁺ -Transportes an Caco-2-Zellen | 33 |
| 4.2.2 Hemmung der [³ H]MPP ⁺ -Aufnahme und des [³ H]MPP ⁺ -Fluxes an Caco-2-Monolayern durch die untersuchten Arzneistoffe | 34 |
| 4.2.3 Flux der kationischen Arzneistoffe durch Caco-2-Monolayer | 37 |
| 4.2.4 Aufnahme der kationischen Arzneistoffe in Caco-2-Monolayer..... | 40 |
| 4.3 Transport am Plazentaepithel | 44 |
| 4.3.1 Charakterisierung des [³ H]Cholintransportes an Plazentazellen (BeWo und JEG-3)..... | 44 |
| 4.3.2 Hemmung des [³ H]Cholintransportes durch die Arzneistoffe..... | 49 |
| 4.3.3 Charakterisierung des [³ H]Clonidintransportes an JEG-3-Zellen | 53 |
| 4.3.4 Hemmung des [³ H]Clonidintransportes durch die Arzneistoffe..... | 56 |

| | |
|---|------------|
| 4.3.5 Aufnahme von [³ H]MPP ⁺ in Plazentazellen (BeWo, JEG-3 und JAR) | 58 |
| 4.3.6 Aufnahme der kationischen Arzneistoffe in Plazentazellen (BeWo, JEG-3)..... | 60 |
| 4.4 Transport an Keratinozyten: Hemmung der [³H]MPP⁺-Aufnahme durch Inhibitoren der organischen Kationentransporter | 65 |
| 4.5 Transportstudien an hOCT1-, hOCT2- oder hOCT3-transfizierten Zell-Linien | 66 |
| 4.5.1 Charakterisierung des [³ H]MPP ⁺ -Transportes an HEK-hOCT1, HEK-hOCT2 und CHO-hOCT3... 66 | |
| 4.5.2 Bestimmung der Affinität ausgewählter Arzneistoffe und kationischer Modellsstrate an den organischen Kationentransportern hOCT1, hOCT2 und hOCT3..... | 71 |
| 4.5.3 Untersuchung des Transportes der Arzneistoffe und Modellsstrate durch die hOCTs | 72 |
| 4.6 Expression und subzelluläre Lokalisation der hOCTs in den verwendeten Zell-Linien | 77 |
| 5 Diskussion | 80 |
| 5.1 Transport der Arzneistoffe und Modellsstrate am Dünndarmepithel..... | 80 |
| 5.2 Transport von Cholin und Clonidin am Plazentaepithel..... | 86 |
| 5.3 Transport von MPP ⁺ an nativen humanen epidermalen Keratinozyten..... | 91 |
| 5.4 Transport der Arzneistoffe und Modellsstrate durch hOCT1, hOCT2 oder hOCT3 | 92 |
| 6 Zusammenfassung | 98 |
| Literaturverzeichnis | 101 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------------|---|
| A | Fläche |
| ATRP | Atropin |
| BUTS | Butylscopolaminium |
| CE | Kapillarelektrophorese |
| CHID | Chinidin |
| CHIN | Chinin |
| CLON | Clonidin |
| DIPH | Diphenhydramin |
| dpm | desintegration per minute |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| ETIL | Etilefrin |
| HEPES | N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure |
| hOCT(N) | humaner organischer Kationentransporter |
| IC ₅₀ | Halbhemmkonzentration |
| J | transepithelialer Flux |
| k.A. | keine Angaben |
| K _i | Hemmkonstante |
| K _t | Michaelis-Menten-Konstante |
| MEM | Minimal Essential Medium |
| MES | 2-(N-morpholino)ethansulfonsäure |
| mOCT | organischer Kationentransporter der Maus |
| MPP ⁺ | N-Methyl-4-phenylpyridinium |
| n | Anzahl der Parallelbestimmungen |
| n.b. | nicht bestimmt |
| n.d. | nicht detektiert |
| p | Irrtumswahrscheinlichkeit |
| P | Hillkoeffizient |
| log P _{O/W} | Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizient |
| PBS | phosphatgepufferte Salzlösung |
| pK _A | Dissoziationskonstante, Säurekonstante |
| pK _B | Basenkonstante |
| r | Regressionskoeffizient |
| r ² | Korrelationskoeffizient |
| RANT | Ranitidin |
| rOCT | organischer Kationentransporter der Ratte |
| S | Substratkonzentration |
| S.E. | Standardfehler |
| TBA | Tetrabutylammonium |
| TCA | Trichloressigsäure |
| TEA | Tetraethylammonium |
| TEER | transepithelialer elektrischer Widerstand |

| | |
|------------------|--|
| TMA | Tetramethylammonium |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)-aminomethanchlorid |
| V_{\max} | Maximalgeschwindigkeit des Transportes |
| λ_{\max} | Absorptionsmaximum |
| z.T. | zum Teil |

Weitere Abkürzungen werden in den entsprechenden Kapiteln erläutert.

1 Einleitung und Zielstellung

Der Dünndarm stellt das Hauptresorptionsorgan für oral applizierte Arzneistoffe dar. Vor der Aufnahme der Pharmaka in den Blutkreislauf muss das intestinale Epithelium als Barriere überwunden werden. Neben einfacher Diffusion durch diese Gewebsschicht gelangen Arzneistoffe auch über spezifische physiologische Transportsysteme in die Blutbahn. So transportiert der in der Bürstensaummembran des Intestinums lokalisierte H⁺/Peptidsympporter PEPT1 β -Lactam-Antibiotika (Ganapathy, M.E. *et al.* 1995), ACE-Hemmer (Zhu *et al.* 2000) und Virusstatika (Han *et al.* 1998). Andererseits wird die orale Bioverfügbarkeit von Arzneistoffen durch Membrantransporter auch limitiert: Das ebenfalls in der Bürstensaummembran des Intestinums exprimierte P-Glykoprotein sezerniert in die Epithelzellen resorbierte Pharmaka unterschiedlicher Substanzklassen wie Digoxin (Mayer *et al.* 1996), Vinblastin (Hunter *et al.* 1991) und Cyclosporin A (Augustijns *et al.* 1993) aktiv in das intestinale Lumen. Von spezifischen intestinalen Transportsystemen als Substrate akzeptierte Prodrugs zeigen nach oraler Gabe gegenüber der Muttersubstanz eine deutlich erhöhte Bioverfügbarkeit (Friedman und Amidon 1989; Tsuji *et al.* 1990). Daher ist die Aufklärung solcher Transportmechanismen für die zielgerichtete Arzneistoff-Entwicklung von großer Bedeutung.

In der vorliegenden Arbeit wird der Transport oral applizierter, basischer Arzneistoffe wie Etilefrin, Clonidin, Diphenhydramin und Ranitidin an der intestinalen Kolonkarzinomzell-Linie Caco-2 untersucht. Diese Pharmaka liegen bei physiologischem pH-Wert zum Großteil als Kationen vor. Daher lässt sich die orale Bioverfügbarkeit mit einfacher Diffusion durch die Dünndarmmucosa, die für hydrophile und ionisierte Stoffe schwer passierbar ist, nicht ausreichend erklären. Die teilweise positive Ladung macht die Substanzen zu potenziellen Substraten für Transportsysteme, die für die Resorption bzw. Sekretion exogener bzw. endogener organischer Kationen verantwortlich sind (Koepsell 1998; Koepsell *et al.* 1999). Hieraus ergab sich die Fragestellung nach der Interaktion dieser Arzneistoffe mit den organischen Kationentransportern hOCT1, hOCT2 und hOCT3 an überexprimierenden Systemen. Hinsichtlich konkreter Schlussfolgerungen bezüglich der in Caco-2-Zellen beteiligten Transportsysteme war der Nachweis von Expression und die subzelluläre Lokalisation dieser Transportproteine mithilfe spezifischer Antikörper notwendig.

Für die Entwicklung des Fetus ist der Transfer von Nährstoffen über die Plazenta absolut notwendig. Ein ausreichendes Nährstoffangebot wird unter anderem durch spezifische Transportsysteme in der Bürstensaum- sowie in der Basalmembran der Plazenta gewährleistet. Viele dieser Transportsysteme interagieren neben ihren physiologischen Substraten allerdings auch mit Xenobiotika. Beispielsweise inhibiert Kokain kompetitiv den durch das Transportprotein SERT vermittelten Serotonintransport (Prasad *et al.* 1994). Erwiesenerma-

ßen akzeptieren die in der Plazenta lokalisierten Monocarboxylattransporter (Price *et al.* 1998) neben Laktat und Pyruvat das Antibiotikum Cefdinir als Substrat (Tsuji *et al.* 1993) und interagieren mit Ibuprofen (Ogihara *et al.* 1996). Diese Interaktionen haben möglicherweise Einfluss auf das Wachstum des Fetus: Der durch Kokain reduzierte Serotonintransport könnte eine Konstriktion der plazentalen Gefäße und so einen geringeren Blutfluss in Richtung des Fetus auslösen (Ganapathy *et al.* 1999). Das in der Bürstensaummembran der Plazenta exprimierte P-Glykoprotein schützt einerseits den Fetus durch aktive Sekretion aufgenommener Xenobiotika (Lankas *et al.* 1998 ; Smit *et al.* 1999), erschwert aber andererseits die Therapie fetaler Tachykardie mit Digoxin (Ito 2001). Die Untersuchung der für Arzneistoffe relevanten plazentalen Transportmechanismen erscheint umso wichtiger, da ungefähr 66 % der Medikamente, die z.B. auch Frauen ohne Wissen ihrer Schwangerschaft einnehmen, nicht an dieser Gruppe getestet wurden (Sannerstedt *et al.* 1996).

Ein weiterer wichtiger Nährstoff für das Wachstum des fetalen Organismus ist das permanente Kation Cholin (Zeisel 1992). Der Fetus hat nur geringe Kapazitäten zur Cholinsynthese und wird daher durch Reserven aus der mütterlichen Leber versorgt (Zeisel *et al.* 1995). Die effiziente Aufnahme der Substanz in die fetale Zirkulation erfolgt durch ein bisher nicht kloniertes, funktionell charakterisiertes Cholintransportsystem in der humanen Plazenta (Sweiry *et al.* 1986). Die Interaktion kationischer Arzneistoffe mit diesem Transportsystem kann daher von therapeutischer Relevanz sein und wurde in der vorliegenden Arbeit an humanen Plazentazell-Linien untersucht. Darüber hinaus wurde die Aufnahme der Pharmaka in die Plazentazell-Linien charakterisiert.

In der vorliegenden Arbeit werden daher Untersuchungen zu folgenden Themenkomplexen in den Mittelpunkt gestellt:

- Expression und subzelluläre Lokalisation der Transportproteine hOCT1, hOCT2 und hOCT3 in Caco-2-Zellen
- Transport kationischer Modellsubstrate und Arzneistoffe an dieser Zell-Linie
- Transport kationischer Modellsubstrate und Arzneistoffe an den humanen Plazentazell-Linien BeWo und JEG-3
- Interaktion und Transport kationischer Arzneistoffe an Zell-Linien, die hOCT1, hOCT2 und hOCT3 heterolog überexprimieren

2 Theoretischer Teil

2.1 Darm- und Plazentaepithelien als physiologische Barrieren

Die Hauptaufgaben von Trennepithelien liegen in ihrer Barrierefunktion und dem Transport von Molekülen. So wird unter anderem der für den Organismus wichtige kontrollierte Stoffaustausch mit der Umgebung durch selektive Passage von Substanzen gewährleistet. Die Zellen der Epithelien sind miteinander über Schlussleisten (tight junctions) verbunden, die permeabel für Substanzen mit einem Durchmesser bis zu 0,8 nm sind. Außerdem weist dieser Zelltyp eine polare Struktur auf: Die apikale Membran bildet fingerartige Ausstülpungen (Mikrovilli) und grenzt die Zelle als funktionelle Außenseite gegen das Lumen ab. Zur serosalen Seite wird die Zelle durch die basolaterale Membran begrenzt.

Das Dünndarmepithel

Die physiologische Funktion der Dünndarmschleimhaut besteht in der Resorption von Nährstoffen. Durch Mehrfachfaltung (zirkuläre Kerckringfalten, Darmzotten und Mikrovilli des Darmepithels) kommt eine Vergrößerung der lumenbegrenzenden Dünndarmoberfläche um den Faktor 600 zustande. Das Epithel der Zotten besteht vorwiegend aus Enterozyten, daneben aus mukusproduzierenden Becherzellen und M-Zellen. Die resorbierenden Enterozyten bilden ab der Mitte der Zotten Mikrovilli aus, die den Bürstensaum dieses Zelltyps bilden (brush border). Die äußere, kohlenhydrathaltige Schicht der Cytoplasmamembran wird als Glykokalix bezeichnet und ist auf die Mikrovilli aufgelagert. Die gesamte Oberfläche des Dünndarmepithels ist mit einer Mukusschicht überzogen. In ihr herrscht ein Mikroklima mit einem pH-Wert von 6,1 bis 6,8. Glykokalix und Mukus bilden zusammen eine Schicht, die trotz der Peristaltikbewegungen des Darms nicht entfernt wird (unstirred layer).

In den epithelialen Zellen der Dünndarmschleimhaut sind Transportsysteme exprimiert, die der Aufnahme von Nahrungsbestandteilen dienen, aber auch Arzneistoffmoleküle transportieren können. So werden z.B. viele β -Lactam-Antibiotika aufgrund ihrer peptidähnlichen Struktur durch den intestinalen Peptidtransporter PEPT1 vom Darmlumen ins Blut aufgenommen, wobei der pH-Gradient zwischen Lumen und Zellinnerem als treibende Kraft genutzt wird.

Das Plazentaepithel

Die Plazenta dient vor allem der Ernährung des Fetus und der Ausscheidung seiner Stoffwechselprodukte, was durch einen Stoffaustausch zwischen mütterlichem und fetalem Blut über das Plazentaepithel gewährleistet wird. In Abb. 1 ist die Struktur der menschlichen Plazenta dargestellt: Der mütterliche Anteil der Plazenta wird von einer aus Bindegewebe bestehenden Basalplatte begrenzt. Sie entsteht nach Eintreten der Schwangerschaft durch

funktionelle Weiterentwicklung des Endometriums aus der Decidua basalis. Von der Basalplatte ausgehende Septen unterteilen den Plazentaraum in Lappen (Kotyledonen). Die von dem Amnion überzogene Chorionplatte schließt den fetalen Anteil der Plazenta ab. Von der Chorionplatte gehen Zottenstämmchen mit Zotten aus, die mit der Basalplatte und den Septen verbunden sind. Das mütterliche Blut fließt, angetrieben von einem Druckgefälle über uteroplazentare Arterien, in schmale Spalten zwischen die Zotten (intervillöse Räume). Das sauerstoffarme fetale Blut fließt über Nabelschnurarterien in die Zottenbäume und -kapillaren, wobei Sauerstoff und Nährstoffe aufgenommen werden. Anschließend strömt das nährstoffreiche Blut durch die Nabelschnurvene zurück zum Fetus. Bei der Nährstoffaufnahme muss eine trennende Gewebeschicht überwunden werden, die als Plazentaschranke bezeichnet wird. Sie besteht unter anderem aus einer dem Fetus zugewandten inneren Epithelschicht, den Zytotrophoblasten und einer der Mutter zugewandten äußeren Epithelschicht, den Bürstensaummembran-ausbildenden vielkernigen Syncytiotrophoblasten.

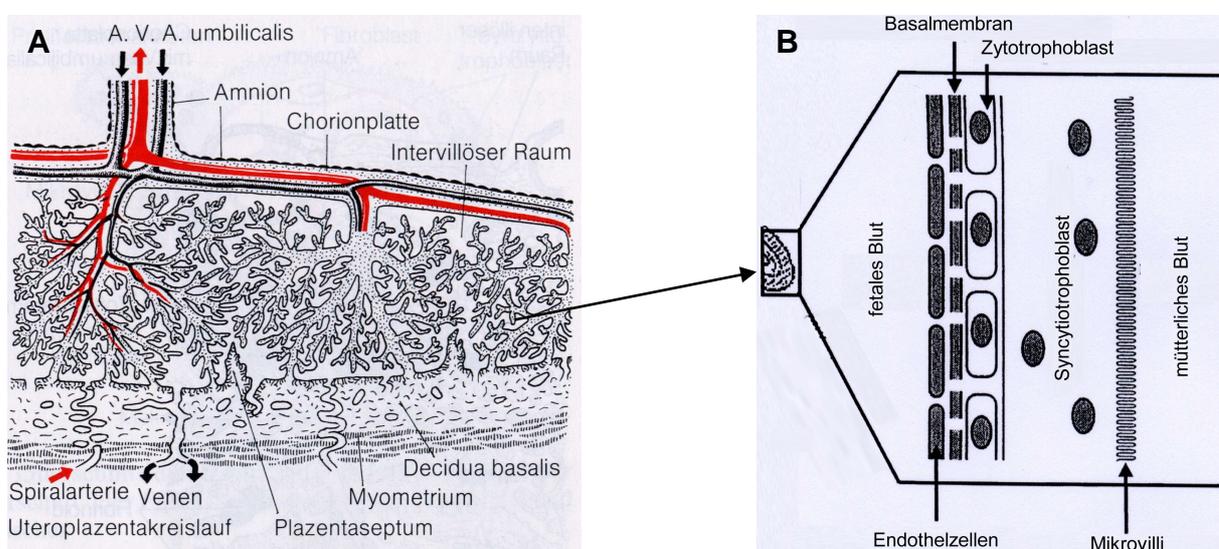


Abb. 1: Schematische Übersicht der Plazenta (A) und Darstellung der Blut-Plazentaschranke (B) des menschlichen Organismus (modifiziert nach (Schiebler und Arnold 2002) (A) und (Kitano *et al.* 2004) (B))

In den Syncytiotrophoblasten sind entscheidende Transportmechanismen für die Entwicklung des Fetus lokalisiert. Da die Plazenta primär eine den Fetus versorgende Funktion hat, ist die Bezeichnung Plazentaschranke nicht ganz zutreffend, zumal nicht nur für den Fetus wichtige Nährstoffe diese Gewebeschicht passieren, sondern auch die meisten Arzneistoffe, die die Mutter zu sich nimmt. Diese Substanzen können mit den vorhandenen Transportsystemen interagieren und so die Entwicklung des Fetus negativ beeinflussen.

2.2 Transportmechanismen durch biologische Membranen

Substanzen können über die epithelialen Barrieren zum einen parazellulär durch die Schlussleisten (tight junctions), zum anderen transzellulär durch die Zellen selbst aufgenommen werden. Transzelluläre Transportvorgänge werden primär in aktive und passive unterteilt. Passive Transportvorgänge erfordern keinen Energieverbrauch und finden immer in Richtung eines Konzentrationsgefälles statt. Dieser Vorgang lässt sich durch das 1. Ficksche Gesetz charakterisieren, nach dem das Ausmaß der Diffusion durch die Phospholipidmembran proportional zur Konzentrationsdifferenz und zur Membranfläche und umgekehrt proportional zur Membrandicke ist. Da die Diffusionsgeschwindigkeit auch von dem Verteilungskoeffizienten des Moleküls zwischen der Membran und der umgebenden Flüssigkeit abhängt, ist der lipophile Innenbereich der Membran für hydrophile Moleküle praktisch undurchlässig. Moleküle von einer Größe bis 180 Da können die Membran durch Poren, die aus eingelagerten Proteinen bestehen, passieren.

Wie die einfache Diffusion findet auch die erleichterte Diffusion ohne Energieverbrauch in Richtung des Konzentrationsgradienten statt. Der Transport des Moleküls findet in diesem Fall durch reversible Bindung an ein membranständiges Transportprotein (Carrier) statt und ist im Gegensatz zur einfachen Diffusion sowohl hemm- als auch sättigbar.

Gegen ein Konzentrationsgefälle können Moleküle Membranen nur durch aktive Transportvorgänge überwinden, die ebenfalls hemm- und sättigbar sind. Die für diesen Prozess notwendige Energie wird beim primär aktiven Transport durch elektrochemische Gradienten oder durch Hydrolyse von ATP bereitgestellt. Die basolateral lokalisierte Na^+/K^+ -ATPase transportiert bei Hydrolyse eines ATP-Moleküls drei Na^+ -Ionen nach außen und zwei K^+ -Ionen in die Zelle. Durch den so entstehenden Na^+ -Gradienten wird unter anderem der Na^+/H^+ -Austauscher angetrieben, der daher als sekundär aktiv bezeichnet wird. Der durch den Na^+/H^+ -Austauscher erzeugte H^+ -Gradient wird wiederum vom somit tertiär aktiven $\text{H}^+/\text{Peptidsymporter}$ als Antriebskraft genutzt.

Große Moleküle wie Proteine oder Antigene werden durch vesikulären Transport in die Zelle aufgenommen. Die Moleküle binden bei diesem Vorgang spezifisch oder unspezifisch an die Zellmembran. Pinozytose bezeichnet dabei die unspezifische Aufnahme von Umgebungsflüssigkeit, während bei der rezeptorvermittelten Endozytose eine spezifische Substanz-Rezeptorbindung stattfindet. Die Ausschleusung von Substanzen aus dem Zellinneren wird als Exozytose bezeichnet. Als Teil der unspezifischen Abwehr bei Säugetieren werden bei der Phagozytose Erreger durch Vesikelbildung in Phagozyten aufgenommen und abgebaut.

2.3 Organische Kationentransporter

Der Transport endogener organischer Kationen, kationischer Arzneistoffe und Monoaminneurotransmittern wurde vor der Klonierung von rOCT1 aus der Rattenniere (Gründemann *et al.* 1994) zunächst auf funktioneller Basis an isolierten Organen, Gewebestücken oder Zellen charakterisiert (Iversen 1965; Miyamoto *et al.* 1988; Moseley *et al.* 1990; Saito *et al.* 1992; Steen *et al.* 1991; Ullrich *et al.* 1993; Wright und Wunz 1987). Vor allem Gewebe von Organen, die an der Resorption und Exkretion von körpereigenen als auch körperfremden Stoffen beteiligt sind, wie Leber, Niere und Intestinum, waren Gegenstand der Studien (für eine Übersicht siehe (Koepsell 1998)).

Organische Kationentransporter (organic cation transporter, OCT) sind Transmembranproteine und werden zusammen mit organischen Anionentransportern aufgrund ihrer genetischen Ähnlichkeiten der SLC22-Transporterfamilie zugeordnet. Koehler und Mitarbeiter bewiesen die Lokalisation der Gene von hOCT1 und hOCT2 auf demselben Chromosom (1997). Die SLC22-Familie ist wiederum Teil der MFS (major facilitator superfamily, Gründemann *et al.* 1998; Koepsell *et al.* 1998; Koepsell *et al.* 1999; Marger und Saier 1993). Die Transportproteine OCT1, OCT2, OCT3, OCTN1 und OCTN2 wurden sowohl aus menschlicher DNA (hOCTs) als auch teilweise von Schwein, Ratte, Maus oder Kaninchen kloniert, wobei hinsichtlich Substratspezifität und Gewebeverteilung teilweise Unterschiede zwischen den Spezies bestehen. Substrate der OCTs sind neben pharmakologisch relevanten Substanzen die permanenten Kationen TEA und MPP⁺ (siehe Abschnitt 2.3.3, Tab. 2), aber auch anionische, zwitterionische und ungeladene Substanzen werden transportiert. Es gehören jeweils hOCT1-3 und hOCTN1-2 zu genetischen Subgruppen innerhalb der SLC22-Familie (für eine Übersicht siehe (Koepsell *et al.* 1999; Koepsell *et al.* 2003)).

2.3.1 Struktur

Als erster organischer Kationentransporter der SLC22-Familie wurde rOCT1 aus der Rattenniere kloniert. Abb. 2 zeigt die von Koepsell und Mitarbeitern postulierte Struktur des humanen OCT1 (2003).

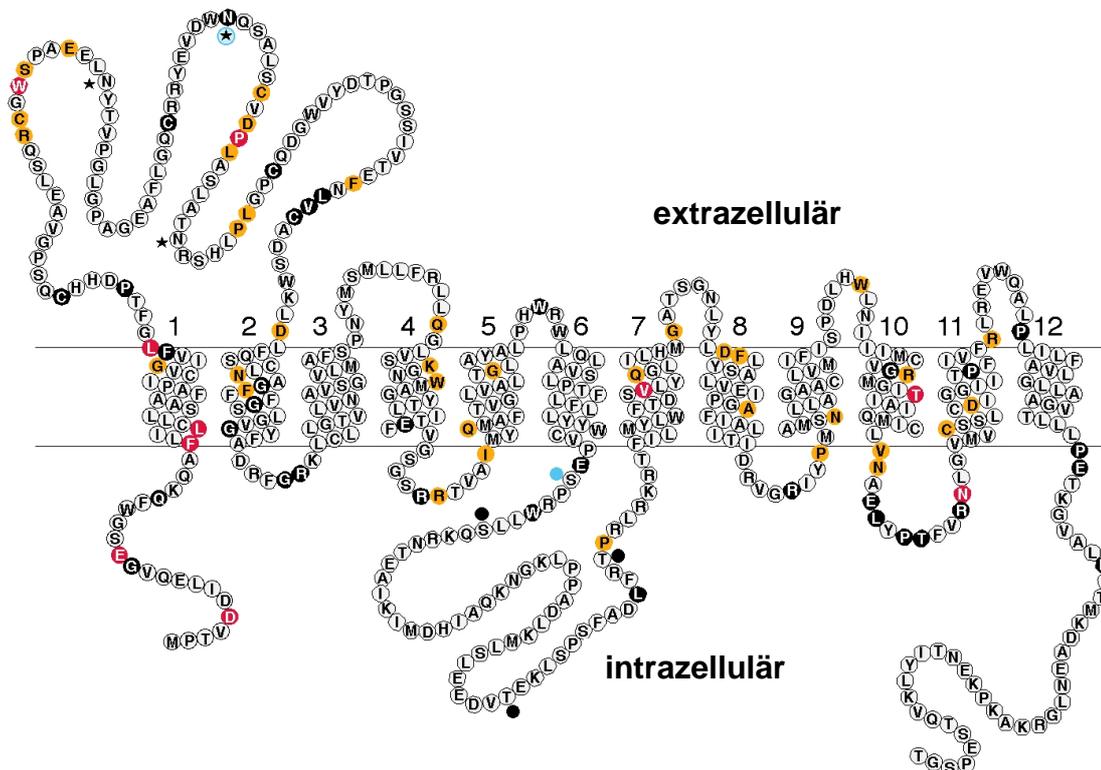


Abb. 2: Struktur des organischen Kationentransporters hOCT1. Aminosäuresequenz und Membrantopologie. In Subgruppen der SLC22-Transporterfamilie konservierte Aminosäuren sind wie folgt gekennzeichnet: Schwarz, in allen Subgruppen konserviert; rot, nur bei OCT1/OCT2/OCT3 und OCTN1/OCTN2 konserviert; orange, nur bei OCT1/OCT2/OCT3 konserviert; blau, übereinstimmende Sequenzen für N-Glykosylierung oder Phosphorylierung bei allen Mitgliedern der SLC22-Transporterfamilie oder bei allen Mitgliedern außer hCT2 (human carnitine transporter 2); Punkte, übereinstimmende Sequenzen für Proteinkinase C-abhängige Phosphorylierungsstellen in hOCT1; Sterne, N-Glykosylierungsstellen in hOCT1 (nach (Koepsell *et al.* 2003)).

Alle Mitglieder der SLC22-Familie weisen 12 Transmembrandomänen mit einer großen extrazellulären und einer kleineren intrazellulären Schleife auf (für hOCT1 postuliert durch Zhang *et al.* 1997). Die Lokalisation der Schleifen sowie die des intrazellulär lokalisierten C-Terminus wurde für rOCT1 von Meyer-Wentrop und Mitarbeitern (1998) mittels Antigen-Antikörper-Reaktionen bewiesen. Kerb und Mitarbeiter (2002) identifizierten anhand von genetischen hOCT1-Varianten bestimmte Aminosäuren in der extrazellulären Schleife als möglicherweise relevant für den Transport organischer Kationen.

Die Charakteristika der einzelnen hOCT(N)s lassen sich wie folgt zusammenfassen.

hOCT1: Der humane OCT1 wurde 1997 von zwei Arbeitsgruppen parallel aus der Leber kloniert. Der Transporter wird im menschlichen Organismus im Gegensatz zu Nagetieren, bei denen OCT1 sowohl in der Leber als auch in der Niere lokalisiert ist, primär in der Leber exprimiert (Abschnitt 2.3.2, Tab. 1). Der Transport kationischer Substrate wurde als pH-unabhängig und membranpotenzialabhängig beschrieben (Gorboulev *et al.* 1997; Zhang *et al.* 1997). Die pharmakologische Relevanz dieses Transportproteins ergibt sich aus der postulierten, bis jetzt aber nur für Ratten nachgewiesenen Lokalisation in der Sinusoidal-membran 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 (Jonker *et al.* 2001). Da Arzneistoffe aus unterschiedlichen Klassen mit hOCT1 interagieren, ist dieser Transporter sehr wahrscheinlich in die hepatische Exkretion von Xenobiotika involviert (Abschnitt 2.3.3, Tab. 2).

hOCT2: Gorboulev und Mitarbeiter (1997) klonierten hOCT2 aus der Niere. hOCT2 transportiert Kationen elektrogen sowie pH- und Na⁺-unabhängig. Die zunächst funktionell, dann immunohistochemisch 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 Substraten (Abschnitt 2.3.3, Tab. 2) unterstreichen die Bedeutung von hOCT2 bei der renalen Exkretion von Arzneistoffen. 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 in Nierengewebe (Grover *et al.* 2004).

hOCT3: Im Gegensatz zu den Transportern hOCT1 und hOCT2 weist der von Gründemann und Mitarbeitern (1998) klonierte hOCT3 eine ubiquitäre Verteilung im menschlichen Organismus auf (Abschnitt 2.3.2, Tab. 1). Die treibende Kraft für die Translokation organischer Kationen durch hOCT3 ist das Membranpotenzial (Wu *et al.* 2000). Die physiologische Funktion von hOCT3 im Gehirn besteht aufgrund seiner Substratspezifität (Abschnitt 2.3.3, Tab. 2) vermutlich in der Aufnahme von Neurotransmittern, die nicht durch neuronale Transportmechanismen resorbiert wurden. Aus diesem Grund wird hOCT3 teilweise auch als extraneuronaler Monoamintransporter (EMT) bezeichnet (Übersicht bei (Eisenhofer 2001)). Allerdings transportiert auch hOCT2 Neurotransmitter (Abschnitt 2.3.3, Tab. 2). OCT3-defiziente Mäuse sind gesund und fertil; das prototypische organische Kation MPP⁺ wurde jedoch verglichen mit dem Wildtyp zu 72% weniger in Herzgewebe und signifikant weniger in Embryos aufgenommen (Zwart *et al.* 2001). Bei präeklampsischen, d.h.

unter Bluthochdruck leidenden, schwangeren Patientinnen wurden signifikant geringere mRNA-Level von hOCT3 in der Plazenta festgestellt, was als ein weiteres Indiz für die Inaktivierung von Monoaminen durch hOCT3 zu werten ist (Bottalico *et al.* 2004).

hOCTN1: Der aus humaner fetaler Leber klonierte hOCTN1 transportiert das prototypische organische Kation TEA bidirektional pH- und teilweise ATP-abhängig, jedoch membranpotenzialunabhängig (Tamai *et al.* 1997; Yabuuchi *et al.* 1999). Das Transportprotein könnte daher aufgrund der starken Expression in der Niere (Abschnitt 2.3.2, Tab. 1) mit dem funktionell bekannten, aber bis dahin nicht klonierten Protonen/OCT-Antiporter in der apikalen Membran renaler Epithelzellen identisch zu sein. Daher ist die Sekretion organischer Kationen durch hOCTN1 in das renale Lumen wahrscheinlich, zumal ein breites Spektrum pharmakologisch aktiver Substanzen zum einen als hOCTN1-Inhibitor oder als dessen Substrat fungiert (Abschnitt 2.3.3, Tab. 2). Mutationen in Genabschnitten, die für hOCTN1 und hOCTN2 codieren, werden mit einer erhöhter Anfälligkeit für Morbus Crohn (einer entzündlichen Darmerkrankung) in Zusammenhang gebracht (Peltekova *et al.* 2004).

hOCTN2: Dieses Transportprotein wurde 1998 von Wu und Mitarbeitern (1998b) aus der humanen Trophoblastenzell-Linie JAR kloniert. Tamai und Mitarbeiter (1998) isolierten OCTN2 aus humaner Nieren-DNA und identifizierten ihn als hochaffinen Na⁺/L-Carnitin-Kotransporter. Somit ist hOCTN2 während des Transportes von Carnitin als einziger bekannter humaner Kationentransporter von einem einwärts gerichteten Na⁺-Gradienten abhängig. Außerdem transportiert hOCTN2 organische Kationen Na⁺-unabhängig (Wu *et al.* 1999). Weiterhin wurden verschiedene genetische Varianten von OCTN2 untersucht. Bei Mutationen in der für OCTN2 codierenden Gensequenz kann im Organismus eine primäre Carnitinefizienz durch verminderte renale Reabsorption dieser physiologisch wichtigen Substanz verursacht werden (Inano *et al.* 2004; Wang *et al.* 1999; Nezu *et al.* 1999). Sekundäre Carnitinefizienz kann aus der Therapie mit Medikamenten resultieren, die selbst hOCTN2-Substrate oder -Inhibitoren sind (vgl. Abschnitt 2.3.3, Tab. 2).

2.3.2 Expression

Das Vorkommen der humanen organischen Kationentransporter hOCT1-3 und hOCTN1-2 in Geweben und Zell-Linien ist in Tab. 1 anhand ausgewählter Beispiele mit den entsprechenden Referenzen und Nachweistechniken dargestellt.

Tab. 1: Expression der humanen organischen Kationentransporter

| Transporter | Gewebe; Zell-Linie | Referenzen (Nachweistechnik) |
|----------------|---|---|
| hOCT1 | Leber, Intestinum; Caco-2-Zellen | Gorboulev <i>et al.</i> (1997), Northern Blot Zhang <i>et al.</i> (1997), Northern Blot Zhang <i>et al.</i> (1999), RT-PCR |
| hOCT2 | Niere (proximaler Tubulus, basolateral), Hirn; Caco-2-Zellen | Bleasby <i>et al.</i> (2000), RT-PCR Gorboulev <i>et al.</i> (1997), Northern Blot Motohashi <i>et al.</i> (2002), Western Blot |
| hOCT3/ hEMT | Leber, Skelettmuskulatur, Niere, Plazenta, Herz, Lunge, Hirn; Caco-2-Zellen | Gründemann <i>et al.</i> (1998), RT-PCR Martel <i>et al.</i> (2001), RT-PCR Wu <i>et al.</i> (2000), Northern Blot |
| hOCTN1 | Niere, Knochenmark, fetale Leber, Luftröhre | Tamai <i>et al.</i> (1997), Northern Blot |
| hOCTN2 | Niere, Bauchspeicheldrüse, Skelettmuskulatur, Plazenta, Herz, Prostata, Schilddrüse; voll differenzierte Caco-2-Zellen (Bürstensaummembran), JAR-Zellen | Elimrani <i>et al.</i> (2003), Western Blot Tamai <i>et al.</i> (1998), Northern Blot Wu <i>et al.</i> (1998b), Northern Blot |

2.3.3 Substratspezifität

Tab. 2 zeigt einen Teil der Substrate und Inhibitoren von hOCT1-3 und hOCTN1-2 unter Angabe der Referenzen, wobei hinsichtlich der Substrate zwischen endogenen (körpereigenen) und Arzneistoffen und Modellsubstraten (körperfremden) unterschieden wird. Für einen Großteil der Substanzen wurde cis-Inhibierung der Aufnahme von Modellsubstraten nachgewiesen. Die cis-Inhibierung zeigt jedoch nicht, ob die Substanz nicht möglicherweise auch als Substrat akzeptiert wird.

Tab. 2: Ausgewählte Substrate und Inhibitoren der humanen organischen Kationentransporter

| Transporter | Substrat | | Inhibitor | Referenzen |
|----------------|--|---|---|--|
| | endogen | Arzneistoff, Modellsubstrat | | |
| hOCT1 | Prostaglandine E ₂ und F _{2α} | Chinidin (pH 6,0), Ganciclovir, Aciclovir, TEA, MPP ⁺ | Clonidin, Chinin, Chinidin (pH 7,5)*, Cholin, Verapamil, Cimetidin, Ritonavir, Saquinavir, Indinavir, Nelfinavir, Prazosin | Kimura <i>et al.</i> (2002), Hayer-Zillgen <i>et al.</i> , (2002), Takeda <i>et al.</i> (2002), van Montfoort <i>et al.</i> (2001), Zhang <i>et al.</i> (1998), Zhang <i>et al.</i> (2000) |
| hOCT2 | Prostaglandine E ₂ und F _{2α} , Dopamin, Cholin, Norepinephrin, Serotonin | TEA, MPP ⁺ , Amantadin, Cimetidin, Memantin, Debrisoquin, Metformin | Decynium-22, Procainamid, Chinin | Busch <i>et al.</i> (1998), Gorboulev <i>et al.</i> (1997), Kimura <i>et al.</i> (2002), Hayer-Zillgen <i>et al.</i> (2002), Dresser <i>et al.</i> (2002) |
| hOCT3/ hEMT | Histamin, Norepinephrin, Adrenalin, Noradrenalin | TEA, MPP ⁺ , Lidocain, Procainamid, Chinidin | Corticosteron, Clonidin, Decynium-22, Imipramin, O-Methylisoprenalin | Gründemann <i>et al.</i> (1998), Gründemann <i>et al.</i> (1999), Hayer- Zillgen <i>et al.</i> (2002), Wu <i>et al.</i> (2000), Hasannejad <i>et al.</i> (2004), Horvath <i>et al.</i> (2003) |
| hOCTN1 | L-Carnitin | Chinidin, Verapamil, TEA | Procainamid, Cephaloridin, Clonidin, Cimetidin | Yabuuchi <i>et al.</i> (1999) |
| hOCTN2 | D, L-Carnitin Acetylcarnitin Cholin | Chinidin, Verapamil, Valproat, Cephaloridin, TEA | Actinomycin D*, Cimetidin*, MPP ⁺ *, Emetin, Cephoselis, Cephemim, Glibenclamid | Huang <i>et al.</i> (1999), Ganapathy, M.E. <i>et al.</i> (2000), Ohashi <i>et al.</i> (1999), Tamai <i>et al.</i> (1998), Wagner <i>et al.</i> (2000) |

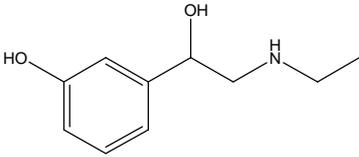
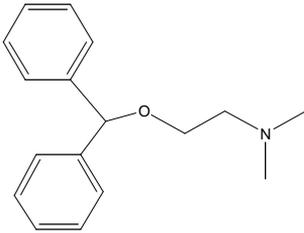
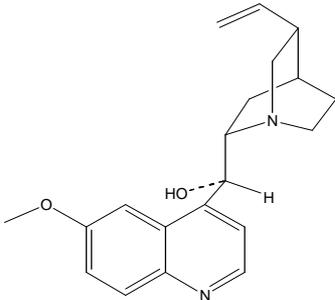
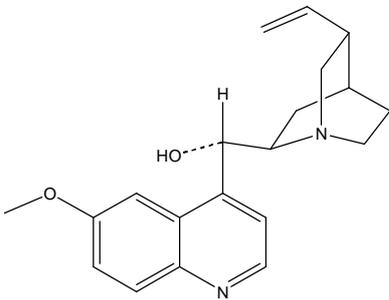
*kein Transport der Substanz durch den entsprechenden hOCT(N)

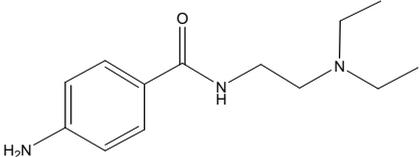
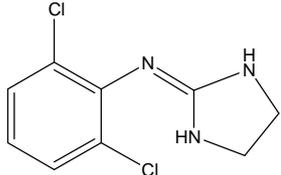
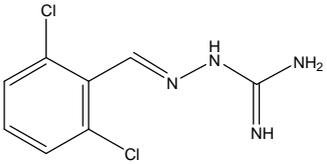
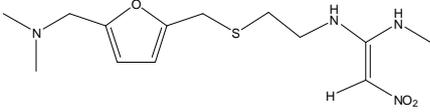
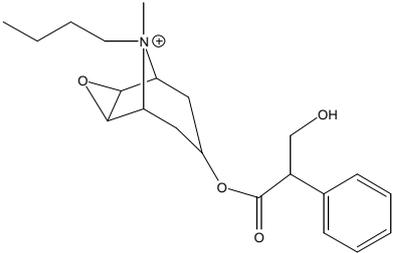
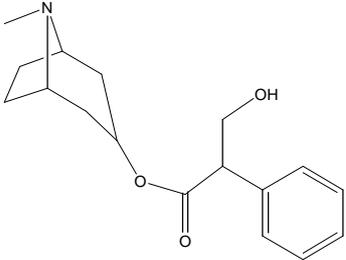
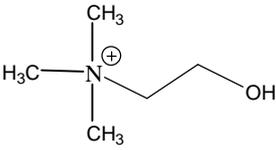
2.4 Untersuchte kationische Arzneistoffe

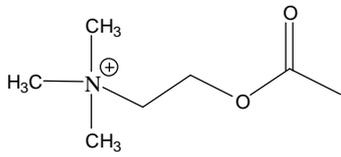
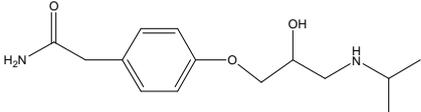
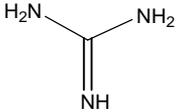
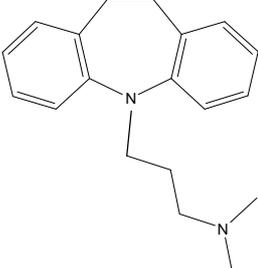
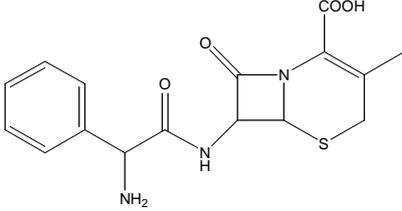
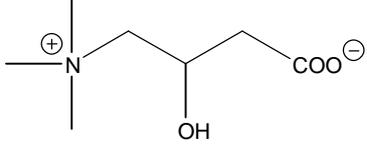
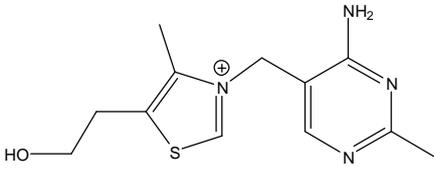
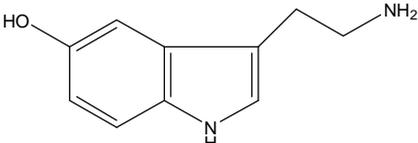
Die für die vorliegende Arbeit relevanten Arzneistoffe beziehungsweise endogenen organischen Kationen und Modellsubstrate sind in Tab. 3 nach pharmakologischen Gesichtspunkten gegliedert dargestellt. Als physikochemische Parameter sind die molare Masse, die Säure- bzw. Basenkonstante pK_A bzw. pK_B (Hansch 1990) und der Okta-nol/Wasser-Verteilungskoeffizient $\log P_{O/W}$ (Hansch 1990) aufgeführt. Bei den mit Kapillarelektrophorese quantifizierten Arzneistoffen sind zusätzlich die entsprechenden

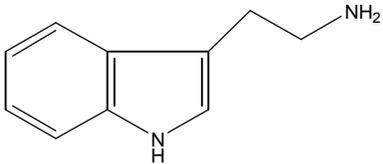
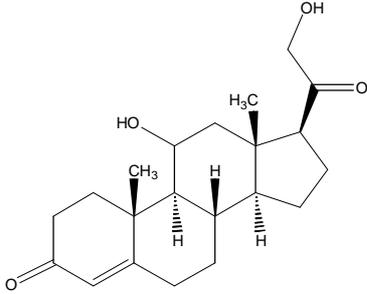
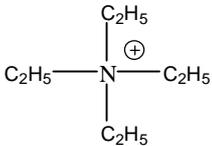
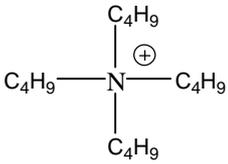
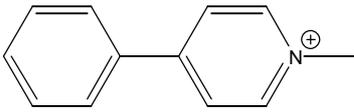
Absorptionsmaxima (λ_{\max}) angegeben (Dibbern 1978). Da viele der untersuchten Arzneistoffe Basen mit pK_A -Werten von 8-10 sind, liegen sie bei physiologischem pH-Wert als Kationen vor und werden daher in der vorliegenden Arbeit als kationische Arzneistoffe bezeichnet. Darüber hinaus untersuchte Substanzen, die den dargestellten Stoffen vergleichbare pharmakologische und/oder strukturelle Eigenschaften besitzen, sind diesen zugeordnet (Burger und Wachter 1993).

Tab. 3: Ausgewählte Substanzen mit ihren physikochemischen und pharmakologischen Eigenschaften

| physikochemische Parameter | Strukturformel | pharmakologische Eigenschaften | strukturell/ pharmakolog. verwandte Substanz |
|--|---|--|---|
| Etilefrin M = 181,24 pK_A 9,0 B 3,8 $\log P_{O/W}$ 0,44 ^k λ_{\max} 272 nm (HCl) |  | Sympathomimetikum | Arterenol |
| Diphenhydramin M = 255,36 pK_B 5,0 $\log P_{O/W}$ 3,27 ^m ; 3,36 ^k λ_{\max} 252 nm (HCl) |  | H ₁ -Antihistaminikum, Sedativum | |
| Chinin M = 324,43 pK_{B1} 9,9 $B2$ 5,5 $\log P_{O/W}$ 3,44 ^m ; 3,2 ^k λ_{\max} 250, 346 nm (HCl) |  | Antimalariamittel | |
| Chinidin M = 324,43 pK_{B1} 9,8 $B2$ 6,1 $\log P_{O/W}$ 3,44 ^m ; 3,2 ^k |  | Antiarrhythmikum | Verapamil |

| | | | |
|--|---|---|--|
| <p>Procainamid</p> <p>M = 235,3</p> <p>pK_B 4,74</p> <p>log P_{O/W} 0,88^m; 1,11^k</p> |  | <p>Antiarrhythmikum</p> | <p>Lidocain (Lokal- anästhetikum)</p> |
| <p>Clonidin</p> <p>M = 230,10</p> <p>pK_B 5,95</p> <p>log P_{O/W} 1,59^m</p> |  | <p>α₂-Sympathomimetikum</p> | |
| <p>Guanabenz</p> <p>M = 231,09</p> <p>pK_B k.A.</p> <p>log P_{O/W} 3,02^k</p> |  | <p>α₂-Sympathomimetikum</p> | |
| <p>Ranitidin</p> <p>M = 314,41</p> <p>pK_A 2,3_B 5,8</p> <p>log P_{O/W} 0,27^m; 0,27^k</p> <p>λ_{max} 225, 317 nm (HCl)</p> |  | <p>H₂-Antihistaminikum</p> | <p>Cimetidin</p> |
| <p>Butylscopolaminium</p> <p>M = 360,5</p> <p>pK_A k.A.</p> <p>log P_{O/W} k.A.</p> <p>λ_{max} 257 nm (HCl)</p> |  | <p>Parasympatholytikum Spasmolytikum</p> | <p>Scopolamin, Methyl- scopolaminium</p> |
| <p>Atropin</p> <p>M = 289,38</p> <p>pK_B 4,2</p> <p>log P_{O/W} 1,83^m; 1,32^k</p> <p>λ_{max} 257 nm (HCl)</p> |  | <p>Parasympatholytikum, Spasmolytikum</p> | |
| <p>Cholin</p> <p>M = 104,18</p> <p>pK_A k.A.</p> <p>log P_{O/W} k.A.</p> |  | <p>Hepatikum, Geriatrikum</p> | <p>Hemicholin</p> |

| | | | |
|--|---|--------------------------------------|------------------------|
| <p>Acetylcholin M = 146,21 pK_A k.A. log P_{O/W} -2,52^m</p> |  | Parasympathomimetikum | Carbachol |
| <p>Atenolol M = 266,34 pK_B 4,4 log P_{O/W} 0,16^m; -0,11^k</p> |  | β-Blocker | Metoprolol, Nadolol |
| <p>Guanidin M = 59,03 pK_A k.A. log P_{O/W} k.A.</p> |  | Endogenes Kation | Metformin |
| <p>Imipramin M = 280,42 pK_B 4,5 log P_{O/W} 4,80^m; 4,41^k</p> |  | Antidepressivum | |
| <p>Cephalexin M = 347,40 pK_A 3,20 log P_{O/W} 0,65^m; 0,23^k; -2,07 (Zwitterion)</p> |  | Antibiotikum | |
| <p>Carnitin M = 161,20 pK_A k.A. log P_{O/W} k.A.</p> |  | antihyperlipoproteinogen | |
| <p>Thiamin M = 265,36 pK_A 4,8 log P_{O/W} k.A.</p> |  | Vitamin B ₁ | |
| <p>Serotonin M = 176,22 log P_{O/W} 0,62^k; 0,21^m pK_{A1} 9,1 A₂ 4,9 B₂ 4,2</p> |  | Biogenes Amin, Neuro- transmitter | |

| | | | |
|---|---|--|---------------------------|
| <p>Tryptamin M = 160,18 pK_A 4,9_B 4,2 log P_{O/W} k.A.</p> |  | Tryptophanderivat | |
| <p>Corticosteron M = 346,47 pK_A k.A. log P_{O/W} 1,94^m; 1,86^k</p> |  | Nebennierenrinden-Hormon, hOCT-Inhibitor | |
| <p>Tetraethylammonium (TEA) M = 130,3 pK_A k.A. log P_{O/W} -2,57^a</p> |  | Modell-hOCT-Substrat, Ganglienblocker | Tetramethylammonium (TMA) |
| <p>Tetrabutylammonium (TBA) M = 252,48 pK_A k.A. log P_{O/W} -0,11^a</p> |  | Modell-hOCT-Substrat | |
| <p>N-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) M = 170,2 pK_A k.A. log P_{O/W} -1,05^b</p> |  | Modell-hOCT-Substrat, Neurotoxin | |

^avon Zhang und Mitarbeitern (1999) aus gemessenen P_{O/W}-Werten von Neef und Meijer (1984) errechnet,

^bgemessen von Riachi und Mitarbeitern (1989), ^kkalkuliert, ^mgemessen

3 Material und Methoden

3.1 Material

[Benzen-³H]Clonidin ([³H]Clonidin) mit einer spezifischen Radioaktivität von 55,5 Ci/mmol, [Methyl-³H]Cholin ([³H]Cholin) mit einer spezifischen Radioaktivität von 81 Ci/mmol und D-[1-¹⁴C]Mannitol ([¹⁴C]Mannitol) mit einer spezifischen Radioaktivität von 57 mCi/mmol wurden von Amersham Biosciences (Deutschland) bezogen. D, L-[³H]Atenolol ([³H]Atenolol) mit einer spezifischen Radioaktivität 15,1 Ci/mmol wurde von Frau Dr. Astrid Voltz (Boehringer Ingelheim, Deutschland) zur Verfügung gestellt. [Methyl-³H]Acetylcholin ([³H]Acetylcholin) mit einer spezifischen Radioaktivität von 85 Ci/mmol, D-[1-³H(N)]Mannitol ([³H]Mannitol) mit einer spezifischen Radioaktivität von 20 Ci/mmol und [Methyl-³H]N-Methyl-4-phenylpyridinium ([³H]MPP⁺) mit einer spezifischen Radioaktivität von 80-85 Ci/mmol wurden von Biotrend (Deutschland) bezogen.

Acetylcholin, Atenolol, Atropin, Arterenol, Butylscopolaminium, Carbachol, Carnitin, Carbonylcyanid 4-Trifluoromethoxyphenylhydrazon (FCCP), Cephalexin, Chinin, Chinidin, Cholin, Corticosteron, Creatin, Diphenhydramin, Guanidin, Hemicholin, Imipramin, Lidocain, Methylscopolaminium, N-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺), Nadolol, Procainamid, Serotonin, Scopolamin, Tetraethylammonium (TEA), Tetramethylammonium (TMA), Tetrabutylammonium (TBA), Thiamin, Tryptamin, Trichloressigsäure (TCA) und Verapamil wurden von Sigma (Deutschland) gekauft, Etilefrin, Ranitidin, Metformin und Metoprolol von Synopharm (Deutschland) und Cimetidin, Clonidin und Guanabenz von ICN (Deutschland). Die Puffersubstanzen (siehe Methoden) wurden ebenfalls von Sigma bezogen. Die Substanzen wurden größtenteils als Hydrochloride eingesetzt.

Das Bradford-Reagenz zur Proteinbestimmung (siehe Methoden), ebenso wie die Kartuschen und Kapillaren für die Kapillarelektrophorese waren Produkte der Firma Bio-Rad (Deutschland). Der Laufpuffer für die Kapillarelektrophorese (siehe Methoden) wurde von Fluka (Deutschland) bezogen. Der Flüssigkeitsszintillator (rotiszint eco-plus) für die Quantifizierung radioaktiver Substanzen wurde von Roth (Deutschland) geliefert. Das Zubehör für die Filtrationsversuche (siehe Methoden) wurde bei Millipore (Deutschland) gekauft.

Die humane Kolonkarzinomzell-Linie Caco-2 wurde von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkultur geliefert. Die humanen Chorionkarzinomzellen BeWo, JEG-3 und JAR wurden von Prof. B. Ugele, Medizinische Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München zur Verfügung gestellt. Die transfizierten Zell-Linien HEK- (human embryonic kidney) CMV, hOCT1 und hOCT2 sowie CHO- (chinese hamster ovary) pcDNA 3.1. und hOCT3 etablierte Prof. Dr. H. Koepsell, Institut für Anatomie und Zellbiologie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg.

Die Zellkulturmedien und -zusätze wurden von Gibco Life Technologies (Deutschland), Biochrom (Deutschland) und Sigma (Deutschland) bezogen.

3.2 Methoden

3.2.1 Experimentelle Methoden

3.2.1.1 Zellzucht und Subkultivierung der verwendeten Zell-Linien

Die Zell-Linien wurden in 75 oder 175 cm²-Plastikflaschen in einem Inkubator in wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei 37°C unter 5% CO₂-Begasung gezüchtet und während der Kultivierung unter aseptischen Bedingungen in einer Laminarbox (Heraeus, Deutschland) versorgt. Die Zell-Linien dieser Arbeit bildeten einen adhären Zellerasen auf dem Boden der Plastikflaschen aus. Mit Hilfe eines Umkehrmikroskops (Axiovert 25, Zeiss, Deutschland) wurde sowohl das Wachstum während der Kultivierung als auch das Ablösen der Zellen während der Subkultivierung beobachtet. In Tab. 4 sind für jede Zell-Linie die Erstbeschreibung, das verwendete Nährmedium und die Kultivierungsbedingungen angegeben.

Tab. 4: Erstbeschreibung und Kultivierungsbedingungen der verwendeten Zell-Linien

| Zell-Linie | Erstbeschreibung Gewebe | Medium und Zusätze | Subkultivierung | Wechsel des Mediums |
|---------------------------------|---|--|---|--|
| Caco-2 | Fogh <i>et al.</i> (1977) Human, Adenokarzinom, Kolon | Minimal Essential Medium (MEM) 10% fetales Kälberserum 1% nicht-essentielle Aminosäurelösung 45 µg/ml Gentamicin | 5 ml PBS (calciumfrei) 3 ml Trypsin 0,05% mit 0,02% EDTA | Tag nach Aussaat zweitägig Tag vor Versuch |
| JEG-3 | Kohler und Bridson (1971) Human, Chorionkarzinom, Plazenta | Minimal Essential Medium (MEM) 10% fetales Kälberserum 1% Na ⁺ -pyruvat (100 mM) 45 µg/ml Gentamicin | 5 ml PBS (calciumfrei) 3 ml Trypsin 0,05% mit 0,02% EDTA | Tag nach der Aussaat zweitägig Tag vor Versuch |
| BeWo | Pattillo und Gey (1968) Human, Chorionkarzinom, Plazenta | Ham`s F12 Medium 15% fetales Kälberserum 1% Penicillin-Streptomycin-Glutamin | 5 ml PBS (calciumfrei) 3 ml Trypsin 0,05% mit 0,02% EDTA | täglich |
| JAR | Pattillo <i>et al.</i> (1971) Human, Chorionkarzinom, Plazenta | RPMI Medium 10% fetales Kälberserum 45 µg/ml Gentamicin | 5 ml PBS (calciumfrei) 3 ml Trypsin 0,05% mit 0,02% EDTA | Tag nach Aussaat zweitägig Tag vor Versuch |
| NHEK | Human, Epidermis | Serumfreies Keratinozytenmedium 5 µg/ml rekombinanter epidermaler Wachstumsfaktor 50 µg/ml Kälberhypophysenextrakt | Isoliert aus humaner Epidermis nach dem Standardprotokoll von Gibco Life Technologies | Tag nach Aussaat zweitägig Tag vor Versuch |
| CHO -pcDNA 3.1. -hOCT3 | Puck <i>et al.</i> (1958) Hamster, Ovarien Prof. Dr. Koepsell | Iscove`s Modified Dulbecco`s Medium 10% fetales Kälberserum 0,6 mg/ml Geneticin 1% Penicillin-Streptomycin-Glutamin | 5 ml PBS (calciumfrei) 5 ml PBS mit 0,02% EDTA | täglich |
| HEK -CMV -hOCT1 -hOCT2 | Graham <i>et al.</i> (1977) Human, transformierte embryonale Nierenzellen Prof. Dr. Koepsell | Dulbeccos Modified Medium (low glucose) 10% fetales Kälberserum 0,6 mg/ml Geneticin 1% Penicillin-Streptomycin-Glutamin 2 mM Glutamin | 5 ml PBS (calciumfrei) | 2 Tage nach Aussaat zweitägig Tag vor Versuch |

3.2.1.2 Untersuchung der zellulären Aufnahme radioaktiver und nichtradioaktiver Substanzen

Zusammensetzung der Versuchspuffer

- Die Versuchspuffer pH 6,0 und pH 6,5 enthielten: 140 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 1,8 mM CaCl₂, 0,8 mM MgSO₄, 5 mM Glucose und 25 mM MES/Tris
- Der Versuchspuffer pH 7,5 enthielt: 140 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 1,8 mM CaCl₂, 0,8 mM MgSO₄, 5 mM Glucose und 25 mM HEPES/Tris
- Der Versuchspuffer pH 8,5 enthielt: 140 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 1,8 mM CaCl₂, 0,8 mM MgSO₄, 5 mM Glucose und 25 mM Tris/HEPES

Stabilitätsprüfungen

Um eine mögliche Biotransformation der Arzneistoffe durch zelluläre Enzyme während der Aufnahme- und Fluxuntersuchungen und der anschließenden Quantifizierung durch Kapillarelektrophorese auszuschließen, wurde zunächst die Stabilität der Arzneistoffe zum einen auf Monolayern, zum anderen im Lysat von Caco-2-Zellen überprüft. Zu diesem Zweck wurden die kultivierten Zellen mit arzneistoffhaltigem Puffer definierter Konzentration überschichtet (Tab. 5). Nach 30, 60/90, 120, 180 und 300minütiger Inkubation bei 37°C wurden dem Puffer Proben entnommen und bei -20°C gelagert. Petrischalen mit Caco-2-Zellen wurden mit destilliertem Wasser, das die Arzneistoffe enthielt, durch Einfrieren bei -20°C lysiert und mittels einer 150 µm-Kanüle homogenisiert. Die so entstandenen Lysate wurden über Zeiträume von 60, 120 und 300 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann erfolgte unter Zusatz von 8% Trichloressigsäure die Fällung der Proteine in Eppendorfgefäßen. Anschließend wurden die Proben 45 Minuten bei 13000 U/min und 4°C zentrifugiert (Biofuge, Heraeus, Deutschland) und bis zur Gehaltsbestimmung bei -20°C gelagert.

Aufnahmeuntersuchungen an Zellmonolayern

Die Zellen wurden mit den in Tab. 5 genannten Zelldichten/2 ml Medium in Petrischalen mit 35 mm Durchmesser (Falcon[®], Becton Dickinson, Großbritannien) ausgesät und zeigten am Tag nach der Aussaat Konfluenz. Die jeweiligen Versuchsbedingungen sind in Tab. 5 zusammengefasst. Die Experimente liefen nach folgendem Schema ab:

- vor Beginn des Versuchs Spülen der Zellen mit 1 ml substratfreiem Versuchspuffer
- Inkubation mit der radioaktiv markierten Substanz über definierte Zeiträume in 1 ml Versuchspuffer bei Raumtemperatur, nichtradioaktive Aufnahmeuntersuchungen fanden bei 37°C in einem Inkubator (Thermostar, BMG Lab Technologies, Deutschland) statt

- Beenden des Versuchs durch viermaliges Spülen mit eiskaltem substratfreiem Versuchspuffer zur Entfernung von unspezifisch gebundenem Substrat.

Für Messungen des radioaktiven Zerfalls wurden die Zellen durch Zugabe von 1 ml Lysispuffer (Igepal[®] Ca 630 (0,5% v/v) in Puffer (50 mM Tris, 140 mM NaCl 1,5 mM MgSO₄ pH 8,0)) abgelöst und in Messröhrchen überführt.

Für nichtradioaktive Messungen wurden die Zellmonolayer mit 1 ml destilliertem Wasser überschichtet und bei – 20°C zweimal eingefroren. Die Proben wurden nach Homogenisation durch eine Kanüle aufgearbeitet, wie unter Stabilitätsprüfungen beschrieben wurde.

Aufnahmeuntersuchungen an Zellsuspensionen

Für Aufnahmeuntersuchungen an Zellsuspensionen (HEK-Zellen) wurden die Zellen in 175 cm²-Flaschen mit den in Tab. 5a beschriebenen Zelldichten/24 ml Medium ausgesät. Die Versuche verliefen in Anlehnung an Ganapathy *et al.* (1981) unter denen in Tab. 5a angegebenen Bedingungen folgendermaßen:

- Spülen der adhärennten Zellschicht mit 10 ml Versuchspuffer, Suspendieren der Zellen in ca. 2 ml Puffer/Flasche, Vereinigen der Suspensionen
- Einstellen der Suspension auf einen definierten Proteingehalt nach der Bradford-Methode
- bei t = 0 min Injektion einer definierten Menge Zellsuspension (80 oder 120 µl) in den Versuchspuffer (320 oder 480 µl) mit radioaktivem Substrat ± Arzneistoffe, kontinuierliche Bewegung der Zellsuspension mit 200 U/min über festgelegte Zeiträume bei Raumtemperatur
- Beenden des Versuchs durch Zugabe von 5 ml eiskaltem Versuchspuffer
- Filtrieren der Suspension durch einen Glasfaserfilter (Typ APFA, Durchmesser 25 mm), zweimaliges Spülen des Filters mit 5 ml eiskaltem Puffer.

Ein Blindwert der trotz Spülens an dem Filter gebundenen Radioaktivität wurde durch sofortiges Filtrieren einer Versuchslösung nach der Zelinjektion erhalten. Dieser Wert wurde von allen Messergebnissen subtrahiert. Für die Bestimmung des radioaktiven Zerfalls mittels Flüssigkeits-Szintillationsspektrometrie wurden die Filter in Messröhrchen überführt.

Tab. 5a: Versuchsbedingungen für die Aufnahme radioaktiver Substrate

| Zell-Linie | Zelldichte (Aussaat) | Tag | Substrat (Konzentration) ± Arzneistoffe (variierend) | pH-Wert | Zeit (min) | Inkubation von: |
|-----------------------------|----------------------|-------|---|---------------|------------|-----------------|
| Caco-2 | $0,8 \cdot 10^6$ | 7 | [³ H]MPP ⁺ (4 nM) ± Arzneistoffe (variierend) | 7,5 | 10 | Monolayern |
| JEG-3 | $0,8 \cdot 10^6$ | 7 | [³ H]Cholin (2-4 nM) ± Arzneistoffe (variierend) | 7,5 | 5 | Monolayern |
| | $0,8 \cdot 10^6$ | 7 | [³ H]Clonidin (3 nM) ± Arzneistoffe (variierend) | 7,5 | 1 | Monolayern |
| | $0,8 \cdot 10^6$ | 7 | [³ H]MPP ⁺ (8 nM) ± Arzneistoffe (variierend) | 7,5 | 10 | Monolayern |
| BeWo | $1 \cdot 10^6$ | 3 | [³ H]Cholin (2; 3 nM) ± Arzneistoffe (variierend) | 7,5 | 1; 10 | Monolayern |
| | $1 \cdot 10^6$ | 3 | [³ H]Acetylcholin (2 nM) ± Arzneistoffe (variierend) | 7,5 | 10 | Monolayern |
| | $1 \cdot 10^6$ | 3 | [³ H]MPP ⁺ (4 nM) ± MPP ⁺ (1 mM) | 6,0; 7,5; 8,5 | 10 | Monolayern |
| JAR | $0,8 \cdot 10^6$ | 3; 6 | [³ H]MPP ⁺ (4 nM) ± Arzneistoffe (1 mM) | 7,5 | 10 | Monolayern |
| | $0,4 \cdot 10^6$ | 10 | [³ H]MPP ⁺ (4 nM) ± MPP ⁺ (1 mM) | 7,5 | 10 | Monolayern |
| NHEK | $0,2 \cdot 10^6$ | 10-14 | [³ H]MPP ⁺ (16 nM) ± Arzneistoffe (variierend) | 7,5 | 10 | Monolayern |
| CHO -pcDNA3.1. -hOCT3 | $0,5 \cdot 10^6$ | 7 | [³ H]MPP ⁺ (1; 2 nM) ± Arzneistoffe (variierend) | 7,5 | 1; 10 | Monolayern |
| | $0,5 \cdot 10^6$ | 7 | [³ H]Acetylcholin (2; 100 nM) [³ H]Cholin (2 nM) [³ H]Clonidin (2 nM) | 7,5 | 10; 0,167 | Monolayern |
| HEK -CMV -hOCT1 | $9,6 \cdot 10^6$ | 3 | [³ H]MPP ⁺ (10; 20 nM) ± Arzneistoffe (variierend) | 7,5 | 1; 10; 20 | Suspensionen |
| | $9,6 \cdot 10^6$ | 3 | [³ H]Acetylcholin (10 nM) [³ H]Cholin (10 nM) [³ H]Clonidin (10 nM) | 7,5 | 10 | Suspensionen |
| HEK -CMV -hOCT2 | $2,4 \cdot 10^6$ | 7 | [³ H]MPP ⁺ (10; 20 nM) ± Arzneistoffe (variierend) | 7,5 | 1; 10; 15 | Suspensionen |
| | $2,4 \cdot 10^6$ | 7 | [³ H]Acetylcholin (10 nM) [³ H]Cholin (10 nM) [³ H]Clonidin (10 nM) | 7,5 | 10 | Suspensionen |

Tab. 5b: Versuchsbedingungen für die Aufnahme nichtradioaktiver Substrate

| Zell-Linie | Zelldichte (Aussaat) | Tag | Substrat (Konzentration) | pH-Wert | Zeit (min) | Inkubation von: |
|------------------------------|----------------------|-----|---------------------------|----------|------------|-----------------|
| Caco-2 | $0,8 \cdot 10^6$ | 7 | Arzneistoffe (variierend) | 7,5; 8,5 | 1; 5 | Monolayern |
| JEG-3 | $0,8 \cdot 10^6$ | 7 | Arzneistoffe (variierend) | 7,5; 8,5 | 1; 5 | Monolayern |
| BeWo | $1 \cdot 10^6$ | 3 | Arzneistoffe (variierend) | 8,5 | 15 | Monolayern |
| CHO -pcDNA 3.1. -hOCT3 | $0,5 \cdot 10^6$ | 7 | Arzneistoffe (variierend) | 7,5; 8,5 | 5; 60 | Monolayern |

3.2.1.3 Bestimmung transepithelialer Fluxe durch Caco-2-Monolayer

Der Flux durch Caco-2-Zellschichten wurde in 24-mm Transwells[®] (Costar, Deutschland) mit Porendurchmessern von 3 μm in der Polycarbonatmembran ($A = 4,71 \text{ cm}^2$) bestimmt. Die Donator- und Akzeptorkompartimente trennende Polycarbonatmembran befindet sich in einem Filtereinsatz, der wiederum in eine Vertiefung eingehängt ist. In der Transwellkammer befinden sich 6 solcher Vertiefungen, in denen die Zellen wie folgt kultiviert wurden:

- Entfernen der Luft aus der Polycarbonatmembran durch Vorinkubieren mit Medium, erst im unteren (2,6 ml), dann im oberen (1,5 ml) Kompartiment
- Befüllen der unteren Kompartimente mit Medium, Aussäen der Zellen mit einer Dichte von $0,2 \cdot 10^6/1,5 \text{ ml}$ in die oberen Kompartimente
- Mediumswechsel zweitägig und am Tag vor dem Versuch
- Überprüfung der Dichtigkeit des Zellrasens durch Messung des elektrischen Widerstandes am Tag des Versuchs an drei Stellen in Medium.

Es wurden sowohl die Fluxraten radioaktiver Substanzen ($[^3\text{H}]$ Atenolol (72 nM), $[^3\text{H}]$ MPP⁺ (2 nM), $[^{14}\text{C}]$ Mannitol (5 μM), $[^3\text{H}]$ Mannitol (28 nM)) als auch nichtradioaktiver Arzneistoffe wie folgt vermessen:

- Entfernen des Mediums, zweimaliges Spülen mit Versuchspuffer
- je nach Fluxrichtung Befüllen des oberen bzw. unteren Kompartiments mit substrathaltigem (Donator) bzw. substratfreiem (Akzeptor) Puffer
- Temperierung (37°C) und kontinuierliche Bewegung (150 U/min) der Transwellkammer während der gesamten Versuchszeit (Thermostar, BMG Lab Technologies)
- bei $t = 0 \text{ min}$ Entnahme und Ergänzen definierter Volumina (25 μl bei Fluxmessungen radioaktiver Substanzen, 100 μl bei Fluxmessungen nichtradioaktiver Substanzen) aus dem Donatorkompartiment für den Bezugswert der Gesamtstoffmenge

- vor Probenentnahme Durchmischen der Akzeptorflüssigkeit durch Anheben der Filtereinsätze
- Entnahme von Proben aus dem Akzeptorkompartiment größtenteils bei $t = 10, 30, 60$ und 120 Minuten; bei Fluxmessungen von apikal nach basolateral 200 μl , von basolateral nach apikal 100 μl
- Ergänzung des entnommenen Volumens durch substratfreien Versuchspuffer (in Korrekturrechnung berücksichtigt)
- zweimaliges Spülen der Membranen mit eiskaltem Versuchspuffer zur Beendigung des Versuchs.

Nach Ausschneiden aus den Einsätzen wurden die Membranen in Messröhrchen überführt (radioaktive Messung) oder mit 1 ml destilliertem Wasser in Eppendorfgläsern bei -20°C eingefroren und wie oben beschrieben aufgearbeitet (nichtradioaktive Messung).

3.2.1.4 Präparation von Caco-2-Zellen für Immunocytochemie

Die Präparationen wurden von Frau Dr. Lips, Institut für Anatomie der Justus-Liebig-Universität Gießen, durchgeführt. Caco-2-Zellen mit der in Abschnitt 3.2.1.2, Tab. 5 angegebenen Zelldichte wurden an Tag 6-7 nach Aussaat in 1,5 ml Eppendorfgläser überführt, zentrifugiert und eingefroren. Aus den Pellets wurden 10 μm dicke Gefrierschnitte angefertigt. Die Gefrierschnitte wurden zunächst für 12-16 Stunden mit dem jeweiligen Anti-OCT- und ggf. mit dem Anti-Villin-Antikörper inkubiert, woran sich eine einstündige Inkubation mit den entsprechenden Sekundär-Antikörpern anschloss. Die Antigen-Antikörper-Reaktionen wurden im Anschluss mithilfe von Epifluoreszenzmikroskopie oder einem konfokalen Laserscanningmikroskop detektiert. Als Negativkontrolle wurde eine Präabsorption des Primärantikörpers mit dem korrespondierenden Peptid vor Inkubation der Gefrierschnitte durchgeführt.

3.2.2 Analytische Methoden

Flüssigkeits-Szintillationsspektrometrie

Die bei den Versuchen eingesetzten radioaktiven Substanzen waren entweder mit Tritium oder Kohlenstoff-14 markiert. Der Zerfall dieser β -Strahler wurde nach Quench-Korrektur als dpm (desintegration per minute) registriert. Die Proben (lysierte Zellen oder substrathaltiger Puffer) wurden nach Überführung in ein Messröhrchen mit 2,8 ml Szintillationsflüssigkeit (rotiszint eco-plus) versetzt und gründlich gemischt.

Die fertigen Proben standen nach Versuchsende etwa 1 h (Fluxmessungen, Aufnahmeuntersuchungen an Zellmonolayern) oder 24 h (Aufnahmeuntersuchungen an Zellsuspensionen) bei Raumtemperatur. Dann folgte die Vermessung mittels eines Flüssigszintillationsspektrometers (Tri-Carb-2100 TR, Packard, USA). Die Messungen dauerten 5 Minuten pro Probe

([³H]-Markierung, [¹⁴C]-Markierung). Mit den Proben wurde ein Standard von 25 µl vermessen, der die radioaktiv markierte Substanz mit den in Tab. 5a angegebenen Konzentrationen enthielt. Aus den dpm-Werten des Standards ergab sich die Gesamtaktivität des Aufnahmebuffers. Über eine Verhältnisgleichung konnte mithilfe der Gesamtaktivität die in den Zellen vorhandene Stoffmenge der radioaktiven Substanz aus den erhaltenen dpm-Werten errechnet werden.

Kapillarelektrophorese (CE)

Das Grundprinzip der Elektrophorese stellt die Migration in Lösung befindlicher geladener Teilchen im elektrischen Feld dar, im Fall der Kapillarelektrophorese in einer Kieselglaskapillare. Die Probenauftrennung erfolgt durch die unterschiedliche elektrophoretische Mobilität der geladenen Analyten, hier kombiniert mit Detektion durch ein Fenster in der Kapillare (on-column-Detektion). Das Fenster entsteht durch Entfernen der äußeren Polyimidbeschichtung. Bei den aus Aufnahmeuntersuchungen als auch aus Fluxuntersuchungen erhaltenen Proben wurde von dem klaren Überstand des Zentrifugats ein Teil entnommen und im Verhältnis 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt. Die bei den nichtradioaktiven Fluxuntersuchungen bei $t = 0$ min entnommenen Proben mussten teilweise vor der Verdünnung in Wasser im Verhältnis 1:10 in Versuchspuffer verdünnt werden.

Für die Vermessung der aufbereiteten Proben kam das Kapillarelektrophoresegerät BIO-FOCUS 3000 (Bio-Rad Laboratories, USA) mit UV-Detektor und Wellenlängenscan-Funktion zur Anwendung. Gemessen wurde unter folgenden Bedingungen:

- Unbeschichtete Kieselglaskapillare: Länge 50 cm, Innendurchmesser 50 µm
- Elektrolyt: Na⁺-Phosphat (NaH₂PO₄/Na₂HPO₄) 100 mM, pH 3,0
- Konditionieren einer neuen Kapillare: Spülen mit 1 N NaOH über 60 Sekunden, mit 0,1 N NaOH über 60 Sekunden, mit dest. Wasser über 200 Sekunden
- vor Beginn einer Messreihe: Spülen der Kapillare mit 0,1 N NaOH über 30 Sekunden, Equilibrieren der Grundlinie mit Laufpuffer bei 10 kV
- Druckinjektion der Proben mit 25 psi·Sekunde in die mit Laufpuffer gefüllte Kapillare, Lauf über 15 Minuten bei 20 kV
- Detektion: kathodenseitig, bei 200 nm oder 225 nm (Ranitidin)
- zwischen zwei Messungen: Spülen mit 0,1 N NaOH, dann mit Laufpuffer über 120 Sekunden
- am Ende einer Messreihe: Spülen der Kapillare mit 0,1 N NaOH über 30 Sekunden, mit dest. Wasser über 200 Sekunden.

Bei einem pH-Wert von 3,0 ist der Transport des Elektrolyten aufgrund von Wandeffekten (elektroosmotischer Fluss, EOF) sehr gering. Unter diesen Bedingungen lag die Migrations-

zeit je nach kationischer Substanz bei 6-8 Minuten (vgl. Abb. 3). Die Peaks wurden anhand ihrer Migrationszeit und UV-Spektren durch Vergleich mit Kalibrierproben zugeordnet. Die Aufbereitung und Vermessung der Kalibrierproben für die Erstellung einer Bezugskurve war identisch mit denen der Proben. Die Bezugskurven zeigten ohne Ausnahme einen linearen Zusammenhang zwischen der Absorption und der Konzentration des jeweiligen Stoffes ($r = 0,99$) im gewählten Konzentrationsbereich. Die Flächen unter den Signalen wurden am Computer (mittels Integration) berechnet und anhand der Bezugskurve in die Konzentration oder Stoffmenge umgerechnet.

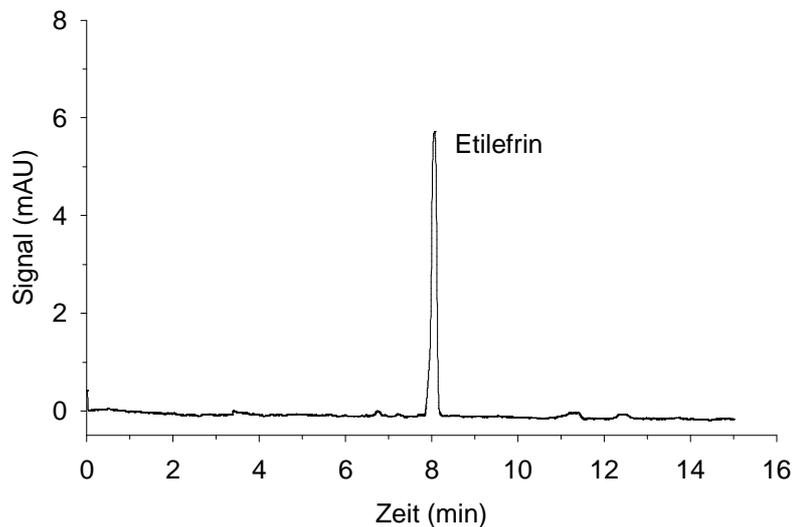


Abb. 3: Elektropherogramm einer Etilefrinkalibrierprobe nach Aufarbeitung des Zell-Homogenates.

Bestimmung des Proteingehaltes

Als Bezugswert für die in die Zellen aufgenommene Stoffmenge dient der Gesamtproteingehalt. Die Bestimmung erfolgte mittels der Standardmethode nach Bradford. Für die Quantifizierung der Proteine wurden Zellen unter denselben Bedingungen kultiviert wie die für das jeweilige Experiment eingesetzten. Durch zweimaliges Spülen mit substratfreiem Versuchspuffer wurden Mediumrückstände entfernt. Im Anschluss daran wurden die Zellen bis zur Bestimmung mit 1 ml destilliertem Wasser bei -20°C eingefroren. Nach dem Auftauen wurde das Lysat mit Hilfe einer $150\ \mu\text{m}$ -Kanüle homogenisiert und dann bei $6000\ \text{U}/\text{min}$ 15 Minuten zentrifugiert. Der klare Überstand wurde je nach Zell-Linie 1:5-1:20 mit destilliertem Wasser verdünnt. Bei Experimenten mit Zellsuspensionen wurde der Proteingehalt direkt aus der Suspension bestimmt, die anteilig im Verhältnis von 1:50-1:200 verdünnt wurde. Von den so erhaltenen Verdünnungen wurden je $20\ \mu\text{l}$ zusammen mit $180\ \mu\text{l}$ 1:5 verdünntem Bradford Reagenz in 96-well Platten gegeben und 5 Minuten bei $300\ \text{U}/\text{min}$ inkubiert. Als Blindwert wurden anstelle der Proteinverdünnung $20\ \mu\text{l}$ destilliertes Wasser

eingesetzt. Die Vermessung erfolgte in einem Fluostar Gerät (BMG Lab Technologies, Deutschland). Die Wellenlänge während der Absorptionsmessung betrug 595 nm.

3.2.3 Mathematische Methoden

Die mathematische Auswertung der Versuchsergebnisse erfolgte unter Verwendung der Programme Microsoft® Excel (Office 2000, Microsoft Cooperation, USA) und Sigma-Plot for Windows (Version 8.0, SPSS Inc., USA).

Bestimmung der Halbhemmkonzentration IC_{50} durch nichtlineare Regression

Generell gibt die IC_{50} (Inhibition Constant) die Konzentration eines Hemmstoffes an, die benötigt wird, um die Aufnahme eines Substrates einer bestimmten Konzentration auf 50% zu senken. Inwieweit die Aufnahme radioaktiver Substanzen ($[^3H]$ Cholin, $[^3H]$ Clonidin, $[^3H]$ MPP⁺) durch potenzielle Hemmstoffe beeinflusst wurde, zeigte unter anderem die Ermittlung der IC_{50} -Werte. Die gemessene Menge radioaktiver Substanz wurde gegen die Hemmstoffkonzentrationen (halblogarithmisch) aufgetragen. Um aus den erhaltenen Messwerten die IC_{50} zu bestimmen, wurde die Gleichung der allosterischen Hill-Kinetik angewandt:

$$Y = \text{Min} + \frac{(\text{Max} - \text{Min})}{1 + \left(\frac{S}{IC_{50}}\right)^P} \quad (1)$$

| | |
|-----------|--|
| Y | im Verhältnis zur Kontrollgruppe prozentual aufgenommene Menge des radioaktiven Substrates in die Zellen |
| Min | minimal aufgenommene Menge des radioaktiven Substrates in die Zellen |
| Max | maximal aufgenommene Menge des radioaktiven Substrates in die Zellen |
| S | Konzentration des Inhibitors |
| IC_{50} | Halbhemmkonzentration |
| P | Hillkoeffizient |

Die Minima (nichtsättigbare Anteile der Substrataufnahme) wurden bei den nachfolgenden IC_{50} -Bestimmungen in Anwesenheit eines sehr hohen Überschusses an unmarkiertem Substrat ermittelt:

- $[^3H]$ Cholinaufnahme \pm Hemmstoffe an JEG-3: Minimum von 9,6% ermittelt in Anwesenheit von 20 mM Cholin

- [³H]MPP⁺-Aufnahme ± Hemmstoffe an HEK-hOCT1: Minimum von 40% ermittelt durch Regression
- [³H]MPP⁺-Aufnahme ± Hemmstoffe an HEK-hOCT2: Minimum von 5,4% ermittelt in Anwesenheit von 10 mM MPP⁺
- [³H]MPP⁺-Aufnahme ± Hemmstoffe an CHO-hOCT3: Minimum von 2,1% ermittelt in Anwesenheit von 10 mM MPP⁺

Die Größe des Überschusses ergab sich aus der Überlegung, dass für die maximale Hemmung des Transportes der Substanz durch sich selbst von einer Konzentration ausgegangen wird, die die IC₅₀ um mehr als das 5-fache überschreitet.

Durch die IC₅₀-Bestimmung wird eine Aussage über die Affinität des Hemmstoffes zum Carrier in Abhängigkeit von der Substratkonzentration getroffen. Die Hemmkonstante K_i kann bei kompetitiver Hemmung durch Umrechnung aus der IC₅₀ ermittelt werden, somit ist K_i unabhängig von der Substratkonzentration (Cheng und Prusoff 1973):

$$K_i = \frac{IC_{50} \cdot S}{1 + \frac{S}{K_t}} \quad (2)$$

| | |
|------------------|---|
| K _i | Hemmkonstante |
| K _t | Michaelis-Menten-Konstante des Substrates |
| IC ₅₀ | Halbhemmkonzentration |
| S | Konzentration des radioaktiven Substrates |

Ermittlung der kinetischen Parameter

Um die kinetischen Parameter Michaelis-Menten-Konstante K_t und Maximalgeschwindigkeit V_{max} bestimmen zu können, wurde zunächst die Aufnahme des radioaktiven Substrates ([³H]Cholin, [³H]Clonidin) in die Plazentazell-Linien JEG-3 oder BeWo in Gegenwart eines Überschusses an unmarkiertem Substrat bestimmt (je 20 mM). Dieser Diffusionsanteil der Gesamtaufnahme wurde von der in die Zellen aufgenommene Menge des radioaktiven Substrates abgezogen. Die korrigierte Stoffmenge wurde mit dem Verhältnis aus angebotener Konzentration des radioaktiven Substrates ([³H]Cholin (3 oder 4 nM); [³H]Clonidin (3 nM)) und jeweilig angebotener Gesamtcholin- oder Gesamtclonidinkonzentration multipliziert. So konnte auf die insgesamt in die Zellen aufgenommene Cholin- oder Clonidinmenge geschlossen werden. Die um den Diffusionsanteil korrigierte Aufnahmerate wurde, bezogen auf den Proteingehalt der Zellen, gegen die insgesamt angebotene Cholin- oder Clonidinkonzentration aufgetragen. Anschließend erfolgte die Bestimmung der kinetischen Parameter durch nichtlineare Regression der Messpunkte mittels folgender Gleichung, wobei der Diffusionsanteil (P · S) vor der Kurvenanpassung subtrahiert wurde:

$$v = \frac{V_{\max} \cdot S}{K_t + S} + P \cdot S \quad (3)$$

- v Aufnahmerate des Substrates
 V_{\max} Maximalgeschwindigkeit des Transportes
 K_t Michaelis-Menten-Konstante
 S Konzentration des Substrates
 P pro Zeiteinheit und Proteinmenge vom Substrat geklärtes Volumen (Clearance)
 $P \cdot S$ nichtsättigbarer, linearer Anteil der Substrataufnahme (Diffusionsanteil)

Die Substratkonzentration bei halbmaximaler Geschwindigkeit wird durch die Michaelis-Menten-Konstante K_t dargestellt, das transportierende Protein ist zur Hälfte gesättigt. V_{\max} repräsentiert die Aufnahmerate bei vollständiger Sättigung des Transportproteins. Durch Linearisierung der Kurve nach Eadie-Hofstee können V_{\max} als Schnittpunkt mit der Abszisse und K_t als negativer Anstieg der linearen Regressionsgrade bestimmt werden. Für diese Transformation wird die Aufnahmerate v gegen den Quotienten aus v und der jeweiligen insgesamt vorhandenen Cholin- oder Clonidinkonzentration S aufgetragen.

Für die Bestimmung kinetischer Parameter der Transportprozesse nichtradioaktiver Substrate wurde die aufgenommene Stoffmenge nicht um den Diffusionsanteil ($P \cdot S$) korrigiert. Vor der Transformation nach Eadie-Hofstee wurde die rechnerisch ermittelte Clearance mit der jeweils angebotenen Gesamtsubstratkonzentration multipliziert und von der dazugehörigen Aufnahmerate abgezogen.

Berechnung des transepithelialen Fluxes

Der transepitheliale Flux J resultiert aus der Auftragung von der in den Akzeptor gelangten Stoffmenge der untersuchten Substanz gegen die Zeit. Die pro Zeiteinheit durch die Membran transportierte Stoffmenge in Prozent des Donators ließ sich bei radioaktiven Fluxstudien mit Hilfe folgender Gleichungen berechnen:

$$J[\%] = \frac{\left(\text{dpm}_{t_n} + \text{dpm}_{t_{n-1\text{korr}}} \cdot \frac{V_{\text{Pr}}}{V_{\text{A}}} \right) \cdot V_{\text{A}} \cdot V_{\text{Standard}} \cdot 100\%}{(\text{dpm}_{\text{Standard}}) \cdot V_{\text{D}} \cdot V_{\text{Pr}}} \quad (4)$$

| | |
|-----------------------------------|---|
| dpm_{t_n} | Zerfallsgeschwindigkeit der entnommenen Probe zum Zeitpunkt t_n |
| $\text{dpm}_{\text{Standard}}$ | Zerfallsgeschwindigkeit des Standards in dpm/25 μl |
| $\text{dpm}_{t_{n-1\text{korr}}}$ | um die Verdünnung korrigierte Zerfallsgeschwindigkeit der Probe zum Zeitpunkt t_{n-1} |
| V_{A} | Gesamtvolumen des Akzeptorkompartimentes in ml |
| V_{D} | Gesamtvolumen des Donatorkompartimentes in ml |
| V_{Standard} | Gesamtvolumen des Standards in ml |
| V_{Pr} | Entnahmevolumen aus dem Akzeptorkompartiment in ml |

Für Fluxuntersuchungen nichtradioaktiver Substanzen kam folgende Gleichung zur Anwendung:

$$J[\%] = \frac{\left(c_{t_n} + c_{t_{n-1\text{korr}}} \cdot \frac{V_{\text{Pr}}}{V_{\text{A}}} \right) \cdot V_{\text{A}} \cdot 100\%}{c_0 \cdot V_{\text{D}}} \quad (5)$$

| | |
|--------------------------|---|
| V_{A} | Gesamtvolumen des Akzeptorkompartimentes in ml |
| V_{D} | Gesamtvolumen des Donatorkompartimentes in ml |
| V_{Pr} | Entnahmevolumen aus dem Akzeptorkompartiment in ml |
| c_{t_n} | Substratkonzentration im Akzeptorkompartiment zum Zeitpunkt t_n |
| $c_{t_{n-1\text{korr}}}$ | um die Verdünnung korrigierte Substratkonzentration im Akzeptorkompartiment zur Zeitpunkt t_{n-1} |
| c_0 | Substratkonzentration im Donatorkompartiment zum Zeitpunkt t_0 |

Die angegebenen Fluxraten pro Zeiteinheit wurden, wenn möglich, durch lineare Regression aus den Messpunkten ermittelt.

Statistische Auswertung

Bei allen Versuchen betrug die Anzahl der voneinander unabhängigen Messungen drei bis neun. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte mit Standardfehler berechnet. Außerdem wurde zur Prüfung auf signifikante Unterschiede ein Teil der Messreihen einem nichtparametrischen zweiseitigen U-Test nach Mann-Whitney unterworfen, wobei eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p = 0,05$ zugrunde gelegt wurde.

4 Ergebnisse

4.1 Verträglichkeit und Stabilität der untersuchten Arzneistoffe

Während der Transportstudien wurden die Arzneistoffe teilweise in hohen Konzentrationen eingesetzt. Um eine Schädigung der Zellmonolayer durch osmotische Effekte oder Beeinflussung der Membranintegrität ausschließen zu können, wurde der transepitheliale Flux von Mannitol gemessen, wie unter 3.2.1.3 beschrieben. Der Mannitolflux wurde in Gegenwart und Abwesenheit der untersuchten Arzneistoffe bei verschiedenen pH-Werten von apikal nach basolateral (J_{a-b}) an Caco-2-Monolayern stellvertretend für die anderen Zell-Linien untersucht. Mannitol wird in geringem Maße und nur durch einfache Diffusion in die Zelle aufgenommen. In der Zell-Linie Caco-2 existiert kein Transportsystem für Mannitol (Artursson *et al.* 1993). Ein gegenüber der Kontrolle erhöhter Mannitolflux wäre demnach nur durch Zellschädigungen infolge der hinzugefügten Arzneistoffe erklärbar.

Um vor Beginn einer Fluxmessung die endgültige Dichtigkeit des Zellrasens zu prüfen, wurde der elektrische Widerstand bestimmt (siehe 3.2.1.3). Der Mittelwert aller gemessenen Widerstände betrug $486 \pm 9 \Omega \cdot \text{cm}^2$.

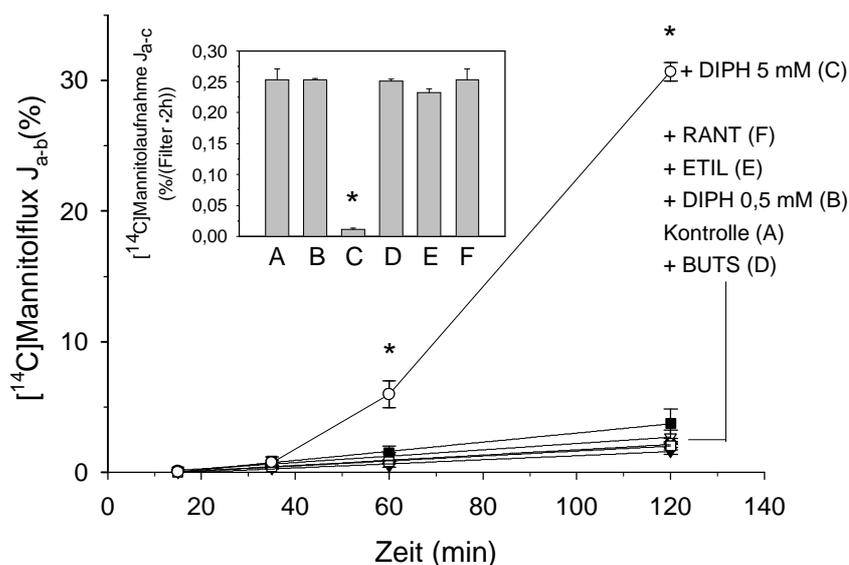


Abb. 4: Einfluss von Arzneistoffen auf den transepithelialen [¹⁴C]Mannitolflux (J_{a-b}). Apikaler Zusatz von [¹⁴C]Mannitol (5 μ M) in An- oder Abwesenheit von Arzneistoffen unterschiedlicher Konzentrationen in Puffer pH 7,5 (37°C), Inkubation über 2 h. Einschub: [¹⁴C]Mannitolaufnahme in die Zellen von der apikalen Seite (J_{a-c}) in 2 h. A: [¹⁴C]Mannitol (Kontrolle), B: plus Diphenhydramin 0,5 mM, C: plus Diphenhydramin 5 mM, D: plus Butylscopolaminium 5 mM, E: plus Etilerfrin 10 mM, F: plus Ranitidin 10 mM. Daten sind Mittelwerte \pm S.E., n = 3, * p \leq 0,05.

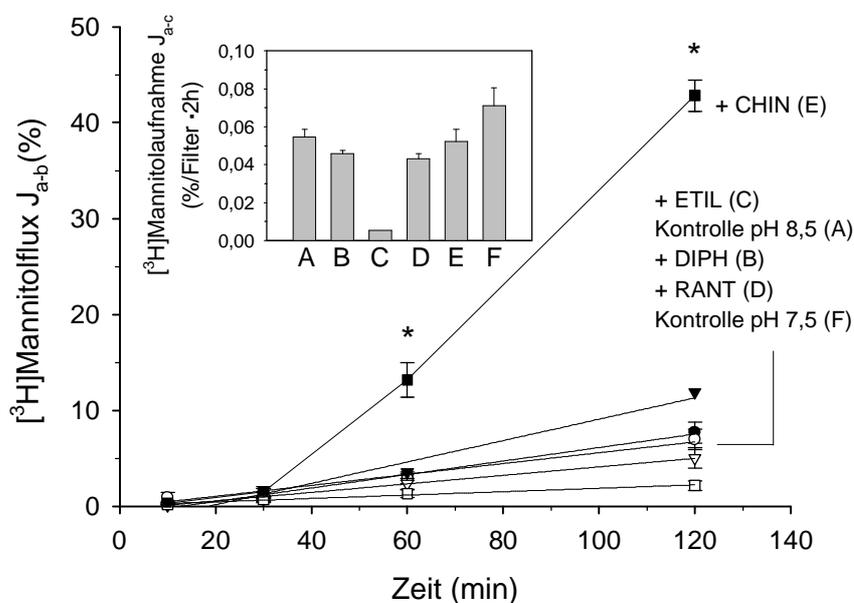


Abb. 5: Einfluss von Arzneistoffen auf den transepithelialen $[^3\text{H}]$ Mannitolflux (J_{a-b}). Apikaler Zusatz von $[^3\text{H}]$ Mannitol (28 nM) in An- oder Abwesenheit von Arzneistoffen unterschiedlicher Konzentrationen in Puffer pH 8,5 (37°C) oder pH 7,5 (37°C), Inkubation über 2 h. Einschub: $[^3\text{H}]$ Mannitolaufnahme in die Zellen von der apikalen Seite (J_{a-c}) in 2 h. A: $[^3\text{H}]$ Mannitol (Kontrolle pH 8,5), B: plus Diphenhydramin 0,5 mM, C: plus Etilefrin 5 mM, D: plus Ranitidin 5 mM, E: plus Chinin 3 mM, F: $[^3\text{H}]$ Mannitol (Kontrolle pH 7,5). Daten sind Mittelwerte \pm S.E., n = 3 (Etilefrin n = 2), * $p \leq 0,05$.

Die in Abb. 4 und Abb. 5 dargestellten Prozentwerte des $[^{14}\text{C}]$ oder $[^3\text{H}]$ Mannitolfluxes pro Zeiteinheit und Filter wurden aus den Messwerten mit Hilfe von Gleichung (4) errechnet.

Bei pH 7,5 erhöhte Diphenhydramin in einer Konzentration von 5 mM den $[^{14}\text{C}]$ Mannitolflux bereits nach 60 Minuten signifikant gegenüber der Kontrolle und erniedrigte die $[^{14}\text{C}]$ Mannitolaufnahme in die Zellen nach zwei Stunden. Dagegen beeinflussten Diphenhydramin in einer Konzentration von 0,5 mM und die anderen Arzneistoffe den $[^{14}\text{C}]$ Mannitolflux nicht (Abb. 4). Abb. 5 zeigt den Effekt des pH-Wertes auf den $[^3\text{H}]$ Mannitolflux, der bei pH 8,5 im Vergleich zu pH 7,5 nach 120 Minuten um den Faktor 3 erhöht war. Bisher belegt ist die Verträglichkeit von pH 4,8 bis 8,0 an Caco-2-Zellen über weniger als 2 Stunden (Palm *et al.* 1999). Außerdem hatte Chinin (3 mM) bei pH 8,5 im Vergleich zur Kontrolle einen starken Anstieg des Fluxes zur Folge, beeinflusste aber die Aufnahme nicht. Dagegen erhöhte der Zusatz von Etilefrin (pH 8,5) den Flux schwach, erniedrigte aber die Aufnahme stark. Die übrigen Arzneistoffe hatten bei pH 8,5 keinen Einfluss auf die Aufnahme oder den Flux von $[^3\text{H}]$ Mannitol. Belegt sind außerdem die Verträglichkeiten von 1 mM Diphenhydramin und von 3 mM Chinin bei pH 7,5 über zwei Stunden.

Stabilität der Arzneistoffe

Ein möglicher Abbau der untersuchten Arzneistoffe durch zelluläre Enzyme während der zweistündigen Fluxmessungen oder der Aufbereitung vor der nichtradioaktiven Quantifizierung wurde mittels Kapillarelektrophorese überprüft. Es wurde die Stabilität der Substanzen auf den Zellen und in Zell-Lysat in Abhängigkeit von den durchgeführten Experimenten untersucht, wie unter 3.2.1.2 beschrieben. Die Stabilitätsprüfungen fanden an der Zell-Linie Caco-2 stellvertretend für die anderen Zell-Linien statt, da Caco-2 als intestinale Zell-Linie über eine Vielzahl metabolisierender Enzyme verfügt (Prueksaritanont *et al.* 1996).

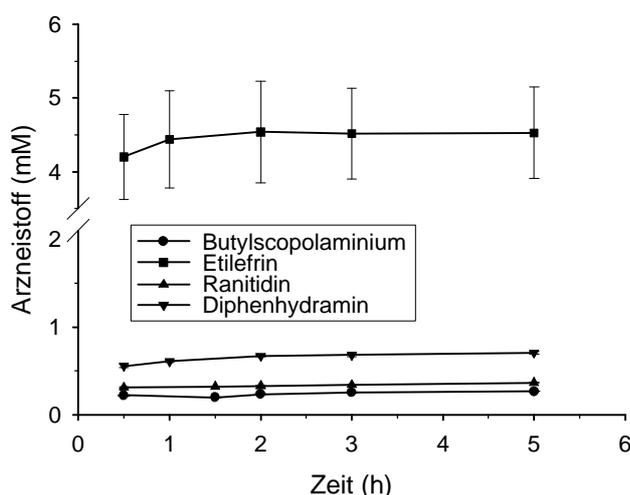


Abb. 6: Stabilität der Arzneistoffe in Puffer über Caco-2-Monolayern. Inkubation mit Butylscopolaminium 0,25 mM (pH 7,5), Etilefrin 5 mM (pH 7,5), Ranitidin 0,5 mM (pH 8,5), Diphenhydramin 0,5 mM (pH 8,5) in Puffer (37°C) über 5 h. Daten sind Mittelwerte \pm S.E., n = 3.

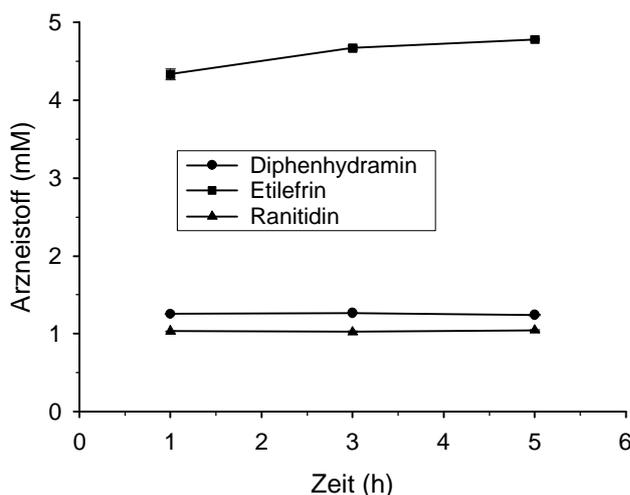


Abb. 7: Stabilität der Arzneistoffe in Caco-2-Lysat. Inkubation mit Diphenhydramin (1 mM), Etilefrin (5 mM), Ranitidin (1 mM) in destilliertem Wasser über 5 h. Daten sind Mittelwerte \pm S.E., n = 3.

Abb. 6 und Abb. 7 lassen erkennen, dass die Arzneistoffe Butylscopolaminium, Diphenhydramin, Etilefrin und Ranitidin über einen Zeitraum von 5 Stunden keinem nennenswerten Abbau unterliegen. Ranitidin wurde allerdings nach dem Stabilitätstest auf den Zell-

Monolayern in geringerer Konzentration als eingesetzt wiedergefunden. Der Abbau von Ranitidin durch zelluläre Enzyme ist wenig wahrscheinlich, da Gan und Mitarbeiter (1993) bei Transportuntersuchungen an Caco-2-Monolayern keinen Metabolismus von Ranitidin feststellen konnten.

4.2 Transport am Dünndarmepithel

4.2.1 Charakterisierung des [³H]MPP⁺-Transportes an Caco-2-Zellen

N-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) gilt als prototypisches Substrat für die organischen Kationentransporter, das von allen 3 hOCTs mit vergleichbaren Affinitätskonstanten (K_t) transportiert wird (Koepsell *et al.* 2003). In der intestinalen Zell-Linie Caco-2 ist die mRNA aller 3 hOCTs exprimiert (siehe Abschnitt 2.3.2, Tab. 1). Deshalb wurde MPP⁺ in den Untersuchungen an Caco-2-Zellen als kationisches Referenzsubstrat ausgewählt, um so die mögliche Interaktion oral verabreichter Arzneistoffe mit hOCTs zu simulieren. Die Aufnahme von MPP⁺ über die apikale Membran von Caco-2-Zellen wurde von Martel und Mitarbeitern (2001) ausführlich charakterisiert. Daher beschränken sich die Untersuchungen an dieser Stelle auf die Zeit- und Na⁺-Abhängigkeit der [³H]MPP⁺-Aufnahme.

Abb. 8 zeigt die Zeit- und pH-Abhängigkeit der [³H]MPP⁺-Aufnahme in Caco-2-Zellen: Die Aufnahme von [³H]MPP⁺ ist bis zu 10 Minuten linear und wird durch einen auswärts gerichteten Protonengradienten leicht stimuliert. Alle folgenden Aufnahmeuntersuchungen mit [³H]MPP⁺ an Caco-2 wurden bei pH 7,5 in Anwesenheit von 140 mM Natriumchlorid über einen Zeitraum von 10 Minuten durchgeführt.

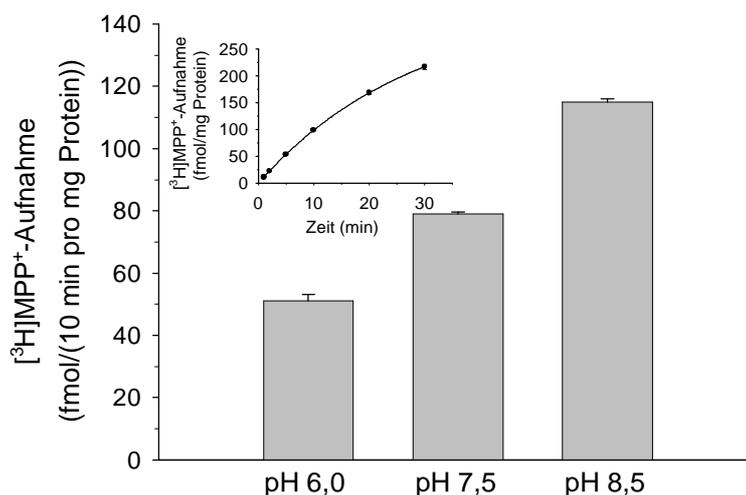


Abb. 8: pH-Abhängigkeit der [³H]MPP⁺-Aufnahme in Caco-2-Zellen. Inkubation mit [³H]MPP⁺ (4 nM) in Puffer pH 6,0; pH 7,5 oder pH 8,5 über 10 min. Einschub: Zeitabhängigkeit der [³H]MPP⁺-Aufnahme. Inkubation mit [³H]MPP⁺ (4 nM) in Puffer pH 7,5. Daten sind Mittelwerte ± S.E., n = 3.

4.2.2 Hemmung der [³H]MPP⁺-Aufnahme und des [³H]MPP⁺-Fluxes an Caco-2-Monolayern durch die untersuchten Arzneistoffe

Die Auswirkung kationischer Modellsubstrate und Arzneistoffe auf die [³H]MPP⁺-Aufnahme ist in Tab. 6 dargestellt. MPP⁺ hemmt die Aufnahme von radioaktiv markiertem MPP⁺ in einer Konzentration von 0,1 mM über 50%. Interessanterweise hat das hOCT1- und hOCT2-Substrat Tetraethylammonium (TEA) bei einer Konzentration von 1 mM nur geringe Auswirkungen auf die [³H]MPP⁺-Aufnahme in Caco-2 Zellen, ebenso wie das hOCT2-Substrat Cholin (Gorboulev *et al.* 1997). In einer Konzentration von 1 mM hemmen das Spasmolytikum Butylscopolaminium und der Acetylcholinesterasehemmer Carbachol die MPP⁺-Aufnahme moderat bis kaum.

Tab. 6: Inhibitoren der [³H]MPP⁺-Aufnahme in Caco-2-Monolayer. Inkubation mit [³H]MPP⁺ (4 nM) in An- oder Abwesenheit kationischer Modellsubstrate/Arzneistoffe in angegebenen Konzentrationen in Puffer pH 7,5 über 10 min. Daten sind Mittelwerte ± S.E., n = 4.

| Inhibitor | [³ H]MPP ⁺ -Aufnahme (%) |
|---------------------------|---|
| Kontrolle | 100 ± 2 |
| MPP ⁺ (0,1 mM) | 44 ± 1 |
| TEA (1 mM) | 76 ± 4 |
| Cholin (1 mM) | 104 ± 9 |
| Butylscopolaminium (1 mM) | 75 ± 0,3 |
| Carbachol (1 mM) | 93 ± 1 |

Desweiteren wurde der Einfluss kationischer Arzneistoffe auf die [³H]MPP⁺-Aufnahme in Caco-2-Monolayern untersucht und deren Halbhemmkonzentrationen nach Gleichung (1) ermittelt.

Tab. 7: IC₅₀-Werte kationischer Arzneistoffe gegen [³H]MPP⁺ an Caco-2-Zellen. Inkubation mit [³H]MPP⁺ (4 nM) in An- oder Abwesenheit kationischer Arzneistoffe (0-100 mM) in Puffer pH 7,5 über 10 min. Die IC₅₀-Werte wurden aus dose-response-Hemmkurven erstellt. Parameter sind gezeigt als Mittelwerte mit S.E., n = 4.

| Arzneistoff | IC ₅₀ (μM) |
|----------------|-----------------------|
| Chinin | 5,9 ± 0,5 |
| Atropin | 230 ± 28 |
| Diphenhydramin | 145 ± 25 |
| Etilefrin | 3956 ± 817 |
| Chinidin | 38 ± 6 |
| Ranitidin | 271 ± 42 |
| Clonidin | 109 ± 14 |

In Tab. 7 sind die ermittelten IC₅₀-Werte der kationischen Arzneistoffe aufgelistet. Die Affinitätskonstanten liegen in einem Konzentrationsbereich von 5,9 μM für das Antimalariamittel Chinin bis 3,9 mM für das Antihypotensivum Etilefrin. Die pharmazeutisch relevanten Arzneistoffe Atropin, Clonidin, Chinin, Chinidin, Diphenhydramin und Ranitidin hemmen in mikromolaren Konzentrationen die [³H]MPP⁺-Aufnahme in Caco-2-Zellen.

Um zu überprüfen, ob die Arzneistoffe nicht nur die Aufnahme, sondern auch den transepithelialen Transport von [³H]MPP⁺ hemmen können, wurden Fluxuntersuchungen von apikal nach basolateral mit [³H]MPP⁺ in An- und Abwesenheit der Arzneistoffe an Caco-2-Monolayern durchgeführt (siehe 3.2.1.3). Die Arzneistoffe Diphenhydramin, Chinin und Chinidin, die in den Verträglichkeitsuntersuchungen membranschädigende Eigenschaften aufwiesen, wurden nur in den als verträglich bestimmten Konzentrationen eingesetzt. Die übrigen Arzneistoffe wurden in der Konzentration von 20 mM eingesetzt. Der transepitheliale Flux wird im Vergleich zur apikalen Aufnahme in Petrischalen oft erst in höheren Konzentrationen gehemmt, da hier auch potenzielle Transporter in der basolateralen Membran mit dem Substrat interagieren können, die bei Aufnahmeuntersuchungen an apikalen Membranen keine Rolle spielen. Die Umrechnung der Messwerte in den prozentualen [³H]MPP⁺-Flux pro Zeiteinheit und Filter erfolgte mit Gleichung (4).

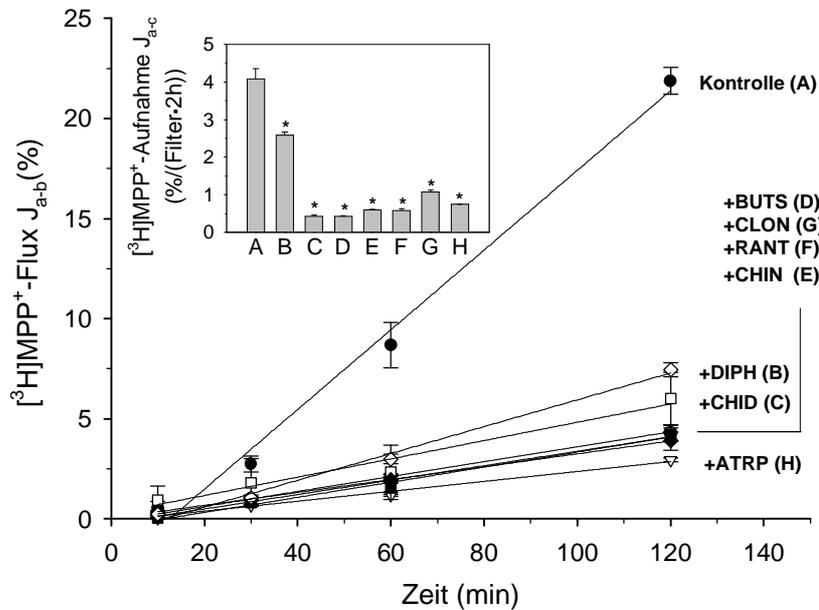


Abb. 9: Hemmung des transepithelialen $[^3\text{H}]\text{MPP}^+$ -Fluxes durch Caco-2-Monolayer (J_{a-b}). Apikaler Zusatz von $[^3\text{H}]\text{MPP}^+$ (2 nM) in An- oder Abwesenheit von Arzneistoffen unterschiedlicher Konzentration in Puffer pH 7,5 (37°C). Einschub: Aufnahme von $[^3\text{H}]\text{MPP}^+$ in die Zellen von der apikalen Seite (J_{a-c}) in 2 h. A: $[^3\text{H}]\text{MPP}^+$ 2 nM (Kontrolle), B: plus Diphenhydramin 0,5 mM, C: plus Chinidin 3 mM, D: plus Butylscopolaminium 20 mM, E: plus Chinin 3 mM, F: plus Ranitidin 20 mM, G: plus Clonidin 20 mM, H: plus Atropin 20 mM. Daten sind Mittelwerte \pm S.E., $n \geq 3$, * $p \leq 0,05$.

Abb. 9 zeigt den Einfluss der Arzneistoffe auf den transepithelialen $[^3\text{H}]\text{MPP}^+$ -Flux in apikal-basolateraler Richtung (J_{a-b}). Die durch lineare Regression ermittelte Fluxrate betrug nach Division durch die Membranfläche $2\%/h\cdot\text{cm}^2$ und lag damit um das 30fache höher als der $[^{14}\text{C}]\text{Mannitol}$ -Flux durch Caco-2-Monolayer ($0,07\%/h\cdot\text{cm}^2$ (Bretschneider *et al.* 1999)). Alle kationischen Arzneistoffe inhibierten den $[^3\text{H}]\text{MPP}^+$ -Flux. Diphenhydramin hemmte in einer Konzentration von 0,5 mM den $[^3\text{H}]\text{MPP}^+$ -Flux um 75%. Die hOCT-Inhibitoren Chinin und Chinidin verringerten in einer Konzentration von 3 mM den $[^3\text{H}]\text{MPP}^+$ -Flux jeweils um 81 und 68%. In einer Konzentration von 20 mM hemmten Atropin, Ranitidin, Clonidin und Butylscopolaminium den $[^3\text{H}]\text{MPP}^+$ -Flux um 85, 80, 79 und 78%. Die Rangfolge der Aufnahmezeiten in die Zellen nach 2 Stunden war von der Fluxrangfolge verschieden. Alle Arzneistoffe hemmten gegenüber der Kontrolle signifikant die Aufnahme in die Zellen: Während Diphenhydramin die $[^3\text{H}]\text{MPP}^+$ -Aufnahme um weniger als 50% reduzierte, hemmten die anderen Arzneistoffe die intrazelluläre Aufnahme wesentlich stärker.

4.2.3 Flux der kationischen Arzneistoffe durch Caco-2-Monolayer

Die Hemmung von [^3H]MPP⁺-Aufnahme und -Flux zeigt deutlich eine Interaktion der Arzneistoffe mit MPP⁺-Transportprotein(en), beweist aber nicht die tatsächliche Translokation der Arzneistoffe über das Epithel durch MPP⁺-Aufnahmesysteme. Daher wurde zunächst der Flux ausgewählter unmarkierter Arzneistoffe in Caco-2-Zellen untersucht, wobei Transport und intrazelluläre Aufnahme sowohl in apikal-basolateraler als auch in basolateral-apikaler Richtung gemessen wurden. Die Quantifizierung erfolgte mittels Kapillarelektrophorese oder Flüssigkeits-Szintillationsmessung (Atenolol). Die Arzneistoffe wurden in Konzentrationen eingesetzt, die sich als für die Zellen verträglich erwiesen hatten.

Die in Tab. 8 dargestellt Fluxraten in %/Filter-h wurden vor der linearen Regression der Daten mit Hilfe von Gleichung (5) aus den gemessenen Werten errechnet. Bei pH 7,5 stellt sich die Rangfolge der Fluxraten in apikal-basolateraler und basolateral-apikaler Richtung wie folgt dar: Chinin > Etilefrin > Ranitidin \geq Butylscopolaminium. Die Fluxraten von apikal nach basolateral waren mit Ausnahme von Ranitidin um den Faktor 1,3-3 höher als von basolateral nach apikal. Bei einem pH-Wert von 8,5 ergab sich folgende Rangfolge der Fluxraten J_{a-b} und J_{b-a} : Diphenhydramin > Etilefrin > Ranitidin > [^3H]Atenolol > Butylscopolaminium (nur J_{a-b} bestimmt). Die Fluxraten J_{a-b} von Diphenhydramin und Etilefrin waren größer als deren Fluxraten J_{b-a} . [^3H]Atenolol zeigte Fluxraten derselben Größenordnung in beide Richtungen. Die Fluxraten von Ranitidin lagen sowohl bei pH 7,5 als auch bei pH 8,5 von basolateral nach apikal über denen von apikal nach basolateral. Bei den Arzneistoffen, deren Fluxraten bei verschiedenen pH-Werten untersucht wurden, lässt sich mit steigendem pH-Wert eine Zunahme der Fluxraten um den Faktor 1,4-4,1 erkennen. So ist unabhängig von der Fluxrichtung $J_{\text{Etilefrin pH 8,5}} > J_{\text{Etilefrin pH 7,5}} > J_{\text{Etilefrin pH 6,5}}$ und $J_{\text{Butylscopolaminium pH 8,5}} > J_{\text{Butylscopolaminium pH 7,5}}$ sowie $J_{\text{Ranitidin pH 8,5}} > J_{\text{Ranitidin pH 7,5}}$.

Tab. 8: Transepithelialer Flux verschiedener kationischer Arzneistoffe an Caco-2-Monolayern in apikal-basolateraler und basolateral-apikaler Richtung. Messung des Fluxes (J_{a-b} , J_{b-a}) über 2 h bei den pH-Werten 6,5; 7,5 oder 8,5 (37°C). Zusatz der Arzneistoffe verschiedener Konzentrationen ($[^3\text{H}]$ Atenolol 72 nM, Butylscopolaminium 5 mM, Diphenhydramin 0,5 mM, Etilefrin 5 mM, Ranitidin 5 mM, Chinin 3 mM) in Puffer zum Donatorkompartiment (1,5 oder 2,6 ml) der Transwell®-Kammern. Nach 10, 30, 60 und 120 min Probenentnahme aus dem Akzeptorkompartiment. Bestimmung der Fluxraten durch lineare Regression, außer für Chinin, Diphenhydramin und Etilefrin pH 6,5. Daten sind Mittelwerte \pm S.E., $n \geq 3$.

| | pH 6,5 | | pH 7,5 | | pH 8,5 | |
|-------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Fluxrate Arzneistoff | J_{a-b} %/(Filter·h) | J_{b-a} %/(Filter·h) | J_{a-b} %/(Filter·h) | J_{b-a} %/(Filter·h) | J_{a-b} %/(Filter·h) | J_{b-a} %/(Filter·h) |
| $[^3\text{H}]$ Atenolol | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | $1,4 \pm 0,1$ | $1,5 \pm 0,3$ |
| Butylscopolaminium | n.b. | n.b. | $0,60 \pm 0,2$ | $0,26 \pm 0,1$ | $0,98 \pm 0,4$ | n.b. |
| Diphenhydramin | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | 44 ± 1 | 23 ± 1 |
| Etilefrin | $1,5 \pm 0,8$ | $0,91 \pm 0,4$ | $2,1 \pm 0,1$ | $1,7 \pm 0,2$ | $8,7 \pm 0,7$ | $5,9 \pm 0,5$ |
| Ranitidin | n.b. | n.b. | $0,57 \pm 0,1$ | $1,1 \pm 0,3$ | $2,3 \pm 0,3$ | $2,8 \pm 0,3$ |
| Chinin | n.b. | n.b. | 33 ± 2 | 12 ± 2 | n.b. | n.b. |

Die zugehörigen intrazellulären Aufnahmeraten (%/(Filter·2h)) sind in Tab. 9 aufgelistet. Die Rangfolgen für Aufnahme in die Zellen und Fluxraten bei pH 7,5 sind identisch, Butylscopolaminium konnte nicht detektiert werden. Die Aufnahmeraten von basolateral in die Zellen (J_{b-c}) waren mit Ausnahme von Chinin bei pH 7,5 2-4fach höher als von apikal in die Zellen (J_{a-c}), bei Erhöhung des pH-Wertes auf 8,5 war J_{b-c} Ranitidin, $[^3\text{H}]$ Atenolol $>$ J_{a-c} Ranitidin, $[^3\text{H}]$ Atenolol, J_{b-c} Etilefrin = J_{a-c} Etilefrin und J_{a-c} Diphenhydramin $>$ J_{b-c} Diphenhydramin. Bei pH 8,5 gliedern sich die Aufnahmeraten J_{a-c} folgendermaßen: Diphenhydramin $>$ Etilefrin $>$ $[^3\text{H}]$ Atenolol $>$ Ranitidin. Die Aufnahmeraten J_{b-c} unterscheiden sich bei pH 8,5 für $[^3\text{H}]$ Atenolol, Diphenhydramin, Etilefrin und Ranitidin kaum. Die Aufnahme von Etilefrin wird durch steigenden pH-Wert von 6,5 nach 7,5 um das 5-7fache stimuliert, bei weiterer Erhöhung des pH-Wertes auf 8,5 steigt die Aufnahmerate um den Faktor 3-4. Die Aufnahmerate von Ranitidin steigt wie die Fluxrate von pH 7,5 nach pH 8,5 an.

In Abb. 10 sind die Aufnahmeraten J_{a-c} und J_{b-c} von Etilefrin aus Tab. 9 zusammen mit J_{b-c} in Gegenwart von 20 mM des hOCT-Substrates TEA bei einem pH-Wert von 7,5 graphisch dargestellt. Der Zusatz von TEA zum basolateralen Donatorkompartiment reduzierte die Etilefrinaufnahme schwach, aber statistisch signifikant. Die Etilefrinaufnahme aus dem

apikalen Kompartiment in die Zellen ist gegenüber der aus dem basolateralen Kompartiment mit und ohne TEA-Zusatz deutlich geringer.

Tab. 9: Aufnahme der Arzneistoffe über apikale und basolaterale Membranen von Caco-2-Monolayern. Messung der Aufnahme (J_{a-c} , J_{b-c}) in 2 h bei den pH-Werten 6,5; 7,5; oder 8,5 (37°C). Zusatz der Arzneistoffe verschiedener Konzentrationen ($[^3\text{H}]$ Atenolol 72 nM, Butylscopolaminium 5 mM, Diphenhydramin 0,5 mM, Etilefrin 5 mM, Ranitidin 5 mM, Chinin 3 mM) in Puffer zum Donatorkompartiment (1,5 oder 2,6 ml) der Transwell®-Kammern. Nach 2 h Ausschneiden der Filter aus dem Einsatz. Daten sind Mittelwerte \pm S.E., $n \geq 3$.

| | pH 6,5 | | pH 7,5 | | pH 8,5 | |
|-------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Aufnahme Arzneistoff | J_{a-c} (%/Filter·2h) | J_{b-c} (%/Filter·2h) | J_{a-c} (%/Filter·2h) | J_{b-c} (%/Filter·2h) | J_{a-c} (%/Filter·2h) | J_{b-c} (%/Filter·2h) |
| $[^3\text{H}]$ Atenolol | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | 0,36 \pm 0,02 | 0,55 \pm 0,03 |
| Butylscopolaminium | n.b. | n.b. | n.d. | n.d. | n.d. | n.b. |
| Diphenhydramin | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | 1,0 \pm 0,1 | 0,72 \pm 0,05 |
| Etilefrin | 0,05 \pm 0,01 | 0,07 \pm 0,01 | 0,25 \pm 0,04 | 0,54 \pm 0,04 | 0,73 \pm 0,1 | 0,60 \pm 0,08 |
| Ranitidin | n.b. | n.b. | 0,07 \pm 0,01 | 0,28 \pm 0,01 | 0,22 \pm 0,03 | 0,69 \pm 0,03 |
| Chinin | n.b. | n.b. | 1,6 \pm 0,06 | 1,1 \pm 0,1 | n.b. | n.b. |

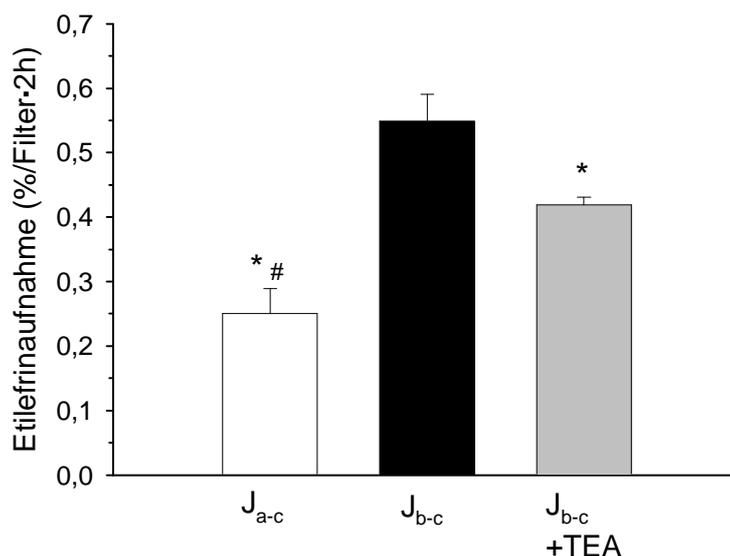


Abb. 10: Vergleich der Etilefrinaufnahme aus apikalem und basolateralem Kompartiment, Einfluss von TEA. Messung der Aufnahme (J_{a-c} , J_{b-c}) in 2 h bei pH 7,5 (37°C). Zusatz von Etilefrin (5 mM) und ggf. TEA (20 mM) in Puffer zum Donatorkompartiment (1,5 oder 2,6 ml) der Transwell®-Kammern. Nach 2 h Ausschneiden der Filter aus dem Einsatz. Daten sind Mittelwerte \pm S.E., $n \geq 3$, * $p \leq 0,05$ vs. J_{b-c} , # $p \leq 0,05$ vs. $J_{b-c} + \text{TEA}$.

4.2.4 Aufnahme der kationischen Arzneistoffe in Caco-2-Monolayer

Die apikale Aufnahme der Arzneistoffe Chinin, Diphenhydramin, Etilefrin und Ranitidin wurde durch Inkubationen von in Petrischalen gewachsenen Caco-2-Zellen charakterisiert, wie unter 3.2.1.2 beschrieben. Entsprechend den MPP⁺-Aufnahmeuntersuchungen fanden die Versuche am Tag 7 statt.

Chinin

Chinin schädigte bei pH 8,5 in einer Konzentration von 3 mM die Zellmembranen, war jedoch bei pH 7,5 über 2 Stunden in derselben Konzentration verträglich. Daher wurden die Zellen bei pH 7,5 inkubiert. Die Menge an aufgenommenem Chinin in Caco-2-Zellen zeigte Nichtlinearität bei Inkubationszeiten > 1 min. Deshalb wurden 1-minütige Inkubationen durchgeführt. In Abb. 11 ist die Aufnahme von Chinin in Abhängigkeit von der Substratkonzentration dargestellt. Im gewählten Konzentrationsbereich von 0,1-5 mM ist keine Sättigung der Chininaufnahme mit steigender Substratkonzentration zu erkennen, die Beteiligung eines spezifischen Transportsystems ist daher wenig wahrscheinlich.

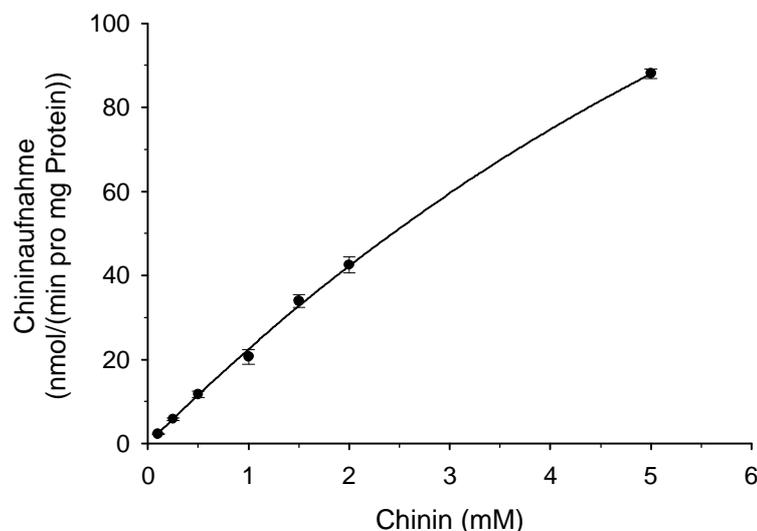


Abb. 11: Chininaufnahme in Caco-2-Zellen in Abhängigkeit von der Substratkonzentration. Inkubation mit Chinin (0,1-5 mM) in Puffer pH 7,5 (37°C) über 1 min. Daten sind Mittelwerte \pm S.E., n = 3.

Diphenhydramin

Die Inkubation von Caco-2-Zellen mit Diphenhydramin bei verschiedenen pH-Werten zeigte, dass Diphenhydramin vergleichbar mit MPP^+ bei auswärts gerichtetem Protonengradienten um den Faktor 2,5 stärker aufgenommen wird als bei einwärts gerichtetem Protonengradienten (Abb. 12). Die folgenden Untersuchungen wurden daher bei pH 8,5 durchgeführt.

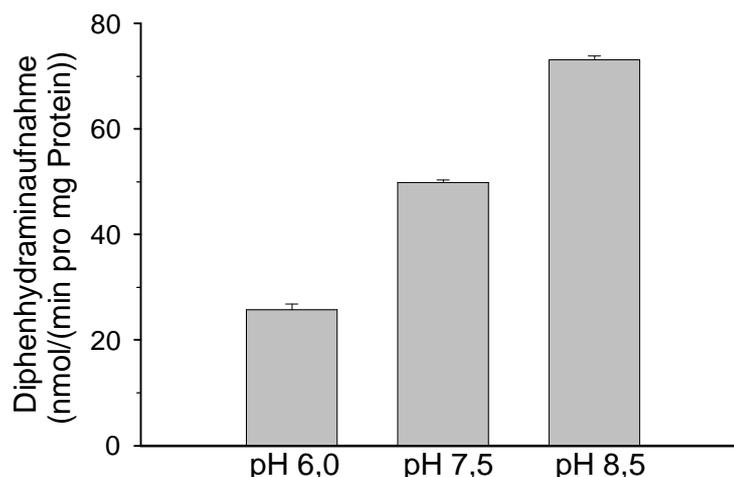


Abb. 12: pH-Abhängigkeit der Diphenhydraminaufnahme in Caco-2-Zellen. Inkubation mit Diphenhydramin (5 mM) in Puffer (37°C) über 1 min. Daten sind Mittelwerte \pm S.E., n = 3.

Die Diphenhydraminaufnahme war vergleichbar der Chininaufnahme in Caco-2-Zellen nichtlinear bei Inkubationszeiten > 1 Minute. Die Charakterisierung der Diphenhydraminaufnahme in Abhängigkeit von der Substratkonzentration erfolgte deshalb bei 1-minütigen Inkubationszeiten. Abb. 13 zeigt einen mit steigender Substratkonzentration hyperbolischen Verlauf der Diphenhydramin-Aufnahmerate, der auf Sättigbarkeit des Transportmechanismus schließen lässt. Durch nichtlineare Regression der Daten nach Gleichung (3) wurden die folgenden kinetischen Parameter ermittelt: Die Michaelis-Menten-Konstante (K_i) und die Maximalgeschwindigkeit (V_{max}) für diesen Transportprozess betragen $0,3 \pm 0,04$ mM und 39 ± 5 nmol/(min pro mg Protein). Die Transformation der Daten nach Eadie-Hofstee nach Subtraktion des errechneten nicht sättigbaren Anteils der Diphenhydraminaufnahme resultierte in einer Geraden ($r = 0,99$; Einschub), so dass möglicherweise ein einzelnes Transportsystem für die Diphenhydraminaufnahme im dargestellten Konzentrationsbereich verantwortlich ist.

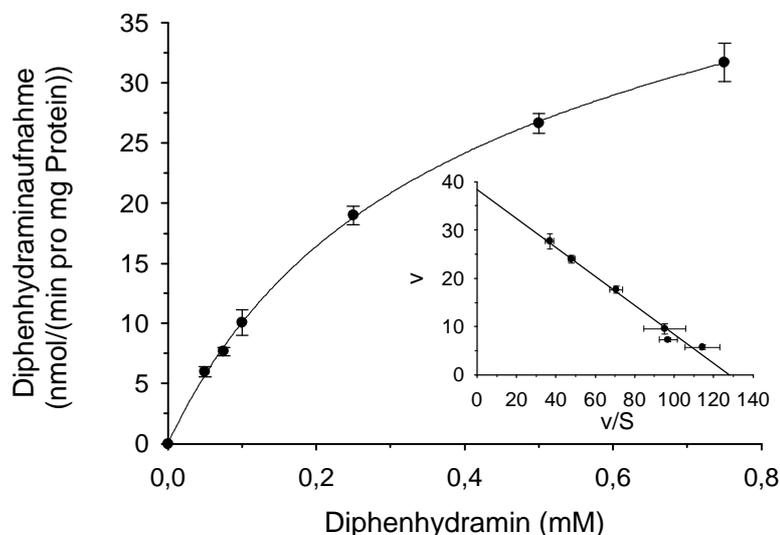


Abb. 13: Diphenhydraminaufnahme in Caco-2-Zellen in Abhängigkeit von der Substratkonzentration. Inkubation mit Diphenhydramin (0,05-0,75 mM) in Puffer pH 8,5 (37°C) über 1 min. Einschub: Eadie-Hofstee-Transformation der Daten nach Subtraktion des nicht-sättigbaren Anteils der Diphenhydraminaufnahme. v: Aufnahme rate (nmol/(min pro mg Protein)), S: Diphenhydraminkonzentration (mM). Daten sind Mittelwerte \pm S.E., n = 3.

Etilefrin

Die apikale Etilefrinaufnahme in Caco-2-Zellen steigt mit Erhöhung des pH-Wertes (Tab. 9). Daher erfolgten weitere Untersuchungen bei pH 8,5. Linearität der apikalen Etilefrinaufnahme war bis zu Inkubationszeiträumen von 5 Minuten gegeben. Die Abhängigkeit der Etilefrinaufnahme von der Substratkonzentration wurde deshalb über einen Konzentrationsbereich von 0,5-50 mM jeweils in einem Zeitraum von 5 Minuten untersucht (Abb. 14). Die nichtlineare Regression der Daten nach Gleichung (3) ergab eine Michaelis-Menten-Konstante (K_m) von $16,4 \pm 3,8$ mM und eine Maximalgeschwindigkeit von 782 ± 158 nmol/(5 min pro mg Protein). Nach Subtraktion des durch Gleichung (3) errechneten nicht-sättigbaren Anteils der Etilefrinaufnahme ergab die Auftragung der Aufnahme rate gegen den Quotienten von Aufnahme rate/Substratkonzentration (Eadie-Hofstee) eine Gerade (Einschub), was möglicherweise auf ein an der Etilefrinaufnahme beteiligtes Transportsystem im gewählten Konzentrationsbereich schließen lässt.

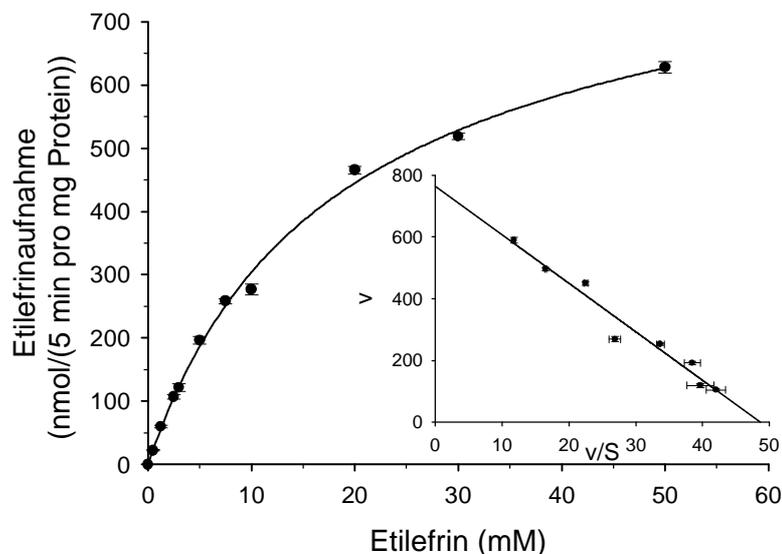


Abb. 14: Etilefrinaufnahme in Caco-2-Zellen in Abhängigkeit von der Substratkonzentration. Inkubation mit Etilefrin (0,5-50 mM) in Puffer pH 8,5 (37°C) über 5 min. Einschub: Eadie-Hofstee-Transformation der Daten nach Subtraktion des nichtsättigbaren Anteils der Etilefrinaufnahme. v : Aufnahme rate (nmol/(5 min pro mg Protein)), S : Etilefrinkonzentration (mM). Daten sind Mittelwerte \pm S.E., $n = 3$.

Ranitidin

Wie für Diphenhydramin und Etilefrin wurden auch für Ranitidin die weiteren Aufnahmeuntersuchungen bei pH 8,5 durchgeführt, da sich die intrazelluläre Aufnahme rate von der apikalen Seite (J_{a-c}) bei Erhöhung des pH-Wertes von pH 7,5 auf pH 8,5 verdreifachte (Tab. 9). Die Ranitidinaufnahme in Caco-2-Zellen war bei Inkubationen > 5 Minuten nichtlinear, die Ranitidinaufnahme in Abhängigkeit von der Substratkonzentration fand daher über Zeiträume von 5 Minuten statt. Aus Abb. 15 wird deutlich, dass die Ranitidinaufnahme in einem Konzentrationsbereich von 1-50 mM nicht sättigbar ist. Daher ist eine transportproteinvermittelte Aufnahme von Ranitidin unter den angegebenen Bedingungen unwahrscheinlich.

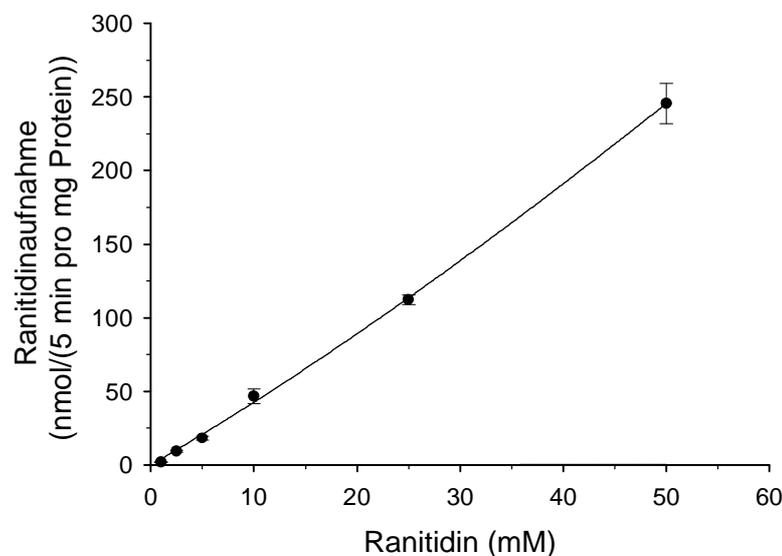


Abb. 15: Ranitidinaufnahme in Caco-2-Zellen in Abhängigkeit von der Substratkonzentration. Inkubation mit Ranitidin (1-50 mM) in Puffer pH 8,5 (37°C) über 5 min. Daten sind Mittelwerte \pm S.E., n = 3.

4.3 Transport am Plazentaepithel

4.3.1 Charakterisierung des [3 H]Cholintransportes an Plazentazellen (BeWo und JEG-3)

In der Plazenta sind eine Vielzahl von Transportsystemen zur Versorgung des Fetus lokalisiert. Arzneistoffe können als Substrate oder Inhibitoren mit diesen Transportsystemen interagieren und so Einfluss auf die Entwicklung des Fetus nehmen (Ganapathy *et al.* 2000).

Das permanente Kation Cholin wird als für den kindlichen Organismus essentieller Nährstoff über die Plazentaschranke transportiert. Dieses Transportsystem wurde mit Hilfe verschiedener Techniken wie Fragmenten menschlicher Plazenta (Welsch 1976b), Mikrocarrierkulturen von BeWo-Zellen (Eaton und Sooranna 1998) oder perfundierter Meerschweinchenplazenta (Sweiry und Yudilevich 1985) funktionell charakterisiert.

An den humanen Plazentazell-Linien BeWo und JEG-3 sollten Interaktionen der kationischen Arzneistoffe mit dem Transportsystem für den ebenfalls kationischen Nährstoff Cholin untersucht werden. Zunächst wurden durch Charakterisierung des [3 H]Cholintransportes an den Zell-Linien die Versuchsbedingungen für die weiteren Untersuchungen festgelegt.

Die Abhängigkeit der [3 H]Cholinaufnahme von der Kultivierungsdauer in BeWo- und JEG-3-Zellen ist in Abb. 16 dargestellt. Die Zell-Linie BeWo nahm an Tag 3 und 7 vergleichbare Mengen an [3 H]Cholin auf, von Tag 7 zu 9 reduzierte sich die [3 H]Cholinaufnahme. Bei JEG-3-Zellen verringerte sich die Aufnahme geringfügig aber konstant von Tag 2 bis 14. Um das Kontaminationsrisiko durch den häufigen Mediumswechsel (Tab. 4) bei BeWo-Zellen gering

zu halten, wurde Tag 3 als Versuchstag festgelegt. Die Versuche an JEG-3-Zellen fanden an Tag 7 in der Plateauphase der [³H]Cholinaufnahme statt.

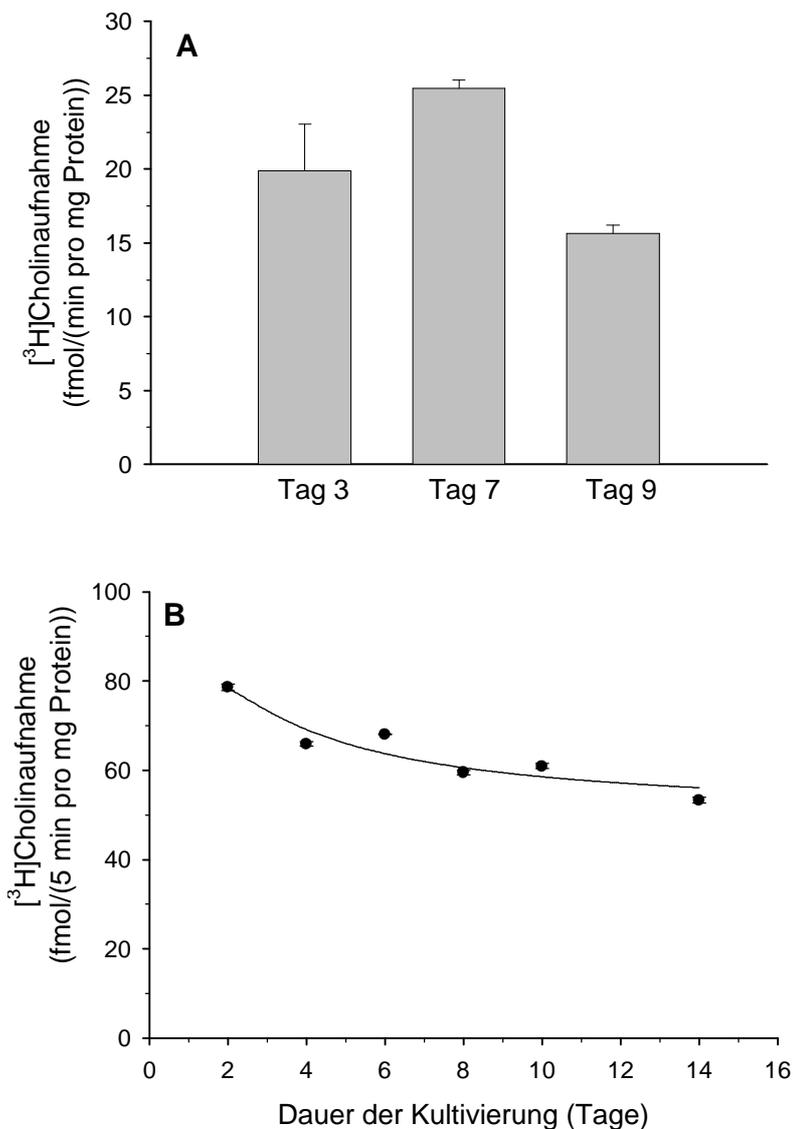


Abb. 16: [³H]Cholinaufnahme in BeWo-Zellen (A) und JEG-3-Zellen (B) in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer. Inkubation mit [³H]Cholin (2 nM) in Puffer pH 7,5 über 1 min (BeWo) oder 5 min (JEG-3). Daten sind Mittelwerte ± S.E., n = 3.

Die Zeitabhängigkeit der [³H]Cholinaufnahme in BeWo- und JEG-3-Zellen ist in Abb. 17 dargestellt. Die aufgenommene [³H]Cholinmenge nimmt in BeWo-Zellen bis ungefähr 2 Minuten, in JEG-3 Zellen bis ungefähr 5 Minuten proportional zur Einwirkzeit zu. Daher betrug die Inkubationszeit bei dem Großteil der anschließenden Aufnahmestudien 1 Minute für BeWo-Zellen und 5 Minuten für JEG-3-Zellen.

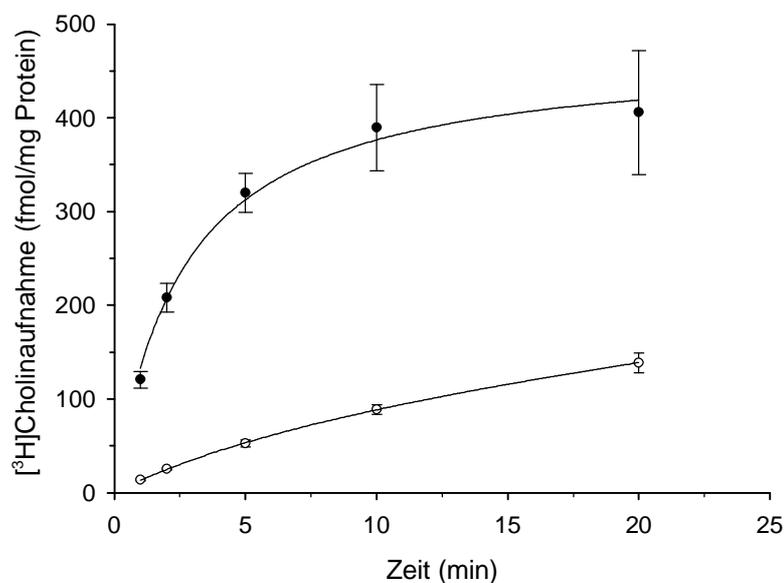


Abb. 17: Zeitabhängigkeit der [³H]Cholinaufnahme in BeWo-Zellen (gefüllte Kreise) und JEG-3-Zellen (offene Kreise). Inkubation mit [³H]Cholin (2 nM) in Puffer pH 7,5 über 20 min. Daten sind Mittelwerte \pm S.E., $n \geq 4$.

Desweiteren wurde die pH-, Na⁺- und Membranpotenzialabhängigkeit der [³H]Cholinaufnahme in BeWo-Zellen untersucht (Abb. 18). Die [³H]Cholinaufnahme in BeWo-Zellen wurde nur leicht durch Änderung des extrazellulären pH-Wertes von 6,5 nach 8,5 stimuliert. Die Aufnahme von [³H]Cholin war leicht Na⁺-abhängig: Der Austausch von Natriumchlorid gegen Lithiumchlorid reduzierte die aufgenommene [³H]Cholinmenge signifikant um 35%. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die folgenden Untersuchungen bei einem extrazellulären pH-Wert von 7,5 und in Gegenwart von 140 mM Natriumchlorid durchgeführt. In einer Konzentration von 10 μ M verringerte das Protonophor FCCP (Carbonylcyanid 4-Trifluoromethoxyphenylhydrazon) bei allen 3 pH-Werten die [³H]Cholinaufnahme signifikant. Durch FCCP bricht der Protonengradient zusammen, an die Stelle des unter physiologischen Bedingungen herrschenden Membranpotenzials tritt ein Protonendiffusionspotenzial (Burckhardt und Pietrzyk 1980). [³H]Cholin wird bei Anwesenheit eines Protonendiffusionspotenzials vermindert in BeWo-Zellen aufgenommen, die [³H]Cholinaufnahme in BeWo-Zellen ist daher abhängig vom Membranpotenzial.

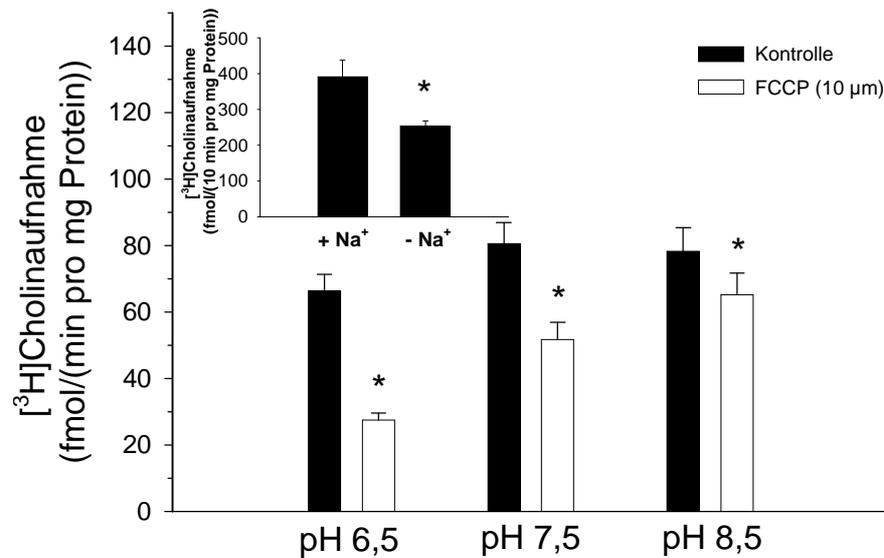


Abb. 18: pH-, Na⁺- und Membranpotenzialabhängigkeit der [³H]Cholinaufnahme in BeWo-Zellen. Vorinkubation für 10 min mit Puffer pH 7,5 in An- oder Abwesenheit von FCCP (10 µM), anschließend Inkubation mit [³H]Cholin (2 nM) in Puffer pH 6,5; 7,5 oder 8,5 für 1 min. Einschub: Na⁺-Abhängigkeit der [³H]Cholinaufnahme in BeWo-Zellen. Inkubation mit [³H]Cholin (2 nM) in Puffer pH 7,5 über 10 min. Natriumchlorid wurde isoosmotisch ersetzt durch Lithiumchlorid. Daten sind Mittelwerte ± S.E., n = 4, * p ≤ 0,05.

Um die kinetischen Parameter des Transportsystems bestimmen zu können, wurde die Abhängigkeit der Cholinaufnahmerate von der Substratkonzentration gemessen (Abb. 19). In beiden Zell-Linien wurden die Aufnahmeraten über einen Konzentrationsbereich von 3 nM bis 1 mM gemessen. Der nicht sättigbare Anteil der [³H]Cholinaufnahme (einfache Diffusion und Bindung des radioaktiven Cholins) wurde in Gegenwart von 20 mM Cholin bestimmt und vor der Kurvenanpassung nach Gleichung (3) von der jeweiligen Aufnahmerate abgezogen. Dieser Anteil betrug jeweils 3,5% und 9,6% der [³H]Cholingesamtaufnahme bei einer Konzentration von 3 nM für BeWo- und JEG-3-Zellen. Die transportvermittelte Aufnahmerate und die Substratkonzentration standen in hyperbolischer Beziehung zueinander. Aus der Eadie-Hofstee-Transformation der Daten resultierten Geraden (Abb. 19 A, B; Einschübe). Die Michaelis-Menten-Konstanten des Cholintransportes (K_t) betragen 108 ± 10 µM in BeWo-Zellen und 206 ± 15 µM in JEG-3-Zellen, die Maximalgeschwindigkeiten (V_{max}) betragen jeweils 3,1 ± 0,09 nmol/(min pro mg Protein) und 4,7 ± 0,1 nmol/(5 min pro mg Protein).

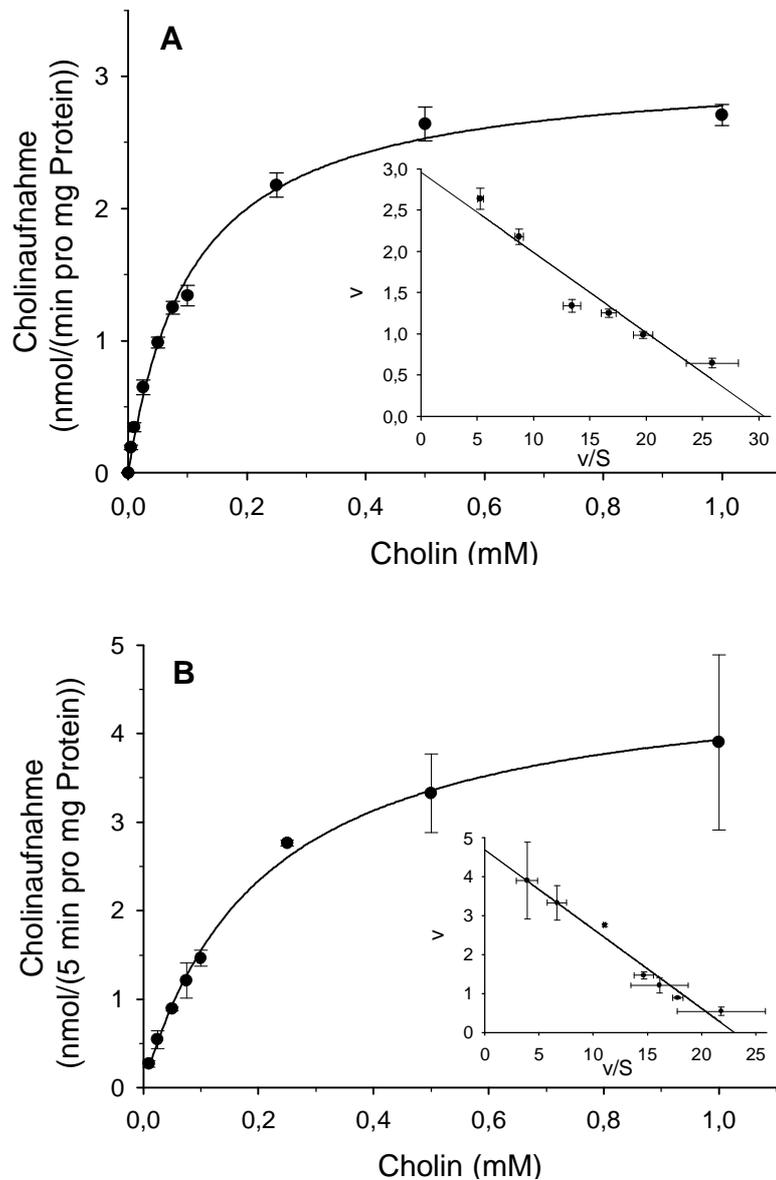


Abb. 19: Abhängigkeit der Cholinaufnahme von der Substratkonzentration in BeWo-Zellen (A) und JEG-3-Zellen (B). Inkubation mit [^3H]Cholin (3 nM) in Gegenwart von unmarkiertem Cholin in steigenden Konzentrationen in Puffer pH 7,5 über 1 min (BeWo-Zellen) oder 5 min (JEG-3-Zellen). Der Diffusionsanteil der Aufnahme wurde in Anwesenheit von 20 mM unmarkiertem Cholin bestimmt. Einschübe: Eadie-Hofstee-Transformation der Daten. v: Aufnahmeraten (nmol/(min pro mg Protein)) bei BeWo oder (nmol/(5 min pro mg Protein)) bei JEG-3; S: Cholinkonzentration (mM). Daten sind Mittelwerte \pm S.E., $n \geq 3$.

4.3.2 Hemmung des [³H]Cholintransportes durch die Arzneistoffe

Nach der ausführlichen Charakterisierung des Cholintransportsystems schlossen sich Untersuchungen bezüglich der Substratspezifität der [³H]Cholinaufnahme an.

Zahlreiche therapeutisch relevante Arzneistoffe hemmten die [³H]Cholinaufnahme in BeWo-Zellen (Abb. 20). Etilefrin, Atropin, Ranitidin, Metoprolol, Clonidin, Butylscopolaminium und Imipramin reduzierten die [³H]Cholinaufnahme im Vergleich zur Kontrolle in einer Konzentration von 1 mM signifikant um $\geq 40\%$.

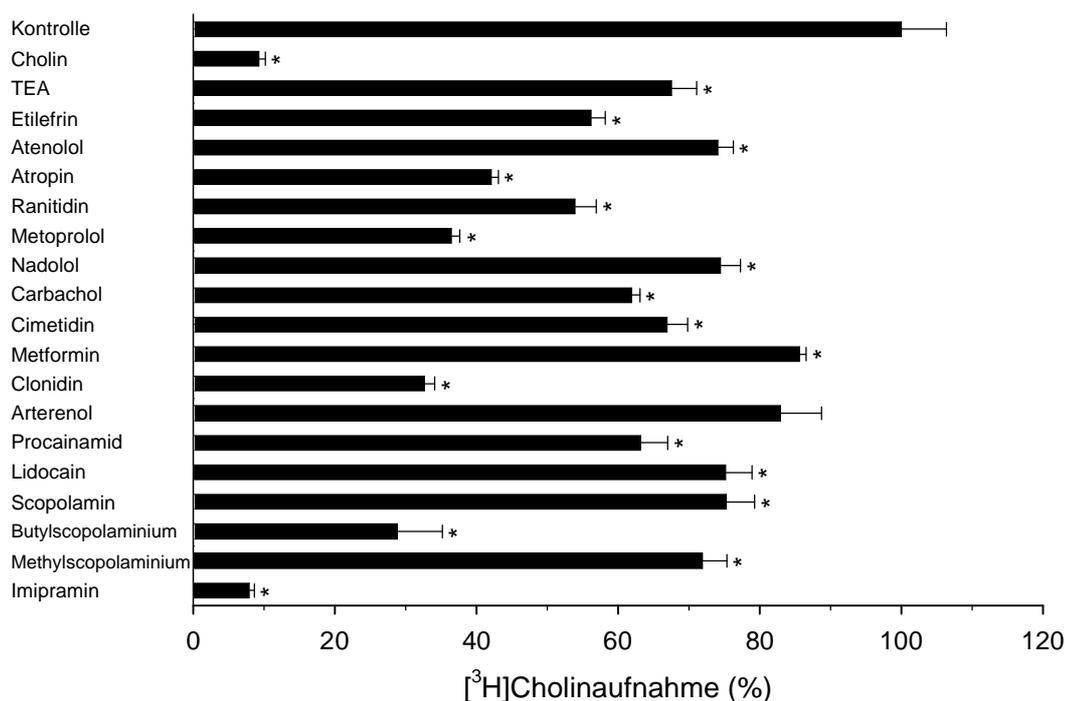


Abb. 20: Substratspezifität der [³H]Cholinaufnahme in BeWo-Zellen. Inkubation mit [³H]Cholin (2 nM) in An- oder Abwesenheit (Kontrolle) kationischer Arzneistoffe (1 mM) in Puffer pH 7,5 über 1 min. Daten sind Mittelwerte \pm S.E., n = 4, * p \leq 0,05.

Der Einfluss kationischer Modellsubstrate und endogener Kationen in einer Konzentration von 1 mM auf die [³H]Cholinaufnahme in BeWo-Zellen ist in Tab. 10 dargestellt: Cholin und Hemicholin hemmten die [³H]Cholinaufnahme um > 90%. Die kationischen Modellsubstrate TEA und TMA und das endogene Kation Guanidin hemmten die Aufnahme auf 70-40% des Kontrollwertes. Das OCTN2-Substrat Carnitin und das endogene Kation Creatin waren keine Inhibitoren der Aufnahme. Die [³H]Cholinaufnahme wurde durch das Vitamin Thiamin auf 30% der Kontrolle gehemmt.

Tab. 10: Inhibitoren der [³H]Cholinaufnahme in BeWo-Zellen. Inkubation mit [³H]Cholin (2 nM) in An- oder Abwesenheit (Kontrolle) kationischer Modellsubstrate/endogener Kationen/Zwitterionen (1 mM) in Puffer pH 7,5 über 1 min. Daten sind Mittelwerte ± S.E., n = 4.

| Substanz | [³ H]Cholinaufnahme (%) |
|------------|-------------------------------------|
| Kontrolle | 100 ± 1,5 |
| Cholin | 3,5 ± 0,4 |
| Hemicholin | 6,9 ± 0,5 |
| TEA | 68 ± 4 |
| TMA | 49 ± 2 |
| Guanidin | 42 ± 2 |
| Carnitin | 93 ± 2 |
| Thiamin | 28 ± 2 |
| Creatin | 98 ± 1 |

Für Acetylcholin ist eine sättigbare Aufnahme in humane Plazentafragmente beschrieben (Welsch 1976a), die kompetitiv durch Cholin gehemmt wird. Daher sollte mittels eines ABC-Tests untersucht werden, ob Acetylcholin und Cholin über dasselbe Transportsystem in BeWo-Zellen gelangen. Zwei Substrate (Acetylcholin (**A**) und Cholin (**B**)) müssen gegenseitig ihre Aufnahme in derselben Konzentration gleichstark hemmen und eine dritte Substanz (Butylscopolaminium (**C**)) muss die Aufnahme beider Substrate in gleichem Maße hemmen. Aus Tab. 11 ist zu erkennen, dass Acetylcholin und Cholin sehr wahrscheinlich durch dasselbe Transportsystem aufgenommen werden: In einer Konzentration von 1 mM hemmt Acetylcholin sowohl die [³H]Acetylcholinaufnahme als auch die [³H]Cholinaufnahme um etwa 80% gegenüber der Kontrolle, Cholin hemmt die [³H]Acetylcholinaufnahme und die [³H]Cholinaufnahme um etwa 90%. Butylscopolaminium (1 mM) inhibiert die Aufnahme beider Substrate in gleichem Ausmaß um 60%.

Tab. 11: ABC-Test an BeWo-Zellen. Inkubation mit [³H]Acetylcholin (2 nM) oder [³H]Cholin (2 nM) in An- oder Abwesenheit von Acetylcholin, Cholin und Butylscopolaminium (alle 1 mM) in Puffer pH 7,5 über 10 min. Daten sind Mittelwerte ± S.E., n = 3.

| | + Acetylcholin (1 mM) A | + Cholin (1 mM) B | + Butylscopolaminium (1 mM) C |
|--|--------------------------------------|--------------------------------|--|
| [³ H]Acetylcholin- aufnahme (%) | 18 ± 0,4 | 9 ± 0,1 | 38 ± 1,2 |
| [³ H]Cholin- aufnahme (%) | 26 ± 0,5 | 14 ± 0,3 | 47 ± 1,2 |

Zur Untersuchung der Substratspezifität der [³H]Cholinaufnahme in JEG-3-Zellen wurden Hemmkurven in Gegenwart kationischer Arzneistoffe und Modellsubstrate erstellt (Abb. 21). Die aus den Daten durch Gleichung (1) und (2) ermittelten Hemmkonstanten (K_i) der (potenziellen) Substrate waren $0,06 \pm 0,01$ mM (Cholin), $1,5 \pm 0,3$ mM (Acetylcholin), $3,3 \pm 0,4$ mM (Etilefrin), $0,25 \pm 0,03$ mM (Diphenhydramin), $0,18 \pm 0,03$ mM (Clonidin), $0,63 \pm 0,11$ mM (Butylscopolaminium), $1,8 \pm 0,2$ mM (Ranitidin), $4,0 \pm 1,0$ mM (Guanidin), $0,36 \pm 0,03$ mM (Chinin), $0,44 \pm 0,06$ mM (Chinidin), $0,74 \pm 0,07$ mM (MPP⁺).

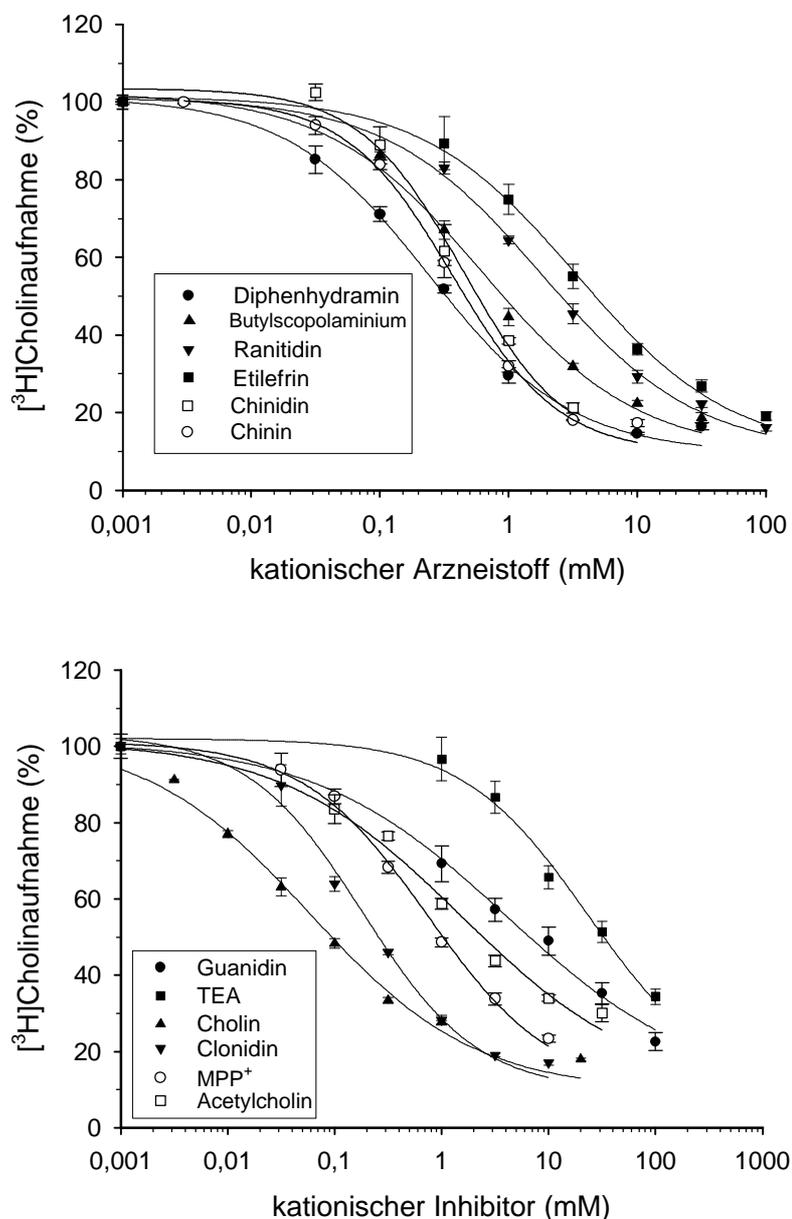


Abb. 21: Substratspezifität der $[^3\text{H}]\text{Cholinaufnahme}$ in JEG-3-Zellen. Inkubation mit $[^3\text{H}]\text{Cholin}$ (2 nM) in An- oder Abwesenheit kationischer Arzneistoffe/Modellsubstrate/endogener Kationen (0-100 mM) in Puffer pH 7,5 über 5 min. Daten sind Mittelwerte \pm S.E., n = 4.

Für die genauere Charakterisierung der Wechselwirkung zwischen Diphenhydramin und dem Cholintransportsystem in JEG-3-Zellen erfolgte die Bestimmung der Cholinaufnahmekinetik in An- oder Abwesenheit von 300 μM Diphenhydramin (Abb. 22). Die $[^3\text{H}]\text{Cholinaufnahme}$ wurde um den zuvor bestimmten Diffusionsanteil in Gegenwart von 20 mM Cholin korrigiert. Er betrug 15,8% für die Kontrollgruppe und 28% für die behandelte Gruppe. Anschließend wurde die Aufnahmekurve den Messpunkten mittels Michaelis-Menten-Gleichung (3) angepasst.

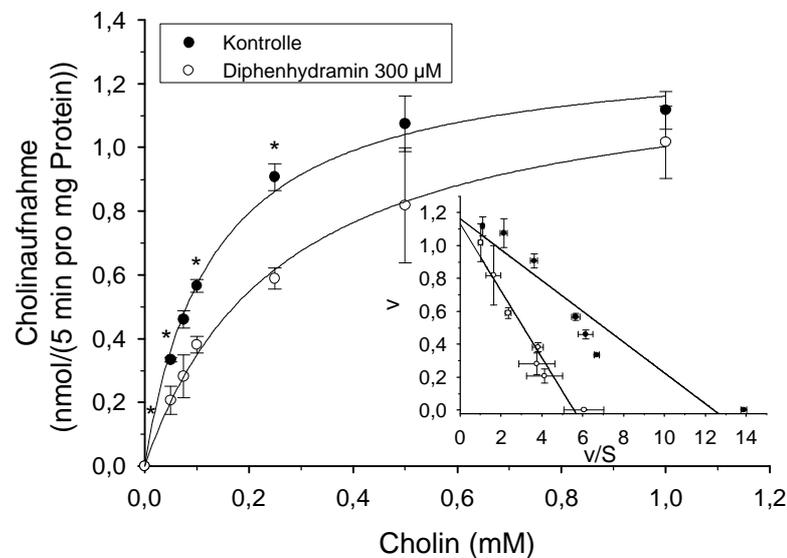


Abb. 22: Einfluss von Diphenhydramin auf die Kinetik des Cholintransportes in JEG-3-Zellen. Inkubation mit [³H]Cholin (4 nM) in Gegenwart steigender Konzentrationen von unmarkiertem Cholin (Kontrolle) und in An- oder Abwesenheit von 300 µM Diphenhydramin in Puffer pH 7,5 über 5 min. Der Diffusionsanteil der Aufnahme wurde in Anwesenheit von 20 mM unmarkiertem Cholin bestimmt. Einschub: Eadie-Hofstee-Transformation der Daten. v: Aufnahmerate (nmol/(5 min pro mg Protein)), S: CholinKonzentration (mM). Daten sind Mittelwerte ± S.E., n = 3, * p ≤ 0,05.

Durch die Zugabe von 300 µM Diphenhydramin stieg die Michaelis-Menten-Konstante (K_t) von 130 auf 260 µM, wohingegen die Maximalgeschwindigkeit des Transportsystems (V_{max}) unbeeinflusst blieb (1,3 nmol/5 min pro mg Protein). Weiterhin lag der Schnittpunkt der Geraden bei Eadie-Hofstee-Transformation der Daten auf der Y-Achse. Diese Ergebnisse lassen auf kompetitive Hemmung der [³H]Cholinaufnahme durch Diphenhydramin schließen.

4.3.3 Charakterisierung des [³H]Clonidintransportes an JEG-3-Zellen

Der α_2 -Rezeptoragonist Clonidin wird auch während der Schwangerschaft zur Therapie der Präeklampsie als Antihypertensivum eingesetzt (Edwards *et al.* 2000). An der perfundierten humanen Plazenta beschrieben Ala-Kokko und Mitarbeiter (1997) den Transfer von Clonidin. Bisher existieren jedoch keine Studien zu plazentalen Transportmechanismen von Clonidin. Daher erschien deren Charakterisierung an der Plazentazell-Linie JEG-3 sinnvoll.

Für die Festlegung der Versuchstage wurde zunächst die Aufnahme von radioaktiv markiertem Clonidin in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer bestimmt und auf den Proteingehalt bezogen (Abb. 23). Die [³H]Clonidinaufnahme stieg über den untersuchten Zeitraum nur wenig an und erreichte an Tag 7-8 ein Plateau, deshalb wurde Tag 7 nach der Aussaat als Versuchstag festgelegt.

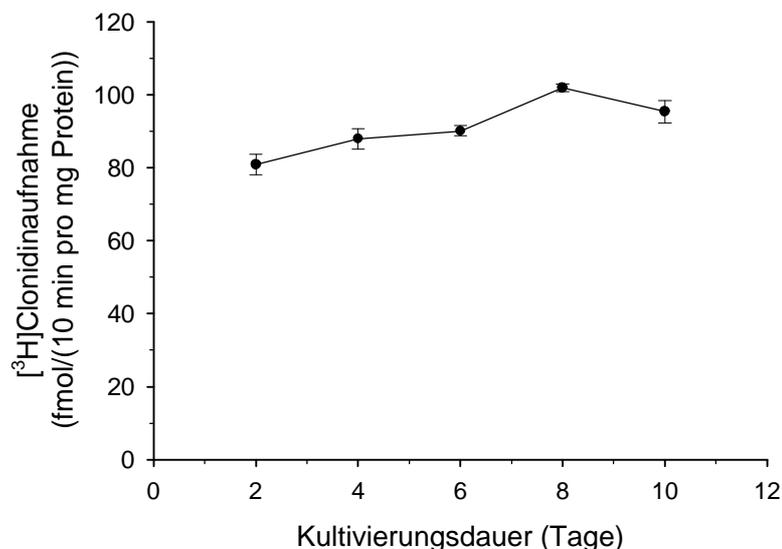


Abb. 23: [3H]Clonidinaufnahme in JEG-3-Zellen in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer. Inkubation mit [3H]Clonidin (3 nM) in Puffer pH 7,5 über 10 min. Daten sind Mittelwerte ± S.E., n = 3.

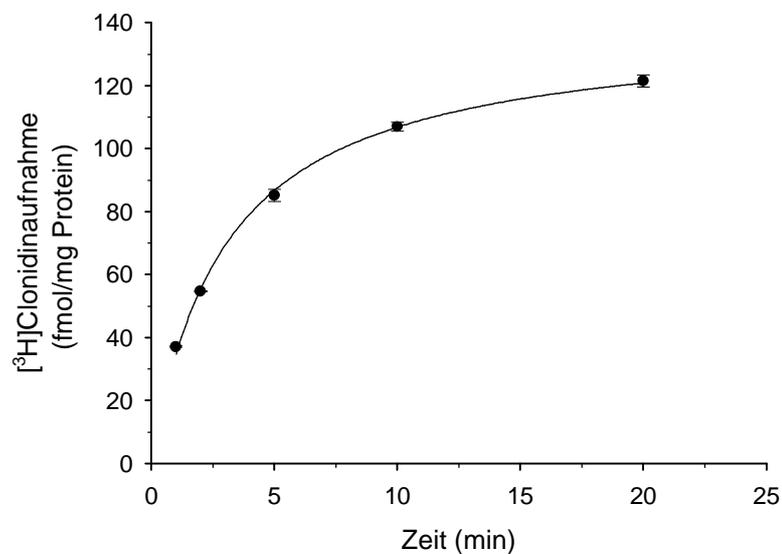


Abb. 24: [3H]Clonidinaufnahme in JEG-3-Zellen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Inkubation mit [3H]Clonidin (3 nM) in Puffer pH 7,5 über 20 min. Daten sind Mittelwerte ± S.E., n = 3.

Die [3H]Clonidinaufnahme in JEG-3-Zellen war nichtlinear bei Inkubationszeiten > 2 Minuten (Abb. 24), daher wurden die Zellen bei den folgenden Untersuchungen 1 Minute inkubiert.

Abb. 25 zeigt die pH- und Na⁺-Abhängigkeit der [3H]Clonidinaufnahme in JEG-3-Zellen. Die [3H]Clonidinaufnahme wurde durch Anheben des pH-Wertes von 6,0 auf 8,5 um den Faktor 10 stimuliert. Der Austausch von Natriumchlorid gegen Cholinchlorid hatte keine Auswir-

kung auf die [^3H]Clonidinaufnahme. Die folgenden Experimente fanden bei pH 7,5 in Anwesenheit von 140 mM Natriumchlorid statt.

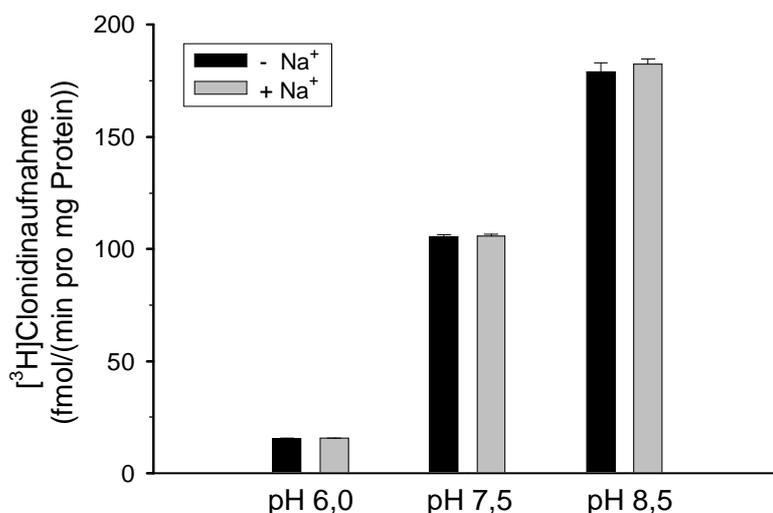


Abb. 25: Na⁺- und pH-Abhängigkeit der [^3H]Clonidinaufnahme in JEG-3-Zellen. Inkubation mit [^3H]Clonidin (3 nM) in Puffer pH 6,0; 7,5 oder 8,5 über 1 min. Natriumchlorid wurde isoosmotisch ersetzt durch Cholinchlorid. Daten sind Mittelwerte \pm S.E., n = 3.

Zur Bestimmung der kinetischen Parameter des Transportsystems wurde die Abhängigkeit der Clonidinaufnahme von der Substratkonzentration gemessen (Abb. 26). Der unspezifische Anteil der [^3H]Clonidinaufnahme (zusammengesetzt aus einfacher Diffusion und Bindung der radioaktiv markierten Substanz) wurde in Gegenwart eines sehr hohen Überschusses (20 mM) von unmarkiertem Clonidin bestimmt. Dieser Anteil betrug 19% der gesamten [^3H]Clonidinaufnahme (3 nM) und wurde vor der Kurvenanpassung nach Gleichung (3) von den Messwerten subtrahiert. Aus der Eadie-Hofstee-Transformation der Daten resultierte eine Gerade (Abb. 26, Einschub). Die Michaelis-Menten-Konstante des Clonidintransportes (K_t) betrug $1,1 \pm 0,10$ mM, die Maximalgeschwindigkeit (V_{\max}) $27,5 \pm 1,7$ nmol/(min pro mg Protein).

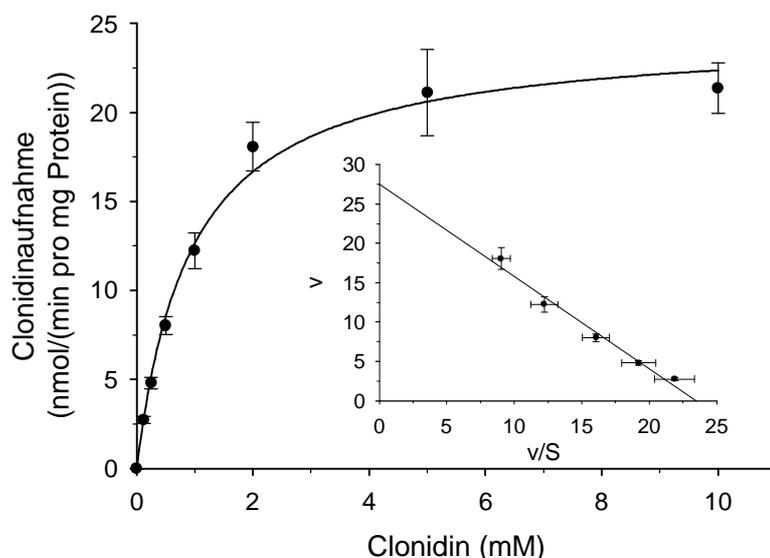


Abb. 26: Abhängigkeit der Clonidinaufnahme von der Substratkonzentration in JEG-3-Zellen. Inkubation mit [^3H]Clonidin (3 nM) in Gegenwart von unmarkiertem Clonidin in steigenden Konzentrationen in Puffer pH 7,5 über 1 min. Der Diffusionsanteil der Aufnahme wurde in Anwesenheit von 20 mM unmarkiertem Clonidin bestimmt. Einschub: Eadie-Hofstee-Transformation der Daten. v: Aufnahmerate (nmol/(min pro mg Protein)); S: Clonidinkonzentration (mM). Daten sind Mittelwerte \pm S.E., n = 4.

4.3.4 Hemmung des [^3H]Clonidintransportes durch die Arzneistoffe

Die Substratspezifität des Clonidintransportsystems in JEG-3-Zellen wurde zunächst durch die Hemmung der [^3H]Clonidinaufnahme in Gegenwart verschiedener physiologisch und pharmakologisch relevanter Substanzen in einer fixen Konzentration von 1 mM charakterisiert. Mehrere therapeutisch relevante Substanzen inhibierten die Aufnahme von [^3H]Clonidin (Tab. 12). Chinin, Chinidin, Verapamil, Diphenhydramin und Clonidin selbst reduzierten in einer Konzentration von 1 mM die [^3H]Clonidinaufnahme um 40-50%. Das Clonidinderivat Guanabenz hemmte in einer Konzentration von 0,3 mM die [^3H]Clonidinaufnahme um 34%. Cholin und die kationischen Modellsubstrate TEA und MPP $^+$ hatten in dieser Konzentration keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die [^3H]Clonidinaufnahme. Die Beteiligung des oben charakterisierten Cholintransportsystems in JEG-3-Zellen an der [^3H]Clonidinaufnahme kann daher weitgehend ausgeschlossen werden.

Tab. 12: Substratspezifität der [³H]Clonidinaufnahme in JEG-3-Zellen. Inkubation mit [³H]Clonidin (3 nM) in An- oder Abwesenheit unmarkierter Substanzen (alle 1 mM, außer Cimetidin 5 mM, Guanabenz 0,3 mM) in Puffer pH 7,5 über 1 min. Daten sind Mittelwerte ± S.E., n ≥ 3, * p ≤ 0,05.

| Substanz | [³ H]Clonidinaufnahme (%) | Substanz | [³ H]Clonidinaufnahme (%) |
|----------------|---------------------------------------|--------------------|---------------------------------------|
| Kontrolle | 100 ± 4 | Kontrolle | 100 ± 4 |
| Clonidin | 61 ± 2* | Carnitin | 99 ± 1 |
| Atropin | 92 ± 2* | Procainamid | 101 ± 4 |
| Chinin | 58 ± 1* | Thiamin | 97 ± 1 |
| Chinidin | 53 ± 2* | Guanidin | 100 ± 13 |
| Cimetidin | 103 ± 1 | MPP ⁺ | 97 ± 2 |
| Ranitidin | 99 ± 2 | Guanabenz | 66 ± 2* |
| Diphenhydramin | 53 ± 2* | Etilefrin | 103 ± 2 |
| TEA | 94 ± 1* | Butylscopolaminium | 98 ± 1 |
| Cephalexin | 98 ± 2 | Verapamil | 49 ± 1* |
| Tryptamin | 87 ± 2* | Cholin | 97 ± 2 |

Für die Bestimmung der Hemmkonstanten K_i wurden Hemmkurven in Gegenwart steigender Konzentrationen von Chinin, Chinidin, Diphenhydramin, Clonidin und Guanabenz aufgenommen (Abb. 27).

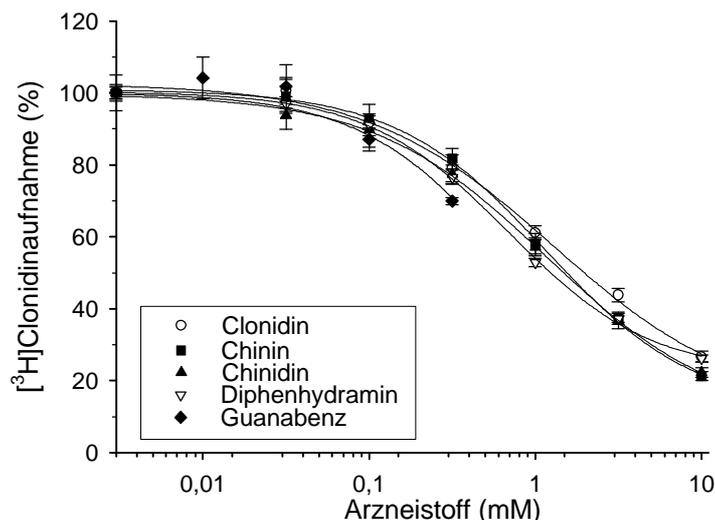


Abb. 27: Substratspezifität der $[^3\text{H}]$ Clonidinaufnahme in JEG-3-Zellen. Inkubation mit $[^3\text{H}]$ Clonidin (3 nM) in An- oder Abwesenheit kationischer Arzneistoffe (0-10 mM) in Puffer pH 7,5 über 1 min. Daten sind Mittelwerte \pm S.E., $n = 4$.

Die nichtlineare Regression der Daten aus den Kompletionsuntersuchungen nach Gleichung (1) und die Ermittlung der Hemmkonstanten K_i aus der Halbhemmkonzentration IC_{50} nach Gleichung (2) ergab K_i -Werte von $1,2 \pm 0,3$ mM für Clonidin, $1,1 \pm 0,1$ mM für Chinin, $1,1 \pm 0,1$ mM für Chinidin, $0,6 \pm 0,1$ mM für Guanabenz und $0,7 \pm 0,05$ mM für Diphenhydramin.

4.3.5 Aufnahme von $[^3\text{H}]\text{MPP}^+$ in Plazentazellen (BeWo, JEG-3 und JAR)

Da der humane OCT3 in der Plazenta exprimiert ist (Wu *et al.* 2000), wurden die in der vorliegenden Arbeit verwendeten humanen Plazentazell-Linien BeWo und JEG-3 sowie eine weitere humane Plazentazell-Linie (JAR) bezüglich der Aufnahme des kationischen Modellsubstrates MPP^+ untersucht.

Die $[^3\text{H}]\text{MPP}^+$ -Aufnahme in BeWo-Zellen war nicht pH-abhängig und durch den Zusatz von 1 mM MPP^+ nur geringfügig hemmbar (Abb. 28). MPP^+ in derselben Konzentration reduzierte die $[^3\text{H}]\text{MPP}^+$ -Aufnahme bei einem pH Wert von 7,5 in JEG-3 Zellen statistisch signifikant aber schwach um 24%. Die $[^3\text{H}]\text{MPP}^+$ -Aufnahme wurde auch durch den hOCT-Inhibitor Chinin in einer Konzentration von 0,5 mM statistisch signifikant auf 76% der Kontrolle gehemmt. Cholin (0,5 mM) beeinflusste die $[^3\text{H}]\text{MPP}^+$ -Aufnahme in JEG-3-Zellen nicht signifikant (Abb. 29).

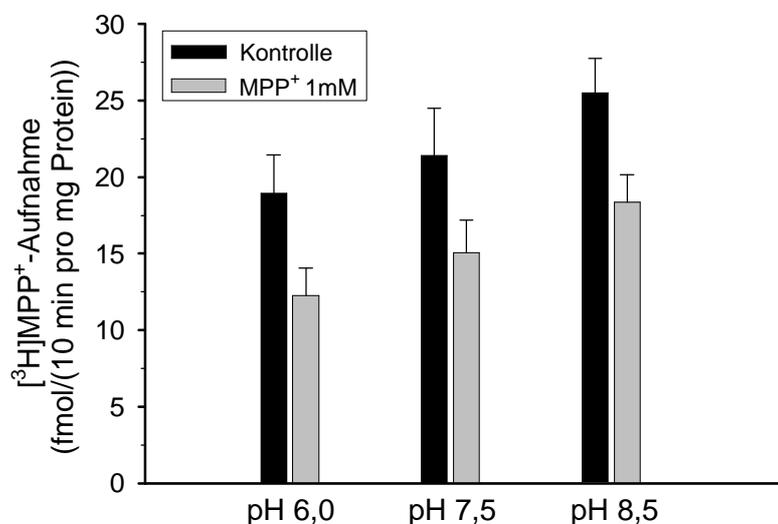


Abb. 28: pH-Abhängigkeit der $[^3\text{H}]\text{MPP}^+$ -Aufnahme in BeWo-Zellen. Inkubation mit $[^3\text{H}]\text{MPP}^+$ (4 nM) in An- oder Abwesenheit von MPP⁺ (1 mM) in Puffer pH 6,0; 7,5 oder 8,5 über 10 min. Daten sind Mittelwerte \pm S.E., n = 6.

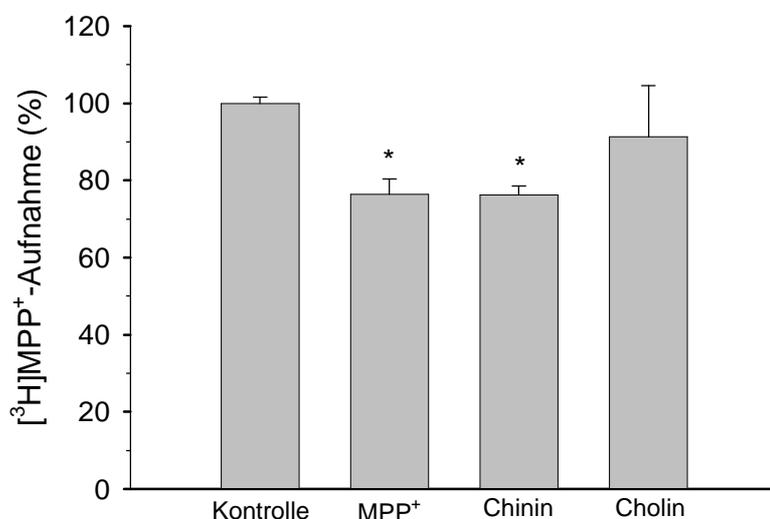


Abb. 29: Einfluss kationischer Modellssubstrate und endogener Kationen auf die $[^3\text{H}]\text{MPP}^+$ -Aufnahme in JEG-3-Zellen. Inkubation mit $[^3\text{H}]\text{MPP}^+$ (8 nM) in An- oder Abwesenheit kationischer Modellssubstrate/endogener Kationen (MPP⁺ 1mM; Chinin und Cholin 0,5 mM) in Puffer pH 7,5 über 10 min. Daten sind Mittelwerte \pm S.E., n = 3, * $p \leq 0,05$.

In JAR-Zellen wurde der Einfluss von MPP⁺ und Serotonin in Abhängigkeit von Zelldichte und Kultivierungsdauer auf die $[^3\text{H}]\text{MPP}^+$ -Aufnahme bei pH 7,5 untersucht (Abb. 30). Unabhängig von Kultivierungsdauer und Zelldichte reduzierte MPP⁺ (1 mM) die $[^3\text{H}]\text{MPP}^+$ -Aufnahme um rund 30% im Vergleich zur Kontrolle. Serotonin in einer Konzentration von 1 mM hemmte die $[^3\text{H}]\text{MPP}^+$ -Aufnahme auf 70%. Eine quantitativ relevante apikale Expression der hOCTs in den untersuchten Plazentazell-Linien ist daher unwahrscheinlich.

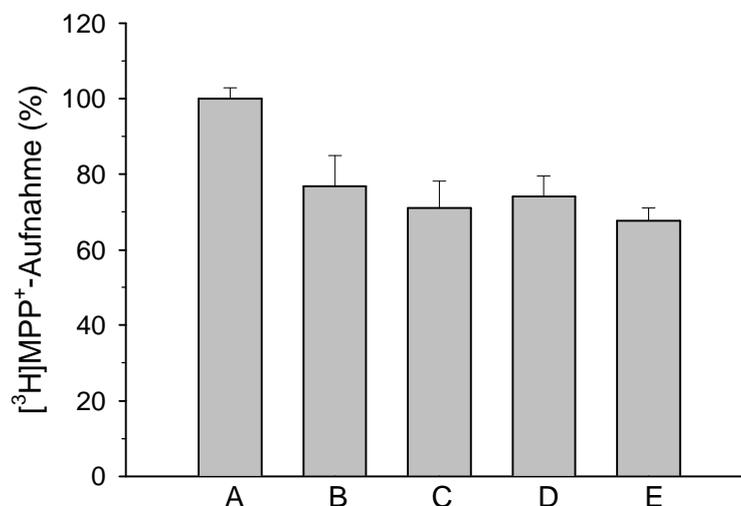


Abb. 30: Hemmung der [³H]MPP⁺-Aufnahme durch MPP⁺ und Serotonin in Abhängigkeit von Kultivierungsdauer und Zelldichte. Inkubation mit [³H]MPP⁺ (4 nM) in An- oder Abwesenheit von MPP⁺ (1 mM) oder Serotonin (1 mM) in Puffer pH 7,5 über 10 min. A: Kontrolle; B: plus MPP⁺ 1 mM Tag 3 (0,8·10⁶ Zellen/2 ml); C: plus MPP⁺ 1 mM Tag 6 (0,8·10⁶ Zellen/2 ml); D: plus MPP⁺ 1 mM Tag 10 (0,4·10⁶ Zellen/2 ml); E: plus Serotonin 1 mM Tag 6 (0,8·10⁶ Zellen/2 ml). Daten sind Mittelwerte ± S.E., n = 3.

4.3.6 Aufnahme der kationischen Arzneistoffe in Plazentazellen (BeWo, JEG-3)

Die Hemmung der [³H]Cholin- und der [³H]Clonidinaufnahme durch die bei physiologischem pH-Wert zum Großteil als Kationen vorliegende Arzneistoffe Chinin, Diphenhydramin, Etilefrin und Ranitidin beweist nicht deren Transport durch die Aufnahmesysteme für Cholin und Clonidin. Daher wurde die apikale Aufnahme der Arzneistoffe in BeWo- und JEG-3-Zellen untersucht, wie unter 3.2.1.2 beschrieben. Entsprechend den Cholin- und Clonidinaufnahmeuntersuchungen fanden die Versuche an Tag 3 (BeWo) und 7 (JEG-3) statt.

Chinin

Die Chininaufnahme in JEG-3-Zellen wurde vergleichbar der an Caco-2 bei einem pH-Wert von 7,5 über Inkubationszeiträume von 1 Minute untersucht. In Abb. 31 ist die Aufnahme von Chinin in Abhängigkeit von der Substratkonzentration dargestellt. Im gewählten Konzentrationsbereich von 0,1-5 mM ist eine leichte Sättigung der Chininaufnahme mit steigender Substratkonzentration zu erkennen. Durch nichtlineare Regression der Daten nach Gleichung (3) wurden die kinetischen Parameter ermittelt: Die Michaelis-Menten-Konstante (K_i) und die Maximalgeschwindigkeit (V_{max}) für diesen Transportprozess betragen $4,1 \pm 3,6$ mM und 96 ± 103 nmol/(min pro mg Protein). Die Eadie-Hofstee-Transformation der Daten nach Subtraktion des errechneten nicht-sättigbaren Anteils der Chininaufnahme resultierte in einer Geraden ($r = 0,93$).

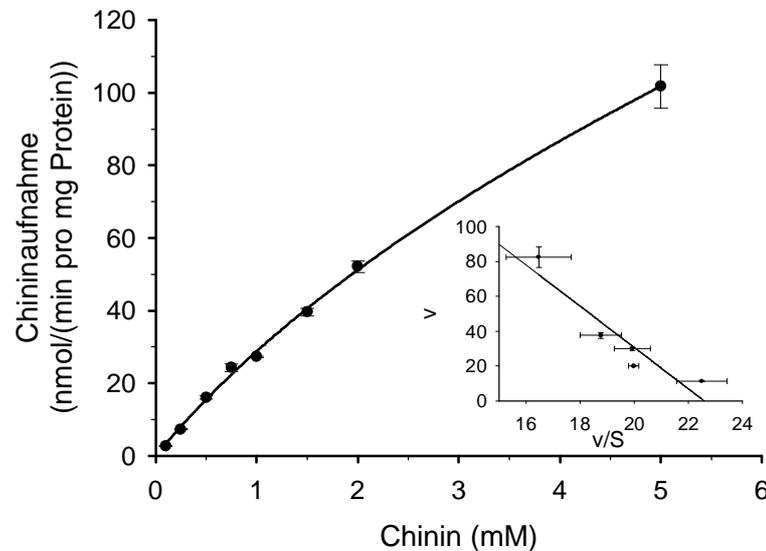


Abb. 31: Chininaufnahme in JEG-3-Zellen in Abhängigkeit von der Substratkonzentration. Inkubation mit Chinin (0,1-5 mM) in Puffer pH 7,5 (37°C) über 1 min. Einschub: Eadie-Hofstee-Transformation der Daten nach Subtraktion des nicht-sättigbaren Anteils der Chininaufnahme. v: Aufnahmerate (nmol/(min pro mg Protein)), S: Chininkonzentration (mM). Daten sind Mittelwerte \pm S.E., n = 3.

Diphenhydramin

Die Erhöhung des pH-Wertes von 6,0 auf 7,5 hatte eine Stimulation der Diphenhydraminaufnahme in JEG-3-Zellen um den Faktor 2 zur Folge; eine weitere Erhöhung des pH-Wertes auf 8,5 stimulierte die Diphenhydraminaufnahme kaum im Vergleich zur Aufnahme bei pH 7,5 (Abb. 32). Wie an Caco-2-Zellen fanden die folgenden Untersuchungen bei pH 8,5 statt.

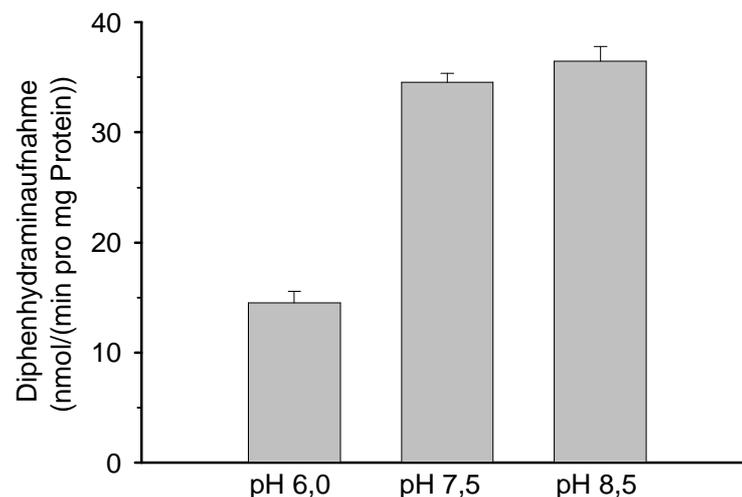


Abb. 32: pH-Abhängigkeit der Diphenhydraminaufnahme in JEG-3-Zellen. Inkubation mit Diphenhydramin (5 mM) in Puffer (37°C) über 1 min. Daten sind Mittelwerte \pm S.E., n = 3.

Bei Inkubationszeiten $>$ 1 Minute stieg die Diphenhydraminaufnahme in JEG-3-Zellen nicht mehr proportional mit den Inkubationszeiten. Für die Bestimmung der kinetischen Parameter

wurden die Zellen daher über Zeiträume von 1 Minute inkubiert. Die Aufnahme von Diphenhydramin in JEG-3-Zellen konnte mit steigender Substratkonzentration durch eine hyperbolische Funktion beschrieben werden; das Transportsystem zeigte Sättigbarkeit in dem dargestellten Konzentrationsbereich von 0,05-2 mM. Mittels nichtlinearer Regression der Daten nach Gleichung (3) wurde eine Michaelis-Menten-Konstante (K_t) von $0,75 \pm 0,6$ mM und eine Maximalgeschwindigkeit (V_{max}) von 74 ± 50 nmol/(min pro mg Protein) ermittelt. Aus der Subtraktion des durch die nichtlineare Regression errechneten nichtsättigbaren Anteils der Diphenhydraminaufnahme und Darstellung der Daten in Form eines Eadie-Hofstee Plots ergab sich eine Gerade (Abb. 33; Einschub). Daher ist im dargestellten Konzentrationsbereich möglicherweise nur ein Transportsystem für die apikale Diphenhydraminaufnahme in JEG-3-Zellen verantwortlich.

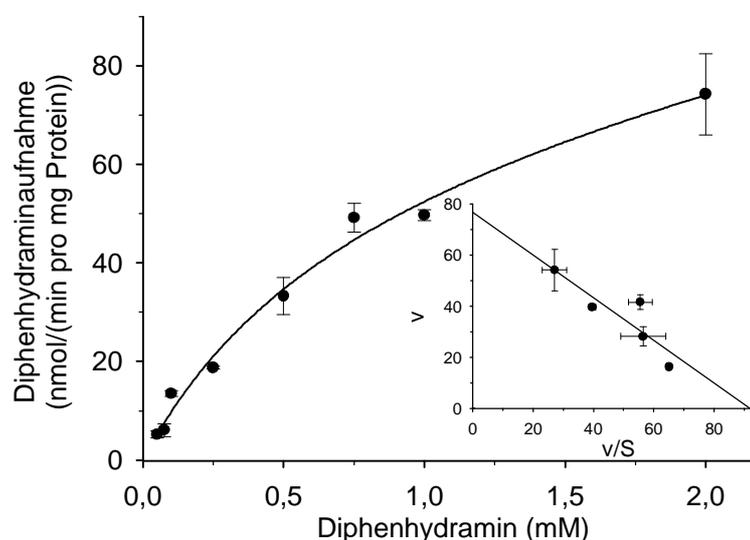


Abb. 33: Diphenhydraminaufnahme in JEG-3-Zellen in Abhängigkeit von der Substratkonzentration. Inkubation mit Diphenhydramin (0,05-2 mM) in Puffer pH 8,5 (37°C) über 1 min. Einschub: Eadie-Hofstee-Transformation der Daten nach Subtraktion des nichtsättigbaren Anteils der Diphenhydraminaufnahme. v: Aufnahme rate (nmol/(min pro mg Protein)), S: Diphenhydraminkonzentration (mM). Daten sind Mittelwerte \pm S.E., n = 3.

Um einen Zusammenhang zwischen der apikalen Aufnahme von Diphenhydramin und Cholin an BeWo-Zellen herstellen zu können, wurden BeWo-Zellen mit Diphenhydramin (0,2 mM) in An- oder Abwesenheit eines Überschusses von 50 mM Cholin inkubiert. Außerdem wurde die Na^+ -Abhängigkeit der Diphenhydraminaufnahme durch Austausch von Natriumchlorid gegen Litiumchlorid untersucht. Wie die Cholinaufnahme war auch die Diphenhydraminaufnahme in BeWo-Zellen zu ungefähr 30% Na^+ -abhängig. 50 mM Cholin hemmten die Diphenhydraminaufnahme signifikant auf 70% der Kontrolle (Abb. 34). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass Diphenhydramin zu einem Teil über das Cholintransportsystem in die Plazentazellen aufgenommen wird.

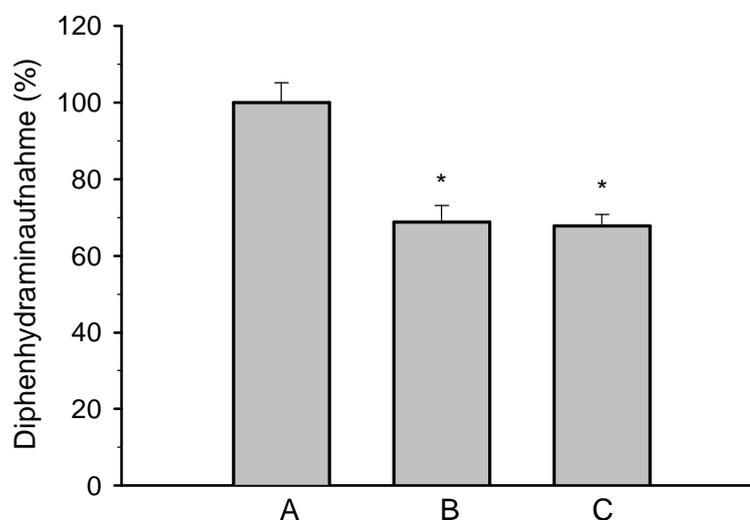


Abb. 34: Einfluss von Cholin und Na^+ auf die Diphenhydraminaufnahme in BeWo-Zellen. Inkubation mit Diphenhydramin (0,2 mM) in Puffer pH 8,5 (37°C) über 15 min. A: 140 mM Natriumchlorid plus 50 mM Mannitol, B: 140 mM Natriumchlorid plus 50 mM Cholinchlorid, C: 140 mM Lithiumchlorid plus 50 mM Mannitol. Daten sind Mittelwerte \pm S.E., n = 6, * $p \leq 0,05$.

Etilefrin

Die Aufnahme von Etilefrin in JEG-3-Zellen war linear bis zu Inkubationszeiträumen von 5 Minuten. Die Untersuchungen der Etilefrinaufnahme an JEG-3-Zellen wurden entsprechend den apikalen Inkubationen mit Etilefrin an Caco-2-Zellen bei pH 8,5 über 5 Minuten durchgeführt.

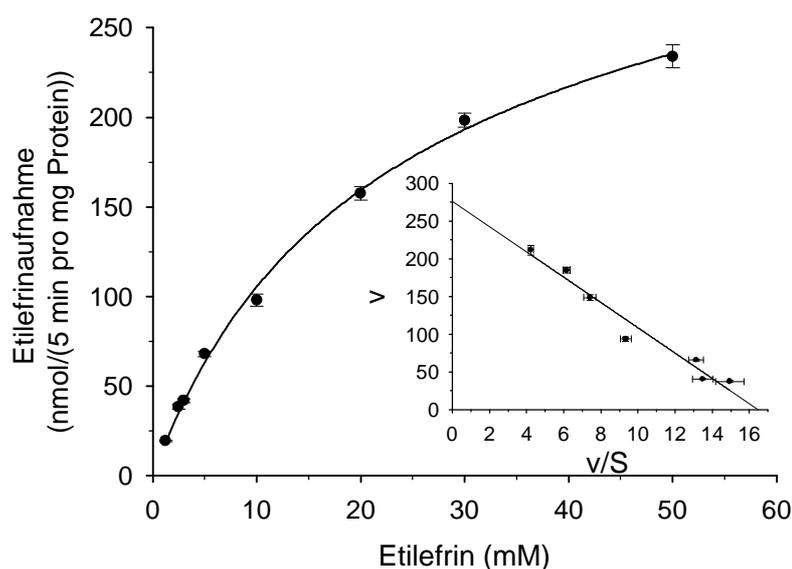


Abb. 35: Etilefrinaufnahme in JEG-3-Zellen in Abhängigkeit von der Substratkonzentration. Inkubation mit Etilefrin (1,25-50 mM) in Puffer pH 8,5 (37°C) über 5 min. Einschub: Eadie-Hofstee-Transformation der Daten nach Subtraktion des nichtsättigbaren Anteils der Etilefrinaufnahme. v: Aufnahme rate (nmol/(5 min pro mg Protein)), S: Etilefrinkonzentration (mM). Daten sind Mittelwerte \pm S.E., n = 3.

Die Abhängigkeit der Etilefrinaufnahmerate von der Substratkonzentration ist in Abb. 35 dargestellt. Aus der Kurvenanpassung nach Gleichung (3) resultierten folgende kinetische Parameter für den Transportprozess: Die Michaelis-Menten-Konstante (K_i) und die Maximalgeschwindigkeit (V_{max}) betragen 19 ± 5 mM und 294 ± 75 nmol/(5 min pro mg Protein). Für die Transformation der Daten nach Eadie-Hofstee wurde der durch die Kurvenanpassung nach Gleichung (3) errechnete nichtcarriervermittelte Anteil der Etilefrinaufnahme von der Gesamtaufnahmerate abgezogen (Einschub).

Die apikale Aufnahme von Etilefrin in einer Konzentration von 5 mM wurde durch den Zusatz von 50 mM des hOCT-Substrates TEA nicht beeinflusst. Dieses Resultat bestätigt erneut die Abwesenheit relevanter Mengen von hOCTs in der apikalen Membran von JEG-3-Zellen.

Ranitidin

Die Ranitidinaufnahmerate in JEG-3-Zellen stieg bei einem pH-Wert von 8,5 bis zu Inkubationszeiträumen von 5 Minuten linear an. Die Versuchsbedingungen waren bezüglich Inkubationszeitraum (5 min) und pH-Wert (8,5) zwecks Vergleichbarkeit identisch mit denen der Ranitidinaufnahme in Caco-2-Zellen.

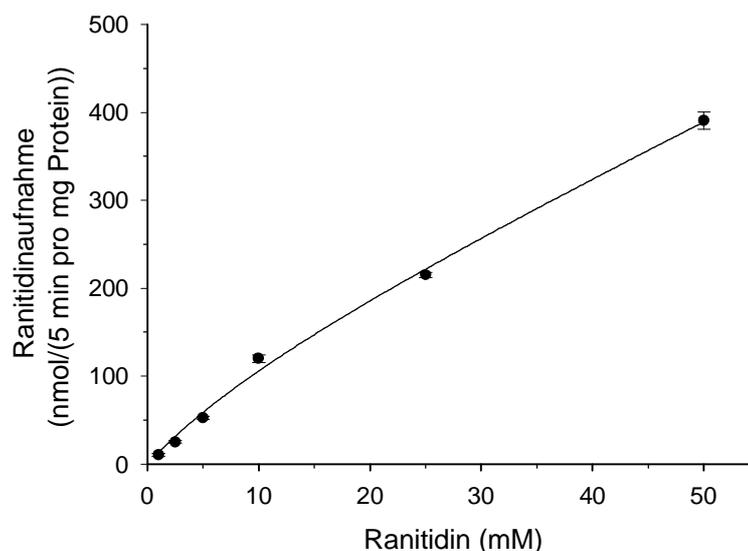


Abb. 36: Ranitidinaufnahme in JEG-3-Zellen in Abhängigkeit von der Substratkonzentration. Inkubation mit Ranitidin (1-50 mM) in Puffer pH 8,5 (37°C) über 5 min. Daten sind Mittelwerte \pm S.E., $n = 3$.

Die Ranitidinaufnahme in JEG-3-Zellen nimmt mit steigender Substratkonzentration fast linear zu. Im gezeigten Konzentrationsbereich ist keine Sättigung des Transportprozesses erkennbar (Abb. 36).

4.4 Transport an Keratinozyten: Hemmung der [³H]MPP⁺-Aufnahme durch Inhibitoren der organischen Kationentransporter

Bisher existieren keine Studien über organische Kationentransporter in der menschlichen Haut. Jedoch wurde der Transport des Kations Thiamin an Hautfibroblasten von Stagg und Mitarbeitern (1999) im Zusammenhang mit megaloblastärer Anämie charakterisiert.

Im Folgenden wurde daher der Einfluss von Inhibitoren der organischen Kationentransporter hOCT1, hOCT2 und hOCT3 auf die [³H]MPP⁺-Aufnahme in native humane epidermale Keratinozytenzellen (NHEK) untersucht. Analog zu den Untersuchungen der [³H]MPP⁺-Aufnahme an Caco-2-Zellen fanden die Experimente über 10-minütige Inkubationszeiträume bei einem pH-Wert von 7,5 statt. Der Diffusionsanteil der [³H]MPP⁺-Aufnahme in Gegenwart von 20 mM MPP⁺ betrug 57% und wurde von der Aufnahmerate abgezogen.

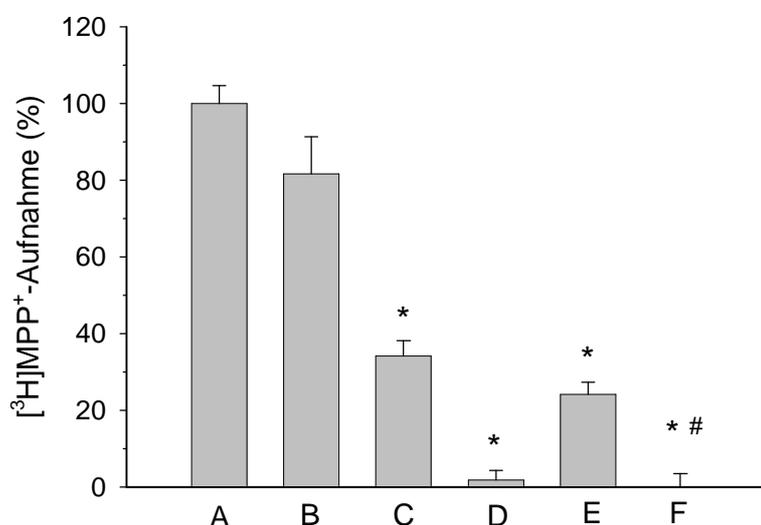


Abb. 37: Hemmung der [³H]MPP⁺-Aufnahme in NHEK-Zellen durch hOCT-Inhibitoren. Inkubation mit [³H]MPP⁺ (16 nM) in An- oder Abwesenheit von hOCT-Inhibitoren (verschiedene Konzentrationen) in Puffer pH 7,5 über 10 Minuten. A: [³H]MPP⁺ 16 nM (Kontrolle), B: plus Atropin 50 µM, C: plus Corticosteron 1 µM, D: plus Chinin 200 µM, E: plus Atropin 50 µM und Corticosteron 1 µM, F: plus Atropin 50 µM, Corticosteron 1 µM und Chinin 200 µM. Daten sind Mittelwerte ± S.E., n = 9, * p ≤ 0,05 vs. Kontrolle, # p ≤ 0,05 vs. E.

Das Spasmolytikum Atropin, das die [³H]MPP⁺-Aufnahme an mit hOCT1-transfizierten HEK-Zellen mit einer Halbhemmkonzentration von 1 µM hemmt (siehe 4.5.2), hat in einer Konzentration von 50 µM keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die [³H]MPP⁺-Aufnahme in NHEK-Zellen. Corticosteron hemmt die hOCT3-vermittelte [³H]MPP⁺-Aufnahme mit einer Halbhemmkonzentration im nanomolaren Bereich (Hayer-Zillgen *et al.* 2002) und reduziert die [³H]MPP⁺-Aufnahme in NHEK-Zellen in einer Konzentration von 1 µM um 60% signifikant gegenüber der Kontrolle. Durch den hOCT-Inhibitor Chinin in einer Konzentration von 200 µM wurde die [³H]MPP⁺-Aufnahme um fast 100% statistisch signifikant gegenüber der Kontrolle reduziert. Die Kombination aus Atropin und Corticoste-

ron bewirkte eine Aufnahmehemmung, die der durch Corticosteron allein vergleichbar war. Wie Chinin alleine reduzierten Atropin, Corticosteron und Chinin zusammen die [^3H]MPP⁺-Aufnahme um 100% signifikant gegenüber der Kontrolle und gegenüber der mit Atropin und Corticosteron behandelten Gruppe.

4.5 Transportstudien an hOCT1-, hOCT2- oder hOCT3-transfizierten Zell-Linien

In den untersuchten Zell-Linien sind neben organischen Kationentransportern auch diverse andere Transportsysteme lokalisiert, wie z.B. das in der vorliegenden Arbeit erstmals charakterisierte Clonidintransportsystem in JEG-3-Zellen. Daher war es wichtig, die Konkurrenz der schwerpunktmäßig untersuchten Arzneistoffe mit einem kationischen Modellsubstrat an den isolierten Transportsystemen zu charakterisieren. Für diese Versuche wurden die mit den humanen organischen Kationentransportern hOCT1, hOCT2 oder hOCT3 transfizierten Zell-Linien CHO und HEK eingesetzt. Der Wildtyp dieser Zellen weist eine geringe Transportaktivität auf und exprimiert die organischen Kationentransporter nicht, so dass erhöhte Aufnahmeraten der Arzneistoffe in den hOCT1-, hOCT2- oder hOCT3-transfizierten Zellen den Rückschluss auf Transport durch die hOCTs zulassen.

4.5.1 Charakterisierung des [^3H]MPP⁺-Transportes an HEK-hOCT1, HEK-hOCT2 und CHO-hOCT3

Die transfizierten Zell-Linien (HEK-CMV, HEK-hOCT1, HEK-hOCT2, CHO-pcDNA 3.1. und CHO-hOCT3) wurden zunächst hinsichtlich der Aufnahme des kationischen Modellsubstrates MPP⁺ charakterisiert. HEK-Zellen wurden wie unter 3.2.1.2 beschrieben als Suspensionen inkubiert. In Abb. 38 ist die Abhängigkeit der [^3H]MPP⁺-Aufnahme von der Kultivierungsdauer dargestellt. Die [^3H]MPP⁺-Aufnahme von HEK-hOCT1 (A) liegt im Vergleich zur kontrolltransfizierten Zell-Linie an Tag 3 um den Faktor 10 höher, nimmt bei weiterer Kultivierung an Tag 7 deutlich ab und steigt an Tag 10 wieder an. Daher wurde Tag 3 der Kultivierung als Versuchstag festgelegt. HEK-hOCT2-Zellen (B) hingegen nahm [^3H]MPP⁺ von Tag 3 bis 9 konstant 10-fach verstärkt im Vergleich zur kontrolltransfizierten Zell-Linie HEK-CMV auf, wobei ein leichter Anstieg der Aufnahme mit andauernder Kultivierung sichtbar wurde. Versuche mit HEK-hOCT2-Zellen fanden an Tag 7 statt. Mit hOCT3 transfizierte CHO-Zellen (C) nahmen [^3H]MPP⁺ gegenüber der kontrolltransfizierten Zell-Linie (CHO-pcDNA 3.1.) 60-fach stärker auf. Die Aufnahme von [^3H]MPP⁺ stieg von Tag 3 bis 7 an. Von Tag 7 bis 10 nahm die [^3H]MPP⁺-Aufnahme nicht weiter zu, daher wurde Tag 7 als Versuchstag für CHO-hOCT3-Zellen festgelegt.

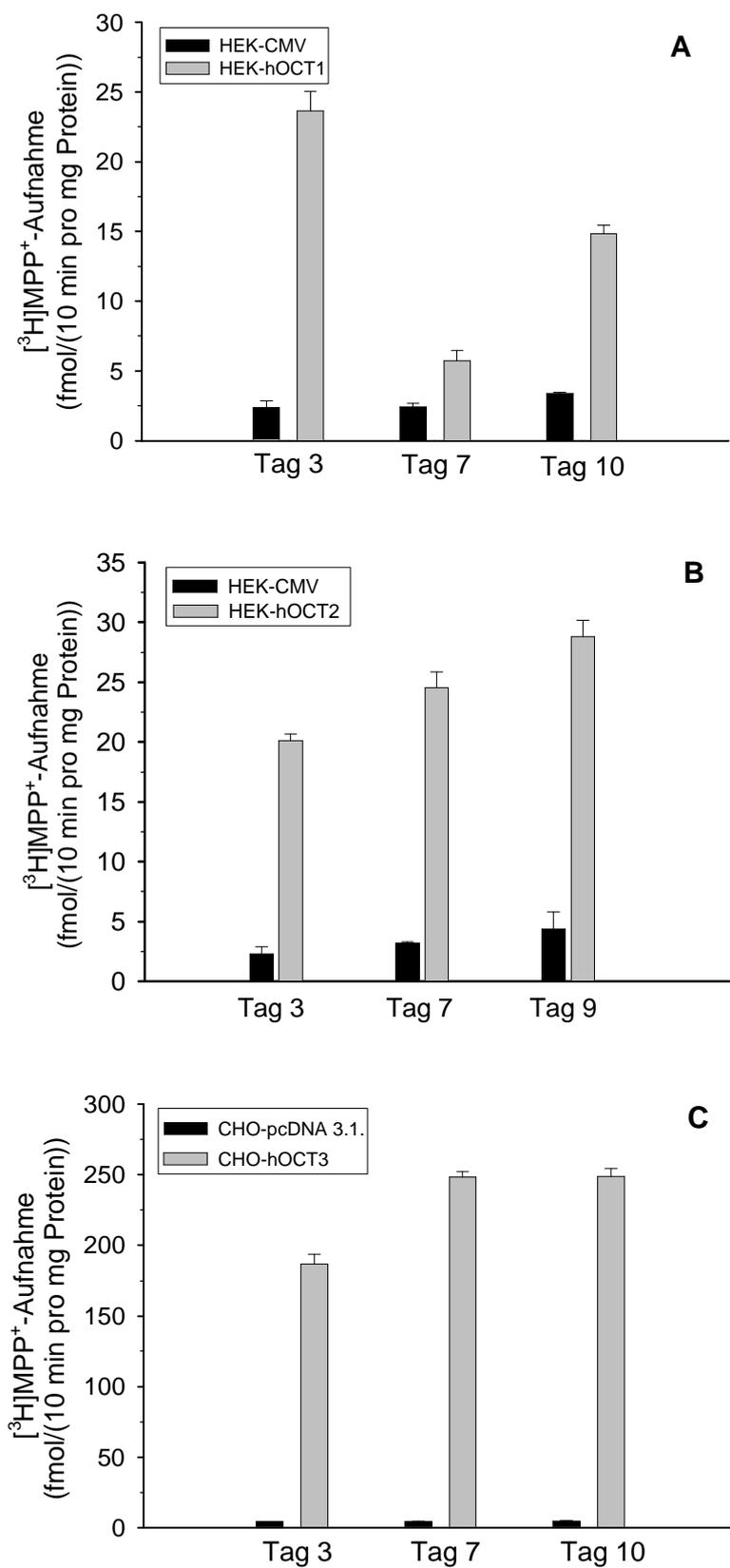


Abb. 38: [³H]MPP⁺-Aufnahme in CHO (-pcDNA 3.1., -hOCT3)- und HEK (-CMV, -hOCT1, -hOCT2)-Zellen in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer. Inkubation mit [³H]MPP⁺ (CHO: 2 nM; HEK: 10 nM) in Puffer pH 7,5 über 10 min. Daten sind Mittelwerte ± S.E., n = 3.

Die [³H]MPP⁺-Aufnahme in hOCT1- und hOCT2-transfizierte Zell-Linien war nichtlinear bei Inkubationszeiträumen > 10 Sekunden, in hOCT3-transfizierte Zell-Linien bei Inkubationszeiträumen > 1 Minute. Für Untersuchungen, die im linearen Bereich der [³H]MPP⁺-Aufnahme stattfinden mussten (Bestimmung der Halbhemmkonzentration von Arzneistoffen), wurde im Fall von HEK-hOCT1 und HEK-hOCT2 über einen Zeitraum von 1 Minute inkubiert, da eine Inkubation von weniger als 1 Minute zu große Versuchsfehler zur Folge hatte.

Bei der Inkubation von Zellsuspensionen (HEK-Zellen) musste zusätzlich die Linearität der [³H]MPP⁺-Aufnahme mit steigendem Proteingehalt untersucht werden (Abb. 39).

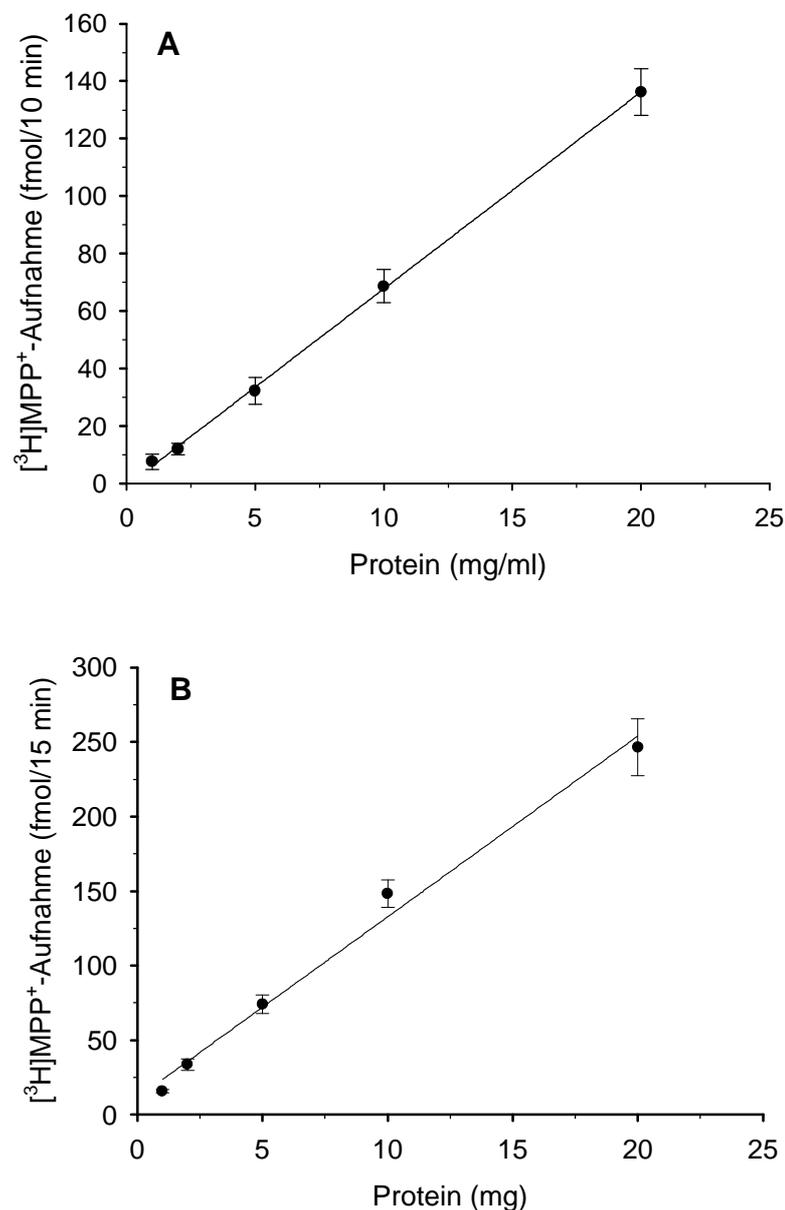


Abb. 39: [³H]MPP⁺-Aufnahme in HEK-hOCT1-Zellen (A) und HEK-hOCT2-Zellen (B) in Abhängigkeit vom Proteingehalt. Inkubation mit [³H]MPP⁺ (10 nM) in Puffer pH 7,5 über 10 min (HEK-hOCT1) oder 15 min (HEK-hOCT2). Daten sind Mittelwerte ± S.E., n = 3.

Die [^3H]MPP $^+$ -Aufnahme stieg in hOCT1-transfizierten Zellen linear bis 20 mg/ml Protein an, in hOCT2-transfizierten Zellen war Linearität der Aufnahme bis 15 mg/ml Protein zu erkennen. Bei der Einstellung der Zellsuspension auf einen definierten Proteingehalt wurden diese Proteinmengen/ml in der Regel nicht überschritten.

Zuletzt wurde die Na $^+$ - und pH-Abhängigkeit der [^3H]MPP $^+$ -Aufnahme in die mit hOCTs transfizierten Zell-Linien untersucht (Abb. 40). HEK-hOCT1-Zellen (A) nahmen [^3H]MPP $^+$ Na $^+$ - und pH-abhängig auf, die Aufnahmerate stieg von pH 6,0 nach pH 7,5 stark an, bei Erhöhung des pH-Wertes auf 8,5 war kein weiterer Anstieg der Aufnahmerate zu erkennen. Die [^3H]MPP $^+$ -Aufnahme in HEK-hOCT2-Zellen (B) wurde zusätzlich von einem einwärts gerichteten Na $^+$ -Gradienten und einem auswärts gerichteten pH-Gradienten stimuliert, durch die Erhöhung des pH-Wertes von 7,5 nach 8,5 nahm die [^3H]MPP $^+$ -Aufnahme um den Faktor 2 zu. In CHO-hOCT3-Zellen (C) wurde [^3H]MPP $^+$ Na $^+$ -unabhängig und moderat pH-abhängig aufgenommen, wobei mit steigendem pH-Wert ein Anstieg der Aufnahmerate zu erkennen war.

Die Untersuchungen wurden an allen 3 transfizierten Zell-Linien bei pH 7,5 in Anwesenheit von 140 mM Natriumchlorid durchgeführt. Die starke Na $^+$ - Abhängigkeit der [^3H]MPP $^+$ -Aufnahme bei den transfizierten HEK-Zellen ist wahrscheinlich ein Artefakt. Bedingt durch die Standzeiten der Zellsuspensionen vor Versuchsbeginn in Na $^+$ -freiem Puffer brach wahrscheinlich das Membranpotenzial zusammen.

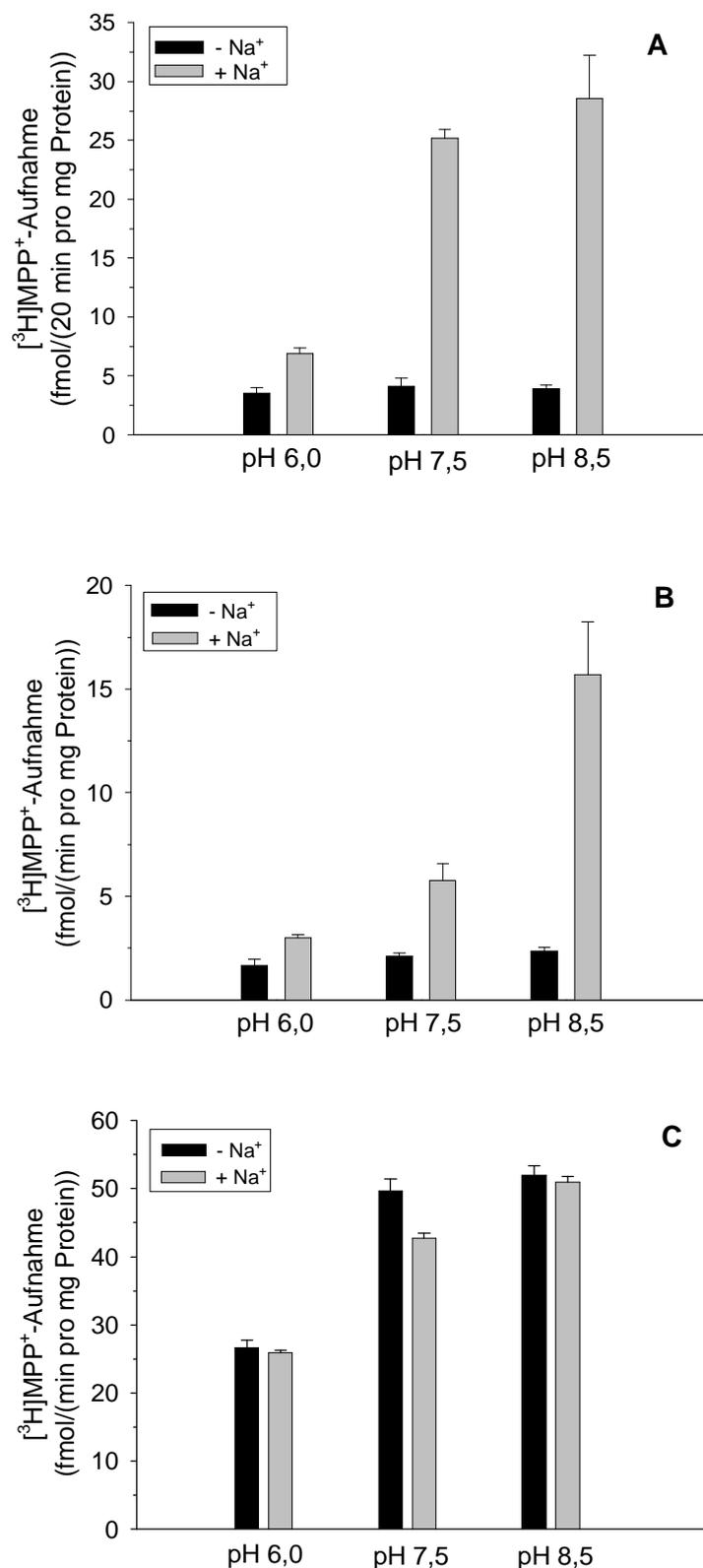


Abb. 40: Na⁺- und pH-Abhängigkeit der [³H]MPP⁺-Aufnahme in HEK-hOCT1-Zellen (A), HEK-hOCT2-Zellen (B) und CHO-hOCT3-Zellen (C). Inkubation mit [³H]MPP⁺ (CHO: 1 nM; HEK: 20 nM) in Puffer pH 6,0; pH 7,5 oder pH 8,5 über 1 min (HEK-hOCT2, CHO-hOCT3) oder 20 min (HEK-hOCT1). Natriumchlorid wurde isoosmotisch ersetzt durch Cholinchlorid. Daten sind Mittelwerte ± S.E., n = 3.

4.5.2 Bestimmung der Affinität ausgewählter Arzneistoffe und kationischer Modellsubstrate an den organischen Kationentransportern hOCT1, hOCT2 und hOCT3

Von den bisher untersuchten Arzneistoffen und kationischen Modellsubstraten wurde zur Charakterisierung ihrer Affinität zu den hOCTs die Halbhemmkonzentration IC_{50} an den jeweiligen transfizierten Zell-Linien HEK-hOCT1, HEK-hOCT2 und CHO-hOCT3 bei pH 7,5 bestimmt. Aus der Kurvenanpassung der Daten mittels Gleichung (1) resultierten die in Tab. 13 aufgelisteten Halbhemmkonzentrationen.

An hOCT1 lagen die IC_{50} -Werte in einem Bereich von 1 μ M bis 450 μ M, an hOCT2 von 15 μ M bis 4,0 mM und an hOCT3 von 37 μ M bis 4,5 mM. Die Rangfolge der inhibitorischen Potenz war für hOCT1 Atropin > Diphenhydramin > Clonidin > Chinin > Butylscopolaminium > Chinidin > Ranitidin > Etilefrin, für hOCT2 Diphenhydramin > Clonidin = Chinin > Atropin > Chinidin > MPP⁺ > TBA > TEA > Butylscopolaminium > Procainamid > Ranitidin > Cholin > Etilefrin und für hOCT3 Chinin > MPP⁺ > Clonidin > Chinidin > TBA > Ranitidin > Atropin > Diphenhydramin > Procainamid > Etilefrin. Die Rangfolgen der IC_{50} -Werte der Arzneistoffe an den 3 hOCTs korrelierten nicht miteinander. Eine Gemeinsamkeit der IC_{50} -Werte an hOCT1 und hOCT2 war jedoch die schwache inhibitorische Potenz der Arzneistoffe Etilefrin und Ranitidin, das Antihypotensivum Etilefrin zeigte zu allen 3 hOCTs die schwächste Affinität. Ergänzend zu Tab. 13 hemmten Butylscopolaminium und TEA in einer Konzentration von 1 mM die [³H]MPP⁺-Aufnahme in CHO-hOCT3-Zellen auf jeweils 88 und 81% des Kontrollwertes. Cholin in derselben Konzentration beeinflusste die [³H]MPP⁺-Aufnahme in CHO-hOCT3-Zellen nicht.

Tab. 13: Halbhemmkonzentrationen von kationischen Arzneistoffen/ kationischen Modellsubstraten/ endogenen Kationen gegen [³H]MPP⁺ an HEK-hOCT1-, HEK-hOCT2- und CHO-hOCT3-Zellen. Inkubation mit [³H]MPP⁺ (CHO-hOCT3: 1 nM; HEK-hOCT1 und HEK-hOCT2: 20 nM) in An- oder Abwesenheit kationischer Arzneistoffe (0-100 mM) in Puffer pH 7,5 über 1 min. Die Halbhemmkonzentrationen wurden aus dose-response-Hemmkurven errechnet. Parameter sind Mittelwerte ± S.E., n = 4.

| Substanz | IC ₅₀ (µM) | | |
|--------------------|-----------------------|------------|------------|
| | hOCT1 | hOCT2 | hOCT3 |
| Atropin | 1,2 ± 0,2 | 29 ± 3 | 466 ± 56 |
| Butylscopolaminium | 16 ± 6 | 764 ± 65 | n.b. |
| Diphenhydramin | 3,4 ± 0,6 | 15 ± 3 | 695 ± 44 |
| Clonidin | 6,5 ± 1,3 | 23 ± 5 | 110 ± 13 |
| Etilefrin | 447 ± 57 | 4009 ± 541 | 4448 ± 141 |
| Chinin | 13 ± 0,8 | 23 ± 3 | 37 ± 2 |
| Chinidin | 20 ± 3 | 50 ± 5 | 335 ± 35 |
| Ranitidin | 28 ± 2 | 1617 ± 161 | 372 ± 44 |
| TEA | n.b. | 404 ± 33 | n.b. |
| TBA | n.b. | 383 ± 27 | 370 ± 21 |
| Procainamid | n.b. | 1141 ± 108 | 1291 ± 63 |
| MPP ⁺ | n.b. | 101 ± 13 | 69 ± 3 |
| Cholin | n.b. | 1823 ± 180 | n.b. |

4.5.3 Untersuchung des Transportes der Arzneistoffe und Modellsubstrate durch die hOCTs

Die Hemmung der [³H]MPP⁺-Aufnahme in die transfizierten Zell-Linien deutet auf eine Interaktion der Arzneistoffe und Modellsubstrate mit den einzelnen humanen OCTs hin, der Transport durch die hOCTs ist mit Interaktionsstudien jedoch nicht nachzuweisen. Deshalb wurde anhand ausgewählter Arzneistoffe und Modellsubstrate der Transport in die mit leeren Vektoren (HEK-CMV, CHO-pcDNA 3.1.) und mit den Transportproteinen transfizierten Zell-Linien (HEK-hOCT1, HEK-hOCT2 und CHO-hOCT3) vergleichend untersucht. Eine unter identischen Bedingungen gegenüber der mit dem leeren Vektor transfizierten Zell-Linie erhöhte Aufnahme der Arzneistoffe in die mit dem Transportprotein transfizierte Zell-Linie wäre nur durch hOCT-vermittelten Transport erklärbar. Untersuchungen zur Aufnahme

unmarkierter Arzneistoffe konnten an transfizierten HEK-Zellen nicht durchgeführt werden, da für die Zellen in Suspension die notwendigen Versuchsbedingungen (Schütteln über 1 Stunde bei 37°C) unverträglich waren.

Wie aus Abb. 41 ersichtlich wird, wurden sowohl [³H]Acetylcholin als auch [³H]Cholin durch hOCT2 transportiert, da die Aufnahmerate um das 6-fache höher lag als die entsprechende der kontrolltransfizierten Zell-Linie. [³H]Clonidin wurde von hOCT2-transfizierten Zellen verglichen mit den kontrolltransfizierten Zellen zwar verstärkt aufgenommen, aber die Aufnahmeraten unterschieden sich statistisch nicht signifikant. Der humane OCT1 transportierte weder [³H]Acetylcholin, noch [³H]Cholin oder [³H]Clonidin.

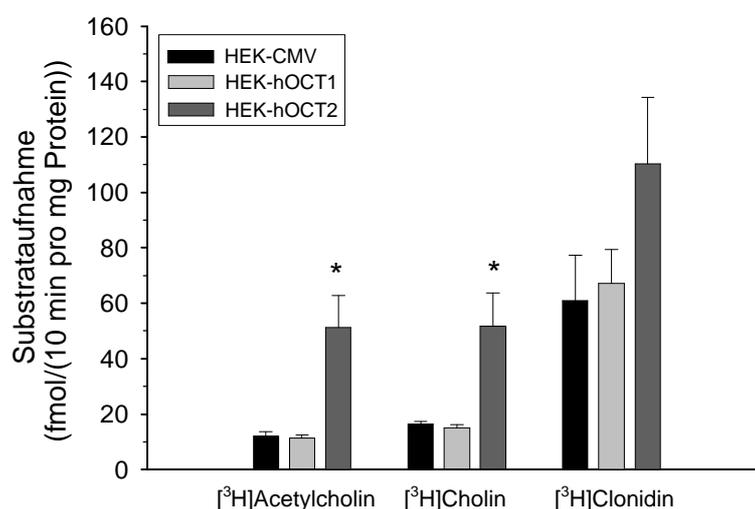


Abb. 41: Aufnahme endogener Substanzen/Arzneistoffe in HEK(-CMV, -hOCT1, -hOCT2)-Zellen. Inkubation mit [³H]Acetylcholin, [³H]Cholin oder [³H]Clonidin (alle 10 nM) in Puffer pH 7,5 über 10 min. Daten sind Mittelwerte ± S.E., n = 3, * p ≤ 0,05 vs. kontrolltransfizierte Zell-Linie.

[³H]Acetylcholin, [³H]Cholin und [³H]Clonidin werden von hOCT3-transfizierten Zellen bei einer Inkubationszeit über 10 Minuten gegenüber den kontrolltransfizierten Zell-Linien nicht verstärkt aufgenommen (Abb. 42). Bei Inkubation über 10 Sekunden ist jedoch eine statistisch signifikant verstärkte Aufnahme in CHO-hOCT3-Zellen verglichen mit CHO-pcDNA 3.1.-Zellen zu erkennen (Abb. 42, Einschub).

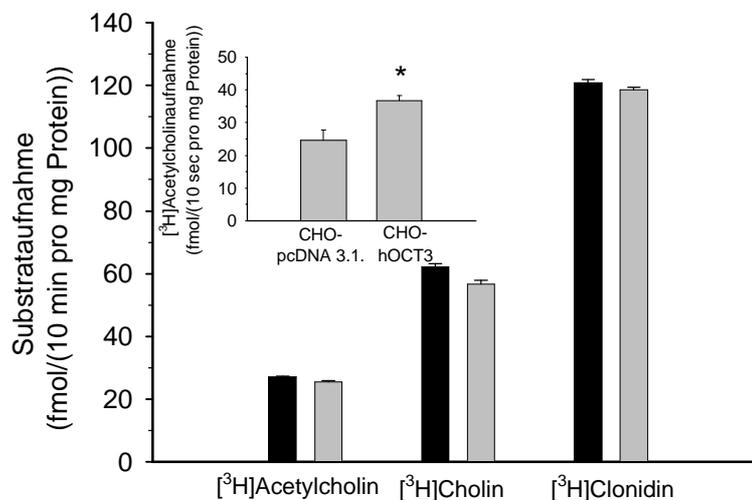


Abb. 42: Aufnahme endogener Substanzen/Arzneistoffe in CHO-pcDNA 3.1-Zellen (schwarze Balken) und CHO-hOCT3-Zellen (graue Balken). Inkubation mit [³H]Acetylcholin, [³H]Cholin oder [³H]Clonidin (alle 2 nM) in Puffer pH 7,5 über 10 min. Einschub: Inkubation mit [³H]Acetylcholin (100 nM) in Puffer pH 7,5 über 10 sek. Daten sind Mittelwerte ± S.E., n = 3, * p ≤ 0,05.

Die Aufnahme der unmarkierten Arzneistoffe Atropin, Chinin, Diphenhydramin und Ranitidin in die Zell-Linien CHO-pcDNA 3.1. und CHO-hOCT3 ist in Abb. 43 dargestellt. Atropin wurde bei pH 7,5, verglichen mit CHO-pcDNA 3.1., 1,4-fach stärker in CHO-hOCT3-Zellen aufgenommen. Der Unterschied der Aufnahmeraten war statistisch signifikant. Diphenhydramin, Ranitidin und Chinin wurden bei pH 7,5 nicht hOCT3-vermittelt in CHO-Zellen aufgenommen. Bei pH 8,5 war die Aufnahme von Ranitidin in CHO-hOCT3-Zellen gegenüber CHO-pcDNA 3.1.-Zellen zwar schwach, aber statistisch signifikant erhöht. Diphenhydramin und Chinin wurden, verglichen mit Atropin und Ranitidin, stark in CHO-Zellen aufgenommen. Die Aufnahmerate von Ranitidin verdoppelte sich mit Erhöhung des pH-Wertes von 7,5 auf 8,5. Die Aufnahme von [³H]Atenolol (72 nM) in CHO-hOCT3-Zellen war durch einen Überschuss an unmarkiertem Atenolol (10 mM) nicht hemmbar. Butylscopolaminium konnte nach einstündiger Inkubation weder in CHO-pcDNA 3.1.- noch in CHO-hOCT3-transfizierten Zellen detektiert werden.

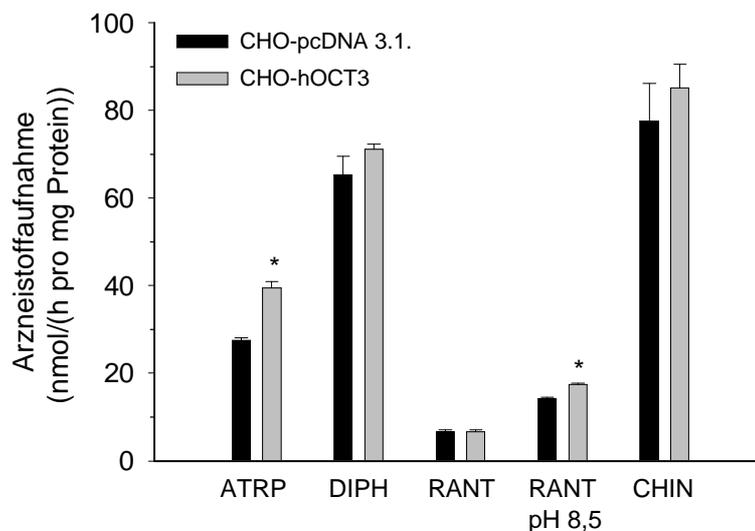


Abb. 43: Aufnahme kationischer Arzneistoffe in die Zell-Linien CHO-pcDNA 3.1. und CHO-hOCT3. Inkubation mit Atropin (ATRP), Diphenhydramin (DIPH), Ranitidin (RANT), Chinin (CHIN) (alle 1 mM) in Puffer pH 7,5 oder pH 8,5 (Ranitidin), (37°C) über 1 h. Daten sind Mittelwerte \pm S.E., $n \geq 3$, * $p \leq 0,05$.

Das Pharmakon Etilefrin wurde bei pH 7,5 2-fach stärker in die Zell-Linie CHO-hOCT3 als in CHO-pcDNA 3.1. aufgenommen (Abb. 44). Der Zusatz von 20 mM Cholin hatte weder bei der hOCT3- noch bei der pcDNA-transfizierten Zell-Linie Einfluss auf die Aufnahmerate. Bei pH 8,5 erhöhten sich die Aufnahmeraten von Etilefrin in CHO-hOCT3- und in CHO-pcDNA 3.1.-Zellen, es existierte kein statistisch signifikanter Unterschied mehr zwischen den Zell-Linien. Durch Zusatz von 20 mM Cholin verringerte sich die Etilefrinaufnahme in CHO-hOCT3-Zellen schwach gegenüber CHO-pcDNA 3.1.-Zellen. Cholin hatte keinen Einfluss auf die Aufnahmerate bei pH 8,5 in CHO-pcDNA 3.1.-Zellen, Etilefrin wurde in CHO-hOCT3-Zellen bei demselben pH-Wert in An- oder Abwesenheit von Cholin quantitativ vergleichbar aufgenommen.

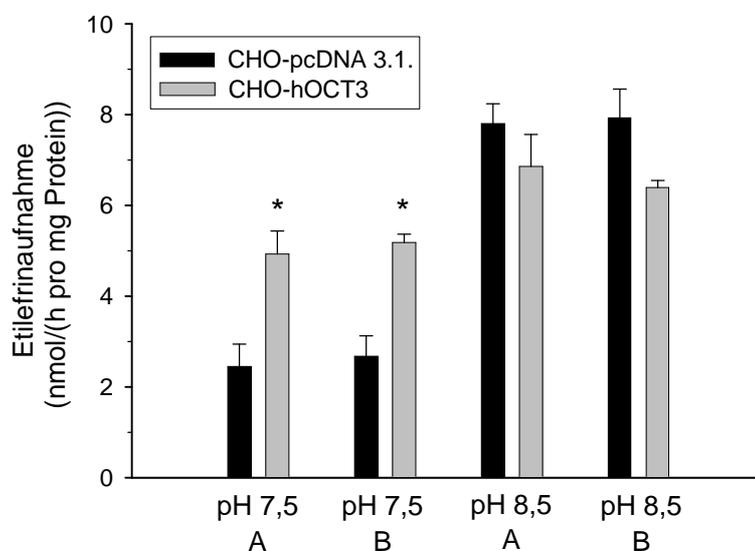


Abb. 44: Etilefrinaufnahme in die Zell-Linien CHO-pcDNA 3.1. und CHO-hOCT3. Inkubation mit Etilefrin (0,2 mM) in An (A)- oder Abwesenheit (B) von Cholin (20 mM) in Puffer pH 7,5 oder pH 8,5 (37°C) über 1 h. Daten sind Mittelwerte \pm S.E., n = 3, * $p \leq 0,05$.

Da Etilefrin im Vergleich zu den anderen Arzneistoffen den größten hOCT3-vermittelten Anteil an der Gesamtaufnahme zeigte, wurden die kinetischen Parameter des Etilefrintransportprozesses an hOCT3 bestimmt (Abb. 45). Eine lineare Beziehung zwischen Etilefrinaufnahmerate und steigenden Inkubationszeiträumen war bis zu 5 Minuten gegeben. Daher wurde die Aufnahme von Etilefrin bei pH 7,5 über 5 Minuten in einem Konzentrationsbereich von 1-50 mM in CHO-pcDNA 3.1.- und CHO-hOCT3-Zellen gemessen. Die Aufnahmerate in CHO-pcDNA 3.1.-Zellen (nichtsättigbarer Anteil der Etilefringesamtaufnahme) wurde von der entsprechenden Aufnahmerate in CHO-hOCT3-Zellen abgezogen. Dann erfolgte die Kurvenanpassung der Daten mit Hilfe von Gleichung (3): Die Michaelis-Menten-Konstante (K_t) für Etilefrin an hOCT3 betrug $2,8 \pm 0,4$ mM und die Maximalgeschwindigkeit (V_{max}) betrug $20 \pm 0,7$ nmol/(5 min pro mg Protein). Die Aufnahme von Etilefrin in CHO-hOCT3-Zellen über das Transportprotein hOCT3 im gewählten Konzentrationsbereich ist somit bewiesen.

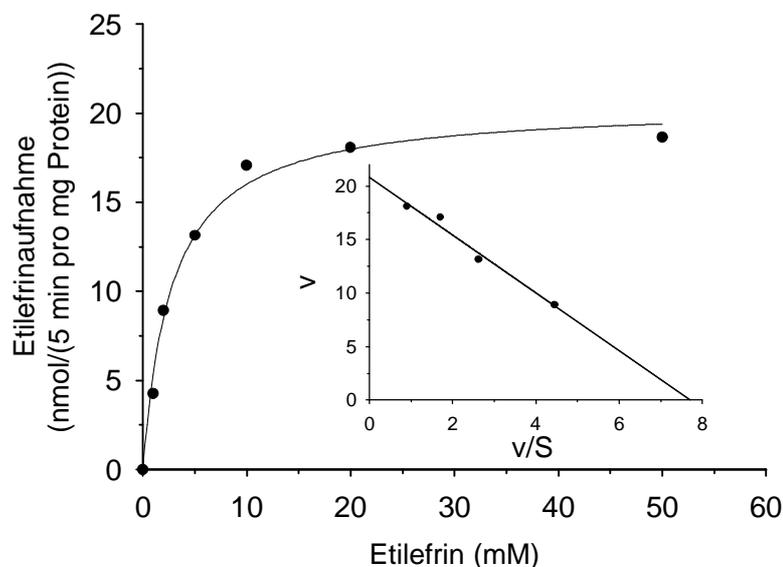


Abb. 45: Etilefrinaufnahme durch hOCT3 in Abhängigkeit von der Substratkonzentration. Inkubation von CHO-pcDNA 3.1.-Zellen (nichtsättigbarer Anteil der Aufnahme) und CHO-hOCT3-Zellen mit Etilefrin (1-50 mM) in Puffer pH 7,5 (37°C) über 5 min. Einschub: Eadie-Hofstee-Transformation der Daten. v: Aufnahmerate (nmol/(5 min per mg Protein)), S: Etilefrinkonzentration (mM).

4.6 Expression und subzelluläre Lokalisation der hOCTs in den verwendeten Zell-Linien

Die mRNA der drei hOCTs ist in Caco-2-Zellen nachgewiesen (Abschnitt 2.3.2, Tab. 1); über die Expression der Transportproteine und deren subzelluläre Lokalisation liegen bisher jedoch keine Erkenntnisse vor. Daher wurde die Expression und subzelluläre Lokalisation der hOCTs in Caco-2-Zellen mittels fluoreszenzgekoppelter Antikörperreaktion aufgeklärt.

Die mRNA von hOCT1 wurde in den Zell-Linien NHEK, JEG-3 und BeWo detektiert, mRNA von hOCT3 wurde in NHEK-Zellen nachgewiesen (pers. Mitteilung Prof. Dr. Koepsell).

Um nicht nur die Transportproteine, sondern auch deren Lokalisation in der Zelle nachweisen zu können, wurde eine Kolo-kalisation durch gleichzeitige Visualisierung des apikalen Markers Villin und der hOCTs durchgeführt. Das Protein Villin ist ausschließlich in den Bürstensaum-bildenden Mikrovilli der Zellen lokalisiert. hOCT2 und hOCT3 sind stark in Caco-2-Zellen exprimiert. Die Kolo-kalisation der hOCT3-Fluoreszenz und der Villin-Fluoreszenz in der Zelle lässt auf eine apikale hOCT3-Expression schließen. Dagegen ist hOCT2 nicht mit Villin kolo-kalisiert und könnte basolateral exprimiert werden (Abb. 46). Aus Abb. 47 wird deutlich, dass hOCT1 in Caco-2-Zellen nur schwach exprimiert wird. Die gezeigten Präabsorptionskontrollen belegen die Spezifität der Antikörper-Reaktion (Abb. 47).

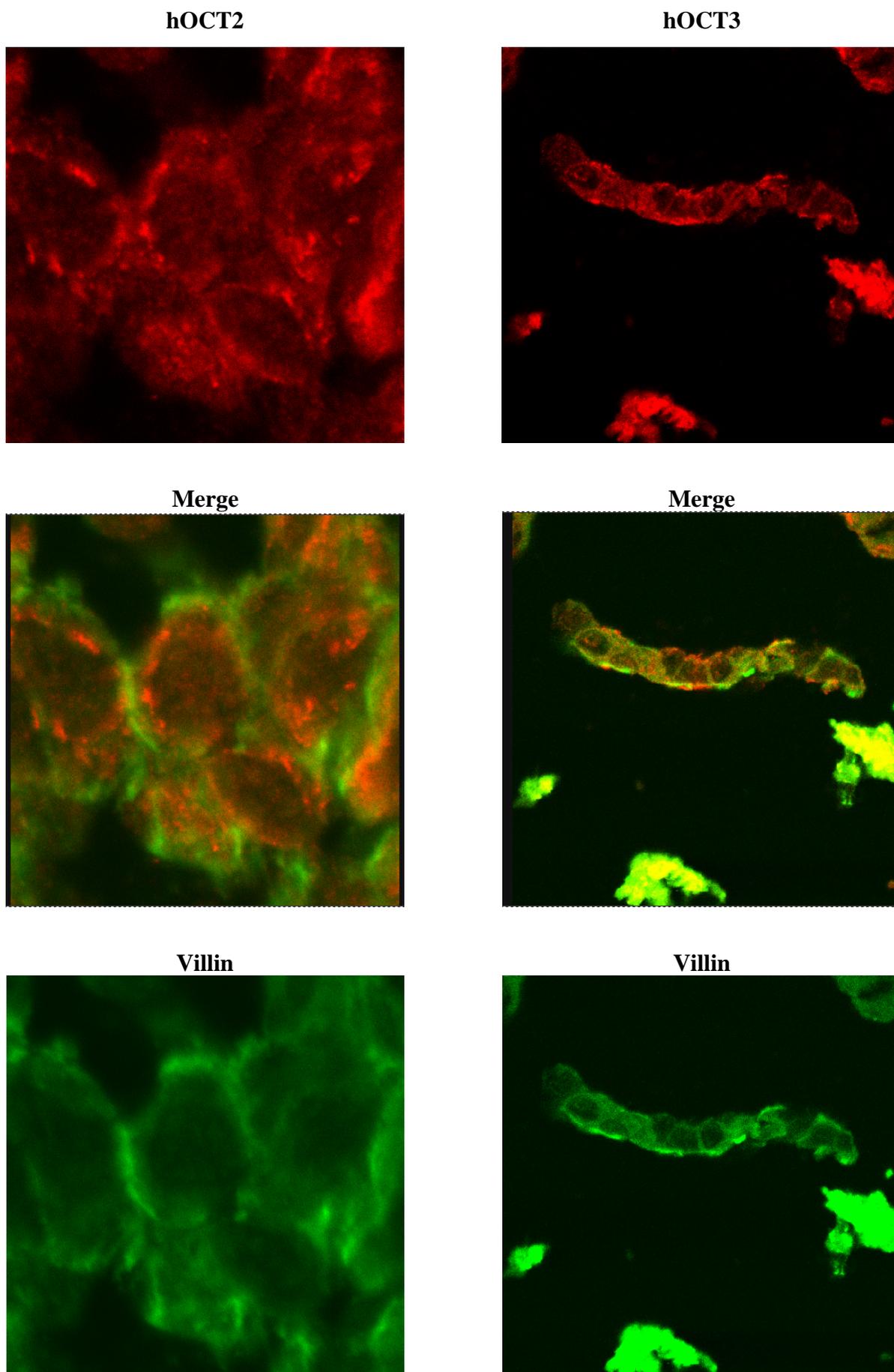


Abb.46: Expression von hOCT2 und hOCT3 in Caco-2-Zellen, Kolokalisation mit dem apikalen Marker Villin (Merge), Vergrößerungen: hOCT2/Villin 1×2500 , hOCT3/Villin 1×625 .

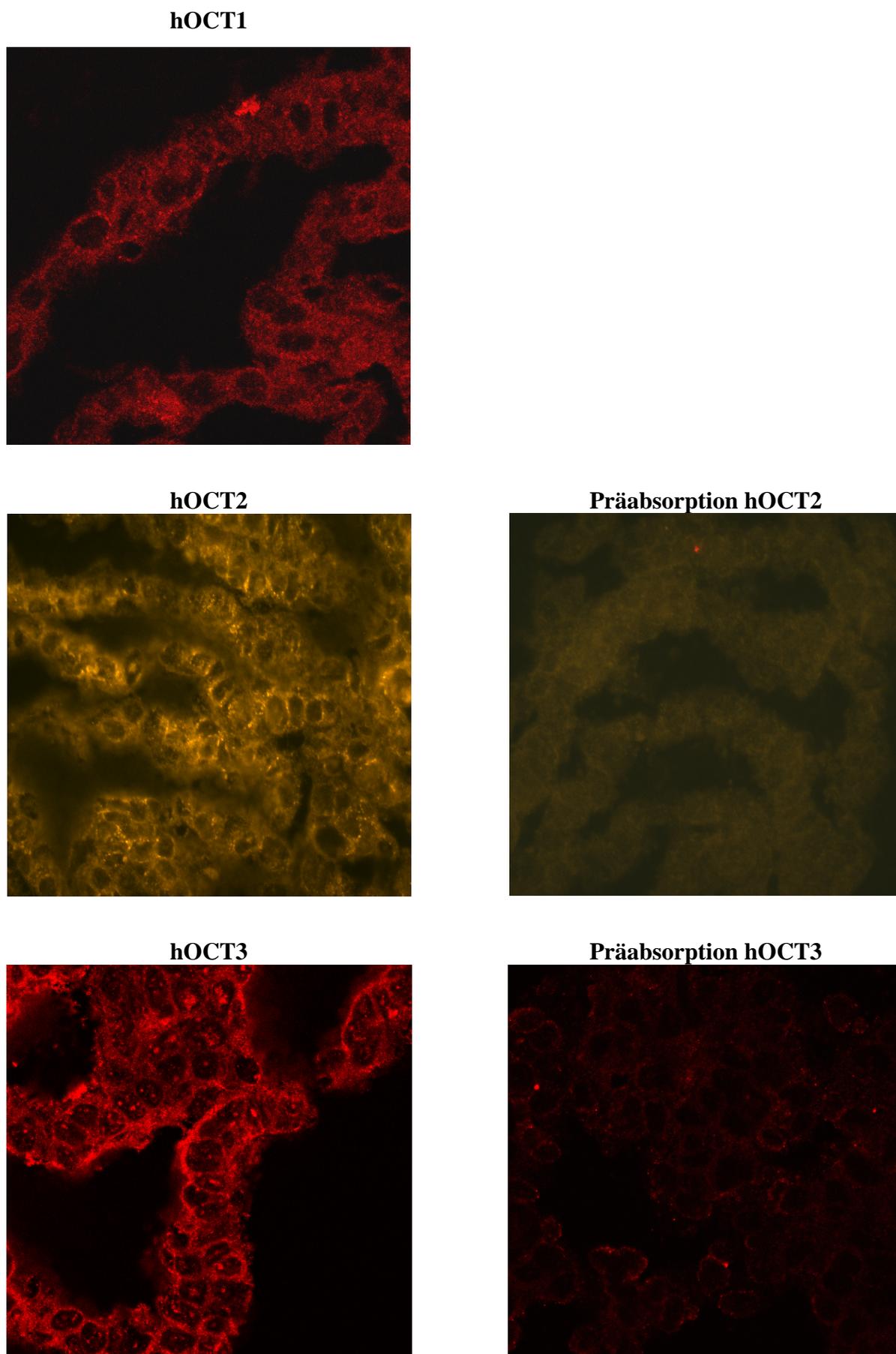


Abb. 47: Expression von hOCT1, hOCT2 und hOCT3 in Caco-2-Zellen, Präabsorption von hOCT2 und hOCT3 als Negativkontrollen, Vergrößerungen: hOCT1 1×600 , hOCT2 1×375 , hOCT3 1×600 .

5 Diskussion

5.1 Transport der Arzneistoffe und Modellsubstrate am Dünndarmepithel

In der vorliegenden Arbeit wurden die Transportmechanismen verschiedener in der Praxis oral applizierter Arzneistoffe durch die epitheliale Barriere des Intestinums untersucht. Als etabliertes in-vitro-Modell dieses Gewebes kam die Kolonkarzinomzell-Linie Caco-2 zur Anwendung. Mehrere Studien belegen eine Korrelation zwischen der Bioverfügbarkeit von Arzneistoffen nach oraler Gabe und deren Permeabilitätskoeffizienten an dieser Zell-Linie (Artursson und Karlsson 1991; Bretschneider *et al.* 1999; Yee 1997).

Die untersuchten Arzneistoffe waren hauptsächlich Basen mit pK_A -Werten von 8-10 oder permanente Kationen. Die basischen Arzneistoffe liegen aufgrund des sauren luminalen pH-Wertes im Intestinum ebenfalls zum Großteil als Kationen vor (Tab. 14). Daher wurde explizit die Beteiligung der humanen organischen Kationentransporter hOCT1, hOCT2 und hOCT3 am Transport dieser Substanzen unter Verwendung transfizierter Zell-Linien untersucht.

Tab. 14: Protonierungsgrad saurer und basischer Gruppen ausgewählter Arzneistoffe in Abhängigkeit des pH-Wertes basierend auf pK_A - und pK_B -Werten der Substanzen

| Arzneistoff (saure/basische Gruppe) | | pH 6,5 | pH 7,5 | pH 8,5 |
|-------------------------------------|------------------------|--------|---------|----------|
| Atropin | tert. N-Atom | 99,9% | 99,5% | 95,2% |
| Atenolol | sek. N-Atom | 99,9% | 99,2% | 92,6% |
| Chinin | aromat. N-Atom | 0,4% | 0,04% | 0,04% |
| | tert. N-Atom | 99,0% | 90,9% | 50,0% |
| Clonidin | Guanidin-N-Atome | 97,3% | 78,0% | 26,2% |
| Diphenhydramin | tert. N-Atom | 99,7% | 96,9% | 76,0% |
| Etilefrin | phenol. OH-Gruppe | 99,7% | 97,0% | 76,0% |
| | sek. N-Atom | 99,9% | 99,8% | 98,0% |
| Procainamid | tert. N-Atom | 99,8% | 98,3% | 85,2% |
| Ranitidin | Nitroethendiamingruppe | 0,006% | 0,0006% | 0,00006% |
| | tert. N-Atom | 98,0% | 83,4% | 33,4% |

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig mittels fluoreszenzgekoppelter Antikörper nachgewiesen werden, dass die Transportproteine hOCT2 und hOCT3 in Caco-2-Zellen exprimiert sind. hOCT3 zeigt in Kollokalisationsstudien mit dem apikalen Marker Villin eine Anreicherung in Richtung der apikalen Membran. Das Transportprotein hOCT2 tritt nicht mit Villin zusammen auf und könnte daher basolateral lokalisiert sein. Dagegen ist hOCT1 nur schwach exprimiert. Blasby und Mitarbeiter (2000) wiesen mithilfe von RT-PCR die mRNA

von hOCT1 und hOCT2 in Caco-2-Zellen nach, nicht aber die Transportproteine selbst. hOCT3 wurde bis jetzt nur mittels RT-PCR in Caco-2 nachgewiesen; hier finden sich einander widersprechende Ergebnisse. Martel und Mitarbeiter (2001) wiesen mRNA von hEMT in Caco-2-Zellen nach, Wu und Mitarbeiter (2000) dagegen fanden kein detektierbares Signal der mRNA von hOCT3.

Das Neurotoxin MPP^+ gilt als Referenzsubstrat für alle drei hOCT-Transportproteine. Radioaktiv markiertes MPP^+ wurde als Testsubstrat eingesetzt, um die Interaktion der Arzneistoffe mit dem Aufnahmesystem für dieses Modellkation an der apikalen Membran von Caco-2-Zellen untersuchen zu können. $[^3H]MPP^+$ wurde leicht pH-abhängig in Caco-2-Zellen aufgenommen. Das kationische Modellsubstrat TEA reduzierte die $[^3H]MPP^+$ -Aufnahme moderat. Für das permanente Kation Cholin existiert ein spezifisches Aufnahmesystem im Intestinum (Kessler *et al.* 1978; Tsubaki und Komai 1987). Da aber Cholin in einer Konzentration von 1 mM die MPP^+ -Aufnahme nicht hemmte, kann es sich bei dem apikalen MPP^+ -Transportsystem nicht um das von Crowe und Mitarbeitern (2002) an Caco-2-Zellen charakterisierte Cholintransportsystem handeln.

Die Halbhemmkonzentrationen der Arzneistoffe lagen in einem Konzentrationsbereich von 6 μM bis 4 mM. Die leichte Stimulation der MPP^+ -Aufnahme durch einen auswärtsgerichteten pH-Gradienten wurde von Martel und Mitarbeitern (2001) bestätigt. Auch aufgrund der Na^+ -Unabhängigkeit und der Membranpotenzialabhängigkeit des Aufnahmeprozesses schlossen die Autoren auf eine hOCT-vermittelte apikale MPP^+ -Aufnahme. Eine weitere Studie über das MPP^+ -Aufnahmesystem in Caco-2-Zellen diskutiert neben einer apikalen hOCT-vermittelten MPP^+ -Aufnahme die apikale Sekretion von MPP^+ durch P-Glykoprotein nach passiver basolateraler Aufnahme (Bleasby *et al.* 2000). Vergleichbar den vorliegenden Ergebnissen wurde von diesen Autoren eine moderate Hemmung der apikalen MPP^+ -Aufnahme durch 2 mM TEA beobachtet. Ebenso hatten 5 mM Cholin keinen Einfluss auf das MPP^+ -Aufnahmesystem. Der in der vorliegenden Arbeit gemessene IC_{50} -Wert von 80 μM für den α_2 -Agonisten Clonidin stimmte mit dem von Martel und Mitarbeitern (2001) ebenfalls an Caco-2-Zellen ermittelten Parameter von 57 μM überein.

An Caco-2-Zellen, die in Transwellkammern[®] kultiviert wurden, reduzierten die apikal zugesetzten Arzneistoffe neben der $[^3H]MPP^+$ -Aufnahme auch den Flux des hOCT-Substrates. Der Anteil des durch Caco-2-Zellen von apikal nach basolateral transportierten $[^3H]MPP^+$ /(h-Filter) ohne Arzneistoffzusatz betrug 9%. In moderater Korrelation zu diesem Ergebnis fanden Bleasby und Mitarbeiter (2000) 2 $nmol/(h \cdot cm^2)$ bei einer MPP^+ -Konzentration von 25 μM 16% des apikal zugesetzten MPP^+ . Das hier charakterisierte apikale Transportsystem für MPP^+ an Caco-2-Zellen ist aller Wahrscheinlichkeit nach mit dem bisher in der Literatur beschriebenen identisch. Vermutlich ist die apikale MPP^+ -Aufnahme hOCT3-

vermittelt, da für dieses Transportprotein eine Anreicherung in Richtung der apikalen Membran von Caco-2-Zellen gezeigt werden konnte.

Der Transport der mit dem MPP^+ -Aufnahmesystem interagierenden Arzneistoffe Butylscopolaminium, Chinin, Diphenhydramin, Etilefrin und Ranitidin wurde direkt untersucht. Zusätzlich wurde der bei physiologischem pH-Wert als Kation vorliegende β -Blocker Atenolol in die Untersuchungen einbezogen. Die gemessenen Flux- und Aufnahmearten der kationischen Arzneistoffe wurden zwecks Vergleichbarkeit in Prozent ausgedrückt, da die Arzneistoffe gemäß ihrer jeweiligen Verträglichkeit in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt wurden.

Diphenhydramin

Das H_1 -Antihistaminikum Diphenhydramin wies von allen Arzneistoffen die höchsten Fluxraten pro Stunde sowohl in die apikale als auch in die basolaterale Richtung auf. Die aus den Fluxuntersuchungen resultierenden Aufnahmearten nach 2 Stunden waren vergleichsweise gering. Die apikale Aufnahme der vergleichsweise lipophilen Substanz ($\log P_{O/W}$ 3,27) war entsprechend den Untersuchungen von Mizuuchi und Mitarbeitern (1999) mit zunehmender Substratkonzentration sättigbar und wurde durch einen auswärts gerichteten Protonengradienten stimuliert. Im Gegensatz zu den vorliegenden Ergebnissen charakterisierten Mizuuchi und Mitarbeiter (2000b) in einer weiteren Studie an Caco-2-Zellen den Transport von Diphenhydramin bei pH 7,4 als sekretorisch mit $J_{b-a} > J_{a-b}$. Die Fluxraten der vorliegenden Arbeit von Diphenhydramin bei pH 8,5 lagen in $\text{nmol}/(\text{h}\cdot\text{cm}^2)$ ausgedrückt ungefähr um den Faktor 2 über denen von Mizuuchi und Mitarbeitern (2000b). Der abnehmende Protonierungsgrad und die zunehmende Lipophilie der Base Diphenhydramin mit steigendem pH-Wert könnten die Ursachen für die größeren Fluxraten bei pH 8,5 durch Caco-2-Zellen sein (Tab. 14). Möglicherweise maskiert der bei pH 8,5 erhöhte Anteil an unprotoniertem Diphenhydramin basolateral lokalisierte spezifische Transportprozesse durch einen erhöhten Diffusionsanteil. So lag der von Mizuuchi und Mitarbeitern (1999) ermittelte diffusible Anteil an der apikalen Diphenhydramingesamtaufnahme in Caco-2-Zellen bei pH 7,4 deutlich unter dem entsprechenden Parameter in der vorliegenden Arbeit bei pH 8,5. Andererseits nahm die Affinität von Diphenhydramin zu dem apikalen Aufnahmesystem mit Erhöhung des pH-Wertes zu: Die bei pH 8,5 bestimmte Michaelis-Menten-Konstante lag mit 0,3 mM unter der von Mizuuchi und Mitarbeitern (1999) bei pH 7,4 gemessenen (0,9 mM). Der an Caco-2-Zellen ermittelte IC_{50} -Wert von Diphenhydramin gegen MPP^+ lag mit 0,15 mM im Konzentrationsbereich des K_T -Wertes. Laut Mizuuchi und Mitarbeitern (1999) sind aber organische Kationentransporter als Aufnahmesystem auszuschließen, da TEA keinerlei Einfluss auf die apikale Diphenhydraminaufnahme in Caco-2-Zellen hatte. In der vorliegenden Arbeit wurde die apikale MPP^+ -Aufnahme in Caco-2-Zellen durch TEA reduziert. Daher ist die Diphenhydraminauf-

nahme über das MPP⁺-Transportsystem wenig wahrscheinlich. Eine basolaterale Diphenhydraminaufnahme unter Beteiligung von hOCT2 kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Ranitidin

Nur ein geringer Prozentsatz des im Donatorkompartiment zugesetzten H₂-Antihistaminikums Ranitidin gelangte durch auf Filtern kultivierte Caco-2-Zellen in den Akzeptor. Ein Anstieg sowohl der Flux- als auch der Aufnahmeraten mit steigendem pH-Wert konnte beobachtet werden. Entsprechend den Studien von Gan und Mitarbeitern (1993) und Mummaneni und Dressman (1994) nahmen in Petrischalen inkubierte Caco-2-Zellen Ranitidin bei pH 8,5 linear mit steigender Substratmenge im Konzentrationsbereich von 1-50 mM auf. Durch die Interaktion von Ranitidin mit anionischen Strukturen der tight junctions während des parazellulären Transportes von apikal nach basolateral (Lee und Thakker 1999; Bourdet *et al.* 2004) wird vermutlich der transepitheliale elektrische Widerstand (TEER) von Caco-2-Monolayern erhöht und die Mannitolpermeabilität erniedrigt (Gan *et al.* 1998). In Übereinstimmung mit Collett und Mitarbeitern (1999) und Lee und Mitarbeitern (2002) lag die gemessene Fluxrate J_{b-a} für Ranitidin an Caco-2-Zellen von 1%/(h·Filter) bei pH 7,5 um den Faktor 4 über der Fluxrate J_{a-b} . Lee und Mitarbeiter (2002) schlossen eine hOCT-vermittelte basolaterale Ranitidinaufnahme aus, da weder TEA noch MPP⁺ die Aufnahmerate beeinflussten. Ranitidin verfügt über ein basisches Stickstoffatom, das bei einem pH-Wert von 7,5 zu 83% und bei einem pH-Wert von 8,5 noch zu 33% protoniert vorliegt. Die Nitroethendiamingruppe ist weder bei pH 7,5 noch bei pH 8,5 in relevantem Umfang protoniert (Tab. 14), (Dumanovic *et al.* 1997). Daher lässt sich der Anstieg von Flux- (J_{a-b} , J_{b-a}) als auch Aufnahmeraten (J_{a-c} , J_{b-c}) um den Faktor 2-4 bei Anheben des pH-Wertes möglicherweise mit dem abnehmenden Protonierungsgrad und der damit zunehmenden Lipophilie der Substanz in Verbindung bringen. Da ein Anstieg des pH-Wertes auch die scheinbare Mannitolpermeabilität der Caco-2-Monolayer um den Faktor 3-4 erhöht, lässt sich die pH-Abhängigkeit der Fluxraten vermutlich durch Änderungen der Membraneigenschaften und des Protonierungsgrades des Moleküls erklären. Der pH-abhängige Anstieg der Aufnahmeraten (J_{a-c} , J_{b-c}) trotz zweimaligen Spülens mit eiskaltem Puffer nach Versuchsende spricht gegen eine pH-bedingte Schädigung der Zellen. Aufgrund der Literaturbefunde ist die hOCT-vermittelte Ranitidinaufnahme in Caco-2-Zellen sowohl über die apikale als auch über die basolaterale Membran unwahrscheinlich. Daher ist Ranitidin mit einem IC₅₀-Wert von 271 µM ein Inhibitor und vermutlich kein Substrat des apikalen MPP⁺-Transportsystems. Die im Vergleich zu Diphenhydramin niedrigen Fluxraten von Ranitidin durch Caco-2-Zellen kommen vermutlich auch durch seine relativ hydrophilen Moleküleigenschaften (log P_{O/W} 0,27) zustande.

Atenolol

Die Fluxraten des β -Blockers Atenolol durch Caco-2-Zellen J_{a-b} und J_{b-a} unterschieden sich nicht voneinander, jedoch war die prozentuale Aufnahme J_{b-c} größer als J_{a-c} . Der Transport dieser wenig permeablen, hydrophilen Substanz ($\log P_{O/W}$ 0,16) an Caco-2-Zellen wird in der Literatur bisher als passiv und nicht sättigbar beschrieben (Adson *et al.* 1995; Artursson und Magnusson 1990; Schipper *et al.* 1999). Jedoch lag Atenolol auch bei pH 8,5 zu 92% protoniert vor (Tab. 14) und ist möglicherweise ein hOCT-Substrat. Laut Neuhoff und Mitarbeitern (2003) sind die Permeabilitätskoeffizienten von Atenolol an Caco-2-Zellen bei pH 7,4 ebenso wie die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Fluxraten in beide Fluxrichtungen gleich groß. In einer Untersuchung zu Transportmechanismen des β -Blockers Celiprolol an Caco-2-Zellen hemmte Atenolol ebenso wie die hOCT-Substrate Cimetidin, Cholin und NMN bei apikalem Zusatz signifikant die Sekretion J_{b-a} des Arzneistoffes (Karlsson *et al.* 1993). Diese Resultate deuten auf Interaktion mit hOCT-vermitteltem Transport hin. Aufgrund der Anreicherung von hOCT3 in Richtung der apikalen Membran von Caco-2-Zellen wäre eine Interaktion mit diesem Transportprotein denkbar. Die mit Ranitidin vergleichbar niedrigen Flux- und Aufnahmeleistungen korrelieren mit der Hydrophilie des β -Blockers.

Etilefrin

Über das oral verabreichte Antihypotensivum Etilefrin liegen bisher wenige Untersuchungen zur intestinalen Absorption vor. Hengstmann und Mitarbeiter (1975) beschrieben eine komplette Aufnahme nach oraler Gabe, gefolgt von einem starken first-pass-Effekt: Etilefrin wird im intestinalen Epithelium durch Konjugierung zu Sulfaten und Glucuroniden metabolisiert (Hengstmann *et al.* 1982). Dagegen wurden in der vorliegenden Arbeit keine Anzeichen der Metabolisierung von Etilefrin durch zelluläre Enzyme gefunden. Vergleichbar den Fluxraten von Ranitidin nahmen die Flux- und Aufnahmeleistungen von Etilefrin mit steigendem pH-Wert zu. Ebenso wie Ranitidin wurde das relativ hydrophile Etilefrin ($\log P_{O/W}$ 0,44) bei pH 7,5 stärker über die basolaterale als über die apikale Membran in Caco-2-Zellen aufgenommen. Die Etilefrinaufnahme in Caco-2-Zellen zeigte jedoch hyperbolischen Verlauf bei steigender Substratkonzentration. Etilefrin könnte daher apikal unter Beteiligung des MPP^+ -Aufnahmesystems und damit hOCT3-vermittelt in Caco-2-Zellen aufgenommen werden. Mit 16 mM lag die ermittelte Michaelis-Menten-Konstante aber weit über dem IC_{50} -Wert von Etilefrin gegen MPP^+ (3956 μM) an dieser Zell-Linie. Wahrscheinlich existieren deshalb in Caco-2-Zellen noch weitere apikal lokalisierte Transportproteine mit niedriger Affinität zu Etilefrin. Eine Beteiligung der hOCTs an der basolateralen Aufnahme von Etilefrin in Caco-2-Zellen wäre möglich: Zum einen reduzierte ein Überschuss des hOCT-Substrates TEA die basolaterale Aufnahme des Antihypotensivums signifikant gegenüber der

Kontrolle, zum anderen ist hOCT2 in Caco-2-Zellen möglicherweise basolateral exprimiert. Die Fluxraten stiegen mit Erhöhung des pH-Wertes von pH 6,5 über pH 7,5 nach pH 8,5 stark an. Etilefrin verfügt neben dem basischen Stickstoffatom auch über eine leicht saure phenolische Gruppe, dadurch liegt Etilefrin bei pH 8,5 sowohl protoniert als auch deprotoniert vor (Tab. 14). Aus diesem Grund können die steigenden Flux- und Aufnahmeraten nicht eindeutig mit dem Protonierungsgrad der Substanz in Verbindung gebracht werden. Möglicherweise besteht, wie schon für Ranitidin beschrieben, auch ein Zusammenhang zwischen steigenden Fluxraten und veränderten Membraneigenschaften der Zellmonolayer bei steigendem pH-Wert.

Chinin

Das Antimalariamittel Chinin wies wie Diphenhydramin hohe Flux- und relativ niedrige Aufnahmeraten an Caco-2-Zellen auf, die auf Filtern kultiviert wurden. Mitverantwortlich für die hohen Fluxraten könnte die Lipophilie der Substanz ($\log P_{O/W}$ 3,44) sein, obwohl das tertiäre Stickstoffatom im Chininmolekül bei pH 7,5 zu 90% protoniert vorliegt (Tab. 14). Im Gegensatz zu Diphenhydramin war die Chininaufnahme in Caco-2-Zellen mit steigender Substratkonzentration nicht sättigbar. In Übereinstimmung mit den hier gemessenen hohen Fluxraten an der intestinalen Zell-Linie Caco-2 ist Chinin nach oraler Gabe zu 65% bioverfügbar (Sowunmi *et al.* 1994). Chinin ist ein hochaffiner lipophiler Inhibitor des MPP⁺-Aufnahmesystems ($IC_{50} = 5,9 \mu M$) und interagiert auch mit anderen Transportsystemen für Kationen in Caco-2-Zellen: Sowohl Flux als auch Aufnahme des Kations Guanidin an Caco-2-Zellen werden durch Chinin signifikant reduziert (Cova *et al.* 2002).

Butylscopolaminium

Das Spasmolytikum Butylscopolaminium permeierte in geringem Umfang durch Caco-2-Monolayer und war nach 2-stündiger Inkubation in Caco-2-Zellen nicht nachweisbar. Im Gegensatz zu Ranitidin und Etilefrin hatte die Erhöhung des pH-Wertes keinen großen Einfluss auf die Fluxrate. Butylscopolaminium ist als quartäre Stickstoffverbindung permanent positiv geladen und liegt daher nicht pH-abhängig protoniert oder deprotoniert vor. Die Ladung des Moleküls könnte auch die Ursache für die geringe Aufnahme der Substanz sein, jedoch existieren in intestinalen Geweben spezifische Transportsysteme für quartäre Stickstoffverbindungen: Im Gegensatz zu den vorliegenden Ergebnissen zeigten Pentikainen und Mitarbeiter (1973), dass 20% oral verabreichten Butylscopolaminiums in das Gewebe des Rattenintestinums aufgenommen wird. Für die strukturell nah verwandte Substanz Methylscopolaminium beschrieben Turnheim und Lauterbach (1977) eine aktive Sekretion an der isolierten intestinalen Rattenmucosa. Auch das permanente Kation Paraquat mit quartärem

Stickstoffatom wird sättigbar in intestinale Bürstensaummembranvesikel der Ratte aufgenommen (Nagao *et al.* 1993).

Butylscopolaminium ist ein niedrigaffiner Inhibitor des apikalen MPP⁺-Aufnahmesystems in Caco-2-Zellen. Der Arzneistoff hemmte die MPP⁺-Aufnahme bei einer Konzentration von 1 mM um $75 \pm 0,3\%$. Ein Transport über dieses oder die in der Literatur beschriebenen intestinalen Transportsysteme für quartäre Stickstoffverbindungen ist aber unwahrscheinlich, da die Aufnahme von Butylscopolaminium in Caco-2-Zellen nicht nachweisbar war.

5.2 Transport von Cholin und Clonidin am Plazentaepithel

Bei den hier durchgeführten Transportuntersuchungen an epithelialen Zell-Linien der humanen Plazenta konnte die Beteiligung organischer Kationentransporter am Cholin- und Clonidintransport weitgehend ausgeschlossen werden. Zunächst wurde das prototypische hOCT-Substrat MPP⁺ von allen 3 Zell-Linien im Vergleich zu Caco-2 geringfügig aufgenommen, die Aufnahme war durch einen Überschuss an unmarkiertem MPP⁺ und dem hOCT-Inhibitor Chinin nur schwach hemmbar.

hOCT3 ist stark in nativer humaner Plazenta exprimiert (Wu *et al.* 2000), aufgrund der Resultate von Bzozkie und Mitarbeitern (1995) möglicherweise basolateral. Jedoch ist hOCT3-mRNA in den humanen Plazentazell-Linien JEG-3 und BeWo nicht nachweisbar (pers. Mitteilung Prof. Koepsell). Wu und Mitarbeiter (2000) konnten gleichfalls keine mRNA von hOCT3 in BeWo und auch nicht in JAR detektieren.

Die mRNA des Transportproteins hOCT1 konnte in BeWo und JEG-3 nachgewiesen werden (pers. Mitteilung Prof. Koepsell). Laut Hayer-Zillgen und Mitarbeitern (2002) ist in JAR die mRNA von hOCT1 schwach und von hOCT3 nicht exprimiert. Sollte hOCT1 in den genannten Plazentazell-Linien als funktionelles Transportprotein exprimiert sein, dann vermutlich in der basolateralen Membran. Für Transportuntersuchungen an der basolateralen Seite der Zellen wäre ihre Kultivierung in Form eines dichten Zellrasens auf Polycarbonatfiltern notwendig. Untersuchungen des Mannitolfluxes durch JEG-3-Zellrasen zeigten jedoch einen im Vergleich zu Caco-2-Zellen um den Faktor 5-8 erhöhten Flux, was auf eine für weitere Fluxuntersuchungen ungenügende Dichtigkeit dieser Zell-Linie hindeutete.

Cholintransport

Der Cholintransport wurde neben der Plazenta bereits an verschiedenen Geweben charakterisiert, so an intestinalen und renalen Epithelien (Acara und Rennick 1973; Saito *et al.* 1992), Fibroblasten (Schloss *et al.* (1994), Neuronen (Okuda *et al.* 2000), der Blut-Hirn-Schranke (Friedrich *et al.* 2001) und Keratinozyten (Hoffmann *et al.* 2002). Die Studien wiesen dabei auf zwei unterschiedliche Cholintransportsysteme hin: Ein hochaffines, Na⁺-abhängiges

Transportsystem mit Michaelis-Menten-Konstanten für Cholin $< 10 \mu\text{M}$ (Blusztajn und Wurtman 1983), das vorwiegend, wenn auch nicht ausschließlich in neuronalem Gewebe exprimiert wird. Dieser von Okuda und Mitarbeitern (2000) klonierte Transporter wird als CHT1 bezeichnet. Seine physiologische Funktion liegt in der Cholinaufnahme in Neuronen für die Synthese des Neurotransmitters Acetylcholin. Das zweite Transportsystem wird mit K_t -Werten für Cholin im Bereich $30\text{-}100 \mu\text{M}$ als niedrigaffin beschrieben (Blusztajn und Wurtman 1983). Die Expression im Organismus ist ubiquitär. Bisher wurde der niedrigaffine Cholintransporter nicht kloniert. Der renale Cholintransporter ist bis auf wenige Ausnahmen nicht enantioselektiv (Somogyi *et al.* 1996). Ullrich und Rumrich (1996) beschrieben die Struktur-Affinitätsbeziehung von Inhibitoren des renalen Cholintransportsystems der Ratte hinsichtlich deren Basizität und Hydrophobizität. Der Abstand zwischen Hydroxylgruppe und Stickstoffatom von Cholin-Analoga ist laut den Untersuchungen von Grunewald und Mitarbeitern (1997) an der Kaninchenniere relevant für die Interaktion mit dem Cholintransporter. Eine Übersicht über bisher veröffentlichte Strukturvorschläge wurde von Lockman und Allen (2002) zusammengestellt.

Von Friedrich und Mitarbeitern (2001) wurde nachgewiesen, dass es sich bei dem an der von Ratten stammenden Blut-Hirnschranke-Zell-Linie RBE4 charakterisierten Cholintransportsystem weder um OCT1, OCT2 und OCT3, noch um CHT1 handelt.

Das in der vorliegenden Arbeit zunächst an BeWo-Zellen charakterisierte Cholintransportsystem (siehe auch Müller *et al.* 2005) war geringfügig Na^+ -abhängig, pH-unabhängig und membranpotenzialabhängig. Ähnliche Resultate sind von van der Aa und Mitarbeitern (1994) an Vesikeln der syncytialen Mikrovillimembran aus humaner Plazenta beschrieben. Die an BeWo und JEG-3-Zellen bestimmten Affinitätskonstanten für Cholin von jeweils $108 \mu\text{M}$ und $206 \mu\text{M}$ zeigten Übereinstimmung mit den entsprechenden K_t -Werten von $0,2\text{-}0,56 \text{ mM}$ aus der Literatur, ermittelt an verschiedenen in-vitro-Modellen der humanen Plazenta (Eaton und Sooranna 1998; Grassl 1994; van der Aa *et al.* 1994). Die physiologische Plasmakonzentration von Cholin liegt bei $22 \mu\text{M}$ (Hasegawa *et al.* 1982), die im Verhältnis zum Plasmaspiegel hohen K_t -Werte sollen laut van der Aa und Mitarbeitern (1994) eine effiziente Aufnahme von Cholin aus dem mütterlichen Blut sicherstellen.

Die von van der Aa und Mitarbeitern (1995) bestimmten IC_{50} -Werte für Ranitidin, Cholin und TEA an Membranvesikeln humaner Plazenta lagen über den in der vorliegenden Arbeit ermittelten Hemmkonstanten für Ranitidin, Cholin und TEA an JEG-3-Zellen. Die Diskrepanz lässt sich unter Umständen durch die Verwendung unterschiedlicher Systeme (Vesikel/konfluenter Zellrasen) erklären. Vergleichbar den Resultaten von van der Aa und Mitarbeitern (1995) hemmten Hemicholin-3 die Cholinaufnahme in BeWo-Zellen sehr stark, Atropin stark und das H_2 -Antihistaminikum Cimetidin schwach. Ebenso wie in JEG-3-Zellen hemmte das kationische Modellsubstrat TEA die Cholinaufnahme in BeWo-Zellen nur

schwach. Die in der vorliegenden Arbeit ermittelte inhibitorische Potenz von Procainamid, Lidocain und Imipramin an BeWo-Zellen sowie die von Acetylcholin und Chinin an JEG-3-Zellen stimmte mit den Ergebnissen von Grassl (1994) an Bürstensaummembranvesikeln der humanen Plazenta überein.

Die geringfügige Interaktion von Carnitin mit dem Cholintransportsystem in BeWo-Zellen überrascht nicht, da Carnitin erwiesenermaßen OCTN2-vermittelt in BeWo-Zellen aufgenommen wird (Rytting und Audus 2004). Da Cholin aber schwache Einwärtsströme an hOCTN2-exprimierenden Oozyten auslöst (Wagner *et al.* 2000), ist eine Überschneidung beider Transportsysteme in unphysiologisch hohen Konzentrationsbereichen von Cholin und Carnitin nicht auszuschließen.

Das endogene Kation Guanidin wird natriumunabhängig und teilweise membranpotenzialabhängig in die Plazentazell-Linie JAR aufgenommen (Zevin *et al.* 1997). Die Autoren schließen eine Beteiligung des Cholintransportsystems aufgrund unterschiedlicher Substratspezifität aus. Jedoch reduzierte Guanidin (1 mM) in der vorliegenden Arbeit die Cholinaufnahme in BeWo-Zellen um 60%, und Cholin zeigte in der genannten Studie in derselben Konzentration starke Affinität zum Guanidintransporter. Andererseits beeinflusste Cholin in einer Konzentration von 10 mM die Guanidinaufnahme in Bürstensaummembranvesikel der humanen Plazenta nicht (Ganapathy *et al.* 1988). In der vorliegenden Arbeit betrug der K_i -Wert von Guanidin gegen Cholin an JEG-3-Zellen 4 mM. Eine Überschneidung von Cholintransportsystem und Guanidintransportsystem hinsichtlich der Substratspezifität wäre denkbar. Für das wasserlösliche Vitamin Thiamin ist ein hochspezifisches, aus der humanen Plazenta kloniertes Transportsystem bekannt (Dutta *et al.* 1999), mit dem Cholin (1 mM) nicht interagiert. Dagegen hemmte Thiamin (1 mM) die Cholinaufnahme in BeWo-Zellen um 70%. An Fragmenten der humanen Plazenta hemmte Cholin kompetitiv die Acetylcholinaufnahme (Welsch 1976a). Der an BeWo-Zellen durchgeführte ABC-Test ließ gleichfalls auf die apikale Aufnahme von Acetylcholin und Cholin durch ein gemeinsames Transportsystem schließen. Jedoch können bei Aufnahmeuntersuchungen an Plazentafragmenten im Gegensatz zu in Petrischalen kultivierten Zellen nicht nur apikale, sondern auch basolaterale Transportmechanismen beteiligt sein.

Das Antimalariamittel Chinin zeigt zwar eine leichte Sättigung seiner Aufnahme in die Zell-Linie JEG-3, aber aufgrund der Diskrepanz um den Faktor 10 zwischen der Michaelis-Menten-Konstante von 4,1 mM und der Hemmkonstante gegen Cholin von 0,36 mM ist eine Aufnahme von Chinin über das Cholintransportsystem wenig wahrscheinlich. Die nichtlineare Regression der kinetischen Daten zeigte eine relativ große diffusible Komponente der Chininaufnahme in JEG-3-Zellen, vermutlich bedingt durch die lipophilen Eigenschaften der Substanz.

Diphenhydramin wird carriervermittelt, vermutlich über das Cholintransportsystem in epitheliale Zell-Linien der humanen Plazenta aufgenommen. Die kompetitive Hemmung von Cholin durch Diphenhydramin wurde in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen. Die Aufnahme von Diphenhydramin war sättigbar mit einem K_t -Wert von 0,75 mM, der im Konzentrationsbereich des gegen Cholin ermittelten K_t -Wertes von 0,25 mM lag. Die Stimulation der Diphenhydraminaufnahme in JEG-3-Zellen durch einen auswärtsgerichteten pH-Gradienten kann nicht ausschließlich durch abnehmende Protonierung der Base erklärt werden, da bei pH 6,0 99% und bei pH 7,5 immer noch 97% der Substanz protoniert vorliegen. Wie Cholin wurde Diphenhydramin partiell Na^+ -abhängig in BeWo-Zellen aufgenommen, die Aufnahme war durch Cholin hemmbar. Allerdings hatte Cholin einen wesentlich schwächeren Effekt auf die Diphenhydraminaufnahme als umgekehrt, vermutlich aufgrund eines hohen Anteils von einfacher Diffusion an der Diphenhydramin-Gesamtaufnahme. In Übereinstimmung mit der beobachteten hohen Diffusionsrate beschrieben Yoo und Mitarbeiter (1986) den Transfer von Diphenhydramin durch die Schafplazenta als schnell und passiv bis zum Konzentrationsausgleich, jedoch nicht als sättigbar. Aufgrund der guten Plazentagängigkeit und der pharmakologischen Eigenschaften von Diphenhydramin kann die Dauermedikation während der Schwangerschaft beim Neugeborenen entzugsähnliche Symptome auslösen (Parkin 1974).

Trotz sättigbarer Aufnahme von Etilefrin in JEG-3-Zellen ist eine ausschließlich Cholintransportsystem-vermittelte Aufnahme unwahrscheinlich, da der ermittelte K_t -Wert der Substanz (19 mM) um den Faktor 6 über deren K_t -Wert gegen Cholin (3,3 mM) liegt. Der Plasmaspiegel von Etilefrin nach Verabreichung therapeutischer Dosen (20 mg) liegt zudem weit unter dem Konzentrationsbereich des ermittelten K_t -Wertes. Das auch in der Schwangerschaft eingesetzte Antihypotensivum bewirkt am Meerschweinchenuterus einen Abfall des Blutflusses begleitet von einem Anstieg des Gefäßwiderstandes (Hohmann und Künzel 1989), daher könnte sich eine Langzeittherapie mit Etilefrin während der Schwangerschaft ebenso negativ auf die Entwicklung des Fetus auswirken wie ein zu niedriger Blutdruck der Mutter. Da Etilefrin eine katecholaminähnliche Struktur aufweist, wäre eine Interaktion mit dem von Ramamoorthy und Mitarbeitern (1993) beschriebenen in der Plazenta lokalisierten Norepinephrin-Transportsystem (NET) zusätzlich zum Cholintransportsystem denkbar. Allerdings ist nicht bekannt, ob dieses Transportsystem in JEG-3-Zellen exprimiert wird. In JAR-Zellen konnte NET nicht nachgewiesen werden (Ramamoorthy *et al.* 1993). Dass die Inkubation in Anwesenheit eines Überschusses des Kations TEA keine Auswirkung auf die apikale Etilefrinaufnahme in JEG-3-Zellen hatte, schloss erneut eine hOCT-vermittelte Etilefrinaufnahme aus.

Ein spezifischer, sättigbarer Transfer des H_2 -Antihistaminikums Ranitidin konnte entsprechend den vorliegenden Ergebnissen an JEG-3-Zellen auch an perfundierter Affen- und

Menschenplazenta nicht festgestellt werden (Dicke *et al.* 1988). Eine pharmakologisch relevante Interaktion zwischen Ranitidin und Cholin an der Plazenta ist unwahrscheinlich: Zwar hemmte das höher dosierte Struktur analogon Cimetidin in einer Konzentration von 1 mM die Cholinaufnahme in BeWo-Zellen ähnlich stark wie Ranitidin auf 70%, die mütterlichen Plasmakonzentrationen von Cimetidin betragen nach Applikation der therapeutischen Dosis jedoch nur 15 μ M (Somogyi und Gugler 1983). Zudem belegt eine Studie die risikoarme Ranitidinmedikation während des ersten Trimesters der Schwangerschaft (Ruigomez *et al.* 1999).

Clonidintransport

Das in der vorliegenden Arbeit charakterisierte Clonidintransportsystem der Plazentazell-Linie JEG-3 (siehe auch Müller *et al.* 2004) ist von dem beschriebenen Cholintransport klar abzugrenzen: Die Aufnahme des Antihypertensivums ist von einem auswärts gerichteten Protonengradienten abhängig, möglicherweise aufgrund des stark abnehmendem Protonierungsgrades der Substanz mit steigendem pH-Wert (Tab. 14). Obwohl Clonidin die Cholinaufnahme in JEG-3-Zellen hochaffin hemmte (K_i 0,18 mM), beeinflusste Cholin (1 mM) die Clonidinaufnahme kaum. Eine Anzahl von Arzneistoffen und Modells substraten, die als Inhibitoren der Cholinaufnahme in BeWo- und JEG-3-Zellen charakterisiert wurden, beispielsweise Atropin, Butylscopolaminium, Thiamin und MPP⁺, hatten keine Auswirkung auf die Clonidinaufnahmerate. Nur Clonidin selbst, das Clonidin analogon Guanabenz, Diphenhydramin, Chinin und Chinidin hemmten die Clonidinaufnahme mit K_i -Werten um 1 mM.

Die Michaelis-Menten-Konstante des Clonidintransportes stimmte mit 1,1 mM gut mit dem von Huwyler und Mitarbeitern (1997) an Primärkulturen von Endothelzellen aus Schweinehirnkapillaren bestimmten K_t -Wert für Clonidin von 1,3 mM überein. Dieselben Autoren beobachteten ebenfalls einen Anstieg der Clonidinaufnahme mit Anstieg des pH-Wertes sowie einen Na⁺-unabhängigen Transfer der Substanz. Das in der vorliegenden Arbeit an der apikalen Membran von JEG-3-Zellen beschriebene Transportsystem könnte daher mit dem Clonidintransporter an der Blut-Hirn-Schranke identisch sein.

Die Guanidinaufnahmerate in die humane Plazentazell-Linie JAR wurde durch Clonidin deutlich vermindert (Zevin *et al.* 1997). Möglicherweise ist das Clonidintransportsystem in JEG-3-Zellen identisch mit dem pH-abhängigen Transportsystem für Diphenhydramin und Chlorpheniramin, das von Mizuuchi und Mitarbeitern (1999; 2000a; 2000b) an Caco-2-Zellen funktionell charakterisiert wurde. Physiologische Substrate dieses Systems könnten bisher unbekannte tertiäre Amine sein. Von den untersuchten Inhibitoren der Clonidinaufnahme sind aber nur in den Molekülen von Diphenhydramin, Chinin und Chinidin tertiäre Stickstoffatome vorhanden. Die an Caco-2-Zellen und an der Blut-Hirn-Schranke beschriebenen Transportsys-

teme sind sowohl apikal als auch basolateral lokalisiert. An der Plazenta dagegen ist die genaue Lokalisation des Transportsystems nicht bekannt. An der perfundierten humanen Plazenta wurde der Übertritt von Clonidin aus dem mütterlichen in den fetalen Blutkreislauf beschrieben (Ala-Kokko *et al.* 1997). Die Untersuchung des Clonidintransportes an der Plazenta hat therapeutische Relevanz: Clonidin wird während der Schwangerschaft zur Behandlung von Präeklampsie eingesetzt, eine für Mutter und Kind gefährliche Form des Bluthochdrucks.

5.3 Transport von MPP^+ an nativen humanen epidermalen Keratinozyten

Durch die transdermale Applikation von Arzneistoffen können first-pass-Effekte sowie intestinaler Abbau und Unverträglichkeiten vermieden werden. Der untersuchte Arzneistoff Clonidin wird auch durch transdermale therapeutische Systeme (TTS) verabreicht (Guagnano *et al.* 1997; Lowenthal *et al.* 1986). Wie gezeigt wurde, beeinflusst Clonidin die hOCT-vermittelte MPP^+ -Aufnahme. Daher wurde mithilfe spezifischer hOCT-Inhibitoren versucht, die Expression von hOCTs in nativen humanen Keratinozyten funktionell nachzuweisen und voneinander abzugrenzen. Bezüglich der Expression von hOCTs in der humanen Epidermis existieren bis heute keine Studien, ebensowenig wurde der Transport des Modellsubstrates MPP^+ an diesem epithelialen Gewebe untersucht. Der Thiamintransport an Hautfibroblasten wurde jedoch von Stagg und Mitarbeitern (1999) charakterisiert.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten auf eine vorrangige Expression von hOCT3 in der apikalen Membran der NHEK-Zellen hin. Das Anticholinergikum Atropin hemmte mit einer IC_{50} von 1 μM hochaffin die [3H]MPP⁺-Aufnahme in hOCT1-transfizierte Zellen. In NHEK-Zellen dagegen reduzierten 50 μM der Substanz die [3H]MPP⁺-Aufnahme nicht signifikant gegenüber der Kontrolle. Daher ist eine Beteiligung von hOCT1 an der apikalen [3H]MPP⁺-Aufnahme wenig wahrscheinlich. Da die mRNA von hOCT1 in NHEK-Zellen nachgewiesen wurde (pers. Mitteilung Prof. Koepsell), ist hOCT1 möglicherweise basolateral lokalisiert. Die Hemmung der [3H]MPP⁺-Aufnahme auf 30% des Kontrollwertes durch 1 μM Corticosteron hingegen lässt auf hOCT3-Expression in NHEK-Zellen schließen: Die bisher bekannten IC_{50} bzw. K_i betragen 290 nM (Hayer-Zillgen *et al.* 2002) und 120 nM (Gründemann *et al.* 1998). Weiterhin wurde hOCT3-mRNA in NHEK-Zellen nachgewiesen (pers. Mitteilung Prof. Koepsell). Chinin hemmte die [3H]MPP⁺-Aufnahme an hOCT1-, hOCT2- und hOCT3-transfizierten Zellen vergleichbar stark und verminderte in Kombination mit Atropin und Corticosteron die [3H]MPP⁺-Aufnahme in NHEK-Zellen statistisch signifikant gegenüber der mit Atropin und Corticosteron behandelten Gruppe auf fast 0% gegenüber der Kontrolle. Dieser Effekt ist möglicherweise auf die intrazelluläre Hemmung von hOCT3 durch Chinin nach Diffusion durch die Zellmembran zurückzuführen, wie bereits an rOCT2 exprimierenden Oozyten beschrieben (Arndt *et al.* 2001). In NHEK-Zellen werden

daher vermutlich hOCT3 apikal, hOCT1 basolateral und hOCT2 nicht in relevantem Umfang exprimiert.

5.4 Transport der Arzneistoffe und Modellsstrate durch hOCT1, hOCT2 oder hOCT3

Ein Vergleich von den in Tab. 7 dargestellten IC_{50} -Werten der Arzneistoffe an Caco-2-Zellen mit den in Tab. 13 aufgelisteten IC_{50} -Werten an den hOCT-transfizierten Zellen gegen [3H]MPP⁺ zeigt, dass generell eine Übereinstimmung zwischen den Parametern an Caco-2-Zellen und denen an hOCT3 besteht.

So ist der Wert für Atropin an hOCT3 466 μM und an Caco-2 230 μM , 1 mM Butylscopolaminium hemmt sowohl an Caco-2-Zellen als auch an hOCT3 die [3H]MPP⁺-Aufnahme um ungefähr 20%. Der IC_{50} -Wert von Diphenhydramin an Caco-2-Zellen liegt mit 145 μM eher im Konzentrationsbereich des IC_{50} -Wertes an hOCT3 von 695 μM als in dem von hOCT2 (15 μM). Die an Caco-2-Zellen und hOCT3 bestimmten Parameter für den α_2 -Agonisten Clonidin waren fast identisch. Der von Zhang und Mitarbeitern (1998) an mit hOCT1 transfizierten HeLa-Zellen gegen TEA gemessene K_i -Wert für Clonidin betrug 0,55 μM und lag somit um den Faktor 10 niedriger als der in der vorliegenden Arbeit an hOCT1 ermittelte. An mit hEMT-transfizierten HEK293-Zellen bestimmten Martel und Mitarbeiter (2001) eine Halbhemmkonzentration von 80 μM für Clonidin gegen [3H]MPP⁺, die den in dieser Arbeit ermittelten Wert bestätigte. Andererseits hemmte Clonidin die [3H]MPP⁺-Aufnahme in hOCT3-transfizierte HRPE-Zellen mit einem K_i -Wert von 373 μM (Wu *et al.* 2000). Der an Caco-2 gemessene IC_{50} -Wert für Etilefrin stimmte mit rund 4 mM sowohl mit dem an hOCT3 als auch mit dem an hOCT2 bestimmten Wert überein. Der IC_{50} -Wert für Ranitidin an Caco-2 entsprach dem an hOCT3.

Das Antimalariamittel Chinin und das Antiarrhythmikum Chinidin interagieren mit den organischen Kationentransportern: In Korrelation mit den vorliegenden Ergebnissen betrug die an hOCT1-transfizierten HeLa-Zellen ermittelte Hemmkonstante für Chinin gegen TEA 23 μM (Zhang *et al.* 1998). An hOCT2-exprimierenden Oozyten wurde für Chinin gegen TEA ein K_i -Wert von 3,4 μM bestimmt (Gorboulev *et al.* 1997), der weit unter dem in Tab. 13 für Chinin an hOCT2 dargestellten Parameter liegt. Möglicherweise haben die unterschiedlichen Membraneigenschaften der exprimierenden Systeme Einfluss auf die Messergebnisse. Der an hOCT1-transfizierten HeLa-Zellen ermittelte K_i -Wert für Chinidin von 17,5 μM (Zhang *et al.* 1998) bestätigte den in Tab. 13 dargestellten IC_{50} -Wert von 20 μM . Die an Caco-2 bestimmten Halbhemmkonzentrationen von Chinin (5,9 μM) und Chinidin (38 μM) stimmen als einzige der in Tab. 6 und 7 gezeigten Werte stärker mit den Halbhemmkonzentrationen an hOCT1 und hOCT2 als mit denen an hOCT3 überein. Für die stark lipophile Substanz Chinin wurde nach Diffusion durch die Membran eine intrazelluläre Inhibierung von

rOCT2 vermutet (Arndt *et al.* 2001). Eine zusätzliche intrazelluläre Inhibierung der [³H]MPP⁺-Aufnahme durch Chinin und Chinidin ist auch bei den hier durchgeführten Experimenten möglich; das Ausmaß der Diffusion könnte je nach Zelltyp variieren und so die Resultate schwer vergleichbar machen.

Entsprechend den Resultaten von Wu und Mitarbeitern (2000) hemmte das kationische Modellsubstrat TEA in einer Konzentration von 1 mM die [³H]MPP⁺-Aufnahme in Caco-2-Zellen und CHO-hOCT3-Zellen auf ungefähr 80% des Kontrollwertes. Die an hOCT2-transfizierten Oozyten für TEA und TBA beschriebenen IC₅₀-Werte von 156 µM und 120 µM gegen [³H]MPP⁺ (Dresser *et al.* 2002) korrelieren moderat mit den in Tab. 13 aufgeführten Werten von 404 µM und 383 µM. Von Zhang und Mitarbeitern (1999) wurde eine direkte Beziehung zwischen Zunahme der Hemmstärke und Lipophilie von n-Tetraalkylammoniumverbindungen an hOCT1 beobachtet. Die hier an hOCT2 bestimmten IC₅₀-Werte von TEA und TBA unterschieden sich jedoch kaum voneinander.

Der IC₅₀-Wert für Procainamid an hOCT3 betrug 1,3 mM. Die von Wu und Mitarbeitern (2000) ermittelte entsprechende K_i betrug 738 µM. Der an hOCT2 für Procainamid bestimmte Parameter von 1,14 mM korrelierte nicht mit der an Oozyten gegen [¹⁴C]TEA gemessenen K_i von 50 µM (Gorboulev *et al.* 1997). Auch die Halbhemmkonzentration von MPP⁺ an hOCT2 lag mit 101 µM weit über der von Gorboulev und Mitarbeitern (1997) gegen [¹⁴C]TEA gemessenen K_i (2,4 µM). An hOCT3 zeigte der IC₅₀-Wert von MPP⁺ (69 µM) gute Übereinstimmung mit der K_i von 54 µM, ebenfalls gegen [³H]MPP⁺ bestimmt an hOCT3-transfizierten HRPE-Zellen von Wu und Mitarbeitern (2000). In einer Konzentration von 0,1 mM hemmte MPP⁺ an Caco-2-Zellen die eigene Aufnahme um 55%. Diese Hemmung korrelierte gut mit der an hOCT3 ermittelten IC₅₀ für MPP⁺. Für das permanente Kation Cholin konnte die Übereinstimmung zwischen den an Caco-2 und hOCT3 gemessenen Werten erneut bestätigt werden: In einer Konzentration von 1 mM hemmte Cholin die [³H]MPP⁺-Aufnahme sowohl in Caco-2-Zellen als auch in CHO-hOCT3-Zellen nicht.

In Abb. 46 ist die Korrelation der inhibitorischen Potenz (Hemmung der [³H]MPP⁺-Aufnahme) von Arzneistoffen und Modellsubstraten zwischen Caco-2-Zellen und hOCT-transfizierten Zellen dargestellt. So gut wie keine Korrelation bestand zwischen den Werten an Caco-2-Zellen und hOCT1-transfizierten Zellen mit $r^2 = 0,355$. Die Werte an Caco-2-Zellen und hOCT2-transfizierten Zellen korrelierten ebenfalls kaum miteinander ($r^2 = 0,461$). Wie oben diskutiert, bestand eine hohe Korrelation zwischen der inhibitorischen Potenz an hOCT3-transfizierten Zellen und an Caco-2-Zellen. Die Korrelation zwischen der prozentualen Hemmung der [³H]MPP⁺-Aufnahme an Caco-2-Zellen und an hOCT3-transfizierten Zellen ergab einen Korrelationskoeffizienten von $r^2 = 0,912$. Bei dem apikal lokalisierten MPP⁺-Aufnahmesystem in Caco-2-Zellen handelt es sich daher mit hoher Wahrscheinlichkeit, wie schon aufgrund der subzellulären Lokalisation vermutet, um den humanen OCT3.

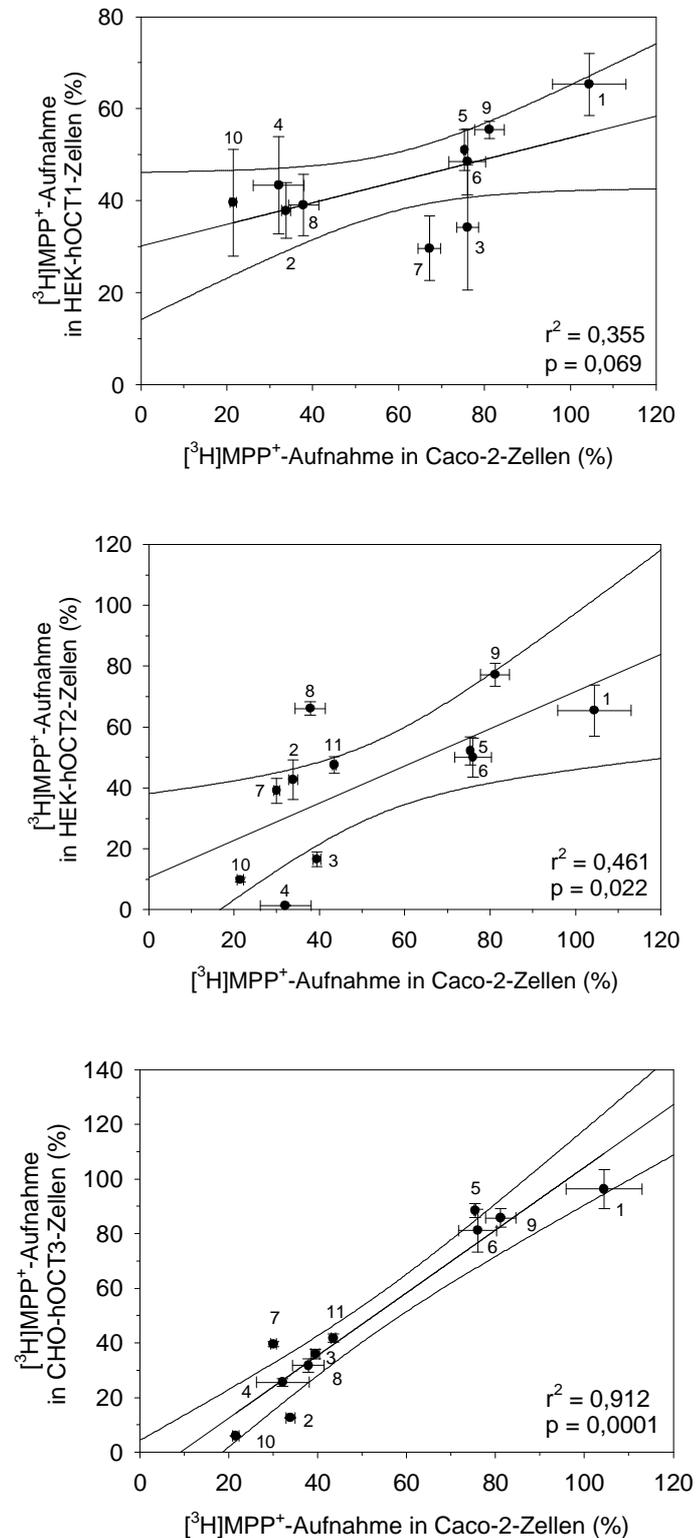


Abb. 46 : Korrelation der inhibitorischen Potenz kationischer Arzneistoffe und Modellsubstrate zwischen Caco-2-Zellen und hOCT-transfizierten Zellen. Es wurden Werte (jeweils gleiche Konzentrationen) aus Konkurrenzexperimenten zugrunde gelegt. Dargestellt sind die linearen Regressionen mit dem 95%-Konfidenzintervall. 1: Cholin, 2: Clonidin, 3: Atropin, 4: Chinidin, 5: Butylscopolaminium, 6: TEA, 7: Diphenhydramin, 8: Ranitidin, 9: Etilerfrin, 10: Chinin, 11: MPP^+ . Angegeben sind die Korrelationskoeffizienten r^2 und die Irrtumswahrscheinlichkeiten p .

Durch Aufnahmeuntersuchungen mit hOCT-transfizierten Zellen im Vergleich mit den entsprechenden kontrolltransfizierten Zellen wurde untersucht, ob es sich bei den untersuchten Substanzen nicht nur um Inhibitoren, sondern auch um Substrate der Kationentransporter handelte. Der in der vorliegenden Arbeit weitgehend Na⁺- und H⁺-unabhängige Transport von [³H]MPP⁺ durch hOCT1, hOCT2 und hOCT3 bestätigte die in der Literatur beschriebene Transportcharakteristik der OCTs (Busch *et al.* 1996b; Gorboulev *et al.* 1997; Kekuda *et al.* 1998). Problematisch sind die teilweise widersprüchlichen Resultate in der Literatur hinsichtlich des Transportes von TEA: Laut Gründemann und Mitarbeitern (1999) transportiert hEMT kein TEA, Wu und Mitarbeiter (2000) zeigten jedoch hOCT3-vermittelten TEA-Transport.

Cholin wird von hOCT1 nicht als Substrat akzeptiert. rOCT1 und mOCT1 transportieren jedoch Cholin (Busch *et al.* 1996b; Green *et al.* 1999; Sinclair *et al.* 2000). Die Eigenschaft von Cholin als hOCT2-Substrat bestätigten die Ergebnisse von Gorboulev und Mitarbeitern (1997) und Sweet und Mitarbeitern (2001). Dagegen wird Cholin sowohl als rOCT2-Substrat als auch als rOCT2-Inhibitor beschrieben (Budiman *et al.* 2000; Gründemann *et al.* 1999). Entsprechend den Resultaten von Gründemann und Mitarbeitern (1999) transportiert hOCT3 kein Cholin. Bei dem in der vorliegenden Arbeit gefundenen hOCT2-vermittelten Acetylcholintransport könnte es sich möglicherweise auch um einen nach Hydrolyse stattfindenden Cholintransport handeln. Gegen eine Hydrolyse von Acetylcholin zu Cholin spricht allerdings, dass in CHO-hOCT3-Zellen über einen Inkubationszeitraum von 10 Sekunden Acetylcholin gegenüber der Kontrolle leicht verstärkt aufgenommen wird und Cholin kein hOCT3-Substrat ist. Außerdem vermuteten Wessler und Mitarbeiter (2001) eine hOCT1- und hOCT3-vermittelte Freisetzung von Acetylcholin aus der humanen Plazenta. Acetylcholin ist laut den vorliegenden Ergebnissen kein hOCT1-Substrat, wird aber von rOCT1 transportiert (Busch *et al.* 1996a). Cholin und Acetylcholin sind daher speziesabhängig Inhibitoren oder Substrate der OCTs.

Clonidin wird weder von hOCT1 und hOCT2, noch von hOCT3 transportiert und ist aufgrund der Hemmung der [³H]MPP⁺-Aufnahme ein hOCT-Inhibitor. Bei Atenolol handelt es sich wahrscheinlich nicht um ein Substrat von hOCT3, da die Aufnahme von [³H]Atenolol in CHO-hOCT3-Zellen durch einen Überschuss an unmarkiertem Atenolol nicht hemmbar war. Die lipophilen Arzneistoffe Diphenhydramin und Chinin (log P_{O/W} 3,27 und 3,44) werden nicht bevorzugt über hOCT3 aufgenommen, weisen aber im Vergleich zu den hydrophileren Arzneistoffen Atropin (log P_{O/W} 1,83), Etilefrin (log P_{O/W} 0,44) und Ranitidin (log P_{O/W} 0,27) wesentlich größere Aufnahmeraten auf, die vermutlich auch durch einfache Diffusion zu erklären sind. Abb. 49 verdeutlicht, dass unabhängig von spezifischen Transportmechanismen in hOCT3-transfizierten Zellen eine hohe Korrelation zwischen der Aufnahmerate der kationischen Arzneistoffe und deren Lipophilie besteht.

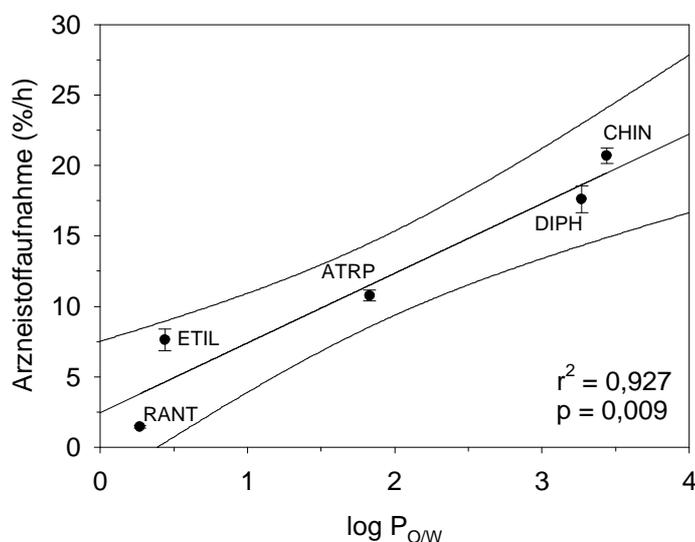


Abb. 49: Korrelation zwischen der prozentualen Aufnahme rate kationischer Arzneistoffe in CHO-hOCT3-Zellen und dem Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizient der Substanzen. Es wurden prozentuale Aufnahme rates bezogen auf die eingesetzte Stoffmenge bei pH 7,5 zugrunde gelegt. Dargestellt ist die lineare Regression mit dem 95%-Konfidenzintervall. ATRP: Atropin, CHIN: Chinin, DIPH: Diphenhydramin, ETIL: Etilefrin, RANT: Ranitidin. Angegeben ist der Korrelationskoeffizient r^2 und die Irrtumswahrscheinlichkeit p .

Die sättigbare Aufnahme von Diphenhydramin in Caco-2-Zellen kann daher, wie vermutet, nicht hOCT3-vermittelt sein. Deshalb wird Diphenhydramin sehr wahrscheinlich über das von Mizuuchi und Mitarbeitern (2000a) beschriebene Transportsystem für tertiäre Amine in Caco-2-Zellen aufgenommen. Somit ist Diphenhydramin wie Chinin als lipophiler hOCT3-Inhibitor zu klassifizieren, beide Substanzen hemmen die [^3H]MPP $^+$ -Aufnahme in hOCT3-transfizierte Zellen. Dagegen wird das Stereoisomer von Chinin, Chinidin, laut Hasannejad und Mitarbeitern (2004) bei pH 7,4 von hOCT3 mit einer K_t von 216 μM als Substrat akzeptiert.

Ranitidin wird bei pH 8,5 geringfügig durch hOCT3 aufgenommen, bei pH 7,5 jedoch nicht. Andererseits steigt die Aufnahme rate von Ranitidin sowohl in CHO-pcDNA 3.1.- als auch in CHO-hOCT3-Zellen bei Erhöhung des pH-Wertes um den Faktor 2, was auf eine erhöhte unspezifische Aufnahme der Substanz hindeutet, möglicherweise auch aufgrund von Membraneffekten und dem Protonierungsgrad der Substanz, wie unter Abschnitt 5.1 diskutiert. Das strukturell und pharmakologisch nah verwandte Cimetidin zeigt in Abhängigkeit von seinem Protonierungsgrad bei pH 7,0 eine größere Affinität zu hOCT2 als bei pH 8,0 (Barendt und Wright 2002).

Butylscopolaminium ist als hydrophiler Inhibitor von hOCT3 einzuordnen, da die Substanz nach Inkubation über 1 Stunde weder in hOCT3- noch in kontrolltransfizierten Zellen nachweisbar war. Das Spasmolytikum Atropin ist neben Etilefrin der einzige Arzneistoff, der in nennenswertem Umfang von hOCT3 transportiert wird. Etilefrin wies die geringste

Affinität zu hOCT3 auf, wurde aber von allen untersuchten Arzneistoffen am stärksten über hOCT3 aufgenommen. Ein Grund könnte in der catecholaminähnlichen Struktur von Etilefrin liegen: Die physiologische Aufgabe von OCT3 im Gehirn besteht vermutlich in der Aufnahme von Monoamintransmittern, die nicht durch neuronale Mechanismen inaktiviert wurden (Gründemann *et al.* 1998; Wu *et al.* 1998a).

Cholin wird nicht von hOCT3 transportiert und beeinflusst in einer Konzentration von 1 mM die [³H]MPP⁺-Aufnahme in CHO-hOCT3-Zellen nicht. Erwartungsgemäß hemmte daher ein Überschuss an Cholin die Aufnahme von Etilefrin in CHO-hOCT3-Zellen, aber auch in CHO-pcDNA 3.1.-Zellen nicht. Bei Etilefrin nahm die Aufnahmerate mit steigendem pH-Wert zu, möglicherweise auch aufgrund von Membraneffekten. Eine Erhöhung des pH-Wertes hat die Maskierung der hOCT3-vermittelten Aufnahme von Etilefrin zur Folge. Die an hOCT3 ermittelte Michaelis-Menten-Konstante für Etilefrin von 2,8 mM stimmt gut mit der entsprechenden Halbhemmkonzentration gegen [³H]MPP⁺ an hOCT3 von 4,5 mM und der an Caco-2-Zellen von 3,9 mM überein. Wie oben diskutiert, müssen aufgrund der Diskrepanz zwischen der Michaelis-Menten-Konstante an Caco-2-Zellen (16 mM) und an hOCT3-transfizierten Zellen weitere Transportsysteme neben hOCT3 an der apikalen Etilefrinaufnahme in Caco-2-Zellen beteiligt sein.

Ob hOCT3 für die orale Bioverfügbarkeit von Etilefrin im menschlichen Organismus verantwortlich ist, muss noch untersucht werden. Dieses Transportprotein ist zwar stark im Rattenintestinum exprimiert (Wu *et al.* 1998a), im humanen Intestinum liegen dagegen noch keine Erkenntnisse über Expression und Lokalisation von hOCT3 vor.

Die empfohlene Tagesdosis für Etilefrin liegt bei 20 mg (Jansen *et al.* 1985). Damit ist der in der vorliegenden Arbeit ermittelte IC₅₀-Wert an Caco-2-Zellen und an hOCT3-transfizierten Zellen von 4 mM um das 40-fache unterschritten, wenn man ein Darmvolumen von 1 Liter voraussetzt: 4 mM Etilefrin entsprächen dann einer Stoffmenge von ungefähr 800 mg. Vermutlich wird Etilefrin im Intestinum noch über andere Transportsysteme aufgenommen.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Transport von kationischen Arzneistoffen an den epithelialen Barrieren von Darm und Plazenta sowie die Interaktion der Substanzen mit humanen organischen Kationentransportern (hOCTs) untersucht. Als in-vitro-Modelle für diese Epithelgewebe kamen die Kolonkarzinomzell-Linie Caco-2 sowie die Chorionkarzinomzell-Linien BeWo, JEG-3 und JAR zur Anwendung. Eine ergänzende Studie wurde an nativen humanen epidermalen Keratinozyten (NHEK-Zellen) durchgeführt. Die Quantifizierung der nichtradioaktiven Arzneistoffe erfolgte durch eine in der vorliegenden Arbeit entwickelte kapillarelektrophoretische Methode.

Dünndarm (Caco-2-Zellen)

- Eine Reihe von Arzneistoffen hemmen die apikale Aufnahme des kationischen Modellsubstrates [^3H]MPP⁺ mit IC₅₀-Werten von 5,9 μM - 3,9 mM sowie den [^3H]MPP⁺-Flux.
- Diphenhydramin und Etilefrin werden apikal sättigbar mit K_t-Werten von 0,3 bzw. 16 mM aufgenommen.
- Die Transportproteine hOCT2 und hOCT3 sind in Caco-2-Zellen exprimiert; hOCT3 in der apikalen Membran.
- Das apikale MPP⁺-Aufnahmesystem ist aufgrund hoher Korrelation der inhibitorischen Potenz von Arzneistoffen und Modellsubstraten zwischen Caco-2-Zellen und hOCT3-transfizierten Zellen aller Wahrscheinlichkeit nach identisch mit dem apikal lokalisierten hOCT3.
- Vermutlich bedingt durch die katecholaminähnliche Struktur wird außer Atropin besonders Etilefrin bei neutralem pH-Wert (7,5) von hOCT3 als Substrat akzeptiert. Die hOCT3-vermittelte Etilefrinaufnahme ist sättigbar (K_t = 2,8 mM).
- In Caco-2-Zellen existieren neben hOCT3 vermutlich noch weitere apikale Aufnahmesysteme für Etilefrin.
- Diphenhydramin ist ein hOCT3-Inhibitor. Die sowohl bei neutralem als auch bei leicht alkalischem pH-Wert sättigbare Aufnahme erfolgt wahrscheinlich durch das an Caco-2-Zellen beschriebene Transportsystem für tertiäre Amine. Ein auswärts gerichteter pH-Gradient stimuliert die Aufnahme.

Plazenta (BeWo-, JAR- und JEG-3-Zellen)**Cholin**

- In BeWo- und JEG-3-Zellen wird Cholin sättigbar mit K_t -Werten von 108 bzw. 206 μM aufgenommen.
- Die Beteiligung von hOCTs an der apikalen Cholinaufnahme ist auszuschließen.
- Ein Großteil der Arzneistoffe interagiert mit dem apikalen [^3H]Cholinaufnahmesystem in BeWo- und JEG-3-Zellen mit K_i -Werten von 0,06-4 mM; die Cholinaufnahme wird durch Diphenhydramin kompetitiv gehemmt.
- Die apikale Aufnahme von Diphenhydramin und Etilefrin in JEG-3-Zellen ist sättigbar ($K_t = 0,75 \text{ mM}$ bzw. 19 mM).
- Die Diphenhydraminaufnahme in BeWo-Zellen ist durch Cholin hemmbar und wie die Cholinaufnahme partiell Na^+ -abhängig. Der K_t -Wert von Diphenhydramin an JEG-3-Zellen korreliert mit dem K_i -Wert gegen die [^3H]Cholinaufnahme. Diphenhydramin wird daher vermutlich über das Cholintransportsystem in BeWo- und JEG-3-Zellen aufgenommen.
- Für Etilefrin existieren wahrscheinlich noch weitere apikale Transportsysteme in JEG-3-Zellen.

Clonidin

- Clonidin wird sättigbar und stark pH-abhängig, aber Na^+ -unabhängig in JEG-3-Zellen aufgenommen ($K_t = 1,1 \text{ mM}$).
- An der apikalen Clonidinaufnahme in JEG-3-Zellen sind wahrscheinlich weder hOCTs noch das Cholintransportsystem beteiligt, da weder MPP^+ noch Cholin die Clonidinaufnahme beeinflussen.
- Chinin, Chinidin, Clonidin, Diphenhydramin und Guanabenz interagieren mit dem Clonidintransportsystem (K_i -Werte um 1 mM).
- Die vergleichbaren K_t -Werte und Transportcharakteristika von Clonidin an JEG-3- und RBE4-Zellen könnten ein Hinweis auf identische Transportsysteme an der Plazenta- und an der Blut-Hirn-Schranke sein.

Haut (NHEK-Zellen)

- Die mRNA von hOCT1 und hOCT3 ist in NHEK-Zellen exprimiert.
- Die apikale [^3H]MPP $^+$ -Aufnahme wird durch den spezifischen hOCT3-Inhibitor Corticosteron und den hOCT-Inhibitor Chinin stark reduziert, durch den spezifischen hOCT1-Inhibitor Atropin jedoch nicht.

- Die Ergebnisse lassen auf apikale Expression von hOCT3 schließen. hOCT1 ist möglicherweise basolateral exprimiert.

Ausblick

- Zukünftige Untersuchungen sollten die Expression und Lokalisation von hOCT3 im humanen Intestinum klären.
- Die kationischen Arzneistoffe sollten auf ihre Eigenschaft als Substrate oder Inhibitoren von hOCT1 und hOCT2 überprüft werden.
- Durch die Aufklärung der Kristallstruktur der hOCTs könnten weiterreichende Erkenntnisse hinsichtlich der Bindungsdomäne(n) gewonnen werden, die dann die zielgerichtete Entwicklung von hOCT-Substraten bzw. -Inhibitoren ermöglichen.
- Es erscheint sinnvoll, die in der Bevölkerung verbreiteten genetischen Polymorphismen der hOCTs als mögliche Ursache von Arzneimittelneben- und -wechselwirkungen noch intensiver als bisher aufzuklären.
- Der Na⁺-unabhängige Cholintransporter könnte aus der Plazentazell-Linie BeWo kloniert werden. Diese Zell-Linie weist hohe Cholin- und niedrige MPP⁺-Aufnahmeraten auf.

Literaturverzeichnis

- ACARA, M. und RENNICK, B. (1973) Regulation of plasma choline by the renal tubule: bidirectional transport of choline. *Am. J. Physiol.* **225**, 1123-1128.
- ADSON, A.; BURTON, P. S.; RAUB, T. J.; BARSUHN, C. L.; AUDUS, K. L. und HO, N. F. (1995) Passive diffusion of weak organic electrolytes across Caco-2 cell monolayers: uncoupling the contributions of hydrodynamic, transcellular, and paracellular barriers. *J. Pharm. Sci.* **84**, 1197-1204.
- ALA-KOKKO, T. I.; PIENIMAKI, P.; LAMPELA, E.; HOLLMEN, A. I.; PELKONEN, O. und VAHAKANGAS, K. (1997) Transfer of clonidine and dexmedetomidine across the isolated perfused human placenta. *Acta Anaesthesiol. Scand.* **41**, 313-319.
- ARNDT, P.; VOLK, C.; GORBOULEV, V.; BUDIMAN, T.; POPP, C.; ULZHEIMER-TEUBER, I.; AKHOUNDOVA, A.; KOPPATZ, S.; BAMBERG, E.; NAGEL, G. und KOEPESELL, H. (2001) 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.
- ARTURSSON, P. und MAGNUSSON, C. (1990) Epithelial transport of drugs in cell culture. II: Effect of extracellular calcium concentration on the paracellular transport of drugs of different lipophilicities across monolayers of intestinal epithelial (Caco-2) cells. *J. Pharm. Sci.* **79**, 595-600.
- ARTURSSON, P. und KARLSSON, J. (1991) Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **175**, 880-885.
- ARTURSSON, P.; UNGELL, A. L. und LOFROTH, J. E. (1993) Selective paracellular permeability in two models of intestinal absorption: cultured monolayers of human intestinal epithelial cells and rat intestinal segments. *Pharm. Res.* **10**, 1123-1129.
- AUGUSTIJNS, P. F.; BRADSHAW, T. P.; GAN, L. S.; HENDREN, R. W. und THAKKER, D. R. (1993) Evidence for a polarized efflux system in CaCo-2 cells capable of modulating cyclosporin A transport. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **197**, 360-365.
- BARENDT, W. M. und WRIGHT, S. H. (2002) The human organic cation transporter (hOCT2) recognizes the degree of substrate ionization. *J. Biol. Chem.* **277**, 22491-22496.
- BLEASBY, K.; CHAUHAN, S. und BROWN, C. D. (2000) Characterization of MPP⁺ secretion across human intestinal Caco-2 cell monolayers: role of P-glycoprotein and a novel Na⁺-dependent organic cation transport mechanism. *Br. J. Pharmacol.* **129**, 619-625.
- BLUSZTAJN, J. K. und WURTMAN, R. J. (1983) Choline and cholinergic neurons. *Science* **221**, 614-620.

- BOTTALICO, B.; LARSSON, I.; BRODSZKI, J.; HERNANDEZ-ANDRADE, E.; CASSLEN, B.; MARSAL, K. und HANSSON, S. R. (2004) 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.
- BOURDET, D. L.; LEE, K. und THAKKER, D. R. (2004) Photoaffinity labeling of the anionic sites in Caco-2 cells mediating saturable transport of hydrophilic cations ranitidine and famotidine. *J. Med. Chem.* **47**, 2935-2938.
- BRETSCHNEIDER, B.; BRANDSCH, M. und NEUBERT, R. H. (1999) Intestinal transport of β -lactam antibiotics: analysis of the affinity at the H⁺/peptide symporter (PEPT1), the uptake into Caco-2 cell monolayers and the transepithelial flux. *Pharm. Res.* **16**, 55-61.
- BUDIMAN, T.; BAMBERG, E.; KOEPESELL, H. und NAGEL, G. (2000) Mechanism of electrogenic cation transport by the cloned organic cation transporter 2 from rat. *J. Biol. Chem.* **275**, 29413-29420.
- BURCKHARDT, G. und PIETRZYK, C. (1980) The influence of an uncoupler on amino acid accumulation in Ehrlich mouse ascites tumor cells. *Biochim. Biophys. Acta* **601**, 403-414.
- BURGER, A. und WACHTER, H. Hunnius` Pharmazeutisches Wörterbuch, 7. Auflage, Walter de Gruyter Verlag, Berlin, New York (1993)
- BUSCH, A. E.; QUESTER, S.; ULZHEIMER, J. C.; GORBOULEV, V.; AKHOUNDOVA, A.; WALDEGGER, S.; LANG, F. und KOEPESELL, H. (1996a) Monoamine neurotransmitter transport mediated by the polyspecific cation transporter rOCT1. *FEBS Lett.* **395**, 153-156.
- BUSCH, A. E.; QUESTER, S.; ULZHEIMER, J. C.; WALDEGGER, S.; GORBOULEV, V.; ARNDT, P.; LANG, F. und KOEPESELL, H. (1996b) Electrogenic properties and substrate specificity of the polyspecific rat cation transporter rOCT1. *J. Biol. Chem.* **271**, 32599-32604.
- BUSCH, A. E.; KARBACH, U.; MISKA, D.; GORBOULEV, V.; AKHOUNDOVA, A.; VOLK, C.; ARNDT, P.; ULZHEIMER, J. C.; SONNERS, M. S.; BAUMANN, C.; WALDEGGER, S.; LANG, F. und KOEPESELL, H. (1998) Human neurons express the polyspecific cation transporter hOCT2, which translocates monoamine neurotransmitters, amantadine, and memantine. *Mol. Pharmacol.* **54**, 342-352.
- BZOSKIE, L. L.; KASHIWAI, K.; TSENG, Y.; HAY, W. und PADBURY, J. (1995) Placental norepinephrine clearance. in vivo measurement and physiological role. *Am. J. Physiol.* **269**, E145-E149.
- CHENG, Y. und PRUSOFF, W. H. (1973) Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* **22**, 3099-3108.
- COLLETT, A.; HIGGS, N. B.; SIMS, E.; ROWLAND, M. und WARHURST, G. (1999) Modulation of the permeability of H₂-receptor antagonists cimetidine and ranitidine by P-glycoprotein in rat intestine and the human colonic cell line Caco-2. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **288**, 171-178.

- COVA, E.; LAFORENZA, U.; GASTALDI, G.; SAMBUY, Y.; TRITTO, S.; FAELLI, A. und VENTURA, U. (2002) Guanidine transport across the apical and basolateral membranes of human intestinal Caco-2 cells is mediated by two different mechanisms. *J. Nutr.* **132**, 1995-2003.
- CROWE, A. P.; LOCKMAN, P. R.; ABBRUSCATO, T. J. und ALLEN, D. D. (2002) Novel choline transport characteristics in Caco-2 cells. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **28**, 773-781.
- DIBBERN, H.-W. (Ed.) UV- und IR-Spektren wichtiger pharmazeutischer Wirkstoffe, Editio Cantor, Aulendorf (1978 incl. Folgelieferungen)
- DICKE, J. M.; JOHNSON, R. F.; HENDERSON, G. I.; KUEHL, T. J. und SCHENKER, S. (1988) A comparative evaluation of the transport of H₂-receptor antagonists by the human and baboon placenta. *Am. J. Med. Sci.* **295**, 198-206.
- DRESSER, M. J.; XIAO, G.; LEABMAN, M. K.; GRAY, A. T. und GIACOMINI, K. M. (2002) Interactions of n-tetraalkylammonium compounds and biguanides with a human renal organic cation transporter (hOCT2). *Pharm. Res.* **19**, 1244-1247.
- DUMANOVIC, D.; JURANIC, I.; DZELETOVIC, D.; VASIC, V. M. und JOVANOVIC, J. (1997) Protolytic constants of nizatidine, ranitidine, and N,N'-dimethyl-2-nitro-1,1-ethendiamine; spectrophotometric and theoretical investigation. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **15**, 1667-1678.
- DUTTA, B.; HUANG, W.; MOLERO, M.; KEKUDA, R.; LEIBACH, F. H.; DEVOE, L. D.; GANAPATHY, V. und PRASAD, P. D. (1999) Cloning of the human thiamine transporter, a member of the folate transporter family. *J. Biol. Chem.* **274**, 31925-31929.
- EATON, B. M. und SOORANNA, S. R. (1998) Regulation of the choline transport system in superfused microcarrier cultures of BeWo cells. *Placenta* **19**, 663-669.
- EDWARDS, N.; BLYTON, C. M.; KESBY, G. J.; WILCOX, I. und SULLIVAN, C. E. (2000) Pre-eclampsia is associated with marked alterations in sleep architecture. *Sleep* **23**, 619-625.
- EISENHOFER, G. (2001) The role of neuronal and extraneuronal plasma membrane transporters in the inactivation of peripheral catecholamines. *Pharmacol. Ther.* **91**, 35-62.
- ELIMRANI, I.; LAHJOUJI, K.; SEIDMAN, E.; ROY, M. J.; MITCHELL, G. A. und QURESHI, I. (2003) Expression and localization of organic cation/carnitine transporter OCTN2 in Caco-2 cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **284**, G863-G871.
- FOGH, J.; FOGH, J. M. und ORFEO, T. (1977) One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J. Natl. Cancer Inst.* **59**, 221-226.
- FRIEDMAN, D. I. und AMIDON, G. L. (1989) Passive and carrier-mediated intestinal absorption components of two angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor prodrugs in rats: enalapril and fosinopril. *Pharm. Res.* **6**, 1043-1047.
- FRIEDRICH, A.; GEORGE, R. L.; BRIDGES, C. C.; PRASAD, P. D. und GANAPATHY, V. (2001) Transport of choline and its relationship to the expression of the organic cation transporters in a rat brain microvessel endothelial cell line (RBE4). *Biochim. Biophys. Acta* **1512**, 299-307.

- GAN, L. S.; HSYU, P. H.; PRITCHARD, J. F. und THAKKER, D. (1993) Mechanism of intestinal absorption of ranitidine and ondansetron: transport across Caco-2 cell monolayers. *Pharm. Res.* **10**, 1722-1725.
- GAN, L. S.; YANNI, S. und THAKKER, D. R. (1998) Modulation of the tight junctions of the Caco-2 cell monolayers by H₂-antagonists. *Pharm. Res.* **15**, 53-57.
- GANAPATHY, M. E.; BRANDSCH, M.; PRASAD, P. D.; GANAPATHY, V. und LEIBACH, F. H. (1995) Differential recognition of β -lactam antibiotics by intestinal and renal peptide transporters, PEPT1 and PEPT2. *J. Biol. Chem.* **270**, 25672-25677.
- GANAPATHY, M. E.; HUANG, W.; RAJAN, D. P.; CARTER, A. L.; SUGAWARA, M.; ISEKI, K.; LEIBACH, F. H. und GANAPATHY, V. (2000) β -lactam antibiotics as substrates for OCTN2, an organic cation/carnitine transporter. *J. Biol. Chem.* **275**, 1699-1707.
- GANAPATHY, V.; MENDICINO, J. F. und LEIBACH, F. H. (1981) Transport of glycyl-L-proline into intestinal and renal brush border vesicles from rabbit. *J. Biol. Chem.* **256**, 118-124.
- GANAPATHY, V.; GANAPATHY, M. E.; NAIR, C. N.; MAHESH, V. B. und LEIBACH, F. H. (1988) Evidence for an organic cation-proton antiport system in brush-border membranes isolated from the human term placenta. *J. Biol. Chem.* **263**, 4561-4568.
- GANAPATHY, V.; PRASAD, P. D.; GANAPATHY, M. E. und LEIBACH, F. H. (1999) Drugs of abuse and placental transport. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **38**, 99-110.
- GANAPATHY, V.; PRASAD, P. D.; GANAPATHY, M. E. und LEIBACH, F. H. (2000) Placental transporters relevant to drug distribution across the maternal-fetal interface. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **294**, 413-420.
- GORBOULEV, V.; ULZHEIMER, J. C.; AKHOUNDOVA, A.; ULZHEIMER-TEUBER, I.; KARBACH, U.; QUESTER, S.; BAUMANN, C.; LANG, F.; BUSCH, A. E. und KOEPESELL, H. (1997) Cloning and characterization of two human polyspecific organic cation transporters. *DNA Cell Biol.* **16**, 871-881.
- GRAHAM, F. L.; SMILEY, J.; RUSSELL, W. C. und NAIRN, R. (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* **36**, 59-74.
- GRASSL, S. M. (1994) Choline transport in human placental brush-border membrane vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* **1194**, 203-213.
- GREEN, R. M.; LO, K.; STERRITT, C. und BEIER, D. R. (1999) Cloning and functional expression of a mouse liver organic cation transporter. *Hepatology* **29**, 1556-1562.
- GROVER, B.; BUCKLEY, D.; BUCKLEY, A. R. und CACINI, W. (2004) Reduced expression of organic cation transporters rOCT1 and rOCT2 in experimental diabetes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **308**, 949-956.
- GRÜNDEMANN, D.; GORBOULEV, V.; GAMBARYAN, S.; VEYHL, M. und KOEPESELL, H. (1994) Drug excretion mediated by a new prototype of polyspecific transporter. *Nature* **372**, 549-552.

- GRÜNDEMANN, D.; SCHECHINGER, B.; RAPPOLD, G. A. und SCHÖMIG, E. (1998) Molecular identification of the corticosterone-sensitive extraneuronal catecholamine transporter. *Nat. Neurosci.* **1**, 349-351.
- GRÜNDEMANN, D.; LIEBICH, G.; KIEFER, N.; KÖSTER, S. und SCHÖMIG, E. (1999) Selective substrates for non-neuronal monoamine transporters. *Mol. Pharmacol.* **56**, 1-10.
- GRUNEWALD, R. W.; OPPERMAN, M. und MÜLLER, G. A. (1997) Choline transport and its osmotic regulation in renal cells derived from the rabbit outer medullary thick ascending limb of Henle. *Pflugers Arch.* **434**, 815-821.
- GUAGNANO, M. T.; PACE, P.; MERLITTI, D.; CARRABS, C.; SANTUCCI, E. und SENSI, S. (1997) Transdermal clonidine therapy and blood pressure nocturnal fall in mild hypertensive male subjects. *Clin. Exp. Hypertens.* **19**, 331-341.
- HAN, H.; DE VRUEH, R. L.; RHIE, J. K.; COVITZ, K. M.; SMITH, P. L.; LEE, C. P.; OH, D. M.; SADEE, W. und AMIDON, G. L. (1998) 5'-Amino acid esters of antiviral nucleosides, acyclovir, and AZT are absorbed by the intestinal PEPT1 peptide transporter. *Pharm. Res.* **15**, 1154-1159.
- 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)
- HASANNEJAD, H.; TAKEDA, M.; NARIKAWA, S.; HUANG, X. L.; ENOMOTO, A.; TAKI, K.; NIWA, T.; JUNG, S. H.; ONOZATO, M. L.; TOJO, A. und ENDOU, H. (2004) Human organic cation transporter 3 mediates the transport of antiarrhythmic drugs. *Eur. J. Pharmacol.* **499**, 45-51.
- HASEGAWA, Y.; KUNIHARA, M. und MARUYAMA, Y. (1982) Determination of picomole amounts of choline and acetylcholine in blood by gas chromatography-mass spectrometry equipped with a newly improved pyrolyzer. *J. Chromatogr.* **239**, 335-342.
- HAYER-ZILLGEN, M.; BRÜSS, M. und BÖNISCH, H. (2002) Expression and pharmacological profile of the human organic cation transporters hOCT1, hOCT2 and hOCT3. *Br. J. Pharmacol.* **136**, 829-836.
- HENGSTMANN, J. H.; WEYAND, U. und DENGLER, H. J. (1975) The physiological disposition of etilefrine in man. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **9**, 179-187.
- HENGSTMANN, J. H.; HENGSTMANN, R.; SCHWONZEN, S. und DENGLER, H. J. (1982) Dihydroergotamine increases the bioavailability of orally administered etilefrine. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **22**, 463-467.
- HOFFMANN, K.; GRAFE, F.; WOHLRAB, W.; NEUBERT, R. H. und BRANDSCH, M. (2002) Functional characterization of a high-affinity choline transport system in human keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **119**, 118-121.
- HOHMANN, M. und KÜNZEL, W. (1989) Etilefrine and amezinium reduce uterine blood flow of pregnant guinea pigs. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **30**, 173-181.

- HORVATH, G.; SUTTO, Z.; TORBATI, A.; CONNER, G. E., SALATHE, M. und WANNER, A. (2003) Norepinephrine transport by the extraneuronal monoamine transporter in human bronchial arterial smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **285**, L829-L837.
- HUANG, W.; SHAIKH, S. N.; GANAPATHY, M. E.; HOPFER, U.; LEIBACH, F. H.; CARTER, A. L. und GANAPATHY, V. (1999) Carnitine transport and its inhibition by sulfonylureas in human kidney proximal tubular epithelial cells. *Biochem. Pharmacol.* **58**, 1361-1370.
- HUNTER, J.; HIRST, B. H. und SIMMONS, N. L. (1991) Epithelial secretion of vinblastine by human intestinal adenocarcinoma cell (HCT-8 and T84) layers expressing P-glycoprotein. *Br. J. Cancer* **64**, 437-444.
- HUWYLER, J.; FRICKER, G.; TOROK, M.; SCHNEIDER, M. und DREWE, J. (1997) Transport of clonidine across cultured brain microvessel endothelial cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **282**, 81-85.
- INANO, A.; SAI, Y.; KATO, Y.; TAMAI, I.; ISHIGURO, M. und TSUJI, A. (2004) Functional Regions of Organic Cation/Carnitine Transporter OCTN2 (SLC22A5): Roles in Carnitine Recognition. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **19**, 180-189.
- ITO, S. (2001) Transplacental treatment of fetal tachycardia: implications of drug transporting proteins in placenta. *Semin. Perinatol.* **25**, 196-201.
- IVERSEN, L. L. (1965) The uptake of catecholamines at high perfusion concentrations in the rat isolated heart: A novel catecholamine uptake process. *Br. J. Pharmacol.* **25**, 18-33.
- JANSEN, W.; SEIBEL, K. und BUHLING, M. (1985) Long-term effect of etilefrine pivalate on blood pressure in man. *Arzneimittelforschung* **35**, 1080-1083.
- JONKER, J. W.; WAGENAAR, E.; MOL, C. A.; BUITELAAR, M.; KOEPESELL, H.; SMIT, J. W. und SCHINKEL, A. H. (2001) Reduced hepatic uptake 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.
- KARLSSON, J.; KUO, S. M.; ZIEMNIAK, J. und ARTURSSON, P. (1993) Transport of celiprolol across human intestinal epithelial (Caco-2) cells: mediation of secretion by multiple transporters including P-glycoprotein. *Br. J. Pharmacol.* **110**, 1009-1016.
- KEKUDA, R.; PRASAD, P. D.; WU, X.; WANG, H.; FEI, Y. J.; LEIBACH, F. H. und GANAPATHY, V. (1998) Cloning and functional characterization of a potential-sensitive, polyspecific organic cation transporter (OCT3) most abundantly expressed in placenta. *J. Biol. Chem.* **273**, 15971-15979.
- KERB, R.; BRINKMANN, U.; CHATSKAIA, N.; GORBUNOV, D.; GORBOULEV, V.; MORNHINWEG, E.; KEIL, A.; EICHELBAUM, M. und KOEPESELL, H. (2002) Identification of genetic variations of the human organic cation transporter hOCT1 and their functional consequences. *Pharmacogenetics* **12**, 591-595.

- KESSLER, M.; ACUTO, O.; STORELLI, C.; MURER, H.; MÜLLER, M. und SEMENZA, G. (1978) A modified procedure for the rapid preparation of efficiently transporting vesicles from small intestinal brush border membranes. Their use in investigating some properties of D-glucose and choline transport systems. *Biochim. Biophys. Acta* **506**, 136-154.
- KIMURA, H.; TAKEDA, M.; NARIKAWA, S.; ENOMOTO, A.; ICHIDA, K. und ENDOU, H. (2002) Human organic anion transporters and human organic cation transporters mediate renal transport of prostaglandins. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **301**, 293-298.
- KITANO, T.; IIZASA, H.; HWANG, I. W.; HIROSE, Y.; MORITA, T.; MAEDA, T. und NAKASHIMA, E. (2004) Conditionally immortalized syncytiotrophoblast cell lines as new tools for study of the blood-placenta barrier. *Biol. Pharm. Bull.* **27**, 753-759.
- KOEHLER, M. R.; WISSINGER, B.; GORBOULEV, V.; KOEPESELL, H. und SCHMID, M. (1997) The two human organic cation transporter genes SLC22A1 and SLC22A2 are located on chromosome 6q26. *Cytogenet. Cell Genet.* **79**, 198-200.
- KOEPESELL, H. (1998) Organic cation transporters in intestine, kidney, liver, and brain. *Annu. Rev. Physiol.* **60**, 243-266.
- KOEPESELL, H.; GORBOULEV, V. und ARNDT, P. (1999) Molecular pharmacology of organic cation transporters in kidney. *J. Membr. Biol.* **167**, 103-117.
- KOEPESELL, H.; SCHMITT, B. M. und GORBOULEV, V. (2003) Organic cation transporters. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **150**, 36-90.
- KOHLER, P. O. und BRIDSON, W. E. (1971) Isolation of hormone-producing clonal lines of human choriocarcinoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab* **32**, 683-687.
- LANKAS, G. R.; WISE, L. D.; CARTWRIGHT, M. E.; PIPPERT, T. und UMBENHAUER, D. R. (1998) Placental P-glycoprotein deficiency enhances susceptibility to chemically induced birth defects in mice. *Reprod. Toxicol.* **12**, 457-463.
- LEE, K. und THAKKER, D. R. (1999) Saturable transport of H₂-antagonists ranitidine and famotidine across Caco-2 cell monolayers. *J. Pharm. Sci.* **88**, 680-687.
- LEE, K.; NG, C.; BROUWER, K. L. und THAKKER, D. R. (2002) Secretory transport of ranitidine and famotidine across Caco-2 cell monolayers. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **303**, 574-580.
- LOCKMAN, P. R. und ALLEN, D. D. (2002) The transport of choline. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **28**, 749-771.
- LOWENTHAL, D. T.; SARIS, S.; PARAN, E.; CRISTAL, N.; SHARIF, K.; BIES, C. und FAGAN, T. (1986) Efficacy of clonidine as transdermal therapeutic system: the international clinical trial experience. *Am. Heart J.* **112**, 893-900.
- MARGER, M. D. und SAIER, M. H., JR. (1993) A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyse uniport, symport and antiport. *Trends Biochem. Sci.* **18**, 13-20.

- MARTEL, F.; GRÜNDEMANN, D.; CALHAU, C. und SCHÖMIG, E. (2001) Apical uptake of organic cations by human intestinal Caco-2 cells: putative involvement of ASF transporters. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **363**, 40-49.
- MAYER, U.; WAGENAAR, E.; BEIJNEN, J. H.; SMIT, J. W.; MEIJER, D. K.; VAN ASPEREN, J.; BORST, P. und SCHINKEL, A. H. (1996) Substantial excretion of digoxin via the intestinal mucosa and prevention of long-term digoxin accumulation in the brain by the *mdr 1a* P-glycoprotein. *Br. J. Pharmacol.* **119**, 1038-1044.
- MEYER-WENTRUP, F.; KARBACH, U.; GORBOULEV, V.; ARNDT, P. und KOEPESELL, H. (1998) Membrane localization of the electrogenic cation transporter rOCT1 in rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **248**, 673-678.
- MIYAMOTO, Y.; GANAPATHY, V. und LEIBACH, F. H. (1988) Transport of guanidine in rabbit intestinal brush-border membrane vesicles. *Am. J. Physiol.* **255**, G85-G92.
- MIZUUCHI, H.; KATSURA, T.; SAITO, H.; HASHIMOTO, Y. und INUI, K. (1999) Transport characteristics of diphenhydramine in human intestinal epithelial Caco-2 cells: contribution of pH-dependent transport system. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **290**, 388-392.
- MIZUUCHI, H.; KATSURA, T.; ASHIDA, K.; HASHIMOTO, Y. und INUI, K. (2000a) Diphenhydramine transport by pH-dependent tertiary amine transport system in Caco-2 cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **278**, G563-G569.
- MIZUUCHI, H.; KATSURA, T.; HASHIMOTO, Y. und INUI, K. (2000b) Transepithelial transport of diphenhydramine across monolayers of the human intestinal epithelial cell line Caco-2. *Pharm. Res.* **17**, 539-545.
- MOSELEY, R. H.; MORRISSETTE, J. und JOHNSON, T. R. (1990) Transport of N1-methylnicotinamide by organic cation-proton exchange in rat liver membrane vesicles. *Am. J. Physiol.* **259**, G973-G982.
- MOTOHASHI, H.; SAKURAI, Y.; SAITO, H.; MASUDA, S.; URAKAMI, Y.; GOTO, M.; FUKATSU, A.; OGAWA, O. und INUI, K. (2002) Gene expression levels and immunolocalization of organic ion transporters in the human kidney. *J. Am. Soc. Nephrol.* **13**, 866-874.
- MÜLLER, J.; NEUBERT, R. H. und BRANDSCH, M. (2004) Transport of clonidine at cultured epithelial cells (JEG-3) of the human placenta. *Pharm. Res.* **21**, 693-695.
- MÜLLER, J.; BORN, I.; NEUBERT, R. H. und BRANDSCH, M. (2005) Apical uptake of choline and cationic drugs in epithelial cell lines derived from human placenta. *Placenta*, im Druck
- MUMMANENI, V. und DRESSMAN, J. B. (1994) Intestinal uptake of cimetidine and ranitidine in rats. *Pharm. Res.* **11**, 1599-1604.
- NAGAO, M.; SAITOH, H.; ZHANG, W. D.; ISEKI, K.; YAMADA, Y.; TAKATORI, T. und MIYAZAKI, K. (1993) Transport characteristics of paraquat across rat intestinal brush-border membrane. *Arch. Toxicol.* **67**, 262-267.

- NEEF, C. und MEIJER, D. K. (1984) Structure-pharmacokinetics relationship of quaternary ammonium compounds. Correlation of physicochemical and pharmacokinetic parameters. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **328**, 111-118.
- NEUHOFF, S.; UNGELL, A. L.; ZAMORA, I. und ARTURSSON, P. (2003) pH-dependent bidirectional transport of weakly basic drugs across Caco-2 monolayers: implications for drug-drug interactions. *Pharm. Res.* **20**, 1141-1148.
- NEZU, J.; TAMAI, I.; OKU, A.; OHASHI, R.; YABUUCHI, H.; HASHIMOTO, N.; NIKAIDO, H.; SAI, Y.; KOIZUMI, A.; SHOJI, Y.; TAKADA, G.; MATSUIISHI, T.; YOSHINO, M.; KATO, H.; OHURA, T.; TSUJIMOTO, G.; HAYAKAWA, J.; SHIMANE, M. und TSUJI, A. (1999) Primary systemic carnitine deficiency is caused by mutations in a gene encoding sodium ion-dependent carnitine transporter. *Nat. Genet.* **21**, 91-94.
- OGIHARA, T.; TAMAI, I.; TAKANAGA, H.; SAI, Y. und TSUJI, A. (1996) Stereoselective and carrier-mediated transport of monocarboxylic acids across Caco-2 cells. *Pharm. Res.* **13**, 1828-1832.
- OHASHI, R.; TAMAI, I.; YABUUCHI, H.; NEZU, J. I.; OKU, A.; SAI, Y.; SHIMANE, M. und TSUJI, A. (1999) Na⁺-dependent carnitine transport by organic cation transporter (OCTN2): its pharmacological and toxicological relevance. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **291**, 778-784.
- OKUDA, T.; HAGA, T.; KANAI, Y.; ENDOU, H.; ISHIHARA, T. und KATSURA, I. (2000) Identification and characterization of the high-affinity choline transporter. *Nat. Neurosci.* **3**, 120-125.
- PALM, K.; LUTHMAN, K.; ROS, J.; GRASJO, J. und ARTURSSON, P. (1999) Effect of molecular charge on intestinal epithelial drug transport: pH- dependent transport of cationic drugs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **291**, 435-443.
- PARKIN, D. E. (1974) Probable Benadryl withdrawal manifestations in a newborn infant. *J. Pediatr.* **85**, 580.
- PATTILLO, R. A. und GEY, G. O. (1968) The establishment of a cell line of human hormone-synthesizing trophoblastic cells in vitro. *Cancer Res.* **28**, 1231-1236.
- PATTILLO, R. A.; RUCKERT, A.; HUSSA, R. und BERNSTEIN, R. A. D. E. (1971) The JAR cell line-continuous human multihormone production and controls. *In Vitro (Rockville)* **6**, 398-399.
- PELTEKOVA, V. D.; WINTLE, R. F.; RUBIN, L. A.; AMOS, C. I.; HUANG, Q.; GU, X.; NEWMAN, B.; VAN OENE, M.; CESCO, D.; GREENBERG, G.; GRIFFITHS, A. M.; GEORGE-HYSLOP, P. H. und SIMINOVITCH, K. A. (2004) Functional variants of OCTN cation transporter genes are associated with Crohn disease. *Nat. Genet.* **36**, 471-475.
- PENTIKAINEN, P.; PENTTILA, A.; VAPAATALO, H. und HACKMAN, R. (1973) Intestinal absorption, intestinal distribution, and excretion of [¹⁴C] labelled hyoscine N-butylbromide (butylscopolamine) in the rat. *J. Pharm. Pharmacol.* **25**, 371-375.

- PIETIG, G.; MEHRENS, T.; HIRSCH, J. R.; CETINKAYA, I.; PIECHOTA, H. und SCHLATTER, E. (2001) Properties and regulation of organic cation transport in freshly isolated human proximal tubules. *J. Biol. Chem.* **276**, 33741-33746.
- PRASAD, P. D.; LEIBACH, F. H.; MAHESH, V. B. und GANAPATHY, V. (1994) Human placenta as a target organ for cocaine action: interaction of cocaine with the placental serotonin transporter. *Placenta* **15**, 267-278.
- PRICE, N. T.; JACKSON, V. N. und HALESTRAP, A. P. (1998) Cloning and sequencing of four new mammalian monocarboxylate transporter (MCT) homologues confirms the existence of a transporter family with an ancient past. *Biochem. J.* **329**, 321-328.
- PRUEKSARITANONT, T.; GORHAM, L. M.; HOCHMAN, J. H.; TRAN, L. O. und VYAS, K. P. (1996) Comparative studies of drug-metabolizing enzymes in dog, monkey, and human small intestines, and in Caco-2 cells. *Drug Metab. Dispos.* **24**, 634-642.
- PUCK, T. T.; CIECIURA, S. J. und ROBINSON, A. (1958) Genetics of somatic mammalian cells. III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. *J. Exp. Med.* **108**, 945-956.
- RAMAMOORTHY, S.; PRASAD, P. D.; KULANTHAIVEL, P.; LEIBACH, F. H.; BLAKELY, R. D. und GANAPATHY, V. (1993) Expression of a cocaine-sensitive norepinephrine transporter in the human placental syncytiotrophoblast. *Biochemistry* **32**, 1346-1353.
- RIACHI, N. J.; LAMANNA, J. C. und HARIK, S. I. (1989) Entry of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine into the rat brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **249**, 744-748.
- RUIGOMEZ, A.; GARCIA RODRIGUEZ, L. A.; CATTARUZZI, C.; TRONCON, M. G.; AGOSTINIS, L.; WALLANDER, M. A. und JOHANSSON, S. (1999) Use of cimetidine, omeprazole, and ranitidine in pregnant women and pregnancy outcomes. *Am. J. Epidemiol.* **150**, 476-481.
- RYTTING, E. und AUDUS, K. L. (2004) OCTN2-Mediated Carnitine Uptake in Placental Choriocarcinoma (BeWo) Cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, im Druck
- SAITO, H.; KOBAYASHI, M.; SUGAWARA, M.; ISEKI, K. und MIYAZAKI, K. (1992) Carrier mediated transport system for choline and its related quaternary ammonium compounds on rat intestinal brush- border membrane. *Biochim. Biophys. Acta* **1112**, 153-160.
- SANNERSTEDT, R.; LUNDBORG, P.; DANIELSSON, B. R.; KIHLLSTROM, I.; ALVAN, G.; PRAME, B. und RIDLEY, E. (1996) Drugs during pregnancy: an issue of risk classification and information to prescribers. *Drug Saf.* **14**, 69-77.
- SCHIEBLER, T. H. und ARNOLD, G. *Zytologie, Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie des Menschen*, 8. Auflage, Springer-Verlag, Berlin (1999)
- SCHIPPER, N. G.; VARUM, K. M.; STENBERG, P.; OCKLIND, G.; LENNERNAS, H. und ARTURSSON, P. (1999) Chitosans as absorption enhancers of poorly absorbable drugs. 3: Influence of mucus on absorption enhancement. *Eur. J. Pharm. Sci.* **8**, 335-343.

- SCHLOSS, P.; MAYSER, W.; NIEHUIS, A. und BETZ, H. (1994) Na⁺-dependent high-affinity uptake of choline into cultured fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **199**, 1320-1325.
- SINCLAIR, C. J.; CHI, K. D.; SUBRAMANIAN, V.; WARD, K. L. und GREEN, R. M. (2000) Functional expression of a high affinity mammalian hepatic choline/organic cation transporter. *J. Lipid Res.* **41**, 1841-1848.
- SMIT, J. W.; HUISMAN, M. T.; VAN TELLINGEN, O.; WILTSHIRE, H. R. und SCHINKEL, A. H. (1999) Absence or pharmacological blocking of placental P-glycoprotein profoundly increases fetal drug exposure. *J. Clin. Invest.* **104**, 1441-1447.
- SOMOGYI, A. und GUGLER, R. (1983) Clinical pharmacokinetics of cimetidine. *Clin. Pharmacokinet.* **8**, 463-495.
- SOMOGYI, A. A.; RUMRICH, G.; FRITZSCH, G. und ULLRICH, K. J. (1996) Stereospecificity in contraluminal and luminal transporters of organic cations in the rat renal proximal tubule. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **278**, 31-36.
- SOWUNMI, A.; SALAKO, L. A. und OGUNBONA, F. A. (1994) Bioavailability of sulphate and dihydrochloride salts of quinine. *Afr. J. Med. Med. Sci.* **23**, 275-278.
- STAGG, A. R.; FLEMING, J. C.; BAKER, M. A.; SAKAMOTO, M.; COHEN, N. und NEUFELD, E. J. (1999) Defective high-affinity thiamine transporter leads to cell death in thiamine-responsive megaloblastic anemia syndrome fibroblasts. *J. Clin. Invest.* **103**, 723-729.
- STEEN, H.; OOSTING, R. und MEIJER, D. K. (1991) Mechanisms for the uptake of cationic drugs by the liver: a study with tributylmethylammonium (TBU₃MA). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **258**, 537-543.
- SWEET, D. H.; MILLER, D. S. und PRITCHARD, J. B. (2001) Ventricular choline transport: a role for organic cation transporter 2 expressed in choroid plexus. *J. Biol. Chem.* **276**, 41611-41619.
- SWEIRY, J. H. und YUDILEVICH, D. L. (1985) Characterization of choline transport at maternal and fetal interfaces of the perfused guinea-pig placenta. *J. Physiol.* **366**, 251-266.
- SWEIRY, J. H.; PAGE, K. R.; DACKER, C. G.; ABRAMOVICH, D. R. und YUDILEVICH, D. L. (1986) Evidence of saturable uptake mechanisms at maternal and fetal sides of the perfused human placenta by rapid paired-tracer dilution: studies with calcium and choline. *J. Dev. Physiol.* **8**, 435-445.
- TAKEDA, M.; KHAMDANG, S.; NARIKAWA, S.; KIMURA, H.; KOBAYASHI, Y.; YAMAMOTO, T.; CHA, S. H.; SEKINE, T. und ENDOU, H. (2002) Human organic anion transporters and human organic cation transporters mediate renal antiviral transport. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **300**, 918-924.
- TAMAI, I.; YABUUCHI, H.; NEZU, J.; SAI, Y.; OKU, A.; SHIMANE, M. und TSUJI, A. (1997) Cloning and characterization of a novel human pH-dependent organic cation transporter, OCTN1. *FEBS Lett.* **419**, 107-111.

- TAMAI, I.; OHASHI, R.; NEZU, J.; YABUUCHI, H.; OKU, A.; SHIMANE, M.; SAI, Y. und TSUJI, A. (1998) Molecular and functional identification of sodium ion-dependent, high affinity human carnitine transporter OCTN2. *J. Biol. Chem.* **273**, 20378-20382.
- THOMAS, M.; TIKELLIS, C.; KANTHARIDIS, P.; BURNS, W.; COOPER, M. und FORBES, J. (2004) The Role of advanced glycation in reduced organic cation transport associated with experimental diabetes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, im Druck
- TSUBAKI, H. und KOMAI, T. (1987) Intestinal absorption of choline in rats. *J. Pharmacobiodyn.* **10**, 571-579.
- TSUJI, A.; TAMAI, I.; NAKANISHI, M. und AMIDON, G. L. (1990) Mechanism of absorption of the dipeptide α -methyl dopa-phe in intestinal brush-border membrane vesicles. *Pharm. Res.* **7**, 308-309.
- TSUJI, A.; TAMAI, I.; NAKANISHI, M.; TERASAKI, T. und HAMANO, S. (1993) Intestinal brush-border transport of the oral cephalosporin antibiotic, cefdinir, mediated by dipeptide and monocarboxylic acid transport systems in rabbits. *J. Pharm. Pharmacol.* **45**, 996-998.
- TURNHEIM, K. und LAUTERBACH, F. O. (1977) Absorption and secretion of monoquaternary ammonium compounds by the isolated intestinal mucosa. *Biochem. Pharmacol.* **26**, 99-108.
- ULLRICH, K. J.; RUMRICH, G.; DAVID, C. und FRITZSCH, G. (1993) Bisubstrates: substances that interact with renal contraluminal organic anion and organic cation transport systems. I. Amines, piperidines, piperazines, azepines, pyridines, quinolines, imidazoles, thiazoles, guanidines and hydrazines. *Pflugers Arch.* **425**, 280-299.
- ULLRICH, K. J. und RUMRICH, G. (1996) Luminal transport system for choline⁺ in relation to the other organic cation transport systems in the rat proximal tubule. Kinetics, specificity: alkyl/aryl amines, alkyl amines with OH, O, SH, NH₂, ROCO, RSCO and H₂PO₄-groups, methylaminostyryl, rhodamine, acridine, phenanthrene and cyanine compounds. *Pflugers Arch.* **432**, 471-485.
- VAN DER AA, E. M.; WOUTERSE, A. C.; PEEREBOOM-STEGEMAN, J. H. und RUSSEL, F. G. (1994) Uptake of choline into syncytial microvillus membrane vesicles of human term placenta. *Biochem. Pharmacol.* **47**, 453-456.
- VAN DER AA, E. M.; WOUTERSE, A. C.; COPIUS PEEREBOOM-STEGEMAN, J. H. und RUSSEL, F. G. (1995) Inhibition of choline uptake in syncytial microvillus membrane vesicles of human term placenta. Specificity and nature of interaction. *Biochem. Pharmacol.* **50**, 1873-1878.
- VAN MONTFOORT, J. E.; MÜLLER, M.; GROOTHUIS, G. M.; MEIJER, D. K.; KOEPEL, H. und MEIER, P. J. (2001) 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.
- WAGNER, C. A.; LUKEWILLE, U.; KALTENBACH, S.; MOSCHEN, I.; BROER, A.; RISLER, T.; BROER, S. und LANG, F. (2000) Functional and pharmacological characterization of human Na⁺-carnitine cotransporter hOCTN2. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **279**, F584-F591.

- WANG, Y.; YE, J.; GANAPATHY, V. und LONGO, N. (1999) Mutations in the organic cation/carnitine transporter OCTN2 in primary carnitine deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **96**, 2356-2360.
- WELSCH, F. (1976a) Effects of drugs on the uptake of acetylcholine by human term placenta fragments. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* **15**, 457-468.
- WELSCH, F. (1976b) Studies on accumulation and metabolic fate of [N-methyl-³H]choline in human term placenta fragments. *Biochem. Pharmacol.* **25**, 1021-1030.
- WESSLER, I.; ROTH, E.; DEUTSCH, C.; BROCKERHOFF, P.; BITTINGER, F.; KIRKPATRICK, C. J. und KILBINGER, H. (2001) Release of non-neuronal acetylcholine from the isolated human placenta is mediated by organic cation transporters. *Br. J. Pharmacol.* **134**, 951-956.
- WRIGHT, S. H. und WUNZ, T. M. (1987) Transport of tetraethylammonium by rabbit renal brush-border and basolateral membrane vesicles. *Am. J. Physiol.* **253**, F1040-F1050.
- WU, X.; KEKUDA, R.; HUANG, W.; FEI, Y. J.; LEIBACH, F. H.; CHEN, J.; CONWAY, S. J. und GANAPATHY, V. (1998a) Identity of the organic cation transporter OCT3 as the extraneuronal monoamine transporter (uptake₂) and evidence for the expression of the transporter in the brain. *J. Biol. Chem.* **273**, 32776-32786.
- WU, X.; PRASAD, P. D.; LEIBACH, F. H. und GANAPATHY, V. (1998b) 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.
- WU, X.; HUANG, W.; PRASAD, P. D.; SETH, P.; RAJAN, D. P.; LEIBACH, F. H.; CHEN, J.; CONWAY, S. J. und GANAPATHY, V. (1999) Functional characteristics and tissue distribution pattern of organic cation transporter 2 (OCTN2), an organic cation/carnitine transporter. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **290**, 1482-1492.
- WU, X.; HUANG, W.; GANAPATHY, M. E.; WANG, H.; KEKUDA, R.; CONWAY, S. J.; LEIBACH, F. H. und GANAPATHY, V. (2000) Structure, function, and regional distribution of the organic cation transporter OCT3 in the kidney. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **279**, F449-F458.
- YABUUCHI, H.; TAMAI, I.; NEZU, J.; SAKAMOTO, K.; OKU, A.; SHIMANE, M.; SAI, Y. und TSUJI, A. (1999) Novel membrane transporter OCTN1 mediates multispecific, bidirectional, and pH-dependent transport of organic cations. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **289**, 768-773.
- YEE, S. (1997) In vitro permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict in vivo (small intestinal) absorption in man--fact or myth. *Pharm. Res.* **14**, 763-766.
- YOO, S. D.; AXELSON, J. E.; TAYLOR, S. M. und RURAK, D. W. (1986) Placental transfer of diphenhydramine in chronically instrumented pregnant sheep. *J. Pharm. Sci.* **75**, 685-687.
- ZEISEL, S. H. (1992) Choline: an important nutrient in brain development, liver function and carcinogenesis. *J. Am. Coll. Nutr.* **11**, 473-481.

- ZEISEL, S. H.; MAR, M. H.; ZHOU, Z. und DA COSTA, K. A. (1995) Pregnancy and lactation are associated with diminished concentrations of choline and its metabolites in rat liver. *J. Nutr.* **125**, 3049-3054.
- ZEVIN, S.; SCHANER, M. E.; ILLSLEY, N. P. und GIACOMINI, K. M. (1997) Guanidine transport in a human choriocarcinoma cell line (JAR). *Pharm. Res.* **14**, 401-405.
- ZHANG, L.; DRESSER, M. J.; GRAY, A. T.; YOST, S. C.; TERASHITA, S. und GIACOMINI, K. M. (1997) Cloning and functional expression of a human liver organic cation transporter. *Mol. Pharmacol.* **51**, 913-921.
- ZHANG, L.; SCHANER, M. E. und GIACOMINI, K. M. (1998) Functional characterization of an organic cation transporter (hOCT1) in a transiently transfected human cell line (HeLa). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **286**, 354-361.
- ZHANG, L.; GORSET, W.; DRESSER, M. J. und GIACOMINI, K. M. (1999) The interaction of n-tetraalkylammonium compounds with a human organic cation transporter, hOCT1. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **288**, 1192-1198.
- ZHANG, L.; GORSET, W.; WASHINGTON, C. B.; BLASCHKE, T. F.; KROETZ, D. L. und GIACOMINI, K. M. (2000) Interactions of HIV protease inhibitors with a human organic cation transporter in a mammalian expression system. *Drug Metab. Dispos.* **28**, 329-334.
- ZHU, T.; CHEN, X. Z.; STEEL, A.; HEDIGER, M. A. und SMITH, D. E. (2000) Differential recognition of ACE inhibitors in *Xenopus laevis* oocytes expressing rat PEPT1 and PEPT2. *Pharm. Res.* **17**, 526-532.
- ZWART, R.; VERHAAGH, S.; BUITELAAR, M.; POPP-SNIJDERS, C. und BARLOW, D. P. (2001) Impaired activity of the extraneuronal monoamine transporter system known as uptake-2 in Orct3/Slc22a3-deficient mice. *Mol. Cell Biol.* **21**, 4188-4196.

Originalarbeiten

1. Müller, J., Neubert, R.H., Brandsch, M. (2004) Transport of clonidine at cultured epithelial cells (JEG-3) of the human placenta. *Pharmaceutical Research* 21, 692-694.
2. Müller, J., Born, I., Neubert, R.H., Brandsch, M. (2004) Apical uptake of choline and cationic drugs in epithelial cell lines derived from human placenta. *Placenta*, im Druck.
3. Müller, J., Lips, K.S., Born, I., Neubert, R.H., Koepsell, H., Brandsch, M. (2004) Transport of cationic drugs at Caco-2 cells and at cells heterologously expressing the organic cation transporters hOCT1, hOCT2 or hOCT3. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, in Vorbereitung.
4. Lips, K.S., Müller, J., Brandsch, M., Zaps, F., Schatz, I., Kummer, W., Koepsell, H. Localization of organic cation transporters in human skin. *Journal of Investigative Dermatology*, in Vorbereitung.

Reviews

1. Brandsch, M., Hoffmann, K., Grafe, F., Müller, J., Wohlrab, W., Neubert, R.H. (2003) Transport of choline, cationic drugs and vitamins at epithelial cells of the human intestine, placenta and skin. *Nova Acta Leopold. N.F.* 87, 65-73.

Proceedingsbeiträge

1. Müller, J., Neubert, R.H., Brandsch, M. (2002) High-affinity uptake of choline in placental cell monolayers. *Proc. 4th World Meeting ADRITELF/APGI/APV*, Florence, p. 911-912.

veröffentlichte Abstracts

1. Müller, J., Brandsch, M., Neubert, R.H. (2001) Can the oral bioavailability of cephalosporins be improved by tensides? *EUFEPS World Conference on Drug Absorption and Drug Delivery*, June 18-20, 2001, Copenhagen, p. 47. ABS
2. Müller, J., Brandsch, M., Neubert, R.H. (2001) Improvement of the oral bioavailability of cephalosporins by tensides. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* 334, p. 75. ABS
3. Müller, J., Neubert, R.H., Brandsch, M. (2002) Transport of the cationic drugs etilefrine and diphenhydramine at placental cell monolayers. "Transporters 2002", September 1 – 5, 2002, Chiemsee, p. 69. ABS
4. Müller, J., Neubert, R.H., Brandsch, M. (2003) Transport of clonidine at epithelial cells of the human placenta. *Jahrestagung DPhG*, 0.8. 10.-11.10. 2003, Würzburg, p. P T29.

Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die mich während meiner Promotionszeit unterstützt haben.

Bei Prof. Dr. R. Neubert (Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) bedanke ich mich für die Überlassung der interessanten Aufgabenstellung, die Freiheit bei der Bearbeitung des Themas und sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer PD Dr. habil. M. Brandsch (AG Membrantransport, Biozentrum der MLU), der durch ständige Hilfsbereitschaft und Ansprechbarkeit wesentlich zum Gelingen der Arbeit beitrug.

Herrn Prof. Dr. H. Koepsell (Institut für Anatomie und Zellbiologie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg) danke ich für die Bereitstellung der hOCT-transfizierten Zell-Linien und die wertvollen fachlichen Anregungen.

Ebenso danke ich Frau Dr. K. Lips (Institut für Anatomie und Zellbiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen) für die durchgeführten immunozytochemischen Experimente, die aufschlussreiche Hinweise für die Diskussion der Arbeit lieferten.

Die kapillarelektrophoretischen Messungen durfte ich im Labor von Frau Dr. I. Born (Institut für Biochemie der MLU) durchführen, die mich dankenswerterweise sowohl bei theoretischen als auch bei praktischen Fragen zur CE unterstützte.

Bei Frau Dr. A. Voltz (Boehringer Ingelheim AG) bedanke ich mich für das radioaktiv markierte Atenolol.

Für die Plazentazell-Linien danke ich Prof. B. Ugele (Medizinische Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München).

Frau Hölsken (Hautklinik der MLU) danke ich für die Kultivierung der NHEK-Zellen.

Bedanken möchte ich mich auch für das gute Arbeitsklima in den Arbeitsgruppen Biopharmazie und Membrantransport.

Für die Durchsicht des Manuskripts oder für hilfreiche Gespräche und Anregungen möchte ich mich an dieser Stelle bei Iris Hinneburg, Tanja Gempe, Franziska Grafe, Kathrin Hoffmann, Ilka Knütter, Andrea Kühn und Linda Metzner bedanken.

Die Deutsche Forschungsgemeinschaft stellte dankenswerter Weise die notwendigen finanziellen Mittel bereit.

Vor allem danke ich meinem Freund und meiner Familie für ihre Unterstützung und Anteilnahme.

Lebenslauf

| | |
|---------------------|----------------|
| Name | Johanna Müller |
| Geburtsdatum | 27.09.1976 |
| Geburtsort | Braunschweig |
| Familienstand | ledig |
| Staatsangehörigkeit | Deutschland |

Schulbildung

| | |
|-----------|--|
| 1982-1986 | Grundschule Hinter der Masch Braunschweig |
| 1986-1988 | Orientierungsstufe Nibelungenschule Braunschweig |
| 1988-1995 | Gymnasium Ricarda-Huch-Schule Braunschweig |
| 05/1995 | Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife |

Berufsausbildung

| | |
|-----------------|---|
| 10/1995-09/1999 | Pharmaziestudium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg |
| 09/1997 | Erster Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung |
| 09/1999 | Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung |
| 10/1999-04/2000 | Diplomarbeit am Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg |
| 05/2000-11/2000 | Pharmaziepraktikum in der Löwen-Apotheke, Alzey |
| 11/2000 | Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung Approbation als Apothekerin |
| 01/2001-03/2004 | Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg |
| 05/2004 | Fachapothekerin für Pharmazeutische Technologie |

Halle (Saale), 10.03.2005

Erklärung

Hiermit erkläre ich, Johanna Müller, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe.

Weiterhin habe ich keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit wurde bisher keiner anderen Bildungseinrichtung bzw. Prüfungsbehörde zur Begutachtung vorgelegt. Desweiteren erkläre ich, dass ich mich bisher nicht um den Erwerb des Doktorgrades beworben habe.

Halle (Saale), 10.03.2005

Johanna Müller