

Transport von Clonidin, Phenylethylamin, Codein und Valproinsäure an Darm- und Hirnzellen

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Biowissenschaften

der Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg

von

Frau Diplom-Pharmazeutin Wiebke Fischer

geboren am 02.05.1980 in Köthen (Anhalt)

Gutachter/in:

1. PD Dr. Matthias Brandsch, Martin-Luther-Universität Halle-Saale
2. Prof. Dr. Reinhard Neubert, Martin-Luther-Universität Halle-Saale
3. Prof. Dr. Gerd Fricker, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

Halle (Saale), 27. Juli 2010

Tag der Verteidigung: 7. Dezember 2010

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einführung	5
2	Transport von Arzneistoffen an Zellmembranen	7
3	Transport von Clonidin in Neuroblastomzellen (SH-SY5Y)	16
3.1	Allgemeine Aspekte.....	16
3.2	Literaturbefunde zum Clonidintransport an der Blut-Hirn-Schranke und am Dünndarmepithel.....	17
3.3	Mechanismus des Clonidintransportes in SH-SY5Y-Zellen	18
3.4	Einfluss potentieller Inhibitoren auf den [³ H]Clonidintransport in SH-SY5Y-Zellen.....	20
4	Transport von β-Phenylethylamin in intestinale Epithelzellen (Caco-2)	22
4.1	Allgemeine Aspekte.....	22
4.2	Mechanismus des β -Phenylethylamintransportes in Caco-2-Zellen.....	23
4.3	Einfluss potentieller Inhibitoren auf den [¹⁴ C] β -Phenylethylamintransport in Caco-2-Zellen.....	25
5	Transport von Codein in intestinale Epithelzellen (Caco-2) und Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke (RBE4)	27
5.1	Allgemeine Aspekte.....	27
5.2	Mechanismus des Codeintransportes in Caco-2-Zellen und RBE4-Zellen	28
5.3	Einfluss potentieller Inhibitoren auf den [³ H]Codeintransport in Caco-2-Zellen und RBE4-Zellen	31
6	Transport von Valproinsäure in intestinale Epithelzellen (Caco-2) und Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke (RBE4)	36
6.1	Allgemeine Aspekte.....	36
6.2	Mechanismus des Valproattransportes in Caco-2-Zellen und RBE4-Zellen.....	38
6.3	Einfluss potentieller Inhibitoren auf den [³ H]Valproattransport in Caco-2-Zellen und RBE4-Zellen	41
7	Vergleichende Betrachtungen	46
8	Zusammenfassung	55
9	Ausblick	58
10	Literatur	59

11 Anlagen.....	68
11.1 Clonidine accumulation in human neuronal cells	
<u>Fischer, W.</u> , Neubert, R.H.H., Brandsch, M., 2007	
<i>European Journal of Pharmaceutical Sciences</i> 32, 291–295	69
11.2 Transport of phenylethylamine at intestinal epithelial (Caco-2) cells: Mechanism and substrate specificity	
<u>Fischer, W.</u> , Neubert, R.H.H., Brandsch, M., 2010	
<i>European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics</i> 74, 281–289	74
11.3 Uptake of codeine at intestinal epithelial (Caco-2) and brain endothelial (RBE4) cells	
<u>Fischer, W.</u> , Bernhagen, J., Neubert, R.H.H., Brandsch, M., 2010	
<i>European Journal of Pharmaceutical Sciences</i> 41, 31–42	83
11.4 Transport of valproate at intestinal epithelial (Caco-2) and brain endothelial (RBE4) cells: Mechanism and substrate specificity	
<u>Fischer, W.</u> , Praetor, K., Metzner, L., Neubert, R.H.H., Brandsch, M., 2008	
<i>European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics</i> 70, 486–492	95

ABKÜRZUNGEN

BHS	Blut-Hirn-Schranke
Caco-2	Humane Kolonkarzinomzelllinie
CTL	<i>Choline-like</i> Transporter (SLC44)
DIDS	4,4'-Diisothiocyano-2,2'-disulfonsäure
FCCP	Carbonylcyanid- <i>p</i> -trifluoromethoxyphenylhydrazon
GABA	γ -Aminobuttersäure
GHB	γ -Hydroxybuttersäure
IC ₅₀	Inhibitorkonzentration, bei der die spezifische Aufnahme des Standardsubstrates um 50 % gehemmt wird
J_{a-b}	Transepithelialer Flux von der apikalen zur basolateralen Seite
J_{a-c}	Apikale Substrataufnahme in die Zellen
J_{b-a}	Transepithelialer Flux von der basolateralen zur apikalen Seite
J_{b-c}	Basolaterale Substrataufnahme in die Zellen
K_i	Inhibitorkonstante
K_t	Michaelis-Konstante
log P	Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizient
MAO	Monoaminoxidase
MATE	<i>Multidrug and toxin extrusion</i> Transportprotein (SLC47)
MCT	Monocarboxylat-Transporter (SLC16)
MDMA	3,4-Methylenedioxyamphetamin
MDR/MRP	<i>Multidrug resistance (protein)</i>
MPP ⁺	<i>N</i> -Methyl-4-phenylpyridinium
OAT	Organische Anionen Transporter (SLC22)
OATP	Organische Anionen transportierende Polypeptide (SLCO/SLC21)
OCTN/OCT	Organische Zwitterionen/Kationen Transporter (SLC22)
P_{app}	Permeabilitätskoeffizient
PAH	<i>p</i> -Aminohippursäure
PEA	β -Phenylethylamin
P-gp	p-Glykoprotein
pH _i	Intrazellulärer pH-Wert
pH _o	Extrazellulärer pH-Wert
pK _a	Säurekonstante
RBE4	<i>rat brain endothelium</i> , Zelllinie aus Rattenhirnendothel
SLC	<i>Solute Carrier</i>
SH-SY5Y	Humane Neuroblastomzelllinie
TEA	Tetraethylammonium
V_{max}	Maximalgeschwindigkeit des Transportes
ZNS	Zentralnervensystem

Weitere Abkürzungen werden in den entsprechenden Kapiteln erläutert.

1 EINFÜHRUNG

In der pharmazeutischen Praxis werden Arzneistoffe vorwiegend peroral verabreicht. Daher gilt der intestinale Resorption des Arzneistoffs in den menschlichen Organismus besonderes Interesse. Die intestinale Arzneistoffaufnahme erfolgt hauptsächlich im Dünndarm; das Dünndarmepithel stellt dabei die eigentliche Barriere dar. Neben der Resorption beruht auch die Verteilung des Arzneistoffs im Organismus auf dem Überwinden epithelialer Barrieren. Bei zentral wirksamen Substanzen ist die Permeation durch die Blut-Hirn-Schranke ein wesentlicher Schritt für eine erfolgreiche Therapie. Die Translokation kann durch passive Prozesse entlang oder aktiv entgegen dem Konzentrationsgefälle erfolgen. Lange Zeit wurde postuliert, der Transport der – überwiegend schwach basischen – Arzneistoffe verlaufe passiv entsprechend der pH-Partitionstheorie (Shore *et al.* 1957, Hogben *et al.* 1959). Zunehmend zeigte sich jedoch, dass physiologische Transportsysteme für die Translokation von Arzneistoffen verantwortlich sind. Aus pharmazeutischer Sicht sind diese Carrier pharmakokinetisch, aber auch hinsichtlich möglicher Interaktionen zwischen Arzneistoffen bzw. mit Nahrungsbestandteilen interessant. Untersuchungen zur Lokalisation, zum Mechanismus und zur Substratspezifität epithelialer Transportsysteme erlangen daher zunehmend Bedeutung.

Pharmazeutisch-relevante Arzneistofftransporter sind zum Beispiel die Peptidtransporter PEPT1 und PEPT2, die Transporter für organische Kationen (OCT), Zwitterionen (OCTN) oder Anionen (OAT) sowie die organische Anionen transportierenden Polypeptide (OATP) oder die Monocarboxylat-Transporter (MCT). PEPT1 und PEPT2 sind für die intestinale Resorption und die renale Reabsorption vieler β -Laktamantibiotika und anderer Arzneistoffe verantwortlich (Bretschneider *et al.* 1999, Klaassen und Aleksunes 2010). OCTs und OCTNs transportieren kationische Arzneistoffe wie Atropin, Chinin, Verapamil und Carnitin (Koepsell *et al.* 2007). OATs, OATPs und MCTs akzeptieren hingegen vorwiegend anionische Arzneistoffe wie Salicylat und Estronsulfat, Herzglykoside und Statine, γ -Hydroxybutyrat oder Nateglinid (Klaassen und Aleksunes 2010, Morris und Felmlee 2008). Das p-Glykoprotein vermittelt als Effluxsystem den Transport von organischen, vorwiegend lipophilen Xenobiotika (Schinkel und Jonker 2003).

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung der Transportmechanismen für die organischen Kationen Clonidin, β -Phenylethylamin und Codein sowie für die anionische Valproinsäure (Abbildung 1.1) an verschiedenen physiologischen Barrieren. 1997 zeigten

erstmalig Huwyler und Mitarbeiter an Endothelzellen von Schweinehirnkapillaren, dass ein sättigbares, pH-abhängiges System für den Transport von Clonidin verantwortlich ist. Spätere Studien ergaben, dass ein vergleichbares System den Clonidintransport an der Haut, der Plazenta sowie am Dünndarm vermittelt (Grafe *et al.* 2004, Müller *et al.* 2004, Fischer *et al.* 2006).

Die Zielrezeptoren des Clonidins befinden sich an Neuronen des zentralen Nervensystems (Regunathan und Reis 1996). Eine mögliche Aufnahme des Clonidins auch in neuronale Zellen stand im Mittelpunkt des ersten Abschnitts dieser Arbeit. Die endogenen Stoffe β -Phenylethylamin und Codein erwiesen sich als potente Inhibitoren der neuronalen und der intestinalen Clonidinaufnahme (Fischer *et al.* 2006). Deshalb wurde in einem weiteren Abschnitt der Transport der kationischen Substanzen β -Phenylethylamin und Codein in intestinale Epithelzellen sowie die Aufnahme des zentralnervös wirksamen Codeins in Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke untersucht. Im letzten Abschnitt dieser Arbeit wurde sich mit dem Transport eines sauren Arzneistoffs, der Valproinsäure, in intestinale Epithelzellen und in Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke beschäftigt.

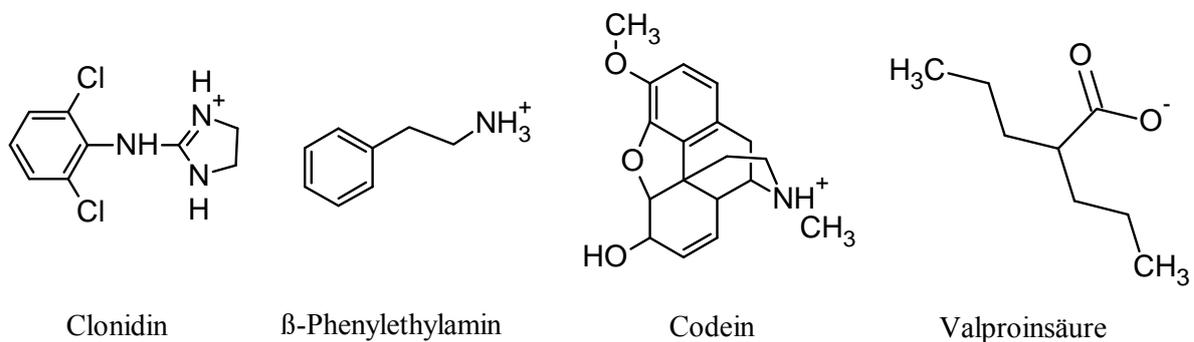


Abbildung 1.1. **Strukturformeln der untersuchten Substanzen.**

Die Zielstellung der vorliegenden Arbeit umfasste im Einzelnen die Charakterisierung

- des Clonidintransportes in humane Neuroblastomzellen (SH-SY5Y),
- des β -Phenylethylamintransportes in humane epitheliale Kolonkarzinomzellen (Caco-2),
- des Codeintransportes in humane epitheliale Kolonkarzinomzellen (Caco-2) und endotheliale Zellen der Blut-Hirn-Schranke von Ratten (RBE4) sowie
- des Valproattransportes in humane epitheliale Kolonkarzinomzellen (Caco-2) und endotheliale Zellen der Blut-Hirn-Schranke von Ratten (RBE4).

2 TRANSPORT VON ARZNEISTOFFEN AN ZELLMEMBRANEN

Der Hauptresorptionsort peroral applizierter Arzneistoffe im menschlichen Organismus ist der Dünndarm. Dabei stellt das Dünndarmepithel, das aus einer einzelligen Schicht besteht, die vorwiegend aus Enterozyten gebildet wird, die entscheidende Resorptionsbarriere dar. Als Epithelzellen sind die Enterozyten durch einen polarisierten Aufbau gekennzeichnet. Untereinander sind die Epithelzellen durch Schlussleisten (*tight junctions*¹) verbunden.

Nach der Resorption in den Blutkreislauf ist für Arzneistoffe, deren Zielstrukturen im zentralen Nervensystem (ZNS) lokalisiert sind, die Permeation durch die Blut-Hirn-Schranke (BHS) essentiell für ihre Wirksamkeit. Diese Barriere reguliert selektiv den Übertritt endogener und exogener Substanzen vom Blut in das Gehirn als Teil des ZNS. Die BHS wird hauptsächlich aus den Endothelzellen der Gefäßkapillaren gebildet, die als spezielle Epithelzellen ebenfalls polarisiert sind. Sehr dichte Schlussleisten verbinden die Zellen untereinander. An der Funktion der BHS sind zudem die Ausläufer der Astrozyten beteiligt, die durch die Basalmembran von den Endothelzellen getrennt sind und in Kontakt zu Neuronen treten.

Nährstoffe und Arzneistoffe können epitheliale bzw. endotheliale Barrieren im menschlichen Organismus mittels unterschiedlicher Transportmechanismen überwinden. Die interzellulären Schlussleisten bilden die parazelluläre Barriere, die nur sehr kleine hydrophile Moleküle wie H₂O aufgrund einfacher Diffusion² durchdringen können. Die Permeabilität der Schlussleisten variiert zwischen unterschiedlichen zellulären Barrieren, aber auch innerhalb eines Gewebes, beispielsweise im intestinalen Epithel. Von größerem Interesse für den Transport von Arzneistoffen ist jedoch die transzelluläre Passage, die durch einfache Diffusion, Carrier-vermittelt über membranständige Translokatoren³ oder durch Vesikel-

¹Die Schlussleisten (*tight junctions*) bilden eine zusammenhängende Diffusionsbarriere, die als parazelluläre Barriere fungiert.

²Die *freie* oder *einfache Diffusion* erfolgt passiv und wird durch einen Konzentrationsgradienten angetrieben.

³Sind *Translokatoren* beteiligt, so spricht man von spezifischem Transport bestimmter Moleküle oder Ionen durch bestimmte Membranen. Abgrenzend zur freien Diffusion ist der Transport über integrale Translokatoren - die Carriersysteme - schneller, substratspezifisch, saturierbar und durch Substratanaloga zu hemmen. Man unterscheidet die *katalysierte* oder *erleichterte Diffusion*, die nur bis zu einem Konzentrationsausgleich und ohne Energieaufwand erfolgt, vom *aktiven Transport*. Dieser ist strikt an einen energieverbrauchenden Prozess gekoppelt und kann entgegen einem Konzentrationsgradienten zur Anreicherung eines Stoffes führen. Sind Transport und Energieverbrauch direkt und stöchiometrisch gekoppelt, spricht man von *primär aktivem Transport*. Erfolgt die Kopplung stöchiometrisch, aber indirekt unter Verwendung der Energie aus elektrochemischen Potentialen von z.B. H⁺- oder Na⁺-Gradienten, spricht man von *sekundär aktivem Transport*. Konzentrationsgradienten, die durch sekundär aktiven Transport aufgebaut wurden, können wiederum als Antriebskraft für einen *tertiär aktiven Transport* dienen.

bildung infolge rezeptorvermittelter Endozytose⁴ erfolgt. Letztere spielt für die überwiegende Zahl der Pharmazeutika nur eine untergeordnete Rolle. Pharmazeutika sind meist organische Moleküle mit schwach basischem oder saurem Charakter. Lange Zeit wurde postuliert, der Transport derartiger Stoffe resultiere ausschließlich aus passiver Diffusion entsprechend der pH-Partitionstheorie (Shore *et al.* 1957, Hogben *et al.* 1959). In Abhängigkeit vom vorliegenden pH-Wert und dem pK_A/pK_B -Wert einer Substanz liegen in Lösung ionisierte und nicht-ionisierte Form im Gleichgewicht vor. Ungeladene Moleküle können entsprechend ihrer Lipophilie ($\log P^5$) die Membranen passiv durchdringen. Bei basischen Arzneistoffen wie Clonidin, β -Phenylethylamin und Codein führt eine Erhöhung, bei sauren Arzneistoffen wie Valproinsäure hingegen eine Erniedrigung des luminalen pH zu einem höheren Anteil ungeladener Moleküle (Strukturen siehe Abbildung 1.1) und somit zu einer gesteigerten Permeation durch die Membran. Demzufolge würde die intestinale Resorption von Wirkstoffen, aber auch die Translokation durch die BHS zum ZNS, nur von der Dissoziationskonstante des Wirkstoffs und der Lipidlöslichkeit der undissoziierten Form abhängen. Lange glaubte man, die existierenden Transportproteine seien nur für die Translokation endogener Substrate wie Glucose, Aminosäuren, Nukleoside, wasserlösliche Hormone und Neurotransmitter von Bedeutung. Seit den 1970er Jahren wurden jedoch zunehmend spezifische membranständige Carrier identifiziert, die an der Resorption und Exkretion von Arzneistoffen beteiligt sind (Petzinger und Geyer 2006, Koepsell *et al.* 2007). Funktionelle Studien beschrieben aufwärts gerichtete Transportprozesse, die durch elektrochemische Gradienten, Symport- oder Antiportmechanismen⁶, das Membranpotential oder eine direkte Energieübertragung durch Spaltung von ATP angetrieben wurden. Anhand des Transportmechanismus unterteilt man die Transportsysteme in zwei Superfamilien: die der *ATP binding cassette* (ABC) Transporter und die der *Solute Carrier* (SLC und SLCO) (Shugarts und Benet 2009). Die Familie der ABC-Transporter umfasst ATP-abhängige polyspezifische Effluxsysteme wie das p-Glykoprotein (P-gp), *multidrug resistance* Proteine (MRPs) oder das *breast cancer resistance* Protein (BCRP). Physiologisch dienen sie dem

⁴Als *Endozytose* wird die Aufnahme von extrazellulärem Material in die Zelle durch Einstülpungen der Plasmamembran und Abschnürung von Endozytosevesikeln bezeichnet. Ursprünglich diente sie der unspezifischen Nahrungsaufnahme; in Zellen höherer tierischer Organismen hat sie vielfältige, zum Teil zellspezifische Aufgaben und erfolgt daher *rezeptorvermittelt*.

⁵Als Maß für die Lipophilie einer Substanz dient der Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizient ($\log P$), das Verhältnis der Konzentration der Substanz in nicht-ionisierter Form zwischen lipophiler und wässriger Phase.

⁶Man unterscheidet *Uniporter*, die in einem Zyklus nur *ein* Substrat transportieren, von *Cotransportern*, die gleichzeitig zwei oder mehr Substrate transportieren. Erfolgt der Transport in gleicher Richtung, spricht man von *Symport*, bei entgegengesetztem Transport von *Antiport*.

Schutz sensitiver und kritischer Gewebe vor Xenobiotika⁷. Pharmazeutisch betrachtet können sie die Bioverfügbarkeit der transportierten Arzneistoffe vermindern.

Pharmazeutisch-relevante Transporter gehören überwiegend der Genfamilie der SLC⁸ an (Shugarts und Benet 2009). Die SLC-Superfamilie umfasst Peptidtransporter (SLC15), Transporter für organische Kationen, Anionen oder Zwitterionen (SLC22, SLC44, SLCO), Monocarboxylat-Transporter (SLC16), Metalltransporter und viele andere (Koepsell *et al.* 2007, Shugarts und Benet 2009). Diese Transportsysteme weisen eine hohe Variabilität hinsichtlich Affinität und Substratumsatz auf. Sie haben in der Regel spezifische physiologische Funktionen, akzeptieren und transportieren jedoch zudem viele Arzneistoffe. So stellen viele β -Laktamantibiotika Substrate des intestinalen Peptidtransporters PEPT1 (SLC15A1) dar (Bretschneider *et al.* 1999). Die Vertreter der Transporter für organische Kationen/Zwitterionen (OCTs, OCTNs) akzeptieren hingegen verschiedenste kationische Wirkstoffe wie Chinidin oder Verapamil (Koepsell *et al.* 2007). Aufgrund des kationischen Charakters der in dieser Arbeit untersuchten Strukturen Clonidin, β -Phenylethylamin und Codein und des anionischen Charakters der Valproinsäure wird im Folgenden der Fokus auf Transportproteine für organische Kationen bzw. Anionen gesetzt.

Die Identifizierung epithelialer Transportproteine auf molekularer Ebene begann in den 1990er Jahren mit der Klonierung von OATPs aus der Leber sowie OATs und OCTs aus der Niere (Petzinger und Geyer 2006). In Säugetieren wurde 1994 als erstes Mitglied der SLC22-Familie der OCT1 von Ratten kloniert (Koepsell *et al.* 2007). Inzwischen wurden 25 humane Mitglieder identifiziert, zu denen unter anderen OAT1-4 (A6-8,11), OCT1-3 (A1-3) und OCTN1-2 (A4-5) zählen. Tabelle 2.1 zeigt eine Übersicht über pharmazeutisch relevante Transporter für organische Kationen. Substrate dieser Carrier sind hauptsächlich schwache Basen, die bei physiologischem pH geladen vorliegen (Koepsell *et al.* 2007). Dazu zählen endogene Substanzen, aber auch Xenobiotika wie das Neurotoxin *N*-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) und Modellsubstanzen wie Tetraethylammonium (TEA). In humanem Dünndarmgewebe wurde ebenso wie in Caco-2-Zellen die mRNA von OCT1, OCT3, OCTN1 und OCTN2 nachgewiesen (Nishimura und Naito 2005, Seithel *et al.* 2006).

⁷Xenobiotika sind chemische Substanzen, die dem Stoffwechsel des betreffenden Organismus fremd sind.

⁸Die SLC-Superfamilie umfasst derzeit 48 Familien mit insgesamt 368 Mitgliedern (inklusive SLCO). Die Klassifizierung erfolgte durch das HUGO (human genome organisation) Nomenklatur Komitee (HGNC). Eine komplette Übersicht ist unter <http://www.bioparadigms.de> zu finden.

Tabelle 2.1. Pharmazeutisch-relevante Transporter für organische Kationen.

Transporter		Gewebe/Zelllinie ^a	Charakteristika	Substrate ^a	Inhibitoren ^a	Referenzen ^b
hOCT1	SLC22A1	Leber , Dünndarm, Hirn u.a. Epithelzellen, Tumorzellen u.a.	elektrogen abhängig vom Membranpotential (indirekt pH-abhängig)	MPP ⁺ , TEA, Cholin, Agmatin, Chinidin, Chinin	Dopamin, Serotonin, Atropin, Diphenhydramin, Clonidin, Verapamil, Kokain, Desipramin, <i>D</i> -Amphetamin	
hOCT2	SLC22A2	Niere , Dünndarm, Hirn u.a. Neuronen, Tumorzellen, Epithelzellen u.a.	elektrogen abhängig vom Membranpotential (indirekt pH-abhängig) bidirektional	MPP ⁺ , TEA, Cholin, Agmatin, Dopamin, Serotonin, Chinin	Atropin, Diphenhydramin, Clonidin, Verapamil, Kokain, Desipramin, <i>D</i> -Amphetamin	
hOCT3 (hEMT)	SLC22A3	Leber, Plazenta, Herz , Dünndarm, Hirn u.a. Epithelzellen, Neuronen, Tumorzellen u.a.	elektrogen abhängig vom Membranpotential (indirekt pH-abhängig) bidirektional	MPP ⁺ , TEA, Agmatin, Atropin	Corticosteron, Cholin, Dopamin, Serotonin, Clonidin, Chinin, Desipramin, <i>D</i> -Amphetamin	
hOCTN1 (hETT)	SLC22A4	Trachea, Niere , Dünndarm, Hirn u.a. Epithelzellen u.a.	Kation/H ⁺ -Antiport elektroneutral bidirektional	Ergothionein, TEA, <i>L</i> -Carnitin, Chinidin, Pyrilamin, Verapamil	Cholin, <i>D</i> -Carnitin, Clonidin, Chinin	
hOCTN2	SLC22A5	Leber, Niere, Herz , Dünndarm, Hirn u.a. Epithelzellen u.a.	Na ⁺ / <i>L</i> -Carnitin-Cotransport: hochaffin, stereospezifisch elektrogen Kationen-Transport: Na ⁺ -unabhängig	<i>L</i> -Carnitin, <i>D</i> -Carnitin, TEA, Cholin, Pyrilamin, Verapamil, Chinidin	MPP ⁺ , Corticosteron, Betain, Clonidin	
PMAT (hENT4)	SLC29A4	Skelettmuskeln, Gehirn , Leber, Niere, Herz	pH-abhängig stimuliert durch auswärts gerichteten H ⁺ -Gradienten	MPP ⁺ , TEA, Serotonin, Dopamin, Guanidin, Histamin	Tryptamin, Chinin, Chinidin, Clonidin, Verapamil	Engel und Wang 2005 Xia <i>et al.</i> 2007
hCHT1	SLC5A7	Cholinerge Neuronen	hochaffin Na ⁺ - und Cl ⁻ -abhängig	Cholin	Hemicholinium-3, Acetylcholin	Okuda and Haga 2000 Apparsundaram <i>et al.</i> 2000
hCTL1	SLC44A1	Plazenta, Gehirn , Herz, Dünndarm, Niere, Haut, Leber u.a.	Na ⁺ -unabhängig stimuliert durch H ⁺ -Gradient	Cholin	Hemicholinium-3, Clonidin, Chinin, Chinidin, Desipramin, Diphenhydramin, Verapamil	Hoffmann <i>et al.</i> 2002 Inazu <i>et al.</i> 2005 Michel <i>et al.</i> 2006 Kouji <i>et al.</i> 2009
hMATE1	SLC47A1	Leber, Niere , Skelettmuskel , Herz	Effluxsystem, organische Kationen/H ⁺ -Antiport bidirektional	TEA, MPP ⁺ , Cimetidin, Kreatinin, Procainamid, Cephalexin	Cholin, Serotonin, Verapamil, Procainamid, Chinidin, Levofloxacin, Ciprofloxacin	Tanihara <i>et al.</i> 2007

Transporter		Gewebe/Zelllinie ^a	Charakteristika	Substrate ^a	Inhibitoren ^a	Referenzen ^b
H ⁺ /tertiäre Amine-Antiporter		Dünndarm	H ⁺ -Antiport Na ⁺ -unabhängig	Diphenhydramin, Chlorphenamin, Procainamid	Chlorphenamin, Procainamid, Imipramin	Mizuuchi <i>et al.</i> 1999, 2000 Katsura <i>et al.</i> 2000
H ⁺ -Antiporter?		Haut, Plazenta, BHS, Intestinum	pH-abhängig stimuliert durch auswärts gerichteten H ⁺ -Gradienten	Clonidin	Diphenhydramin, Chlorphenamin	Grafe <i>et al.</i> 2004 Müller <i>et al.</i> 2004 Huwylar <i>et al.</i> 1997 André <i>et al.</i> 2009
H ⁺ -Antiporter?		Dünndarm	pH-abhängig stimuliert durch auswärts gerichteten H ⁺ -Gradienten	Methylenmethamphetamin	Methamphetamin, Diphenhydramin, Clonidin, Phenylethylamin, Tyramin	Kuwayama <i>et al.</i> 2008
H ⁺ -Antiporter		Retinapigmentepithel	H ⁺ -Antiport Na ⁺ -unabhängig	Verapamil	Chinidin, Pyrilamin, Diphenhydramin	Han <i>et al.</i> 2001
„Pyrilamin-Transporter“, „Oxycodon-Transporter“		BHS	H ⁺ -Antiport energieabhängig	Mepyramin (Pyrilamin), Oxycodon	Chlorphenamin, Diphenhydramin, Propranolol, Imipramin, Amitryptilin, Chinidin, Verapamil	Yamazaki <i>et al.</i> 1994b Okura <i>et al.</i> 2008 Nakazawa <i>et al.</i> 2009
H ⁺ /organische Kationen-Antiporter		BHS	H ⁺ -Antiport	Naloxon	Propranolol, Pethidin, Pyrilamin, Diphenhydramin	Suzuki <i>et al.</i> 2010

^aDie Tabelle stellt keine vollständige Übersicht der aktuellen Datenlage dar. Sie enthält lediglich die für diese Arbeit relevanten Informationen. Vor allem Substrate und Inhibitoren werden nur beispielhaft aufgelistet.

^bÜbersichtsartikel zu den Organische Kationen/Zwitterionen Transportern (OCT und OCTN/SLC22) und den *multidrug and extrusion exchangers* (MATE/SLC47): Koepsell *et al.* 2007, Klaassen und Aleksunes 2010.

OCT3, OCTN1 und OCTN2 sind in der apikalen Membran von Enterozyten exprimiert, OCT1 hingegen in der basolateralen Membran (Shugarts und Benet 2009). Müller und Mitarbeitern zufolge wird auch OCT2 in der Enterozytenmembran exprimiert (Müller *et al.* 2005). In menschlichem Hirngewebe wurde die mRNA von OCT1-3 sowie von OCTN1-2 nachgewiesen (Nishimura und Naito 2005); speziell in den Endothelzellen der BHS werden anscheinend OCT1 und OCT2 exprimiert (Lin *et al.* 2010). Neben den auf molekularer Ebene bekannten *multidrug and toxin extrusion* (MATE) H⁺-Antiportern wurde auf funktioneller Ebene die Aktivität weiterer H⁺-Antiportmechanismen beschrieben: die Translokation von tertiären Aminen wie Diphenhydramin, von Clonidin oder Verapamil durch diverse Epithelien wird teilweise durch H⁺-Antiporter vermittelt (Tabelle 2.1; Mizuuchi *et al.* 1999, Huwyler *et al.* 1997, Han *et al.* 2001). Andere Studien zeigten, dass der Transport von kationischen Arzneistoffen wie 3,4-Methylen-dioxy-methamphetamin (MDMA) oder Pyrilamin und Oxycodon durch einen auswärts gerichteten H⁺-Gradienten stimuliert wird (Tabelle 2.1; Kuwayama *et al.* 2008, Okura *et al.* 2008).

Tabelle 2.2 zeigt eine Übersicht über pharmazeutisch-relevante Transporter für organische Anionen. Dazu zählen unter anderen die Familien der OATs (SLC22), der OATPs (SLCO) und der MCTs (SLC16). 1994 wurde der OAT2 als erstes Mitglied der zur SLC22 Familie zählenden OATs aus Rattenleber kloniert (Srimaroeng *et al.* 2008). Inzwischen sind sieben humane Vertreter identifiziert worden (hOAT1-7). Sie vermitteln den Transport diverser organischer Anionen wie *p*-Aminohippurat (PAH), Estronsulfat oder nicht-steroidaler Antiphlogistika (Koepsell und Endou 2004, Srimaroeng *et al.* 2008). Der Transport von Gallensäuresalzen, Schilddrüsenhormonen, Herzglykosiden und anderen Arzneistoffen wird von Mitgliedern der Superfamilie der OATPs (SLCO/SLC21⁹) vermittelt (Hagenbuch und Meier 2004). Das Expressionsmuster der insgesamt 11 identifizierten humanen OATPs variiert. An der apikalen Seite humaner Enterozyten sind OATP1A2 und OATP2B1 lokalisiert, an der basolateralen hingegen OATP3A1 und OATP4A1 (Shugarts und Benet 2009). In Caco-2-Zellen wurde ebenfalls die mRNA von OATP2B1 nachgewiesen (Seithel *et al.* 2006). Endothelzellen der BHS exprimieren apikal OATP1A5 und basolateral OATP1A4 sowie OATP2B1 (Klaassen und Aleksunes 2010). Die dritte große Familie Anionen transportierender Proteine stellen die MCTs dar, die die Genfamilie SLC16 bilden. Sie besteht aus 14 Mitgliedern, die sowohl Influx- als auch Effluxprozesse vermitteln.

⁹Nach der ursprünglichen Einteilung gehörten die OATPs zur Familie der SLC21. Einer aktualisierten phylogenetischen Klassifizierung und Nomenklatur entsprechend bilden sie die Superfamilie SLCO. Sie umfasst 6 Familien, die insgesamt in 13 Unterfamilien unterteilt sind (Hagenbuch und Meier 2004).

Tabelle 2.2. Pharmazeutisch-relevante Transporter für organische Anionen.

Transporter	Gewebe/Zelllinie ^a	Charakteristika	Substrate ^a	Inhibitoren ^a	Referenzen ^{b,c}	
hMCT1	SLC16A1	ubiquitär Gehirn	H ⁺ -Cotransport oder Monocarboxylat-Antiport bidirektional	Lactat, Pyruvat, Acetat, Benzoat, Propionat, β-, γ-Hydroxybutyrat	Phloretin, α-Cyano-4- hydroxycinnamat (CHC), Stilbendisulfonate (DIDS)	
hMCT2	SLC16A7	Gehirn, Niere u.a.	H ⁺ -Cotransport	Pyruvat, Lactat, Ketonkörper	CHC, DIDS	
hMCT3	SLC16A8	Retinalpigmentepithel, Choroid plexus u.a.	H ⁺ -Cotransport	Lactat		
hMCT4	SLC16A3	Gehirn, Plazenta, Herz u.a.	H ⁺ -Cotransport	Lactat, Pyruvat, Ketonkörper	schwach CHC, DIDS	Merezhinskaya und Fishbein 2009
hMCT5	SLC16A4	Gehirn, Darm, Leber, Niere u.a.	<i>orphan</i>	?		
hMCT6	SLC16A5	Niere, Gehirn, Darm, Herz u.a.	abhängig vom pH und vom Membranpotential	Bumetanid, Probenecid, Nateglinid	Furosemid, Torasemid, Glibenclamid	Murakami <i>et al.</i> 2005
hMCT7	SLC16A6	Gehirn, Pankreas, Muskel	<i>orphan</i>	?		
hMCT8 (XPCT)	SLC16A2	Leber, Darm, Gehirn u.a.	erleichterter Transport Na ⁺ - und H ⁺ -unabhängig	Schilddrüsenhormone T3, T4		Merezhinskaya und Fishbein 2009
hMCT9	SLC16A9	Endometrium, Niere, Gehirn u.a.	<i>orphan</i>	?		
hMCT10 (TAT1)	SLC16A10	Niere, Darm, Herz u.a.	erleichterter Transport Na ⁺ - und H ⁺ -unabhängig	aromatische Aminosäuren, <i>L</i> -DOPA, Iodothyronine		Merezhinskaya und Fishbein 2009
hMCT11	SLC16A11	Lunge, Choroid plexus u.a.	<i>orphan</i>	?		
hMCT12	SLC16A12	Niere	<i>orphan</i>	?		
hMCT13	SLC16A13	Brust, Knochenmark	<i>orphan</i>	?		
hMCT14	SLC16A14	Gehirn, Choroid plexus, Herz u.a.	<i>orphan</i>	?		
hSMCT	SLC5A8, A12	Niere, Darm	Na ⁺ -Cotransport	kurzkettige Monocarboxylate		
hOAT1	SLC22A6	Niere, Skelettmuskel, Gehirn, Plazenta	organische Anionen/Dicarboxylat- Antiport	<i>p</i> -Aminohippursäure (PAH), Salicylat, Acetylsalicylat, Prostaglandine (PG) E ₂ und F _{α2}	Probenecid, diverse Antibiotika, Vitamine u.a.	
hOAT2	SLC22A7	Leber, Niere	Na ⁺ -unabhängig	PAH, PG E ₂ und F _{α2} , Salicylat, Acetylsalicylat	Diclofenac, Ibuprofen, Erythromycin	
hOAT3	SLC22A8	Leber, Gehirn, Niere, Auge	organische Anionen/Dicarboxylat- Antiport	PAH, <i>L</i> -Carnitin, Estronsulfat, Cimetidin	Probenecid, diverse Antibiotika, Antihistaminika u.a.	

Transporter		Gewebe/Zelllinie ^a	Charakteristika	Substrate ^a	Inhibitoren ^a	Referenzen ^{b,c}
hOAT4	SLC22A11	Niere, Plazenta	hochaffin Na ⁺ -unabhängig	PAH, Estronsulfat, PG E ₂ und F _{α2}	diverse Cephalosporin- antibiotika, Diuretika u.a.	
hOAT10	SLC22A13	Niere, Gehirn, Herz, Darm	pH-abhängig, Antiport gegen OH ⁻ , Glutathion u.a.	Nikotinat, PAH, Urat	Estronsulfat, Probenecid	Bahn <i>et al.</i> 2008
hOATPs	SLCO	diverse	Na ⁺ -unabhängig partiell HCO ₃ ⁻ -Antiport	Gallensäuren, cyclische Peptide, Herzglykoside, Steroide, Statine, Thyroxin u.a.	diverse Arzneistoffe	Hagenbuch und Meier 2004
hAE1	SLC4A1	Erythrozyten, Niere, Herz, Kolon	Cl ⁻ /HCO ₃ ⁻ -Antiport	HCO ₃ ⁻ , OH ⁻ , monovalente Anionen	DIDS	Romero <i>et al.</i> 2004
hAE2	SLC4A2	Epithelzellen u.a.	Cl ⁻ /HCO ₃ ⁻ -Antiport	HCO ₃ ⁻ , anorganische Anionen, Benzoat, Nikotinat, Butyrat, Valproat	DIDS	Yabuuchi <i>et al.</i> 1998 Romero <i>et al.</i> 2004
hAE3	SLC4A3	Gehirn, Darmepithel, Herz u.a.	Cl ⁻ /HCO ₃ ⁻ -Antiport	HCO ₃ ⁻ , monovalente Anionen	DIDS	Romero <i>et al.</i> 2004

^aDie Tabelle stellt keine vollständige Übersicht der aktuellen Datenlage dar. Sie enthält lediglich die für diese Arbeit relevanten Informationen. Vor allem Substrate und Inhibitoren werden nur beispielhaft aufgelistet.

^bÜbersichtsartikel zu den Monocarboxylat-Transportern (MCT/SLC16): Halestrap und Meredith 2004, Morris und Felmler 2008.

^cÜbersichtsartikel zu den Organische Anionen Transportern (OAT/SLC22) und den Organische Anionen transportierenden Polypeptiden (OATP/SLCO): Koepsell und Endou 2004, Srimaroeng *et al.* 2008, Klaassen und Aleksunes 2010.

Die Isoformen weisen jeweils eigene Expressionsmuster, biologische Eigenschaften und Transportcharakteristika auf (Enerson und Drews 2003, Merezhinskaya und Fishbein 2009): MCT1-4 werden durch einen H^+ - bzw. Substratgradienten angetrieben und transportieren aliphatische Monocarboxylate wie Lactat, Pyruvat, kurzkettige Fettsäuren oder Ketonkörper. MCT6, MCT8 und MCT10 arbeiten hingegen unabhängig von dem Vorhandensein eines H^+ -Gradienten und weisen eine vollständig abweichende Substratspezifität auf (Tabelle 2.2). Zu ihren Substraten zählen Arzneistoffe wie Bumetanid, Thyroidhormone oder aromatische Aminosäuren. Bei MCT5, MCT7, MCT9 und MCT11-14 handelt es sich um sogenannte *orphan* Transporter¹⁰. Im menschlichen Dünndarm wurde die Expression von MCT1 sowie MCT3-5 gezeigt (Gill *et al.* 2005); MCT3-5 wurden an der basolateralen Membran gefunden. Die Lokalisation von MCT1 wird jedoch widersprüchlich diskutiert. Gill und Mitarbeiter zeigten, dass MCT1 im humanen Intestinum und in Caco-2-Zellen apikal exprimiert wird, andere Autoren favorisierten die basolaterale Expression (für eine Übersicht siehe Thwaites und Anderson 2007). Caco-2-Zellen exprimieren neben MCT1 in geringerem Umfang MCT3-6 (Hadjigapiou *et al.* 2000, Gill *et al.* 2005, Morris und Felmler 2008). Im Gehirn wurden MCT1, MCT2 und MCT4 nachgewiesen (Pierre und Pellerin 2005). MCT1 wird verstärkt in Endothelzellen der Kapillargefäße exprimiert, während MCT4 vornehmlich in Astrozyten lokalisiert ist.

¹⁰Als *orphan* Transporter bezeichnet man Carrier, deren molekulare Identität bekannt ist, über deren Funktionalität jedoch bislang noch keine Kenntnisse vorliegen.

3 TRANSPORT VON CLONIDIN IN NEUROBLASTOMZELLEN (SH-SY5Y)

Vgl. Anlage 11.1 (Fischer *et al.* 2007)

3.1 Allgemeine Aspekte

Clonidin wurde erstmals 1966 als Imidazolinderivat synthetisiert. Der Arzneistoff agiert als partieller Agonist an peripheren und zentralen α_2 -adrenergen Rezeptoren (Guyenet 1997). Zusätzlich bindet Clonidin agonistisch an I₁- und I₂-Imidazolinbindungsstellen (IBS), den sogenannten Imidazolin-Rezeptoren (Guyenet 1997, Regunathan und Reis 1996). Die Stimulation dieser zentralen Rezeptoren führt zu einer Erniedrigung des Sympathikonus im menschlichen Organismus. Der Arzneistoff besitzt ein breites Indikationsspektrum, das unter anderem die Therapie opiat-, nikotin- und alkoholbedingter Entzugssymptome umfasst (Kotlyar und Hatsukami 2002). Hauptsächlich wird Clonidin jedoch zur Behandlung der arteriellen Hypertonie eingesetzt (Mansoor und Frishman 2002). Neben meist peroralen oder intravenös applizierten Arzneiformen werden für die Therapie mit Clonidin auch transdermale therapeutische Systeme¹¹ eingesetzt (Burriss 1993). Nach peroraler Gabe wird der Arzneistoff schnell resorbiert und ist zu über 65 % bioverfügbar¹².

Der peroralen oder dermalen Applikation folgt die Freisetzung aus der entsprechenden Arzneiform. Um im Organismus wirksam zu werden, muss der Arzneistoff im Anschluss verschiedene Barrieren überwinden. Die Resorption des Clonidins durch das Epithel des Dünndarms bzw. die Penetration durch das *Stratum corneum*¹³ stellt den ersten Schritt dar. Eine Bindung an die Zielrezeptoren im ZNS kann wiederum erst nach dem Durchdringen der BHS erfolgen. Erstmals demonstrierten Huwyler und Mitarbeiter 1997 an aus Schweinehirnkapillaren isolierten Endothelzellen, dass ein sättigbarer Na⁺-unabhängiger, jedoch stark pH-abhängiger Prozess in den Transport des Clonidins involviert ist. In Studien an humanen Keratinozyten (HaCaT; Grafe *et al.* 2004) sowie an Epithelzellen der Plazenta (JEG3; Müller *et al.* 2004) und des Intestinums (Caco-2; Fischer *et al.* 2006) wurden vergleichbare Transportcharakteristika beobachtet. Jüngsten Untersuchungen zufolge ist ein H⁺-gekoppelter reversibel arbeitender Antiporter für den Clonidintransport an der BHS verantwortlich (André *et al.* 2009). Neben passiven Diffusionsvorgängen sind demnach sättigbare Carrier-vermittelte

¹¹Die mittlere Tagesgesamtosis für Clonidin beträgt 0,075-0,6 mg. In Deutschland ist derzeit kein Clonidin-haltiges transdermales therapeutisches System (TTS) auf dem Markt, in den USA wird jedoch das Präparat Catapres-TTS[®] eingesetzt (Boehringer Ingelheim; Burriss 1993).

¹²Den Fachinformationen der Präparate Haemiton[®] (AWD Pharma, Deutschland) und Catapresan[®] (Boehringer Ingelheim, Deutschland) entsprechend beträgt die orale Bioverfügbarkeit von Clonidin 75-100 % bzw. 65-100 %. Maximale Plasmakonzentrationen werden nach 1-2 h erreicht.

¹³Die Hornschicht (*Stratum corneum*) stellt bei der Permeation durch die Haut die Hauptresorptionsbarriere dar.

Prozesse an der epithelialen bzw. endothelialen Translokation des Clonidins beteiligt. Ist die Permeation durch die BHS erfolgt, kann Clonidin an die entsprechenden neuronalen Zielrezeptoren binden. Die anschließende Elimination des Arzneistoffs aus der interneuronalen Flüssigkeit verhindert eine Anreicherung sowie mögliche Intoxikationen. Die Aufnahme des Clonidins in die Neuronen könnte zu dieser interstitiellen Elimination beitragen. In den Nervenzellen sind intrazelluläre I₂-Bindungsstellen lokalisiert (Regunathan und Reis 1996). Interaktionen des neuronal aufgenommenen Clonidins mit diesen Rezeptoren sind daher wahrscheinlich. Zudem erfolgen vermutlich Abbauprozesse sowie ein Abtransport der Substanz. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Aufnahme des Clonidins an Neuronen untersucht.

3.2 Literaturbefunde zum Clonidintransport an der Blut-Hirn-Schranke und am Dünndarmepithel

Den thematischen Ansatz dieser Dissertation bildeten die Studien der Arbeitsgruppe um Huwyler zur Translokation des Clonidins durch die BHS (Huwyler *et al.* 1997) sowie darauf aufbauende eigene Vorarbeiten zum Transport des Clonidins am Dünndarmepithel (Fischer *et al.* 2006). Die Transportcharakteristika wiesen an beiden Barrieren starke Übereinstimmungen auf: An Endothelzellen von Schweinehirnkapillaren (Huwyler *et al.* 1997) sowie an humanen intestinalen Caco-2-Zellen (Fischer *et al.* 2006) beruhte der transepitheliale Transport des Clonidins sowohl auf passiver Diffusion als auch auf Carrier-vermittelten Prozessen. Die Aufnahme des Clonidins verlief Na⁺-unabhängig, jedoch stark pH-abhängig. Eine extrazelluläre Alkalisierung erhöhte die Aufnahme. An Caco-2-Zellen wurde zudem demonstriert, dass nicht die extrazelluläre H⁺-Konzentration *per se*, sondern ein nach außen gerichteter H⁺-Gradient die treibende Kraft für die Clonidinaufnahme darstellt (Fischer *et al.* 2006). Die Michaelis-Konstante (K_t) des sättigbaren Clonidintransportes, ein Maß für die Affinität eines Substrates zu einem spezifischen Transportsystem, betrug 1,34 mM an der BHS (Huwyler *et al.* 1997) bzw. 0,54 mM am Dünndarm (Fischer *et al.* 2006). Viele Xenobiotika wie Guanabenz, Methamphetamin, Imipramin, Chinin oder Diphenhydramin reduzierten die aufgenommene Menge Clonidin in Caco-2-Zellen (Fischer *et al.* 2006). Hingegen hatten die typischen Substrate der Transporter für organische Kationen wie TEA, MPP⁺ und Cholin (Tabelle 2.1) keinen signifikanten Einfluss.

Die starke Ähnlichkeit der Mechanismen des Clonidintransportes an der BHS und am Dünndarm lassen vermuten, dass es sich um identische Systeme handelt. Desgleichen ist eine

Identität mit den funktionell an Caco-2-Zellen beschriebenen H⁺/tertiäre Amine-Antiportern nicht auszuschließen (Mizuuchi *et al.* 1999, 2000).

3.3 Mechanismus des Clonidintransportes in SH-SY5Y-Zellen

Um festzustellen, ob ein den oben erwähnten Mechanismen verwandtes Transportsystem für Clonidin in Neuronen existiert, wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst der Mechanismus der Clonidinaufnahme in humane Neuroblastomzellen untersucht. Hierfür wurde die Aufnahme von [³H]-markiertem Clonidin in SH-SY5Y-Zellen gemessen, die zuvor 4 Tage in Gewebekulturschalen kultiviert worden waren. In Analogie zum Clonidintransport an der Haut, der BHS und dem Intestinum (Grafe *et al.* 2004, Huwyler *et al.* 1997, André *et al.* 2009, Fischer *et al.* 2006) beeinflussten weder die Abwesenheit von extrazellulärem Na⁺ oder K⁺ noch von Cl⁻ die [³H]Clonidinaufnahme in SH-SY5Y-Zellen. Hingegen führte eine Erniedrigung des extrazellulären pH-Wertes (pH_o) von 7,5 auf 6,0 zu einer um das 7-fache verminderten [³H]Clonidinaufnahme (**Anlage 11.1**: Fischer *et al.* 2007, Fig. 2). Diese pH-Abhängigkeit könnte möglicherweise auf passiver Diffusion entsprechend der pH-Partitionstheorie beruhen. Der Anteil des undissoziierten Clonidins beträgt bei pH 6,0, 7,5 und 8,5 jeweils 0,7 %, 17 % und 68 % (pK_a 8,2; Remko *et al.* 2006). Die Aufnahme des Clonidins bei pH_o 7,5 und 8,5 war jedoch vergleichbar. Überdies war eine intrazelluläre Akkumulation des Clonidins zu beobachten, die nicht allein durch Diffusion zu erreichen ist. Diese intrazelluläre Akkumulation wurde wie folgt ermittelt: Die [³H]Clonidinaufnahme in SH-SY5Y-Zellen stieg mit zunehmender Inkubationsdauer an; nach 20 Minuten war ein Maximum von 2,7 pmol pro mg Protein erreicht (**Anlage 11.1**: Fischer *et al.* 2007, Fig. 1). Das totale Zellvolumen der SH-SY5Y-Zellen¹⁴ betrug 18,2 µl pro mg Protein. Das zugängliche intrazelluläre Volumen, ermittelt anhand der Aufnahme eines nicht metabolisierten Glucosederivates¹⁵, betrug 12,6 µl pro mg Protein. Ausgehend von der Gesamtkonzentration des [³H]Clonidins im Inkubationspuffer von 3 nM entsprechen die berechneten intrazellulären Konzentrationen von 145-210 nM einer 50-70-fachen Akkumulation. Betrachtet man nur den Anteil undissoziierten Clonidins, wurde intrazellulär eine Konzentration von 13-20 nM beobachtet. Die Konzentration im Puffer betrug 0,5 nM. Auf diesem Wege

¹⁴Das totale Zellvolumen der SH-SY5Y-Zellen wurde mit dem CASY[®]TT Zellzähler bestimmt. Das zugrunde liegende Messprinzip beruht auf der Messung des Widerstandes der angesaugten Zellsuspension mittels elektronischer Pulsflächenanalyse.

¹⁵SH-SY5Y-Zellen wurden bis zum Konzentrationsausgleich mit 3-O-[¹⁴C]-Methyl-D-Glucose, einem nicht metabolisierten Glucosederivat, inkubiert (**Anlage 11.1**: Fischer *et al.* 2007). Auf diese Weise kann das - für H₂O bzw. hydrophile Substanzen - zugängliche intrazelluläre Volumen der Zellen bestimmt werden.

berechnet resultiert ebenfalls eine starke, nicht ausschließlich durch reine Diffusion zu erklärende Akkumulation. Es ist allerdings zu beachten, dass die durchgeführten Kalkulationen eine mögliche zelluläre Retention nicht berücksichtigen. Diese könnte zum Teil auf spezifischer oder unspezifischer Bindung an Lipide und Proteine oder auf elektrostatischer Bindung an geladene Strukturen beruhen (Heikkinen *et al.* 2009). Die Verteilung innerhalb der Zellen wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst und variiert stark. Daher bleibt die tatsächliche Konzentration an freiem Clonidin im Cytosol ungewiss. In den Zellen befinden sich saure Organellen, vorwiegend Lysosomen, mit einem pH-Wert von etwa 4,5 bis 5,0 (Heikkinen *et al.* 2009, Kornhuber *et al.* 2010). Der cytosolische pH-Wert liegt im Neutralen (pH \sim 7,1; Lu *et al.* 2010). Durch den entstehenden H^+ -Gradienten kann eine lysosomale Sequestrierung erfolgen, das heißt, insbesondere basische Substanzen werden gemäß der pH-Partitionstheorie durch den Effekt der sogenannten Ionenfalle¹⁶ in den Zellorganellen angereichert (Trapp *et al.* 2009). Dieses Phänomen wird auch als *Lysosomotropismus* bezeichnet, die betreffenden Strukturen, Amingruppen enthaltende schwach basische Substanzen, als *lysosomotrop* (De Duve *et al.* 1974, Kornhuber *et al.* 2010). Einer Studie an neuronalen SY5Y-Zellen zufolge werden Substanzen mit ansteigender Lipophilie verstärkt akkumuliert (Kornhuber *et al.* 2010). Die akkumulierten Substanzen werden zum Teil in die lysosomale Membran eingelagert und können deren Permeabilität erhöhen. Eine steigende Substratkonzentration führt so zu einer Verminderung der lysosomalen Akkumulation, unabhängig von einer Änderung des intralysosomalen pH oder einer Volumenveränderung. Das intralysosomale Volumen ist zwar im Verhältnis zum gesamten Zellvolumen relativ gering (1:200; De Duve *et al.* 1974¹⁷), jedoch kann die lysosomale Akkumulation schwacher Basen 100-fach und höher sein (Kornhuber *et al.* 2010). Dies entspricht einer etwa 50 %igen Retention der intrazellulär aufgenommenen Substanz in den Lysosomen. In Caco-2-Zellen führte eine Hemmung der lysosomalen Sequestrierung durch Abschwächen des intrazellulären pH-Gradienten zu einer bis zu 50 % verminderten Aufnahme an Propranolol (pK_a 9,1; Heikkinen *et al.* 2009). In der Annahme eines vergleichbaren Effektes für die Clonidinaufnahme in SH-SY5Y-Zellen resultierte eine 25-35-fache intrazelluläre Akkumulation. Diese Anreicherung übersteigt die

¹⁶Ungeladene Substanzteilchen diffundieren in die Lysosomen und werden dort aufgrund des sauren Milieus entsprechend der Basenstärke der Substanz anteilig protoniert. Daraus resultieren eine gesteigerte Hydrophilie der Teilchen und eine dadurch stark verlangsamte Rückdiffusion in das Cytosol (De Duve *et al.* 1974, Trapp *et al.* 2009). Dieser Effekt wird als Ionenfalle (*ion trapping*) bezeichnet und betrifft vor allem schwach basische Substanzen mit einem pK_a von 6 bis 10 (Trapp *et al.* 2009).

¹⁷Das Verhältnis zwischen dem intralysosomalen und dem gesamten Zellvolumen von 1:200 wurde an Leberzellen und Fibroblasten von Ratten bestimmt (De Duve *et al.* 1974). In der Literatur werden diese Parameter jedoch allgemein auf lebende Zellen übertragen (Trapp *et al.* 2009, Kornhuber *et al.* 2010).

entsprechend der pH-Partitionstheorie zu erwartende bei weitem. Überdies wurde kürzlich gezeigt, dass in Caco-2-Zellen ein stereospezifischer Carrier-vermittelter Mechanismus am Transport des kationischen Wirkstoffs Propranolol beteiligt ist (Wang *et al.* 2009). Es ist daher unwahrscheinlich, dass die Akkumulation ausschließlich auf pH-Partition in Abhängigkeit von Lipophilie und Basenstärke des Substrates beruht.

In Wettbewerbsstudien wurde die [³H]Clonidinaufnahme in SH-SY5Y-Zellen in Anwesenheit steigender Konzentrationen unmarkierten Substrates untersucht. Die lineare, nicht-sättigbare Transportkomponente, beruhend auf einfachen Diffusionsvorgängen und unspezifischer Bindung des [³H]Clonidins, betrug 6 % der totalen Aufnahme (**Anlage 11.1**: Fischer *et al.* 2007, Fig. 3). Die Anreicherung des Clonidins war folglich in hohem Maße sättigbar, V_{\max} betrug 218 ± 47 nmol/min pro mg Protein. Die an neuronalen SH-SY5Y-Zellen ermittelte Michaelis-Konstante (K_t) des Clonidintransportes betrug $0,7 \pm 0,1$ mM. Der K_t -Wert stimmt mit den an der BHS (Huwyler *et al.* 1997, André *et al.* 2009), an humanen Keratinozyten (Grafe *et al.* 2004) sowie an Plazenta- (Müller *et al.* 2004) und intestinalen Epithelzellen (Fischer *et al.* 2006) ermittelten K_t -Werten von 0,3-1,1 mM überein. Die neuronale Aufnahme, der letzte Schritt der Translokation des Clonidins im Organismus, wird demnach analog zur dermalen oder intestinalen Resorption und zur Permeation durch die BHS durch einen sättigbaren Na^+ -unabhängigen, jedoch H^+ -abhängigen Prozess vermittelt.

3.4 Einfluss potentieller Inhibitoren auf den [³H]Clonidintransport in SH-SY5Y-Zellen

Eine mögliche Ursache für Interaktionen von Arzneistoffen ist das Konkurrieren um Bindungsstellen wie Rezeptoren oder Transportproteine. Daher wurde der Einfluss anderer Arzneistoffe und endogener Substanzen wie Aminosäuren und biogene Amine auf die Clonidinaufnahme an SH-SY5Y-Zellen untersucht (**Anlage 11.1**: Fischer *et al.* 2007, Tabelle 1). Verschiedene Wirkstoffe wie Guanabenz, Imipramin, Diphenhydramin, Codein oder Chinin sowie das Spurenamin β -Phenylethylamin reduzierten die Clonidinaufnahme in SH-SY5Y-Zellen. Sie stellen somit unspezifische oder spezifische Inhibitoren oder möglicherweise Substrate dar. Für drei ausgewählte Inhibitoren wurden anhand von Wettbewerbsstudien Inhibitorkonstanten (K_i)¹⁸ als carrier- und substratspezifisches Maß für die Affinität

¹⁸In Wettbewerbsstudien wurde die [³H]Clonidinaufnahme in SH-SY5Y-Zellen in Anwesenheit steigender Inhibitorkonzentrationen gemessen. Aus den resultierenden Hemmkurven wurden die IC_{50} -Werte bestimmt. Unter Annahme einer kompetitiven Hemmung wurden anschließend die inhibitorischen Konstanten (K_i) berechnet; diese Parameter sind von der eingesetzten Substratkonzentration unabhängig.

der Inhibitoren zum Transportsystem bestimmt. Die K_i -Werte für Maprotilin, Chinin und Imipramin von $0,33 \pm 0,03$ mM, $0,57 \pm 0,01$ mM und $0,38 \pm 0,02$ mM lagen im Bereich der an Caco-2-Zellen ermittelten Affinitäten (Fischer *et al.* 2006). Auffällig war, dass weder TEA, MPP^+ noch Cholin die [3H]Clonidinaufnahme in SH-SY5Y-Zellen signifikant beeinflussten. Daher konnte eine Beteiligung des hCTL1 und des hCHT1, des PMAT sowie der OCTs, OCTNs oder MATE-Transporter ausgeschlossen werden (Tabelle 2.1; Koepsell *et al.* 2007, Engel und Wang 2005). Die Clonidinaufnahme in SH-SY5Y-Zellen ist hinsichtlich Transportmechanismus und Spezifität der inhibitorischen Substanzen vergleichbar mit der Clonidinaufnahme in Caco-2-Zellen (Fischer *et al.* 2006). An Neuronen, der BHS, der Haut, der Plazenta und am Dünndarm könnten somit identische Systeme für die Clonidinaufnahme verantwortlich sein (Huwlyer *et al.* 1997, Andre *et al.* 2009, Grafe *et al.* 2004, Müller *et al.* 2004, Fischer *et al.* 2006). Zudem zeigt der Mechanismus große Übereinstimmungen zu in diversen Studien beschriebenen H^+ /Kation-Austauschern, die zum Beispiel die Translokation von Verapamil, MDMA oder Pyrilamin vermitteln (Tabelle 2.1; Han *et al.* 2001, Kuwayama *et al.* 2008, Okura *et al.* 2008). Eine Beteiligung des für den Transport von Diphenhydramin und Chlorphenamin verantwortlichen H^+ /tertiäre Amine-Antiporters (Mizuuchi *et al.* 1999, 2000) an der Akkumulation des Clonidins in neuronalen Zellen ist wahrscheinlich.

An Neuronen sind nicht nur die Zielrezeptoren des Clonidins lokalisiert; darüber hinaus wird der Arzneistoff durch einen saturierbaren, pH-abhängigen Mechanismus in Neuronen akkumuliert. Der Aufnahmemechanismus weist starke Ähnlichkeiten zu zuvor postulierten H^+ -Antiportern auf. Es wurden jedoch keine Übereinstimmungen zu bereits klonierten Carriern für organische Kationen gefunden. Um die Bedeutung der neuronalen Aufnahme des Clonidins zu klären, sind weiterführende Studien erforderlich. Verschiedene Funktionen wären denkbar, zum Beispiel eine Verringerung der Clonidinkonzentration im Rahmen der Elimination aus der Hirnflüssigkeit oder ein regulierender Einfluss auf Membranrezeptoren. Vermutlich interagiert Clonidin nach der Aufnahme in die Neuronen mit intrazellulären Bindungsstellen, die unter physiologischen Bedingungen von der sogenannten *Clonidine-displacing substance* (CDS¹⁹), dem „Gehirn eigenen Clonidin“, besetzt werden (Regunathan und Reis 1996).

¹⁹Die exakte Struktur der klassischen CDS ist bislang nicht eindeutig bekannt. Genau genommen stellt CDS ein Gemisch endogener Substanzen dar, die - wie Clonidin - agonistisch an α_2 -Rezeptoren und I-Bindungsstellen wirken. Zwei Komponenten der aktiven CDS konnten bereits identifiziert werden: die β -Carboline Harman und Harmalan (Parker *et al.* 2004).

4 TRANSPORT VON β -PHENYLETHYLAMIN IN INTESTINALE EPITHELZELLEN (CACO-2)

Vgl. Anlage 11.2 (Fischer *et al.* 2010a)

4.1 Allgemeine Aspekte

β -Phenylethylamin (PEA) gehört zu den Spurenaminen, die strukturell mit den klassischen Monoamin-Neurotransmittern Dopamin, Noradrenalin und Serotonin verwandt sind (Berry 2004). PEA ist in kakaohaltigen und fermentierten Lebensmitteln sowie in Käse und Rotwein enthalten und wird von bestimmten Pflanzen, Pilzen und probiotischen Bakterien produziert (Branchek und Blackburn 2003). Im menschlichen Organismus wird das biogene Amin aus der Aminosäure *L*-Phenylalanin gebildet. PEA ist ein typisches Substrat der metabolisch aktiven Monoaminoxidase B²⁰ (MAO-B) (Yang und Neff 1973). Bedingt durch einen Mangel an vesikulären Speichermechanismen und die hohe Affinität zu MAO-B unterliegt es im menschlichen Körper einer starken Fluktuation (Burchett und Hicks 2006, Zucchi *et al.* 2006). In Säugetieren wurde PEA im gesamten ZNS heterogen verteilt mit extrazellulären Konzentrationen von 2-15 nM nachgewiesen (Berry 2004). Pharmakologisch wirkt es indirekt sympathomimetisch, indem es die Aktivität verschiedener Monoamin-Neurotransmitter beeinflusst (Berry 2004, Burchett und Hicks 2006). PEA fungiert im Gehirn in submikromolekularen Konzentrationen als Neuromodulator, indem es indirekt die Erregbarkeit der Neuronen durch bestimmte Neurotransmitter verändert. Das Spurenamin wird daher auch als „endogenes Amphetamin“ (Janssen *et al.* 1999) bezeichnet. Darüber hinaus bindet PEA an G-Protein gekoppelte *trace amine-associated receptors*²¹ (TAAR) und beeinflusst so direkt die neuronale Aktivität (Zucchi *et al.* 2006). Pathologisch betrachtet ist die Rolle des Spurenamins bei psychischen und neurologischen Erkrankungen wie Depression, ADHS²² oder der Parkinsonkrankheit sowie bei Essstörungen und Epilepsie interessant (Branchek und Blackburn 2003). Diese Effekte können durch Störungen der PEA-Biosynthese, des Katabolismus oder der Exkretion sowie durch den Einfluss von exogenem PEA verursacht werden (Mason *et al.* 1983). Obwohl exogenem PEA wiederholt psychostimulierende und antidepressive Effekte zugeschrieben wurden, liegen bislang keine Untersuchungen zur intestinalen Resorption vor. Generell wurden bisher keine für die Translokation von PEA

²⁰Die *Monoaminoxidase B* ist ein Enzym der äußeren Mitochondrienmembran, das u.a. Catecholamine abbaut.

²¹*Trace amine-associated receptors* = Spurenamin-Rezeptoren. Im menschlichen Organismus wurden bisher 6 TAAR und 3 Pseudogene identifiziert; PEA wird von TAAR1 und TAAR4 erkannt (Zucchi *et al.* 2006).

²²ADHS = Aufmerksamkeits-Defizit/-Hyperaktivitäts-Syndrom

verantwortlichen Membrantransporter identifiziert. Einige Studien weisen jedoch auf spezifische Transportprozesse hin: In chromaffinen Zellen von Rindern wurde bereits 1975 eine ATP-sensitive Aufnahme von [^{14}C]PEA beobachtet (Da Prada *et al.* 1975). In Vesikeln derartiger Zellen wurde eine Kokain-insensitive Akkumulation von [^{14}C]PEA beschrieben (Powers *et al.* 1995). Neben Diffusionsprozessen ist zudem ein Na^+ -abhängiger sättigbarer Mechanismus in die PEA-Aufnahme an aus Ratten isoliertem Lungengewebe involviert (Ben-Harari und Bakhle 1980). Weiterhin ergaben Untersuchungen an Kaninchen, dass durch einen Na^+/K^+ -Gradienten angetriebene, Carrier-vermittelte Prozesse für die PEA-Aufnahme in Erythrozyten verantwortlich sind (Mason *et al.* 1983). PEA beeinflusst außerdem den Transport anderer Substanzen. Das Spurenamin inhibierte den Glycin-Einstrom in Erythrozyten von Tauben (Kittams und Vidaver 1969). Die Hemmung war reversibel und nicht-kompetitiv. Die pH-abhängige Aufnahme von Clonidin und MDMA in Caco-2-Zellen wurde ebenfalls durch PEA reduziert (Fischer *et al.* 2006, Kuwayama *et al.* 2008), die beobachtete Inhibition war kompetitiver Natur.

4.2 Mechanismus des β -Phenylethylamintransportes in Caco-2-Zellen

PEA könnte ein endogenes Substrat eines der oben genannten pH-abhängigen Transportsysteme an Caco-2-Zellen darstellen. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit zunächst der Mechanismus der Aufnahme von radioaktiv-markiertem PEA ([^{14}C]PEA) in humane Dünndarmepithelzellen (Caco-2) untersucht, die für 7 Tage auf Gewebekulturschalen kultiviert wurden.

Die [^{14}C]PEA-Aufnahme erfolgte unabhängig von ATP^{23} und von extrazellulären Gradienten anorganischer Ionen wie Na^{+24} , wurde jedoch durch einen alkalischen pH_o stark stimuliert (**Anlage 11.2**: Fischer *et al.* 2010a, Fig. 1). Diese pH-Sensitivität kann verschiedene Ursachen haben: i) die Aufnahme wird durch einen H^+ -Antiporter vermittelt, angetrieben durch einen nach außen gerichteten H^+ -Gradienten, ii) das Carrier-System wird durch eine extrazelluläre Protonierung gehemmt, iii) der Carrier akzeptiert nur die nicht protonierte Form des PEAs als Substrat. Die pH-Sensitivität einiger Transporter für organische Kationen wurde durch Effekte des Membranpotentials bzw. H^+ -Diffusionspotentials erklärt (Koepsell *et al.* 2004). Die beobachtete intestinale [^{14}C]PEA-Aufnahme war jedoch unabhängig vom

²³Die [^{14}C]PEA-Aufnahme in Caco-2-Zellen war in Abwesenheit und Anwesenheit (1 mM) des ATP-Syntheseinhibitors 2,4-Dinitrophenol (DNP) vergleichbar.

²⁴Die Abwesenheit von Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} bzw. Cl^- -Ionen oder von Glucose im Inkubationspuffer hatte keinen Einfluss auf die [^{14}C]PEA-Aufnahme in Caco-2-Zellen.

Membranpotential. Eine intrazelluläre Ansäuerung²⁵ durch Präinkubation der Zellen mit NH_4Cl erhöhte die aufgenommenen Menge [^{14}C]PEA in Caco-2-Zellen um 26 % (**Anlage 11.2**: Fischer *et al.* 2010a, Fig. 1A, Inset). Der Zusatz des Protonophors Carbonylcyanid-*p*-trifluoromethoxyphenylhydrazon (FCCP, 50 μM) reduzierte die Aufnahme. Demnach ist vermutlich nicht die extrazelluläre H^+ -Konzentration *per se*, sondern ein auswärts gerichteter H^+ -Gradient die stimulierende Kraft der PEA-Aufnahme. Mit einem pK_a von 9,73 (Mason *et al.* 1983) variiert der Anteil ungeladener PEA-Moleküle im verwendeten pH-Bereich stark. Bei pH 6,0, 7,5 bzw. 8,5 liegt PEA zu 0,02 %, 0,6 % bzw. 5,6 % undissoziiert vor. Die Fraktion nicht-ionisierter PEA-Moleküle und die beobachtete [^{14}C]PEA-Aufnahme nehmen jedoch nicht in gleichem Maße zu. Daher ist es unwahrscheinlich, dass die Translokation des PEAs ausschließlich auf passiver Diffusion beruht. Mit zunehmender Inkubationsdauer war ein anfänglich starkes, später jedoch abgeschwächtes Ansteigen der Aufnahmeaktivität zu beobachten. Nach 5 Minuten war ein Plateau erreicht, die maximale [^{14}C]PEA-Aufnahme betrug 172 pmol pro mg Protein (**Anlage 11.2**: Fischer *et al.* 2010a, Fig. 2). Die in den Zellen akkumulierte Menge [^{14}C]PEA liegt deutlich über der zu erwartenden Anreicherung; dies gilt auch unter Beachtung einer möglichen intrazellulären Sequestrierung (Heikkinen *et al.* 2009, Kornhuber *et al.* 2010). Ein weiteres Indiz für einen Carrier-vermittelten Transport ist die Sättigung des Prozesses mit steigender Substratkonzentration. Kompetitionsstudien ergaben eine Michaelis-Menten-Kurve mit einem K_t -Wert von $2,6 \pm 0,2$ mM und einer V_{max} von 97 ± 2 nmol/min pro mg Protein (**Anlage 11.2**: Fischer *et al.* 2010a, Fig. 3). Die Auftragung der Daten als Eadie-Hofstee-Diagramm²⁶ zeigte einen linearen Verlauf (**Anlage 11.2**: Fischer *et al.* 2010a, Fig. 3, Inset B). Dies deutet darauf hin, dass unter den gegebenen Bedingungen nur ein Mechanismus an der PEA-Aufnahme in Caco-2-Zellen beteiligt ist.

Die intestinale [^{14}C]PEA-Aufnahme erwies sich als ATP-, Na^+ - und K^+ -unabhängig. Der hier untersuchte Mechanismus ist daher nicht mit dem der ATP-sensitiven Aufnahme von [^{14}C]PEA in bovinen chromaffinen Zellen identisch (Da Prada *et al.* 1975). Eine Übereinstimmung mit dem Na^+/K^+ -Gradient-abhängigen Carriersystem in Kaninchen-Erythrozyten (Mason *et al.* 1983) ist ebenso auszuschließen wie mit dem sättigbaren Na^+ -abhängigen Mechanismus im Lungengewebe von Ratten (Ben-Harari und Bakhle 1980).

²⁵Der intrazelluläre pH (pH_i) von Caco-2-Zellen liegt bei etwa 7,4 (Liang *et al.* 2007). Eine Präinkubation mit NH_4Cl führt zu einer Ansäuerung um etwa 0,3 pH-Einheiten (Fischer *et al.* 2006).

²⁶Das Eadie-Hofstee-Diagramm stellt eine Umformung der Michaelis-Menten-Gleichung dar, bei der v gegen $v/[S]$ aufgetragen wird. Der Schnittpunkt der y-Achse gibt V_{max} an, die Steigung der Geraden $-K_t$.

Die in dieser Studie ermittelte Affinitätskonstante der intestinalen PEA-Aufnahme liegt im unteren millimolaren Bereich. Sie ist damit den K_t -Werten von 0,5 und 1,1 mM für die pH-abhängige Aufnahme von Clonidin und MDMA an Caco-2-Zellen sehr ähnlich (Fischer *et al.* 2006, Kuwayama *et al.* 2008). Kuwayama und Mitarbeiter postulierten, dass der MDMA-Transport in Abhängigkeit von den vorliegenden Konzentrationen bidirektional verläuft. Übersteigt der einwärts gerichtete H^+ -Gradient den einwärts gerichteten Konzentrationsgradienten für das Substrat, arbeitet der Transporter vermutlich als H^+ -gekoppelte Effluxpumpe. Unter umgekehrten Bedingungen erfolgt ein erleichterter Transport des Substrates im Cotransport mit dem Proton (Kuwayama *et al.* 2008). Dieses Prinzip könnte auch für die Translokation von PEA gelten. Hinsichtlich des transepithelialen Transportes (Flux) des PEAs ergaben sich jedoch im Vergleich zum MDMA-Flux abweichende Resultate. Für die Messungen des bidirektionalen PEA-Fluxes wurden Caco-2-Zellen für 21-23 Tage auf permeablen Polycarbonatfiltern kultiviert. Der [^{14}C]PEA-Flux von der apikalen zur basolateralen Seite (J_{a-b}) überstieg mit 7,2 %/30 min/cm² (**Anlage 11.2**: Fischer *et al.* 2010a, Fig. 5) den der Referenzsubstanz [^{14}C]Mannitol²⁷ (0,15 %/h/cm², **Anlage 11.3**: Fischer *et al.* 2010b) um das 100-fache. J_{a-b} von PEA war 5-mal höher als der basolateral-zu-apikale Flux (J_{b-a}); die absorptiven überwiegen demnach die sekretorischen Prozesse. Im Gegensatz dazu übersteigt der MDMA-Transport J_{b-a} deutlich den J_{a-b} (Kuwayama *et al.* 2008). Wie für PEA ist auch für Chinidin, potenter Inhibitor der intestinalen PEA-Aufnahme, ein signifikant stärkerer Flux von apikal nach basolateral festgestellt worden (Ishida *et al.* 2006). Die intestinale Translokation des Chinidins erfolgt ebenso pH-abhängig wie die von MDMA und PEA.

4.3 Einfluss potentieller Inhibitoren auf den [^{14}C]β-Phenylethylamintransport in Caco-2-Zellen

Die Spezifität des untersuchten Mechanismus ist sowohl für die mögliche Identifizierung eines verantwortlichen Transportsystems als auch pharmazeutisch von Interesse. Deshalb wurde der Einfluss diverser Strukturen auf die [^{14}C]PEA-Aufnahme in intestinale Caco-2-Zellen untersucht. Weder Aminosäuren, Monoamin-Neurotransmitter noch quaternäre Amine wie MPP⁺, TEA, Carnitin oder Cholin beeinflussten die Aufnahme. Eine Beteiligung der bekannten Transporter für diese Substrate kann daher ausgeschlossen werden (Tabelle 2.1).

²⁷Mannitol kann die Epithelzellschicht ausschließlich durch passive Diffusion – hauptsächlich parazellulär – durchdringen und wird daher als Referenzsubstanz für nicht-sättigbaren linearen Transport, als sog. *space marker*, verwendet. Der Mannitolflux stellt zudem eine Kontrollgröße für die Verträglichkeit der Substanzen dar, da eine Schädigung der Integrität des Zellrasens die interzelluläre Permeabilität erhöht.

Neben PEA selbst waren unter anderen sein Metabolit *N*-Methylphenylethylamin, *D,L*-Amphetamin und MAO-B-Inhibitoren wie Harmalin inhibitorisch aktiv (Tabelle 4.1, **Anlage 11.2**: Fischer *et al.* 2010a, Tabelle 1). Zudem reduzierten viele kationische Arzneistoffe wie Clonidin, Chinin oder Diphenhydramin die [^{14}C]PEA-Aufnahme in Caco-2-Zellen.

Tabelle 4.1. **Substratspezifität der [^{14}C]PEA-Aufnahme an Caco-2-Zellen.**

Inhibitor	[^{14}C]PEA-Aufnahme (%)	Inhibitor	[^{14}C]PEA-Aufnahme (%)
Kontrolle	100 \pm 1	Clonidin	63 \pm 6
β -Phenylethylamin	42 \pm 1	Codein	88 \pm 4
Phenelzin	57 \pm 3	Chinin	63 \pm 1
Tranlycypromin	45 \pm 2	Chlorphenamin	48 \pm 2
Harmalin	51 \pm 6	Diphenhydramin	46 \pm 3
<i>N</i> -Methylphenylethylamin	42 \pm 3	Imipramin	32 \pm 1
<i>D,L</i> -Amphetamin	40 \pm 3	Maprotilin	39 \pm 1

Die Inhibitoren wurden in einer Konzentration von 2 mM eingesetzt.

Für ausgesuchte Hemmstoffe wurden die inhibitorischen Konstanten bestimmt (**Anlage 11.2**: Fischer *et al.* 2010a, Tabelle 2, Fig. 4). Die ermittelten K_i -Werte lagen im Bereich von $0,66 \pm 0,06$ mM (Tranlycypromin) bis $5,5 \pm 0,2$ mM (Ethylmorphin). Einige Inhibitoren wie Tranlycypromin oder *D,L*-Amphetamin interagierten mit vergleichbarer Affinität mit den Transportsystemen für PEA und Clonidin in Caco-2-Zellen (**Anlage 11.2**: Fischer *et al.* 2010a, Tabelle 2). Für andere Inhibitoren wurden hingegen abweichende Affinitäten bezüglich der Aufnahme von PEA und Clonidin beobachtet. Am stärksten zeigte sich dieser Effekt bei Chinin und Chinidin. Generell wurde die Aufnahme von PEA und Clonidin in Caco-2-Zellen jedoch von den gleichen Substanzen beeinflusst. Die Charakteristika beider Transportprozesse sind den bereits erwähnten Mechanismen für die Aufnahme von MDMA, Diphenhydramin, Verapamil und Pylrilamin gleich (Kuwayama *et al.* 2008, Mizuuchi *et al.* 1999, 2000, Han *et al.* 2001, Okura *et al.* 2008; vgl. Kapitel 3.3): Zum einen interagieren sie bevorzugt mit lipophilen aromatischen Strukturen, die aliphatische Aminogruppen enthalten. Zum anderen erfolgt der Transport Na^+ -unabhängig, jedoch stark pH-abhängig und wird überdies durch einen nach außen gerichteten H^+ -Gradienten angetrieben.

5 TRANSPORT VON CODEIN IN INTESTINALE EPITHELZELLEN (CACO-2) UND ENDOTHELZELLEN DER BLUT-HIRN-SCHRANKE (RBE4)

Vgl. Anlage 11.3 (Fischer *et al.* 2010b)

5.1 Allgemeine Aspekte

Codein gehört zur Gruppe der Opium-Alkaloide, die im Schlafmohn (*Papaver somniferum*) enthalten sind. Synthetisch wird es durch Methylierung des Opiates²⁸ Morphin hergestellt. Seine pharmakologische Wirkung entfaltet Codein hauptsächlich durch Interaktion mit zentralen μ -Opioidrezeptoren. Es gilt als 'Goldstandard' unter den Antitussiva, obgleich seine Effektivität umstritten ist (Bolser und Davenport 2007). Zudem wirkt es analgetisch und führt unter anderem zu Obstipation, Atemdepression und Sedation (Thorn *et al.* 2009). In der pharmazeutischen Praxis wird Codein überwiegend peroral verabreicht. Nach oraler Applikation von 60 - 120 mg wurden Plasmakonzentrationen von 93 - 474 ng/ml bzw. 0,3 - 1,6 μ M gemessen (Rogers *et al.* 1982, Kim *et al.* 2002). Codein wird rasch aus dem Darmtrakt resorbiert; seine orale Bioverfügbarkeit variiert jedoch aufgrund des individuell unterschiedlich ausgeprägten *First-Pass*-Metabolismus. Nach Applikation einer oralen Einzeldosis wurde eine Bioverfügbarkeit von 50 % bzw. 59 % festgestellt (Rogers *et al.* 1982, Spahn *et al.* 1985). Während der Passage vom Darm bis zu seinen Zielrezeptoren im ZNS unterliegt Codein verschiedenen Metabolisierungsvorgängen. Durch die Aktivität von CYP2D6, CYP3A4 und UGT2B7²⁹ erfolgt der Umbau zu Morphin, Norcodein und Codein-6-glucuronid (Somogyi *et al.* 2007, Thorn *et al.* 2009). Jeder der drei Metabolite ist ebenfalls agonistisch am μ -Opioidrezeptor wirksam.

Bislang wurden keine Studien zur intestinalen Aufnahme des Codeins publiziert. Allerdings entdeckte man in Untersuchungen an Ratten Aufnahmemechanismen für Codein in das Gehirn (Scrafani und Hug 1968, Oldendorf *et al.* 1972). Nach oraler Applikation wurde im Gehirn im Vergleich zum Plasma eine 2-5-fache Codeinkonzentration gemessen (Xie und Hammarlund-Udenaes 1998). Ein spezifisches, für die Aufnahme von Codein ins Gehirn verantwortliches Membrantransportprotein konnte bisher jedoch nicht identifiziert werden. Marks und Medzihradsky stellten bereits 1974 fest, dass der Transport von basischen Aminen

²⁸Begrifflich unterscheidet man *Opioide* von *Opiaten*. Die Gruppe der *Opioide* umfasst alle natürlichen und synthetischen Substanzen mit morphinähnlichen Eigenschaften, die an Opioidrezeptoren wirken. Als *Opiate* werden hingegen nur die natürlich im Opium vorkommenden Alkaloide bezeichnet.

²⁹Die *Cytochrom P450*-Enzyme (*CYP*) sind für den oxidativen Abbau körpereigener sowie körperfremder Substanzen verantwortlich. *CYP*-Enzyme kommen ubiquitär im menschlichen Körper vor, wurden jedoch gehäuft in Darm, Leber und Lunge gefunden. *UGT2B7* gehört zur Familie der *UDP-Glucuronosyltransferasen* und ist in Leber, Niere, Darmepithel und Gehirn lokalisiert.

wie Codein in Leukozyten von einem Na^+ -abhängigen Carrier vermittelt wird. Aufgrund seines kationischen Charakters könnte Codein zudem ein Substrat der Transporter für organische Kationen darstellen (Tabelle 2.1; Koepsell *et al.* 2007, Klaassen und Aleksunes 2010). Sowohl die intestinale Resorption als auch die Translokation des Codeins durch die BHS sind essentiell für seine Wirksamkeit. In diesem Teil der Arbeit wurde sich daher mit der Charakterisierung des Codeintransportes am Dünndarmepithel und an Endothelzellen der BHS im Hinblick auf eine mögliche Identifizierung der beteiligten Transportsysteme beschäftigt.

5.2 Mechanismus des Codeintransportes in Caco-2-Zellen und RBE4-Zellen

In diesem Abschnitt der Arbeit wurde die Aufnahme von radioaktiv markiertem Codein (^3H Codein) in Caco-2-Zellen und RBE4-Zellen bestimmt. Diese wurden zuvor 7 bzw. 4 Tage auf Gewebekulturschalen kultiviert. An beiden Zelltypen war die ^3H Codeinaufnahme unabhängig von anorganischen Ionen wie Na^+ oder K^{+30} , jedoch wiederum stark pH-abhängig. Eine Alkalisierung des pH_o von 6,0 auf 7,5 bzw. 8,5 führte zu einer 9- bzw. 16-fachen Erhöhung der ^3H Codeinaufnahme in Caco-2-Zellen und sogar zu einer 12- bzw. 23-fachen Anreicherung in RBE4-Zellen (**Anlage 11.3**: Fischer *et al.* 2010b, Fig. 1). Die intrazelluläre Ansäuerung durch Präinkubation mit NH_4Cl resultierte in beiden Zelltypen in einer um 42 % gesteigerten ^3H Codeinaufnahme (**Anlage 11.3**: Fischer *et al.* 2010b, Fig. 2). Der Zusatz des Protonophors FCCP zum Inkubationspuffer reduzierte hingegen die Aufnahme um 38 % in Caco-2-Zellen und um 83 % in RBE4-Zellen. Demnach scheint ein auswärts gerichteter H^+ -Gradient die ^3H Codeinaufnahme zu stimulieren. Der Anteil des undissoziiert vorliegenden Codeins variiert im verwendeten pH-Bereich stark (pK_a 8,2; Chen *et al.* 1991). Bei pH 6,0, 7,5 und 8,5 beträgt er 0,6 %, 17 % und 67 %. Die beobachtete Steigerung der ^3H Codeinaufnahme in Caco-2- und RBE4-Zellen erfolgte jedoch nicht proportional zum Ansteigen des undissoziierten Codeins. Zudem war der Aufnahmemechanismus saturierbar; unmarkiertes Codein (2 mM (Caco-2), 10 mM (RBE4)) reduzierte die aufgenommene Menge an ^3H Codein deutlich um 47 % (Caco-2) und 92 % (RBE4). Mit zunehmender Inkubationszeit stieg die ^3H Codeinaufnahme an. Über 2 (Caco-2) bzw. 5 Minuten (RBE4) war der Verlauf linear, dann erfolgte eine Abschwächung des Anstiegs. Nach 20 Minuten war

³⁰Die ^3H Codeinaufnahme in Caco-2-Zellen und RBE4-Zellen war in An- und Abwesenheit von Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- -Ionen oder von Glucose im Inkubationspuffer nicht signifikant verschieden. Auch die Abwesenheit von K^+ -Ionen im Inkubationspuffer bzw. die Anreicherung mit K^+ -Ionen (140 mM), jeweils unter Zusatz eines K^+ -Ionophors (Valinomycin), hatten keinen Einfluss auf die Aufnahme.

jeweils ein Plateau bei Maximalkonzentrationen von 150 fmol [³H]Codein pro mg Protein in Caco-2-Zellen und 717 fmol pro mg Protein in RBE4-Zellen erreicht (**Anlage 11.3**: Fischer *et al.* 2010b, Fig. 3). In der Annahme einer homogenen Verteilung innerhalb der Zellen und eines Zellvolumens von etwa 10 µl pro mg Protein³¹ wurde [³H]Codein in Caco-2-Zellen 12-fach akkumuliert. In RBE4-Zellen war sogar eine 60-fache Akkumulation zu beobachten. Betrachtet man ausschließlich die nicht-ionisierte Fraktion des Codeins mit einer Ausgangskonzentration von 0,2 nM [³H]Codein im Inkubationspuffer, war die Anreicherung in den Zellen 10- bzw. 30-fach. Die erreichten intrazellulären Konzentrationen übersteigen somit mit Abstand die theoretisch gemäß der pH-Partitionstheorie zu erreichenden. Angesichts des lipophilen Charakters des Codeins (log*P* 3,98; Chen *et al.* 1991) ist eine Verteilung in lipophile Zellstrukturen wahrscheinlich. Zudem unterliegt der basische Arzneistoff vermutlich partiell einer lysosomalen Sequestrierung (Heikkinen *et al.* 2009). Diese Effekte der intrazellulären Verteilung wurden bereits für die neuronale Aufnahme des Clonidins ausführlich diskutiert (vgl. Kapitel 3.3). Auch unter Berücksichtigung einer solchen lysosomalen Retention übersteigt der beobachtete Konzentrationsgradient des Codeins in Caco-2- und RBE4-Zellen den zu erwartenden. Die Effekte der Verteilung in Lipidstrukturen und der lysosomalen Sequestrierung tragen jedoch sehr wahrscheinlich zu einem kleinen Anteil zur starken intrazellulären Anreicherung des Codeins bei.

Die Akkumulation des Codeins in den Zellen erwies sich als temperatur- und konzentrationsabhängig. Bei 4 °C verlief die zeitabhängige [³H]Codeinaufnahme in Caco-2- und RBE4-Zellen über den gesamten Zeitraum linear und war deutlich geringer als bei 23 °C (100 %). Nach 20 Minuten betrug die aufgenommene Menge [³H]Codein 39 fmol (Caco-2) bzw. 98 fmol pro mg Protein (RBE4); das entspricht 26 % bzw. 14 % der Aufnahme bei 23 °C. Diese starke Temperaturabhängigkeit der [³H]Codeinaufnahme deutet auf die Beteiligung eines Carriersystems hin. Ferner war mit steigender Substratkonzentration im Inkubationspuffer eine Sättigung der Codeinaufnahme zu beobachten (**Anlage 11.3**: Fischer *et al.* 2010b, Fig. 4). Die lineare, nicht-sättigbare Transportkomponente betrug 22 % (Caco-2) bzw. 6 % (RBE4). Nach Abzug des linearen Anteils ergab die Transformation der Daten einen hyperbolen Verlauf der Codeinaufnahme an Caco-2-Zellen mit einem *K_t*-Wert von

³¹Das Zellvolumen von etwa 10 µl pro mg Protein wurde innerhalb der Arbeitsgruppe mittels Messungen der Aufnahme von 3-O-[¹⁴C]-Methyl-*D*-Glucose bestimmt (bisher nicht veröffentlichte Daten). Für Caco-2-Zellen wurde in einer früheren Studie ein Zellvolumen von 3,66 µl pro mg Protein beschrieben (Blais *et al.* 1987). Legt man dieses Zellvolumen zugrunde, wären die jeweiligen intrazellulären Codeinkonzentrationen und somit die intrazelluläre Akkumulation um den Faktor 3 erhöht.

6,7 ± 1,4 mM und einer V_{\max} von 199 ± 15 nmol/2 min pro mg Protein. An RBE4-Zellen wurde ein K_t -Wert von 0,4 ± 0,1 mM und eine V_{\max} von 200 ± 2 nmol/5 min pro mg Protein bestimmt. Einigen Autoren zufolge verlaufen auch intrazelluläre Bindungsprozesse und die lysosomale Sequestrierung konzentrationsabhängig und sind sättigbar (Heikkinen *et al.* 2009, Kornhuber *et al.* 2010). Die starke Temperatur- und Konzentrationsabhängigkeit der Codeinaufnahme in Kombination mit der Existenz spezifischer Inhibitoren sprechen jedoch sehr für die Beteiligung einer Carrier-vermittelten Transportkomponente. In diesem Zusammenhang wird oft die Richtung des transepithelialen Transportes als Kriterium für die Existenz eines Carriers angesehen. Daher wurde der bidirektionale Transport von [³H]Codein durch Caco-2-Zellen bestimmt, die zuvor 21-24 Tage auf permeablen Filtern kultiviert worden waren. Der transepitheliale Transport J_{a-b} betrug 7,0 ± 0,4 %/h/cm² und überstieg den des *space markers* [¹⁴C]Mannitol 47-fach (0,15 ± 0,01 %/h/cm²). Der [³H]Codeinflux J_{a-b} war damit doppelt so hoch wie der J_{b-a} (3,8 ± 0,3 %/h/cm²). Die resultierenden Permeabilitätskoeffizienten P_{app} waren mit 28 ± 2 cm/s * 10⁻⁶ (J_{a-b}) und 29 ± 2 cm/s * 10⁻⁶ (J_{b-a}) in beiden Richtungen vergleichbar. Ein Überschuss unmarkierten Codeins (10 mM) im Donorkompartiment reduzierte den [³H]Codeinflux um 29 % und 31 %³². Der Codeintransport am intestinalen Epithel schließt demnach sowohl absorptive als auch sekretorische Prozesse ein. Der transepitheliale Transport resultiert aus dem Zusammenspiel apikaler und basolateraler Influx- und Effluxsysteme und hängt zudem vom Zelltyp ab (Neumann *et al.* 2004). Daher lassen sich allein aus den Fluxdaten keine eindeutigen Rückschlüsse auf die Existenz apikaler Transportsysteme ziehen. Analog zum Codeinflux wurde an Caco-2-Zellen ein in beide Richtungen quantitativ vergleichbarer Transport von MPP⁺ und Serotonin beschrieben (Martel *et al.* 2000, 2003). Der Flux J_{b-a} der organischen kationischen Arzneistoffe Propranolol, Diphenhydramin und MDMA durch Caco-2-Zellen war sogar jeweils höher als der Flux J_{a-b} (Wang *et al.* 2009, Mizuuchi *et al.* 2000, Kuwayama *et al.* 2008). Der apikale Transport dieser Substanzen wird bekanntermaßen durch spezifische Carriersysteme, die OCTs bzw. den Serotonintransporter (SERT), vermittelt (Koepsell *et al.* 2007, Martel *et al.* 2003). Die Translokation von Propranolol wird von einem stereoselektiven Transporter vermittelt (Kuwayama *et al.* 2008). Weiterhin wurde demonstriert, dass für die

³²Um einen massiv schädigenden Effekt des Codeins auf die Zellen auszuschließen, wurde der J_{a-b} Flux von [¹⁴C]Mannitol analog zum Codeinflux bestimmt. Der transepitheliale Transport von [¹⁴C]Mannitol war in Anwesenheit von 10 mM Codein im Donorkompartiment nicht erhöht. Zusätzlich war der transepitheliale elektrische Widerstand (*transepithelial electrical resistance*, TEER) in allen Flux-Experimenten zu Beginn und nach Beendigung vergleichbar.

apikale Aufnahme von Diphenhydramin und MDMA an Caco-2-Zellen ein H^+ -Antiportsystem verantwortlich ist (Mizuuchi *et al.* 2000, Kuwayama *et al.* 2008). Der in beide Richtungen ausgewogene Codeintransport spricht demnach nicht gegen das Vorhandensein eines spezifischen Carriers. Für PEA wurde bereits die Möglichkeit eines umkehrbaren, bidirektional verlaufenden Transportprozesses diskutiert. Vermutlich ist ein derartiges System für den MDMA-Transport an Caco-2-Zellen (Kuwayama *et al.* 2008) verantwortlich. In Anbetracht der hier ermittelten Permeabilitätskoeffizienten ist nicht auszuschließen, dass ein ähnlicher Mechanismus die intestinale Codeinaufnahme vermittelt.

5.3 Einfluss potentieller Inhibitoren auf den [3H]Codeintransport in Caco-2-Zellen und RBE4-Zellen

Trotz der routinemäßigen oralen Applikation gibt es bislang nur sehr wenige Kenntnisse zur intestinalen Resorption von Codein und anderen Opioiden. 2006 wurde der transepitheliale Flux des Opioids Morphin an Caco-2-Zellen untersucht (Dale *et al.* 2006). Der beobachtete apikale Morphinflux J_{a-b} war niedriger als der Mannitolfux. Hingegen überstieg der in dieser Arbeit ermittelte Codeinflux durch Caco-2-Zellen den Mannitolfux vielfach. Morphin, direkte Vorstufe des Codeins in der Biosynthese, hatte zudem keinen Effekt auf die [3H]Codeinaufnahme in Caco-2-Zellen (Abbildung 5.1, **Anlage 11.3:** Fischer *et al.* 2010b, Tabelle 1). Generell beeinflussten verwandte Alkaloide wie Codeinon oder Ethylmorphin die Aufnahme nicht oder nur schwach. Einzig Apomorphin zeigte eine starke inhibitorische

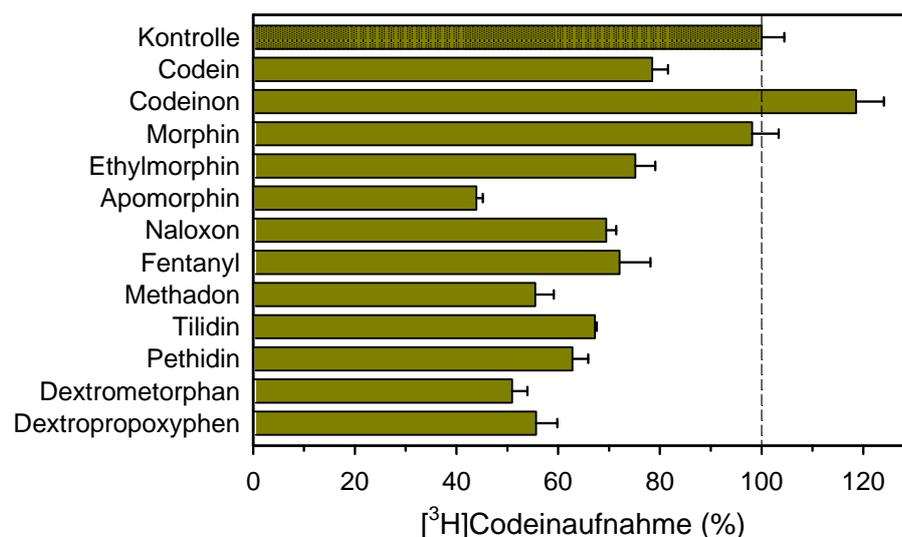


Abbildung 5.1. **Substratspezifität der [3H]Codeinaufnahme in Caco-2-Zellen.** Die opioiden Inhibitoren wurden in einer Konzentration von 2 mM eingesetzt.

Potenz. Hingegen erwiesen sich synthetische Opioide wie Tilidin, Naloxon oder Dextromethorphan als effektive Inhibitoren. Die ermittelten IC_{50} -Werte der opioiden Wirkstoffe lagen zwischen 1,1 mM für Dextromethorphan und 2,2 mM für Tilidin (**Anlage 11.3**: Fischer *et al.* 2010b, Tabelle 2, Fig. 5A). An den RBE4-Zellen war eine vergleichbare Inhibitorspezifität zu beobachten. Die inhibitorische Kraft der untersuchten Opioide war jedoch signifikant höher (**Anlage 11.3**: Fischer *et al.* 2010b, Tabelle 1). Apomorphin und die synthetischen Opioide reduzierten die [3H]Codeinaufnahme auf unter 35 %. Für Methadon als Vertreter der synthetischen Opioide wurde ein IC_{50} -Wert von 160 μM ermittelt (**Anlage 11.3**: Fischer *et al.* 2010b, Tabelle 3, Fig. 5D). In einer Studie von 1968 fanden sich bereits Hinweise auf aktiven Codeintransport am Gehirn (Scrafani und Hugh 1968). Codein reduzierte, im Gegensatz zu quartären organischen Basen, die pH-abhängige Aufnahme von Dihydromorphin am Rattenhirn. Später belegten Untersuchungen mittels der Oldendorf-Technik, dass Codein schnell durch die BHS dringt (Oldendorf *et al.* 1972). Schneller Na^+ -unabhängiger aktiver Transport von Codein, aber auch von Amphetamin, Methadon und Naloxon wurde zudem an Leukozyten der Ratte nachgewiesen (Marks und Medzihradsky 1974). Die dort ermittelte Michaelis-Konstante für Codein von 200 μM ist mit der in dieser Studie an RBE4-Zellen bestimmten vergleichbar. Zudem waren Morphin und Tryptamin nur schwach inhibitorisch effektiv, Kokain und Desipramin hingegen stark. Die übereinstimmenden Ergebnisse deuten auf die Beteiligung ähnlicher Systeme an der Codeinaufnahme in Leukozyten und an der BHS hin.

Neben den synthetischen Opioiden beeinflussten diverse nicht-opioide Arzneistoffe die [3H]Codeinaufnahme an Caco-2-Zellen. Sehr potente Inhibitoren waren *D,L*-Amphetamin, Propranolol, Pyrilamin und Chinidin (Abbildung 5.2, **Anlage 11.3**: Fischer *et al.* 2010b, Tabelle 1). Clonidin, PEA, Methamphetamin, Diphenhydramin und andere Kationen zeigten ebenfalls inhibitorische Effekte. Die in Konkurrenzexperimenten ermittelten IC_{50} -Werte lagen zwischen 0,73 mM für Diphenhydramin und 4,8 mM für Tryptamin (**Anlage 11.3**: Fischer *et al.* 2010b, Tabelle 2, Fig. 5B,C). Der IC_{50} -Wert des Diphenhydramins lag somit im Bereich der Michaelis-Konstanten des Transportes von Diphenhydramin und Chlorphenamin an Caco-2-Zellen (0,9 mM; Mizuuchi *et al.* 1999, 2000). Die Translokation beider Substanzen erfolgt durch einen H^+ /tertiäre Amine-Antiporter, der spezifisch *N*-Dimethyl- und *N*-Diethyl-Strukturen erkennt. Propranolol, ebenfalls ein potenter Inhibitor der Codeinaufnahme an Caco-2-Zellen (Abbildung 5.2), wird partiell durch einen stereospezifischen Membrantransporter transportiert (Wang *et al.* 2009).

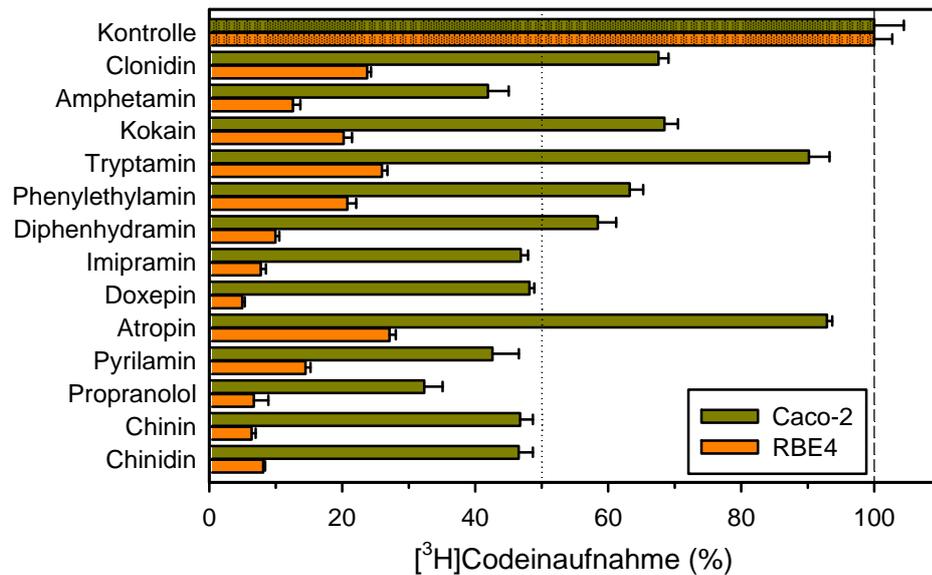


Abbildung 5.2. **Substratspezifität der $[^3\text{H}]$ Codeinaufnahme in Caco-2- und RBE4-Zellen.** Die Inhibitoren wurden in einer Konzentration von 2 mM eingesetzt.

Die Aufnahme von Clonidin und MDMA an Caco-2-Zellen wird wahrscheinlich durch einen pH-abhängigen Carrier vermittelt (Fischer *et al.* 2006, Kuwayama *et al.* 2008). Die funktionellen Parameter und die Inhibitorspezifität dieser Transportsysteme sind jeweils mit denen der hier untersuchten $[^3\text{H}]$ Codeinaufnahme vergleichbar: Der Transport von Codein, Clonidin und MDMA erfolgt unabhängig von ATP und Na^+ , jedoch stark stimuliert durch einen auswärts gerichteten H^+ -Gradienten. Überdies reduzierten Clonidin, PEA, Amphetaminderivate und Diphenhydramin jeweils die Substrataufnahme an Caco-2-Zellen. Demnach könnten die Transportsysteme für Codein, Clonidin und MDMA identisch sein. Die Studien zur Aufnahme dieser drei Substanzen ergaben jeweils ein vergleichbares Inhibitorprofil (Fischer *et al.* 2006, **Anlage 11.2**: Fischer *et al.* 2010a). Daher wurde die Art der Inhibition der Codeinaufnahme durch Clonidin und PEA untersucht. Zu diesem Zweck wurde die $[^3\text{H}]$ Codeinaufnahme in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen unmarkierten Codeins sowie steigender Konzentrationen des jeweiligen Inhibitors gemessen. Die Darstellung der Daten als Dixon-Plots³³ resultierte jeweils in zwei Geraden, deren Schnittpunkt im IV. Quadranten lag. Die Inhibition der $[^3\text{H}]$ Codeinaufnahme an Caco-2-Zellen durch

³³Als *Dixon-Plot* bezeichnet man die Auftragung der reziproken Aufnahmerate des Substrates gegen die Konzentration des Inhibitors. Aufgrund der zwei verschiedenen Substratkonzentrationen ergeben sich jeweils zwei lineare Kurvenverläufe. Bei einer *kompetitiven* Inhibition treffen diese Geraden oberhalb der Abszisse aufeinander, bei einer *nicht-kompetitiven* Inhibition direkt auf der Abszisse. Die Inhibitorkonstante K_i entspricht dem Abszissenwert des Schnittpunktes, d.h., der entsprechenden Inhibitorkonzentration.

durch Clonidin und PEA ist demnach kompetitiver Art; die beiden Substanzen könnten selbst Substrate oder reine Inhibitoren des Transportsystems darstellen. Die derart ermittelten Inhibitorkonstanten K_i betragen 1,9 mM für Clonidin und 3,7 mM für PEA (**Anlage 11.3**: Fischer *et al.* 2010b, Fig. 6).

Die nicht-opioiden Inhibitoren der Codeinaufnahme an Caco-2-Zellen hemmten analog die Codeinaufnahme an RBE4-Zellen. Die inhibitorische Potenz der organischen Kationen erwies sich generell jedoch an den Endothelzellen der BHS als signifikant höher (Abbildung 5.2, **Anlage 11.3**: Fischer *et al.* 2010b, Tabelle 1). Diverse kationische Arzneistoffe wie Clonidin, die MAO-B-Inhibitoren PEA und Tranylcypromin oder Tryptamin reduzierten die [^3H]Codeinaufnahme in RBE4-Zellen deutlich. Ebenso potente Hemmstoffe waren unter anderen Propranolol, Diphenhydramin, *D,L*-Amphetamin, Pylrilamin und Verapamil.

Für ausgewählte Inhibitoren wurden in Kompetitionsstudien die entsprechenden Affinitäten bestimmt. Die IC_{50} -Werte von Clonidin und PEA ($\sim 500 \mu\text{M}$) lagen im Bereich der beschriebenen Michalis-Konstanten des Clonidintransportes an verschiedenen Epithelien (Huwyler *et al.* 1997, Grafe *et al.* 2004, Müller *et al.* 2004, Fischer *et al.* 2006, Andre *et al.* 2009). Propranolol und Pylrilamin waren mit IC_{50} -Werten von $135 \mu\text{M}$ und $168 \mu\text{M}$ stärker affin als Clonidin und PEA (**Anlage 11.3**: Fischer *et al.* 2010b, Tabelle 3 und Fig. 5D). Am Endothel von Rinderhirnkapillaren wurde niedrigaffiner ($K_t = 3,3 \text{ mM}$) sowie hochaffiner ($K_t = 50 \mu\text{M}$) Transport von Pylrilamin (Mepyramin) beobachtet (Yamazaki *et al.* 1994c). *In vivo*-Experimente an Ratten zeigte zudem, dass die Translokation von Pylrilamin durch die BHS hauptsächlich durch ein pH-abhängiges Carriersystem vermittelt wird (Yamazaki *et al.* 1994a). Die Transportkonstante von $4,4 \text{ mM}$ ist dem *in vitro* beobachteten K_t -Wert der niedrigaffinen Transportkomponente ähnlich. In Analogie zur Codeinaufnahme inhibierten Chlorphenamin, Diphenhydramin und Propranolol die Pylrilaminaufnahme, während Phenylalanin und Cholin keinen signifikanten Effekt zeigten. In einer jüngst durchgeführten Studie wurde ein spezifischer hochaffiner H^+ -Antiporter am Endothel von Rattenhirnkapillaren identifiziert, der Pylrilamin und Oxycodon konzentrations- und energieabhängig transportiert (Okura *et al.* 2008). Dieser sogenannte Pylrilamin-Transporter arbeitet unabhängig vom Membranpotential und von Na^+ . Chinidin, Verapamil und trizyklische Antidepressiva hemmten die Aktivität des vermeintlichen Transporters für organische Kationen, TEA, MPP^+ und *L*-Carnitin hingegen nicht (Okura *et al.* 2008, Nakazawa *et al.* 2009). Einer aktuellen Studie zufolge könnte der Influx von Naloxon an der BHS ebenfalls durch den Pylrilamin-Transporter vermittelt sein (Suzuki *et al.* 2010). Die in dieser Arbeit gezeigten Charakteristika

des Codeintransportes an RBE4-Zellen weisen große Übereinstimmungen zu denen des Pyrilamin-Transporters auf; eine Identität beider Mechanismen ist daher nicht auszuschließen.

Interessanterweise wurde die [³H]Codeinaufnahme in Caco-2-Zellen wie auch in RBE4-Zellen weder durch Aminosäuren wie *L*-Tyrosin, ein Synthesebaustein des Codeins, noch durch Monoamin-Neurotransmitter wie Noradrenalin, Serotonin oder Dopamin signifikant reduziert (**Anlage 11.3**: Fischer *et al.* 2010b, Tabelle 1). Die typischen Substrate der Transporter für organische Kationen MPP⁺, TEA, Cholin oder Carnitin hatten ebenfalls keinen Effekt. Eine Beteiligung der entsprechenden Transportproteine an der intestinalen Resorption von Codein oder an der Translokation durch die BHS kann daher ausgeschlossen werden (Tabelle 2.1).

6 TRANSPORT VON VALPROINSÄURE IN INTESTINALE EPITHELZELLEN (CACO-2) UND ENDOTHELZELLEN DER BLUT-HIRN-SCHRANKE (RBE4)

Vgl. Anlage 11.4 (Fischer *et al.* 2008)

6.1 Allgemeine Aspekte

Valproinsäure wurde ursprünglich 1963 als krampflösendes Mittel entdeckt (Nalivaeva *et al.* 2009). Heute stellt die Valproinsäure, in Form der freien Säure und als Natriumsalz, ein Standardtherapeutikum bei verschiedenen Formen der Epilepsie dar. Zudem wird sie bei bipolaren Störungen und zur Migräneprophylaxe eingesetzt. Der Wirkmechanismus ist bislang nicht eindeutig geklärt (für eine Übersicht siehe Bolanos und Medina 1997, Nalivaeva *et al.* 2009). Valproinsäure erhöht die Konzentration des inhibitorischen Neurotransmitters γ -Aminobuttersäure (GABA) im Gehirn. Ursächlich dafür sind einerseits ein verminderter GABA-Abbau durch Inhibition der metabolisierenden Enzyme sowie andererseits ein GABA-mimetischer Effekt an postsynaptischen Rezeptoren (Nilsson *et al.* 1992). Valproinsäure beeinflusst außerdem verschiedenste regulatorische Mechanismen (Bolanos und Medina 1997, Nalivaeva *et al.* 2009): sie interagiert mit spannungsabhängigen Na^+ -Kanälen, vermindert durch Interaktionen mit NMDA-Rezeptoren³⁴ die neuronale Aktivität und inhibiert die Histondeacetylase. Dies führt zur Regulation der GABA-Synthese und einer veränderten neuronalen Genexpression. Zudem beeinflusst der Arzneistoff die Bildung und den Abbau von Amyloiden³⁵ (Stapleton *et al.* 2007, Nalivaeva *et al.* 2009). Daher wird der Einsatz der Valproinsäure bei Krebserkrankungen und zentralnervösen Störungen wie Schizophrenie oder Nervendegenerationen erwogen.

In der Pharmakotherapie wird Valproinsäure überwiegend oral appliziert; die mittlere Tagesdosis beträgt 20–30 mg pro kg Körpergewicht (Covanis *et al.* 1982). Da die Zielstrukturen des Antiepileptikums im ZNS liegen, ist für die Wirksamkeit eine hinreichende intestinale Resorption ebenso bedeutend wie die Überwindung der BHS. Valproinsäure wird nach oraler Applikation schnell und nahezu vollständig resorbiert, die Bioverfügbarkeit beträgt über 90 % (Zaccara *et al.* 1988). Cato und Mitarbeiter beschrieben 1995, dass an der Resorption der Valproinsäure an Darmsegmenten der Ratte sowohl passive als auch aktive Komponenten beteiligt sind. Sie beobachteten aktive Transportvorgänge im Jejunum und

³⁴N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren (NMDA-Rezeptoren) gehören zu den sog. ionotropen Glutamatrezeptoren. Der natürliche Ligand dieser membranständigen Ionenkanäle ist der erregende Neurotransmitter Glutamat, NMDA stellt einen spezifischen Agonisten dar.

³⁵Amyloide sind unlösliche Faserprotein-Aggregate. Eine pathologische Akkumulation von Amyloiden spielt bei der Entstehung verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen eine Rolle.

Ileum. An Caco-2-Zellen wurde zudem ein aktiver Transport der Valproinsäure von der apikalen zur basolateralen Seite festgestellt, der in Anwesenheit von Carbapenemen (β -Laktamantibiotika) reduziert war³⁶ (Torii *et al.* 2002). Zudem wurde vermehrt von Interaktionen der Valproinsäure mit Transportern für Monocarbonsäuren berichtet. Tsuji und Mitarbeiter beschrieben den H^+ -gekoppelten Transport der kurzkettigen Fettsäuren Essigsäure, Benzoesäure, Salicylsäure und Mevalonsäure (Tsuji *et al.* 1990, 1994, Takanaga *et al.* 1994, Tamai *et al.* 1997). Valproat inhibierte jeweils den Transport dieser endogenen metabolisch bedeutenden Säuren. Diese Fettsäuren sind Substrate einiger Mitglieder der MCT-Familie, speziell der MCT1–4 (Tabelle 2.2; Halestrap und Meredith 2004, Morris und Felmler 2008). Entsprechend seiner Struktur könnte Valproat ebenfalls ein Substrat der MCTs darstellen (Abbildung 1.1). Allein die inhibitorische Wirkung der Valproinsäure auf diese Carrier erlaubt jedoch keine Rückschlüsse bezüglich ihres Transportes. Die nicht MCT-vermittelte H^+ -abhängige Aufnahme von Nateglinid an Caco-2-Zellen wurde durch Valproat ebenso reduziert wie der durch OATP2B1 vermittelte Transport von Estron-3-sulfat (Tabelle 2.2; Okamura *et al.* 2002, Sai *et al.* 2006). Wiederum bedeutet dies nicht, dass Valproat ein Substrat des OATP2B1 darstellt (Thwaites und Anderson 2007).

Aufgrund der Lipophilie der Valproinsäure ($\log P$ 2,57; Abbott und Acheampong 1988) könnte vermutet werden, dass der Arzneistoff die BHS durch passive Diffusion überwindet. Diverse Studien weisen jedoch darauf hin, dass sättigbare, aktive Transportsysteme in die Translokation der Valproinsäure durch die BHS involviert sind (Cornford *et al.* 1985, Gibbs *et al.* 2004). Diskutiert werden Transportsysteme wie die Mitglieder der MCT-Familie und nicht dazugehörige Anionen-Austauscher (Terasaki *et al.* 1991) oder ein Transporter für mittelkettige Fettsäuren (Adkison und Shen 1996). Valproat wirkte inhibitorisch auf den Transport von Salicylat, Acetat, Butyrat und Pyruvat durch die BHS (Bolanos und Medina 1997). Zudem wurde an Endothelzellen der BHS die Expression von MCT1 und MCT2 beobachtet (Pierre und Pellerin 2005). Eine Interaktion der Valproinsäure mit MCTs ist daher wahrscheinlich. Am choroidalen Epithel wurde gezeigt, dass ein energieabhängiges Carriersystem für organische Anionen in den Valproattransport involviert ist (Naora *et al.* 1996). Weiterhin wurde vermutet, dass für die Translokation der Valproinsäure an der

³⁶Die pharmazeutische Relevanz derartiger Wechselwirkungen zeigt eine aktuelle Mitteilung des Bundesinstitutes für Arzneimittel und Medizinprodukte, dass die gleichzeitige Anwendung von Valproaten und Carbapenemen nicht kontrollierbar und daher zu vermeiden sei (BfArM, 2010). Diese Anordnung beruht unter anderem auf den Ergebnissen der Studie von Torii und Mitarbeitern, denen zufolge aus einer Hemmung basolateraler Transporter durch Carbapeneme ein reduzierter Valproinsäureflux resultiert (Torii *et al.* 2002).

humanen Plazenta ein Monocarboxylsäure-Transporter verantwortlich ist (Utoguchi und Audus 2000, Nakamura *et al.* 2002). Der Transport erfolgte asymmetrisch über einen sättigbaren H^+ -abhängigen Mechanismus. An Astrozyten interagierte Valproat zudem mit Aufnahmemechanismen für *L*-Glutamat, *L*-Aspartat und GABA (Nilsson *et al.* 1992). Bislang gibt es nur vereinzelt Studien zum Transport der Valproinsäure an heterolog exprimierten Carriern. So zeigte der in HEK293-Zellen exprimierte Anionenaustauscher AE2 eine spezifische Transportaktivität für Valproinsäure (Yabuuchi *et al.* 1998). Daraus lässt sich jedoch nicht ableiten, ob dieses Transportprotein das einzige und hauptsächlich verantwortliche System für die Translokation der Valproinsäure im menschlichen Organismus darstellt. Aus pharmakologischem und pharmazeutischem Interesse wurden daher Untersuchungen zum Mechanismus, zur Richtung und zur Spezifität des Valproattransportes durchgeführt. Zudem wurden die kinetischen Parameter des Transportprozesses ermittelt.

6.2 Mechanismus des Valproattransportes in Caco-2-Zellen und RBE4-Zellen

Um die verantwortlichen Transportmechanismen am Dünndarmepithel und am Endothel der BHS zu charakterisieren, wurde an entsprechend kultivierten Caco-2- und RBE4-Zellen die Aufnahme von Tritium-markiertem Valproat ($[^3H]$ Valproat) bestimmt.

Die $[^3H]$ Valproataufnahme erwies sich an beiden Zelllinien als unabhängig von Na^+ und anderen anorganischen Ionen³⁷. Ein Ansäuern des pH_o stimulierte die Aufnahme hingegen stark (**Anlage 11.4**: Fischer *et al.* 2008, Fig. 1). In Caco-2-Zellen wurde bei pH_o 6,0 im Vergleich zu pH_o 8,5 die 20-fache Menge $[^3H]$ Valproat aufgenommen. In RBE4-Zellen war dieser Effekt noch stärker ausgeprägt; die Aufnahme bei pH_o 6,0 überstieg die bei pH_o 8,5 beobachtete 32-fach. Bezogen auf die Proteinmenge war zudem die Aufnahmeaktivität in RBE4-Zellen wesentlich höher als in Caco-2-Zellen. Mögliche Ursachen für eine entgegengesetzt gerichtete pH-Sensitivität wurden bereits diskutiert (siehe Kapitel 4.2). Dementsprechend bestehen folgende Möglichkeiten für den $[^3H]$ Valproattransport: i) die Aufnahme erfolgt durch einen H^+ -Symporter, angetrieben durch einen nach innen gerichteten H^+ -Gradienten, ii) eine extrazelluläre Protonierung stimuliert das Carriersystem oder iii) der Carrier akzeptiert nur ungeladene Moleküle als Substrat, im Falle der anionischen Valproinsäure (pK_a 4,95; Abbott und Acheampong 1988) die protonierte Form. Das Protonophor FCCP verminderte die $[^3H]$ Valproataufnahme in Caco-2-Zellen um 86 % und in RBE4-Zellen um

³⁷Die Abwesenheit von Na^+ -, Ca^{2+} -, Mg^{2+} -, Cl^- - oder K^+ -Ionen im Inkubationspuffer hatte keinen Einfluss auf die Aufnahme von $[^3H]$ Valproat. Ebenso war die Aufnahme mit K^+ -reichem Puffer nicht signifikant verändert.

79 % (**Anlage 11.4:** Fischer *et al.* 2008, Fig. 1, Insets). Demzufolge stimuliert anscheinend nicht der saure pH_o *per se* die Aufnahme, sondern ein nach innen gerichteter H⁺-Gradient. Der Anteil undissoziierter Valproinsäure variiert im verwendeten pH-Bereich stark. Bei pH 6,0, 7,5 und 8,5 beträgt er 8,2 %, 0,3 % und 0,03 %. Die beobachtete [³H]Valproataufnahme in Caco-2- und RBE4-Zellen änderte sich jedoch nicht im gleichen Verhältnis wie der Anteil der nicht-dissoziierten Valproinsäure. Zudem war die [³H]Valproataufnahme in beiden Zelltypen in hohem Maße sättigbar. Ein Überschuss an unmarkiertem Substrat reduzierte die Aufnahme bei pH 6,0 um 87 % in Caco-2-Zellen und um 91 % in RBE4-Zellen (**Anlage 11.4:** Fischer *et al.* 2008, Fig. 1). 1994 wurde von Tsuji und Mitarbeitern ein spezifisches Transportsystem für Monocarboxylate wie Benzoat und Salicylat in Caco-2-Zellen beschrieben, das durch einen einwärts gerichteten H⁺-Gradienten angetrieben wurde. Der transepitheliale Transport von Benzoat und Salicylat war sättigbar und jeweils in Gegenwart von Acetat, Salicylat, Benzoat und Valproat gehemmt (Tsuji *et al.* 1994, Takanaga *et al.* 1994, Putnam *et al.* 2002). Der Benzoatflux von apikal nach basolateral überwog den Flux in umgekehrter Richtung (Putnam *et al.* 2002). Vergleichbare Ergebnisse ergab die vorliegende Studie zum Valproinsäureflux durch Caco-2-Zellen. Der J_{a-b} des [³H]Valproates war mit $21 \pm 1 \text{ \%}/\text{h}/\text{cm}^2$ 150-fach höher als der des *space markers* Mannitol und überstieg den J_{b-a} des [³H]Valproates 14-fach (**Anlage 11.4:** Fischer *et al.* 2008, Tabelle 3). Demnach überwiegen an intestinalen Epithelzellen für Valproinsäure ebenso wie für Benzoat die absorptiven Prozesse über die sekretorischen. Vergleichbare Ergebnisse wurden in Studien zum Nateglinidflux an Caco-2-Zellen gezeigt (Okamura *et al.* 2002). RBE4-Zellen bilden in Kultur auf permeablen Filtern keine ausreichend dichten Zellrasen um entsprechende Untersuchungen zum spezifischen Transport durch die BHS vorzunehmen. An Ratten wurden jedoch nach Injektion von Valproat in die Halsschlagader asymmetrische Transportprozesse an der BHS beobachtet (Cornford *et al.* 1985). Die Translokation aus der Hirnflüssigkeit in das Blut überwog dabei die Aufnahmeprozesse aus dem Blut in das Gehirn.

Mit zunehmender Inkubationszeit war in beiden Zelltypen ein zunächst schneller, im Folgenden jedoch abgeschwächter Anstieg der [³H]Valproataufnahme zu beobachten (**Anlage 11.4:** Fischer *et al.* 2008, Fig. 2). Nach 5 Minuten wurde in Caco-2- bzw. RBE4-Zellen bei pH_o 6,0 eine maximale Aufnahme von 262 fmol bzw. 474 fmol pro mg Protein gemessen. Ein erreichbares Zellvolumen von 10 µl pro mg Protein³⁸ vorausgesetzt, entspricht dies bei einer Angebotskonzentration von 1 nM [³H]Valproat einer 25-fachen (Caco-2) bzw. 50-fachen

³⁸Bisher unveröffentlichte Daten unserer Arbeitsgruppe (siehe Kapitel 5.2, Fußnote 31).

(RBE4) intrazellulären Anreicherung. Betrachtet man nur die undissoziiert vorliegende Valproinsäure, erfolgte ebenfalls eine Akkumulation. In Caco-2-Zellen ($\text{pH}_i \sim 7,4$; Liang *et al.* 2007) war die intrazelluläre Anreicherung nicht-dissoziierter Valproinsäure relativ geringfügig. In RBE4-Zellen ($\text{pH}_i \sim 7,2$; Smith und Drewes 2006) wurde hingegen eine Anreicherung auf mehr als das 3-fache beobachtet. Effekte einer lysosomalen Akkumulation, die für die kationischen Substanzen diskutiert wurden, sind im Falle der anionischen Valproinsäure auszuschließen. Eine steigende Substratkonzentration führte zur Sättigung des Transportprozesses (**Anlage 11.4**: Fischer *et al.* 2008, Fig. 3). Die nicht-sättigbare Komponente der [^3H]Valproataufnahme in Caco-2-Zellen betrug 8,3 %. Die kinetischen Untersuchungen ergaben einen K_t -Wert von $0,6 \pm 0,2$ mM und eine V_{\max} von 146 ± 13 nmol/2 min pro mg Protein. An RBE4-Zellen lag die nicht-sättigbare Komponente bei 1,8 %. V_{\max} betrug 245 ± 10 nmol/min pro mg Protein. Der K_t -Wert von $0,8 \pm 0,1$ mM war mit dem an Caco-2-Zellen ermittelten vergleichbar. Der K_t -Wert der Valproinsäureaufnahme ist demnach niedriger als die ermittelten Werte für die Aufnahme von Benzoat und Salicylat an Caco-2-Zellen ($K_t = 4,8$ mM und $5,3$ mM; Tsuji *et al.* 1994, Takanaga *et al.* 1994) und primären Kapillarendothelzellen ($K_t = 3,4$ mM; Terasaki *et al.* 1991). Relativ spezifische H^+ -abhängige Transportmechanismen wie für Benzoat, Acetat oder Salicylat wurden in diversen Studien für weitere Monocarboxylate wie Lactat, Pyruvat oder Nateglinid beschrieben (Enerson und Drewes 2003, Halestrap und Meredith 2004, Okamura *et al.* 2002). Einige dieser Studien berichteten von einer inhibitorischen Wirkung der Valproinsäure auf den untersuchten Transportprozess. In Anbetracht der Übereinstimmungen zwischen der Valproataufnahme und der Aufnahme von MCT-Substraten durch Mitglieder der MCT-Familie stellte sich die Frage, i) ob Valproinsäure ein Substrat eines oder mehrerer MCTs darstellt bzw. wenn dem so ist, ii) ob ein MCT das hauptsächlich verantwortliche System für den Valproinsäuretransport am intestinalen Epithel und/oder am Endothel der BHS ist. Für die Beantwortung dieser Frage sind neben dem Mechanismus zum einen die spezifische Lokalisation der MCTs und zum anderen die Spezifität des Systems für bestimmte Substrate bzw. Inhibitoren von Bedeutung.

Ein Symport von Monocarboxylaten mit Protonen wurde bislang nur für MCT1-4 beschrieben (Enerson und Drewes 2003, Merezhinskaya und Fishbein 2009). In Caco-2-Zellen wurde die Expression von MCT1 sowie -weniger stark- von MCT3 und MCT4 gezeigt (Hadjiagapiou *et al.* 2000, Gill *et al.* 2005, Morris und Felmlee 2008). Gill und Mitarbeiter demonstrierten die Expression von MCT1 in der apikalen Membran von Caco-2-Zellen und

humanem Intestinum (Gill *et al.* 2005). Einige Autoren favorisierten jedoch die basolaterale Expression von MCT1 am menschlichen Dünndarmepithel (Thwaites und Anderson 2007). Im Gehirn wurden MCT1, MCT2 und MCT4 nachgewiesen (Pierre und Pellerin 2005). Während MCT1 eindeutig in großen Mengen in Endothelzellen der Kapillargefäße exprimiert wird, ist die Expression von MCT2 umstritten. Die Expression von MCT4 erfolgt anscheinend ausschließlich in Astrozyten. Sollte Valproat ein Substrat eines der MCTs darstellen, ist eine Beteiligung des MCT1 an der Translokation von Valproat aus dem Blut in das Gehirn demnach am wahrscheinlichsten.

6.3 Einfluss potentieller Inhibitoren auf den [³H]Valproattransport in Caco-2-Zellen und RBE4-Zellen

Um nähere Informationen über die am Transport des Valproates beteiligten Mechanismen zu erhalten, wurde die Substratspezifität des Transportsystems untersucht. Abgesehen von Valproinsäure interagierten verschiedene anionische Substanzen mit dem Valproattransport. Benzoat, kurzkettige Fettsäuren wie Acetat sowie nicht-steroidale Antiphlogistika wie Salicylat inhibierten die [³H]Valproataufnahme an Caco-2-Zellen sehr stark (Abbildung 6.1, **Anlage 11.4**: Fischer *et al.* 2008, Tabelle 1). Die in entsprechenden Kompetitionsstudien ermittelten Inhibitorkonstanten lagen im Bereich von $1,7 \pm 0,2$ mM für Butyrat bis $5,2 \pm 0,1$ mM für Acetat (**Anlage 11.4**: Fischer *et al.* 2008, Tabelle 2). In verschiedenen Studien an Caco-2-Zellen wurde der H⁺-stimulierte Transport von Butyrat stark durch L-Lactat inhibiert (Hadjigapiou *et al.* 2000, Stein *et al.* 2000). L-Lactat und Pyruvat sind prototypische Substrate der Transportproteine MCT1-4 (Halestrap und Meredith 2004); die Affinitäten variieren an MCT1-3 mit K_m -Werten von 0,1 mM bis 6 mM. Interessanterweise reduzierten weder Lactat noch Pyruvat oder γ -Hydroxybutyrat (GHB) die [³H]Valproataufnahme signifikant (Abbildung 6.1, **Anlage 11.4**: Fischer *et al.* 2008, Tabelle 1). Eine Beteiligung der Transportsysteme MCT1-3 am Valproattransport in Caco-2-Zellen ist daher auszuschließen. Hingegen transportiert MCT4 L-Lactat und Pyruvat mit niedriger Affinität (K_m 28 mM und 150 mM; Halestrap und Meredith 2004). Allerdings wurde bislang keine Expression von MCT4 an der apikalen Membran von Caco-2-Zellen gezeigt.

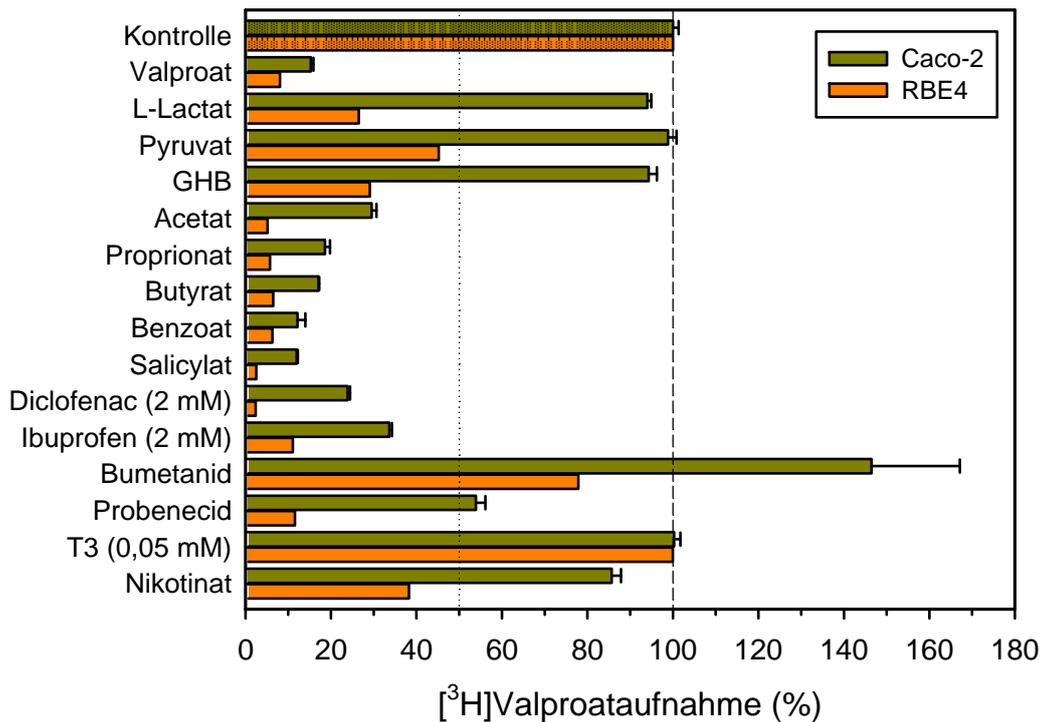


Abbildung 6.1. **Substratspezifität der $[^3\text{H}]$ Valproataufnahme in Caco-2- und RBE4-Zellen.** Die Inhibitoren wurden in einer Konzentration von 10 mM eingesetzt (Ausnahmen sind gekennzeichnet).

4,4'-Diisothiocyanostilben-2,2'-disulfonsäure (DIDS) ist ein Inhibitor des MCT1, des MCT2 sowie diverser Anionen-Austauscher. Yabuuchi und Mitarbeiter beschrieben, dass der DIDS-sensitive intestinale Anionen-Austauscher AE2 den Transport der Valproinsäure vermittelt (Yabuuchi *et al.* 1998). Die Stilbensulfonsäure DIDS hatte jedoch keinen Effekt auf die Aufnahme des $[^3\text{H}]$ Valproates in Caco-2-Zellen. DIDS-sensitive Mechanismen - unter anderen MCT1, MCT2 und die Anionen-Austauscher AE1-3 (Tabelle 2.2) - sind demnach nicht am intestinalen Valproinsäuretransport beteiligt. Ein Mitwirken von MCT6, MCT8 und MCT10 kann gleichfalls ausgeschlossen werden: i) heterolog in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert, transportiert MCT6 zwar die Inhibitoren Probenecid und Nateglinid, nicht jedoch Valproat und Salicylat (Murakami *et al.* 2005), ii) Standardsubstrate des MCT6, des MCT8 bzw. des MCT10 sind Bumetanid, *L*-Triiodothyronin (T3) bzw. aromatische Aminosäuren (Halestrap und Meredith 2004); diese Substanzen hatten keinen Effekt auf die $[^3\text{H}]$ Valproataufnahme an Caco-2-Zellen (Abbildung 6.1, **Anlage 11.4**: Fischer *et al.* 2008, Tabelle 1), iii) im Gegensatz zum stark H^+ -abhängigen $[^3\text{H}]$ Valproattransport erfolgt der

durch MCT6, MCT8 und MCT10 vermittelte Uniport H^+ -unabhängig. Da die [3H]Valproat-aufnahme komplett Na^+ -unabhängig verlief, ist eine Beteiligung Na^+ -abhängiger Carrier für Monocarboxylate wie des Na^+ -abhängigen Monocarboxylat-Transporters SMCT auszuschließen (Tabelle 2.2; Gopal *et al.* 2005). Grundsätzlich könnte einer der bekannten H^+ -abhängigen Carrier der SLC-Familien für den Valproattransport verantwortlich sein. So transportieren die H^+ -gekoppelten Aminosäure-Transporter PAT1 und PAT2 elektroneutral kurzkettige Fettsäuren (Foltz *et al.* 2004). Allerdings beeinflussten die affinen PAT1-Substrate *L*-Prolin und GABA die Valproataufnahme weder in Caco-2- noch in RBE4-Zellen (**Anlage 11.4**: Fischer *et al.* 2008, Tabelle 1). Desgleichen erwiesen sich weder Estron-3-sulfat noch MPP^+ , TEA, Carnitin oder PAH als Inhibitoren. Eine Beteiligung eines GABA-Transporters³⁹, des OATP2B1, des PMAT, der OCTs oder der OATs an der Valproinsäureaufnahme ist daher unwahrscheinlich (Tabelle 2.2). Die intestinale Aufnahme der Valproinsäure gleicht der von Mevalonat und Acetat an Vesikeln der intestinalen Bürstensaummembran von Kaninchen (Tsuji *et al.* 1990, Tamai *et al.* 1997). Der H^+ -gekoppelte Transport wurde jeweils durch Valproat, Acetat, Benzoat und Salicylat gehemmt. Benzoat und Valproat wurden zudem in die Vesikel aufgenommen (Tamai *et al.* 1997). Der Transport war jeweils durch einen einwärts gerichteten H^+ -Gradienten sowie durch einen auswärts gerichteten HCO_3^- -Gradienten stimuliert und folglich zum Teil durch einen Anionen-Antiporter vermittelt. Weiterhin reduzierte Valproat den Transport von Benzoat, Salicylat und Nateglinid an Caco-2-Zellen, der durch einen pH-abhängigen Carrier für Monocarboxylate vermittelt wurde (Tsuji *et al.* 1994, Takanaga *et al.* 1994, Okamura *et al.* 2002). Takanaga postulierte ein identisches Transportsystem für Benzoat und Salicylat (Takanaga *et al.* 1994). Die ermittelten Affinitätskonstanten waren mit der inhibitorischen Konstante des Salicylats für die Inhibition des intestinalen Valproattransportes vergleichbar. Zudem ergaben eigene Studien zur Aufnahme von [^{14}C]Salicylat an Caco-2-Zellen ähnliche Ergebnisse. Die Aufnahme war stark pH-abhängig. Eine Verminderung des pH_o von 7,5 auf 6,0 stimulierte die Aufnahmeaktivität mehr als 10-fach (**Anlage 11.4**: Fischer *et al.* 2008, Fig. 4). Ein Überschuss an unmarkiertem Salicylat bzw. Valproat (10 mM) reduzierte die Aufnahme bei pH_o 6,0 um 74 % bzw. 64 %. Der Transport von Salicylat und Valproat könnte daher durch ein identisches System erfolgen. Vermutlich wird die intestinale Resorption der Valproinsäure

³⁹GABA ist ein Substrat der GABA-Transporter 1-3 (GAT 1-3) sowie des Betain/GABA Transporters BGT1 (SLC6A1,11-13).

durch einen *orphan*⁴⁰ MCT, möglicherweise einen H⁺-Symporter, vermittelt, der L-Lactat nicht als Substrat akzeptiert. Die Beteiligung eines DIDS-unempfindlichen Anionen-Antiporters ist ebenfalls nicht auszuschließen. Frühere Studien identifizierten die Valproinsäure als Substrat des MCT1 (Utoguchi und Audus 2000, Thwaites und Anderson 2007). Den Ergebnissen dieser Arbeit folgend würde dies bedeuten, dass der MCT1 nicht an der apikalen Membran von Caco-2-Zellen exprimiert ist und der intestinale Valproinsäuretransport durch einen anderen Mechanismus vermittelt wird.

An der BHS stellt sich die Situation anders dar. Generell interagierten die Inhibitoren der [³H]Valproataufnahme an Caco-2-Zellen ebenso mit der Aufnahme an RBE4-Zellen. Valproat, die kurzkettigen Fettsäuren, Salicylat⁴¹, Benzoat, Nateglinid und Diclofenac reduzierten die aufgenommene Menge Valproat erheblich (Abbildung 6.1, **Anlage 11.4**: Fischer *et al.* 2008, Tabelle 1). Die inhibitorische Stärke der einzelnen Substanzen war an den RBE4-Zellen deutlich höher als an den Caco-2-Zellen. Analog zur intestinalen Aufnahme bewirkten weder TEA, MPP⁺ oder Carnitin noch PAH eine Reduktion. Während L-Lactat, D-Lactat, Pyruvat, GHB, Probenecid und Nikotinat an Caco-2-Zellen ineffektiv waren, reduzierten sie die [³H]Valproataufnahme in RBE4-Zellen deutlich (**Anlage 11.4**: Fischer *et al.* 2008, Tabelle 1). Zudem war Bumetanid schwächer, aber dennoch signifikant inhibitorisch wirksam. Die K_i-Werte von 0,4 ± 0,1 mM für Nateglinid bis 0,8 ± 0,1 mM für Acetat spiegelten die stärker ausgeprägten Interaktionen wieder (**Anlage 11.4**: Fischer *et al.* 2008, Tabelle 2). L-Lactat war niedriger affin (K_i 2,5 ± 0,2 mM). Der Inhibitorspezifität des Valproattransportes an RBE4-Zellen zufolge ist eine Beteiligung des MCT1, des MCT2 oder des MCT4 zu vermuten. An Endothelzellen der BHS wurde bislang nur die Expression von MCT1 (Pierre und Pellerin 2005) gezeigt. Mittels immunozytochemischer und PCR-Untersuchungen wurde MCT1 zudem in RBE4-Zellen als vorherrschende MCT Isoform identifiziert (Smith und Drewes 2006). Unsere Ergebnisse unterstützen somit die Hypothese, dass MCT1 an der BHS das hauptsächlich verantwortliche Transportsystem für Valproat darstellt. Da MCT1 an der apikalen und der basolateralen Membran von Hirnendothelzellen lokalisiert wurde (Gerhart *et al.* 1997), ist eine Beteiligung sowohl am Influx als auch am Efflux der Valproinsäure wahrscheinlich.

⁴⁰Nach derzeitigen Kenntnissen handelt es sich bei folgenden Mitgliedern der MCT-Familie um *orphan* Transporter: MCT5, MCT7, MCT9 und MCT11-14 (Morris und Felmler 2008).

⁴¹Salicylat erwies sich erneut als potenter Inhibitor der [³H]Valproataufnahme. Aufgrund dessen durchgeführte Untersuchungen der Aufnahme von [¹⁴C]Salicylat an RBE4-Zellen zeigten analog zur intestinalen Aufnahme eine starke pH-Abhängigkeit (**Anlage 11.4**: Fischer *et al.* 2008, Fig. 4) sowie eine vergleichbare Reduktion der Aufnahme bei pH 6,0 durch unmarkiertes Salicylat bzw. Valproat auf 91 % bzw. 85%.

Die therapeutische Serumkonzentration der Valproinsäure beträgt 60-120 mg/l (Covanis *et al.* 1982). Die in dieser Studie an Hirnendothelzellen ermittelte Transportkonstante liegt im entsprechenden Konzentrationsbereich von 0,36-0,72 mM. Bei therapeutischen Serumkonzentrationen erfolgt demnach die Translokation der Valproinsäure an der BHS mit halbmaximaler Transportgeschwindigkeit. Eine derartige Betrachtung der Translokation am intestinalen Epithel ist eher spekulativ, da die luminal erreichte Konzentration nach oraler Applikation nicht genau bekannt ist. Valproinsäure wird in relativ hohen Dosen von 20-30 mg pro kg Körpergewicht eingesetzt (Covanis *et al.* 1982). Nach einer solchen Gabe liegt die lokale Valproinsäurekonzentration im Darmlumen im unteren millimolaren Bereich. Die Resorption der Valproinsäure am intestinalen Epithel erfolgt demnach anscheinend ebenfalls mit halbmaximaler Transportgeschwindigkeit oder schneller.

Den Ergebnissen dieser Studie zufolge wird Valproinsäure nach oraler Applikation durch die Aktivität eines spezifischen H^+ -abhängigen DIDS-unempfindlichen Transportsystems gegen einen Konzentrationsgradienten in intestinalen Epithelzellen akkumuliert. Dieses Transportsystem fungiert möglicherweise als H^+ /Monocarboxylat-Symporter. Der folgende Efflux könnte durch MCT4 und/oder MCT5 vermittelt sein. Das starke Überwiegen der absorptiven über die sekretorischen Prozesse erklärt die hohe orale Bioverfügbarkeit dieses Arzneistoffes. Die anschließende Permeation der BHS ist unabdingbar, um therapeutisch wirksame Konzentrationen in der Umgebung der neuronalen Zielstrukturen der Valproinsäure zu erreichen. Diese Translokation wird vermutlich sowohl an der luminalen als auch an der abluminalen Membran der Endothelzellen durch das Transportsystem MCT1 vermittelt.

7 VERGLEICHENDE BETRACHTUNGEN

Vgl. Anlagen 11.1-11.4 (Fischer *et al.* 2007, 2008, 2010a, 2010b)

Im Fokus der vorliegenden Arbeit standen Untersuchungen zum Transport der organischen kationischen Substanzen Clonidin, PEA und Codein sowie des anionischen Arzneistoffs Valproinsäure in Darm- und Hirnzellen. Jede dieser Strukturen weist einen lipophilen Charakter auf; bei physiologischen pH-Werten liegen sie überwiegend in geladener Form vor. Daher tragen wahrscheinlich sowohl passive Diffusionsvorgänge gemäß der pH-Partitionstheorie als auch Carrier-vermittelte Transportprozesse zur Translokation der untersuchten Substanzen bei.

Die Aufnahme von Clonidin, Codein, PEA und Valproinsäure verlief unabhängig von Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Cl^- , Glucose und ATP. Jedoch zeigte sich in jedem Fall eine starke pH-Abhängigkeit. In Abbildung 7.1 sind beispielhaft für Codein und Valproinsäure verhältnismäßig der Anteil des undissoziierten Substrates und die jeweilige Substrataufnahme bei pH 6,0, 7,5 und 8,5 dargestellt.

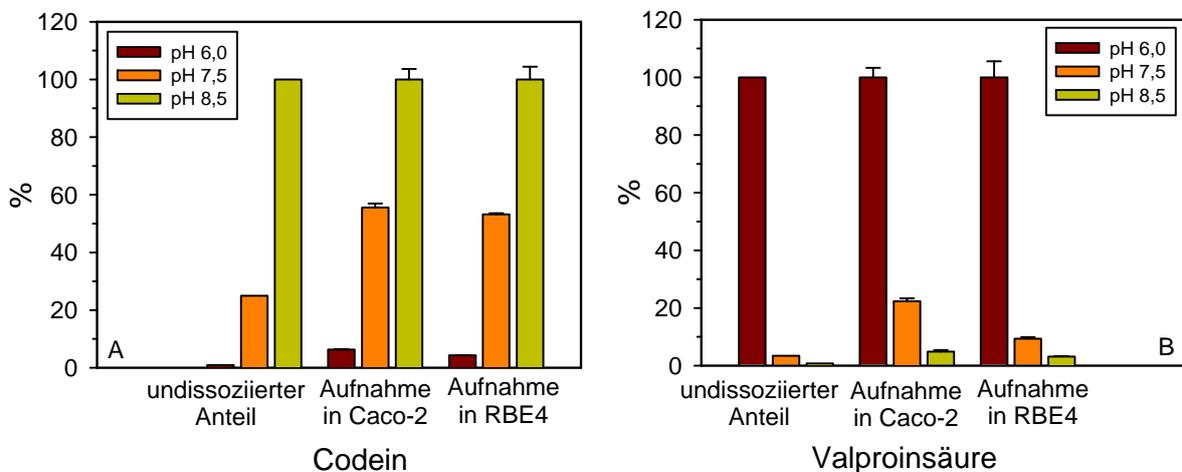


Abbildung 7.1. **Ionisationsgrad und Aufnahme von Codein (A) und Valproinsäure (B).** Gegenüberstellung des Anteils undissoziiert vorliegenden Substrates und der jeweiligen Substrataufnahme in Caco-2- und RBE4-Zellen bei pH 6,0, 7,5 bzw. 8,5 im Inkubationspuffer. Als Bezugsgröße (100 %) dienten jeweils die Maximalwerte bei pH 8,5 für Codein (A) bzw. pH 6,0 für Valproinsäure (B).

Bei keinem der untersuchten Transportmechanismen stimmten die Relationen zwischen den jeweils bei pH 6,0, 7,5 und 8,5 vorliegenden Fraktionen undissoziierten Substrates mit den Relationen der beobachteten Aufnahmeaktivitäten überein. Es wurde beobachtet, dass die Aufnahme der kationischen Substanzen PEA und Codein durch einen auswärts gerichteten

H⁺-Gradienten stimuliert wird (**Anlagen 11.2 und 11.3**: Fischer *et al.* 2010a, 2010b). An der apikalen Seite des Dünndarmepithels herrscht ein saures Mikroklima (Daniel *et al.* 1989). Eine Nahrungsaufnahme führt zwar zu einer temporären Alkalisierung im Darm, beeinflusst jedoch nicht dieses Mikroklima⁴². Der physiologische pH-Wert am Endothel der BHS wird durch den Blutstrom bestimmt und liegt bei pH 7,4. Intrazellulär wurde an RBE4-Zellen ein pH-Wert von 7,2 gemessen (Smith und Drewes 2006). Demnach liegt unter physiologischen Bedingungen ein schwacher auswärts gerichteter H⁺-Gradient vor. Bei den hier untersuchten Transportprozessen handelt es sich möglicherweise um bidirektional arbeitende Mechanismen (Kuwayama *et al.* 2008). In Abhängigkeit von den vorliegenden Konzentrationsgradienten für Protonen und das Substrat vermittelt das Transportsystem den Efflux oder aber den Influx des Substrates. Im Gegensatz zur Aufnahme der kationischen Substanzen war die der anionischen Valproinsäure durch einen einwärts gerichteten H⁺-Gradienten stark stimuliert (**Anlage 11.4**: Fischer *et al.* 2008, Fig. 1). Vermutlich dient der physiologische H⁺-Gradient am Dünndarmepithel als treibende Kraft der intestinalen Valproinsäureresorption. Die beobachteten Charakteristika des Valproinsäuretransportes an der BHS deuten auf MCT1 als verantwortliches Transportsystem hin. MCT1 fungiert zum Teil als Monocarboxylate-Antiporter. Hauptsächlich vermittelt der Carrier jedoch den Cotransport von Protonen mit Monocarboxylaten wie Lactat (Halestrap und Meredith 2004, Morris und Felmler 2008). Eine ausreichende extrazelluläre H⁺-Konzentration ist somit essentiell für die Transportaktivität; ein H⁺-Gradient treibt den Transport zusätzlich an. Die Rolle des H⁺-Gradienten erschloss sich aus den Aufnahmemessungen unter Zusatz des Protonophors FCCP. An Caco-2- und RBE4-Zellen wurde die Aufnahme des Valproates durch FCCP deutlich stärker reduziert als die von Codein (**Anlagen 11.3 und 11.4**: Fischer *et al.* 2010b, 2008). FCCP transportiert in seiner ungeladenen Form Protonen durch die Membran und kehrt anschließend in anionischer Form zurück (Liu *et al.* 2008). Bei den Untersuchungen zur Valproataufnahme erfolgte die Rückkehr nach außen gerichtet und wurde durch das Membranpotential begünstigt. Hingegen war die einwärts gerichtete Rückkehr bei den Untersuchungen zur Aufnahme der Kationen verlangsamt und der zu beobachtende Effekt somit schwächer.

In den untersuchten Zelltypen war eine intrazelluläre Akkumulation sowohl von Clonidin, PEA und Codein als auch von Valproat zu beobachten (Tabelle 7.1). Aufgrund der unterschiedlichen pH-Werte innerhalb und außerhalb der Zellen kann entsprechend der pH-Parti-

⁴²Im oberen Bereich der Villi wurde ein pH-Wert von 6,6-6,9 gemessen (Daniel *et al.* 1989). Der pH_i von Caco-2-Zellen ist ca. 7,4 (Liang *et al.* 2007). Ein nach außen gerichteter H⁺-Gradient würde demnach bei einem pH_o > 7,4 vorliegen.

tionstheorie intrazellulär eine höhere totale Substratkonzentration erreicht werden als extrazellulär angeboten wurde. Betrachtet man jedoch ausschließlich den undissoziierten Anteil des Substrates, sollte diesbezüglich maximal ein Konzentrationsausgleich erfolgen. Dennoch war eine 10- bis 40-fache intrazelluläre Akkumulation des nicht-dissoziierten Clonidins, PEAs und Codeins zu beobachten. Hingegen waren die Konzentrationen der nicht-dissoziierten Valproinsäure nach maximaler Aufnahme ausgeglichen (Tabelle 7.1).

Tabelle 7.1. **Intrazelluläre Anreicherung von [³H]Clonidin, [¹⁴C]PEA, [³H]Codein und [³H]Valproat.**

Substrat (c _o)	Zelllinie	Intrazelluläre Anreicherung	
		Substrat -total-	Substrat -undissoziiert-
Clonidin (3 nM)	SH-SY5Y	50-70-fach	26-40 -fach
PEA (1,1 μM)	Caco-2	16-fach	12 -fach
Codein (1,2 nM)	Caco-2	12-fach	10 -fach
	RBE4	60-fach	30 -fach
Valproat (1 nM)	Caco-2	25-fach	1,1 -fach
	RBE4	50-fach	3,3 -fach

c_o = Gesamtkonzentration des radioaktiv markierten Substrates im Inkubationspuffer

Clonidin, PEA und Codein unterliegen als basische, lysosomotrope Substanzen dem Phänomen der Ionenfalle (De Duve *et al.* 1974, Trapp *et al.* 2009), einem verschiedenen Autoren zufolge sättigbaren Akkumulationsprozess in sauren Zellorganellen (Heikkinen *et al.* 2009, Kornhuber *et al.* 2010). Effekte einer intrazellulären Verteilung tragen vermutlich zu der ausgeprägten Akkumulation von Clonidin, PEA und Codein bei, sie erklären diese jedoch nicht vollständig. Das Ausmaß hängt zum einen von den Substrateigenschaften wie Struktur, Lipophilie und Basenstärke, zum anderen aber vor allem vom Zelltyp ab (Neumann *et al.* 2004). In unterschiedlichen Geweben variieren Art und Menge der intrazellulären Proteine, Lipide und Zellorganellen stark. Die auf diese Weise intrazellulär angereicherte Substratmenge ist daher schwer zu quantifizieren.

Die in dieser Arbeit untersuchten Aufnahmeprozesse folgten jeweils einer Michaelis-Menten-Kinetik. In Tabelle 7.2 sind die Transportkonstanten (K_t) der sättigbaren Komponente gegenübergestellt. Sie liegen im unteren millimolaren Bereich, ähnlich den beschriebenen

K_t -Werten für den Transport der organischen Kationen Diphenhydramin und Chlorphenamin (0,9 mM; Mizuuchi *et al.* 1999, 2000) oder MDMA (1,1 mM; Kuwayama *et al.* 2008). Vergleicht man die Transportkonstanten für die Aufnahme der organischen Kationen an Caco-2-Zellen, sind die der PEA- und Codeinaufnahme 5- bzw. 10-fach höher als die der Clonidinaufnahme (Fischer *et al.* 2006). Der K_t -Wert der Clonidinaufnahme an SH-SY5Y-Zellen stimmt mit den an der BHS, an Keratinozyten und an Epithelzellen der Plazenta und des Intestinums ermittelten Werten überein (0,3-1,34 mM; Huwyler *et al.* 1997, Andre *et al.* 2009, Grafe *et al.* 2004, Müller *et al.* 2004, Fischer *et al.* 2006).

Tabelle 7.2. **Michaelis-Konstanten des Transportes von Clonidin, PEA, Codein und Valproinsäure.**

Zelllinie	K_t (mM)			
	Clonidin	PEA	Codein	Valproat
Caco-2	0,5 ± 0,1 ^a	2,6 ± 0,2	4,7 ± 1,4	0,6 ± 0,2
SH-SY5Y	0,7 ± 0,1	-	-	-
RBE4	-	-	0,4 ± 0,1	0,8 ± 0,1

^aFischer *et al.* 2006

Hinsichtlich der Substratspezifität der Aufnahme von Clonidin, PEA und Codein waren deutlich Gemeinsamkeiten zu erkennen. Auffällig war, dass MPP^+ , TEA, *L*-Carnitin, Cholin und weitere typische Substrate molekular identifizierter Transportproteine die Aufnahme nicht beeinflussten (**Anlagen 11.1-11.3**: Fischer *et al.* 2007, 2010a, 2010b). Demnach ist für den Transport von Clonidin, PEA oder Codein an den untersuchten Zelllinien keiner der bisher bekannten Transporter für organische Kationen verantwortlich: weder ein OCT oder OCTN noch ein MATE-Transporter, PMAT, CHT1 oder CTL1 (Übersicht in Tabelle 2.1). Eine Beteiligung Monoamin-Neurotransmitter transportierender Systeme kann ebenfalls ausgeschlossen werden; die jeweils eingesetzten Monoamine beeinflussten die Aufnahme der kationischen Substrate nicht. Allerdings interagierte eine Vielzahl organischer basischer Substanzen mit den Transportmechanismen für Clonidin, PEA und Codein: Imidazolin-derivate wie Clonidin, MAO-B-Inhibitoren wie PEA und Opioide wie Codein inhibierten die Aufnahme der radioaktiv markierten Substrate in die epithelialen und neuronalen Zellen. Zudem verminderten zyklische Antidepressiva (z.B. Imipramin, Doxepin), Antihistaminika (z.B. Diphenhydramin), Psychostimulantien (z.B. Kokain, Amphetamin), Chinidin,

Tryptamin und andere die intrazelluläre Akkumulation der kationischen Substrate. Aufgrund der vergleichbaren Spezifität könnte ein identischer Mechanismus für den Transport der drei Kationen verantwortlich sein. Vergleicht man den Effekt ausgewählter Inhibitoren auf die Substrataufnahme an Caco-2-Zellen, war die [^3H]Clonidinaufnahme (Fischer *et al.* 2006) generell stärker reduziert als die der [^3H]Codeinaufnahme (Abbildung 7.2). Die größten Unterschiede von 36 %, 37 % und 45 % waren für Kokain, Ethylmorphin und Verapamil zu beobachten. Der inhibitorische Einfluss auf die [^{14}C]PEA-Aufnahme war für bestimmte Substanzen wie PEA, Tranylcypromin, Phenelzin und Tryptamin mit dem Einfluss auf die [^3H]Clonidinaufnahme vergleichbar, für andere Inhibitoren wie Clonidin, Kokain, Codein und Verapamil hingegen eher mit dem Einfluss auf die [^3H]Codeinaufnahme (Abbildung 7.2). Auffällig war, dass Chinin und Chinidin die Aufnahme des [^{14}C]PEAs weniger stark beeinflussten als die des [^3H]Codeins. Lediglich Amphetamin reduzierte die Aufnahme aller drei Substanzen gleich stark.

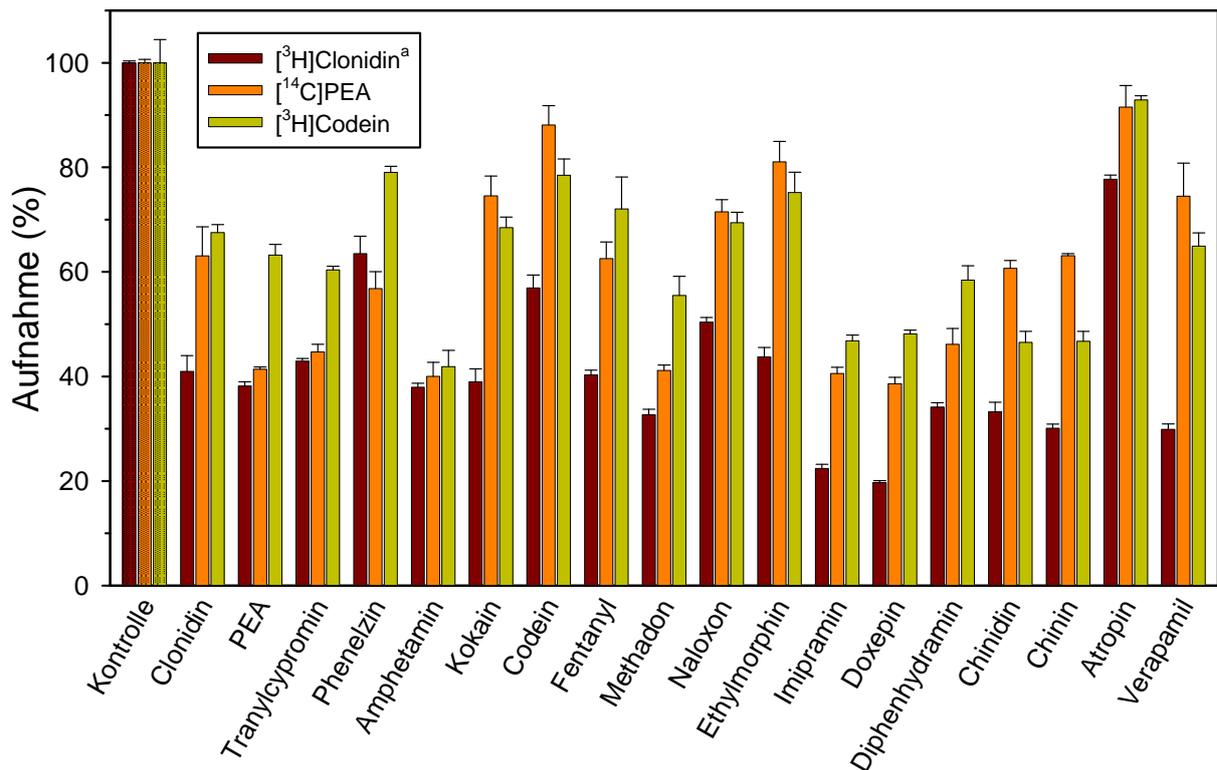


Abbildung 7.2. **Substratspezifität der Aufnahme von [^3H]Clonidin, [^{14}C]PEA und [^3H]Codein an Caco-2-Zellen.** Die Inhibitoren wurden in einer Konzentration von 2 mM eingesetzt.

^aDaten bisher unveröffentlicht bzw. aus Fischer *et al.* 2006

Eine Gegenüberstellung der Affinitätskonstanten der Inhibitoren der Aufnahme von [³H]Clonidin, [¹⁴C]PEA und [³H]Codein an Caco-2-Zellen spiegelt diese Beobachtungen nur zum Teil wider (Tabelle 7.3). Tendenziell waren die Affinitäten bezüglich der [³H]Clonidinaufnahme höher. Grundsätzlich unterschieden sich die K_i -Werte jedes einzelnen Inhibitors jedoch nur marginal voneinander. Die Parameter differierten am stärksten bei Chinidin und Chinin. Die bezüglich der [¹⁴C]PEA-Aufnahme ermittelten Inhibitorkonstanten waren 7- bzw. 10-fach höher als die bezüglich der [³H]Clonidinaufnahme ermittelten Konstanten.

Tabelle 7.3. **Inhibitorkonstanten ausgewählter Hemmstoffe der Aufnahme von [³H]Clonidin, [¹⁴C]PEA und [³H]Codein an Caco-2-Zellen.**

	[³ H]Clonidin	[¹⁴ C]PEA	[³ H]Codein
	K_i (mM)	K_i (mM)	K_i (mM)
Clonidin	0,79 ^a	3,4 ± 0,3	2,3 ± 0,3
Idazoxan	0,86 ± 0,10 ^b	2,5 ± 0,2	1,4 ± 0,1
PEA	0,83 ± 0,10 ^b	0,82 ± 0,15	1,7 ± 0,2
Phenelzin	1,7 ± 0,1 ^b	1,3 ± 0,2	1,8 ± 0,1
Codein	1,6 ^a	4,6 ± 0,4	5,5 ± 0,3
Methadon	0,46 ± 0,03 ^b	0,70 ± 0,03	1,2 ± 0,2
Diphenhydramin	0,38 ^a	0,98 ± 0,01	0,73 ± 0,08
Chinidin	0,41 ^a	2,8 ± 0,1	1,1 ± 0,1
Chinin	0,30 ^a	3,2 ± 0,8	1,0 ± 0,1

^aFischer *et al.* 2006, ^bDaten bisher nicht veröffentlicht

Die Ergebnisse zur Spezifität der untersuchten Mechanismen erlauben keine eindeutige Entscheidung über eine mögliche Identität bzw. Verschiedenheit der für den Transport von Clonidin, PEA und Codein verantwortlichen Systeme. Die beobachteten Unterschiede hinsichtlich der inhibitorischen Potenz weisen jedoch deutlich auf die Beteiligung vermittelnder Transportsysteme hin. Strukturell betrachtet sind die Inhibitoren durch einen lipophilen, aromatischen Grundkörper und eine *N*-haltige Seitenkette gekennzeichnet. Der von Mizuuchi beschriebene H⁺/tertiäre Amine-Antiporter weist eine ähnliche Spezifität auf; dieses Transportsystem erkennt spezifisch *N*-Dimethyl- und *N*-Diethyl-Reste (Mizuuchi *et al.* 2000). Aufgrund der enthaltenen Aminogruppe - überwiegend sekundär oder tertiär - sind die Inhibitoren als lysosomotrope Substanzen einzuordnen. Eine auf pH-Partition und

Lysosomotropismus begründete intrazelluläre Akkumulation wird durch andere lysosomotrope Substanzen in Abhängigkeit von deren Lipophilie und pK_a -Wert inhibiert (Kornhuber *et al.* 2010). In Abbildung 7.3 sind beispielhaft für $[^3\text{H}]$ Codein die beobachtete Aufnahme in Anwesenheit der Inhibitoren an Caco-2-Zellen bzw. die Inhibitorkonstanten in Abhängigkeit von der Lipophilie und der Basenstärke der Inhibitoren dargestellt.

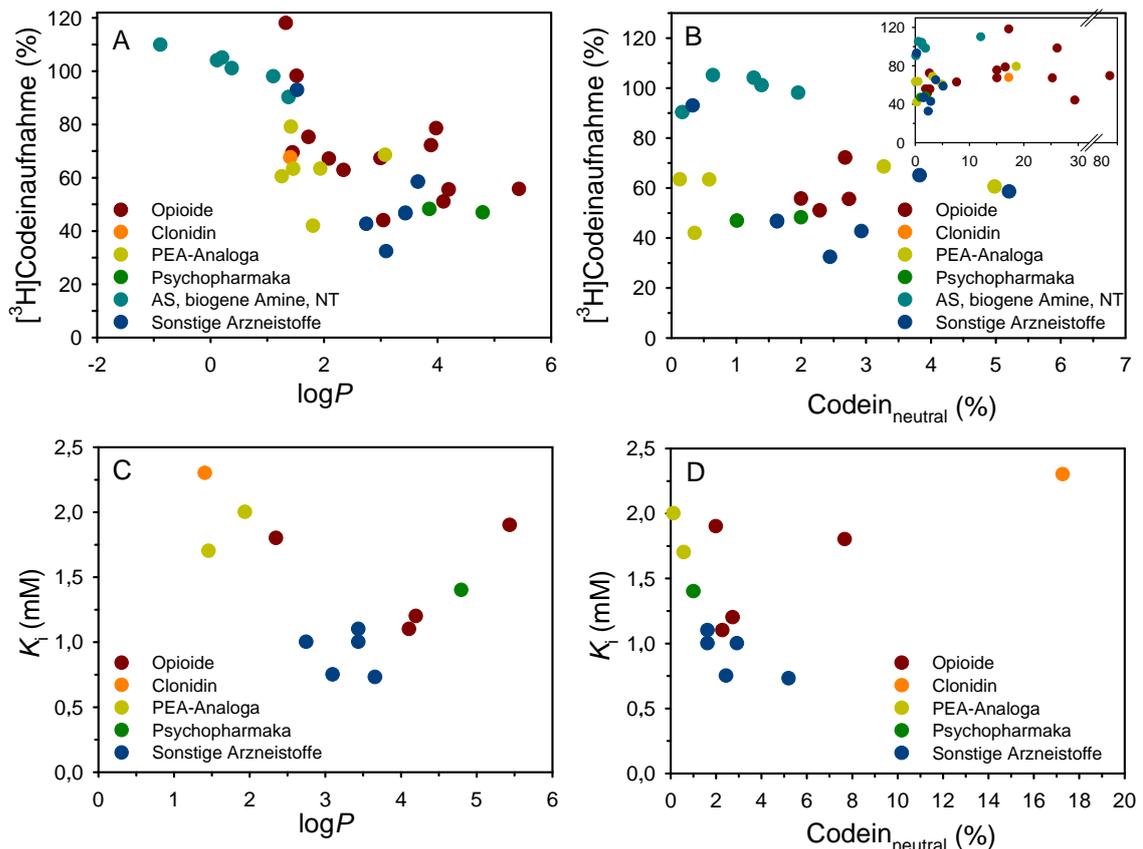


Abbildung 7.3. **Abhängigkeit der Hemmkraft von der Lipophilie und der Basenstärke des Inhibitors.** Die $[^3\text{H}]$ Codeinaufnahme an Caco-2-Zellen in Anwesenheit der Inhibitoren (2 mM) (A,B) bzw. die Inhibitorkonstanten (C,D) wurde gegen den Verteilungskoeffizienten ($\log P$) (A,C) bzw. gegen den Anteil des undissoziierten Codeins (B,D) aufgetragen.

Weder für die $[^3\text{H}]$ Codeinaufnahme noch für die $[^3\text{H}]$ Clonidin- oder die $[^{14}\text{C}]$ PEA-Aufnahme konnte an den untersuchten Zellen ein direkter kausaler Zusammenhang zwischen der Hemmkraft und der Lipophilie bzw. dem pK_a -Wert der einzelnen Inhibitoren festgestellt werden.

Die an Caco-2-Zellen für PEA, Codein und Valproinsäure ermittelten Permeabilitätskonstanten (P_{app}) deuten darauf hin, dass ein spezifisches Carriersystem in den Transport involviert ist. Der transepitheliale Transport der drei Substrate von der apikalen zur basolateralen Seite wird durch dieses System ermöglicht.

ralen Seite der Caco-2-Zellen überstieg den des *space markers* Mannitol (0,15 %/cm²/h) 33- bis 140-fach (Tabelle 7.4) und war jeweils durch einen Überschuss unmarkierten Substrates signifikant vermindert. Die Reduktion des Codein- und Valproatfluxes war vergleichbar, während die des PEA-Fluxes deutlich stärker war. Sowohl der P_{app} -Wert des Codeins als auch die Inhibitionsstärke des unmarkierten Substrates sind mit den entsprechenden Werten des Clonidins vergleichbar (Fischer *et al.* 2006). Hingegen war die Permeabilität der Caco-2-Zellen für PEA und Valproat deutlich höher.

Tabelle 7.4. **Transepithelialer Flux des [³H]Clonidins, des [¹⁴C]PEAs, des [³H]Codeins und des [³H]Valproates durch Caco-2-Zellen.**

	Kontrolle	10 mM Substrat		Orale Bioverfügbarkeit
	P_{app} (cm/s * 10 ⁻⁶)	P_{app} (cm/s * 10 ⁻⁶)	%	%
Clonidin	22,5 ^a	16,2 ^a	72	> 65 ^a
PEA	57,6	20,9	36	k.A.
Codein	28,4	20,1	71	50-59 ^b
Valproat	80,9	65,9	81	> 90 ^c

^aFachinformationen; ^bRogers *et al.* 1982, Spahn *et al.* 1985; ^cZaccara *et al.* 1988; k.A. = keine Angabe

Tendenziell ergibt sich das gleiche Verhältnis für die orale Bioverfügbarkeit der Substrate (Tabelle 7.4). Diese resultiert für Arzneistoffe allerdings aus dem Zusammenspiel von Resorption, Elimination, Distribution und Metabolisierung. Der transepitheliale Flux wird einerseits durch passive Prozesse, andererseits durch das Vorhandensein von Transportsystemen an der apikalen und der basolateralen Seite bestimmt. Zudem wird der Flux durch eine mögliche intrazelluläre Retention beeinflusst. Ein hoher Flux kann demnach zu einer hohen Bioverfügbarkeit beitragen und sie partiell erklären⁴³, garantiert diese jedoch nicht. Im Gegenzug kann aus einer hohen oralen Bioverfügbarkeit nicht zwingend auf einen hohen Flux oder die Existenz spezifischer Carrier geschlossen werden. Demzufolge ist es nicht möglich, anhand der Fluxdaten eindeutige Rückschlüsse auf die Existenz oder die Identität spezifischer apikaler Carrier für PEA, Codein oder Valproinsäure zu ziehen.

⁴³Für β -Laktamantibiotika wurde beispielsweise gezeigt, dass die orale Bioverfügbarkeit dieser antibiotischen Arzneistoffe maßgeblich von deren jeweiliger Affinität zu dem intestinalen Peptidtransporter PEPT1 abhängt (Bretschneider *et al.* 1999).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass an den jeweils untersuchten Barrieren mit hoher Wahrscheinlichkeit sättigbare H^+ -abhängige Mechanismen an der Translokation des Clonidins, des β -Phenylethylamins, des Codeins und der Valproinsäure beteiligt sind. Die verantwortlichen Transportsysteme konnten jedoch bislang nicht eindeutig bestimmt werden. Die hinsichtlich Mechanismus und Spezifität stark übereinstimmenden Transportcharakteristika deuten auf eine Verwandtschaft der den Transport von Clonidin, β -Phenylethylamin und Codein vermittelnden Systeme hin. Ebenso besteht möglicherweise eine Verwandtschaft zu beschriebenen H^+ -Antiport-Mechanismen, die zum Beispiel den Transport von Diphenhydramin und Chlorphenamin oder MDMA (Mizuuchi *et al.* 1999, 2000, Kuwayama *et al.* 2008) vermitteln. Für eine eindeutige Identifizierung dieser Transportsysteme sind weiterführende Studien notwendig. Da die funktionelle Charakterisierung umfassend erfolgt ist, könnten Untersuchungen auf molekularer Ebene die entsprechenden Kenntnisse erbringen. Diverse *orphan* Transporter der SLC-Superfamilie, speziell Mitglieder der Genfamilien SLC22 (Organische Kationen/Zwitterionen/Anionen Transporter) und SLC25 (Mitochondriale Carrier), könnten in den Transport der kationischen Substanzen involviert sein. Potentielle Kandidaten stellen zudem die *Choline-like* Transporter CTL2-5 (SLC44A2-5) dar. Als bislang einziges funktionell beschriebenes Mitglied der SLC44-Familie weist der Cholintransporter hCTL1 (SLC44A1) die gleichen Charakteristika wie die in dieser Arbeit untersuchten Transportmechanismen für Clonidin, PEA und Codein auf: der Transport erfolgt unabhängig von Na^+ , wird jedoch durch einen auswärts gerichteten H^+ -Gradient angetrieben (Kouji *et al.* 2009, Michel *et al.* 2009). Zudem hatten bemerkenswerterweise OCT-spezifische Inhibitoren keinen Effekt auf die Transportaktivität (Michel *et al.* 2009). Für die intestinale Aufnahme der Valproinsäure ist vermutlich ein *orphan* MCT - MCT5, MCT7, MCT9 oder MCT11-14 - verantwortlich; eine intestinale Expression wurde bislang jedoch nur für MCT5 gezeigt (Morris und Felmler 2008). Neben einer Carrier-vermittelten Komponente tragen sehr wahrscheinlich passive Transportprozesse gemäß der pH-Partitionstheorie und sich anschließende intrazelluläre Verteilungsvorgänge zur beobachteten Akkumulation der ionischen Substanzen bei.

8 ZUSAMMENFASSUNG

Physiologische Transportsysteme gewinnen zunehmend an pharmazeutischer Bedeutung. In der vorliegenden Arbeit wurde zum einen die Aufnahme von Clonidin in humane Neuroblastomzellen (SH-SY5Y) untersucht. Zum anderen stand der Transport der Arzneistoffe Codein und Valproinsäure am intestinalen Epithel und an Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke im Mittelpunkt dieses Projektes. Als *in vitro*-Modelle dienten hierfür die humane Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 und die aus Rattenhirn gewonnene Endothelzelllinie RBE4. Darüber hinaus beinhalteten die Studien Untersuchungen zum Transport des biogenen Amins β -Phenylethylamin an Caco-2-Zellen. Analysiert wurden sowohl der Mechanismus als auch die Spezifität des jeweiligen Transportprozesses. Die Zellen wurden für die zugrundeliegenden Aufnahmemessungen in Gewebekulturschalen kultiviert. Für Codein, Valproinsäure und β -Phenylethylamin wurde zusätzlich der transepitheliale Transport durch Caco-2-Zellen ermittelt, die auf permeablen Polycarbonatfiltern kultiviert worden sind.

Die wesentlichen Ergebnisse dieser Arbeit sind:

1. Transport von Clonidin

- Humane Neuroblastomzellen (SH-SY5Y) akkumulieren Clonidin entgegen einem Konzentrationsgradienten.
- Eine Alkalisierung des extrazellulären pH stimuliert die Clonidinaufnahme stark.
- Die Clonidinaufnahme verläuft unabhängig von Na^+ .
- Kinetische Untersuchungen ergaben eine Michaelis-Konstante (K_t) von 0,7 mM und eine maximale Transportgeschwindigkeit (V_{max}) von 218 nmol/min pro mg Protein.
- Guanabenz, Imipramin, Diphenhydramin, Chinin, β -Phenylethylamin und andere Kationen stellen potente Inhibitoren der Clonidinaufnahme dar.

2. Transport von β -Phenylethylamin

- In Caco-2-Zellen vermittelt ein hochaktiver, saturierbarer Prozess die Aufnahme des β -Phenylethylamins.
- Die β -Phenylethylaminaufnahme erwies sich als Na^+ -unabhängig, jedoch stark pH-abhängig. Ein auswärts gerichteter H^+ -Gradient stimuliert die Aufnahmeaktivität.

- Die konzentrationsabhängige Aufnahme des β -Phenylethylamins resultierte in einem hyperbolen Verlauf mit einem K_t -Wert von 2,6 mM und einer V_{\max} von 96 nmol/min pro mg Protein.
- Untersuchungen des transepithelialen Transportes durch Caco-2-Zellen ergaben einen überwiegend basolateral gerichteten Nettoflux.
- Die biogenen Amine Harmalin und *N*-Methylphenylethylamin sowie viele basische Arzneistoffe wie Phenelzin, Amphetamin, Diphenhydramin oder Methadon reduzieren die β -Phenylethylaminaufnahme in Caco-2-Zellen stark. Clonidin und Codein sind ebenfalls potente Inhibitoren.

3. Transport von Codein

- In Caco-2- und RBE4-Zellen ist ein sättigbarer, temperaturabhängiger Prozess an der Aufnahme des Codeins beteiligt.
- Die Codeinaufnahme verläuft Na^+ -unabhängig, jedoch stark pH-abhängig. Ein nach außen gerichteter H^+ -Gradient erhöht die Aufnahme erheblich.
- Kinetische Untersuchungen der Codeinaufnahme ergaben jeweils einen Michaelis-Menten-Verlauf: K_t und V_{\max} betragen 6,7 mM und 199 nmol/2 min pro mg Protein (Caco-2) bzw. 0,4 mM und 200 nmol/5 min pro mg Protein (RBE4).
- Der apikale Flux überstieg den Mannitolflux 47-fach. Die berechneten Permeabilitätskoeffizienten (P_{app}) des Codeintransportes durch Caco-2-Zellen sind in beiden Richtungen - apikal-nach-basolateral und umgekehrt - vergleichbar.
- Synthetische Opioide wie Methadon und die nicht-opioiden organischen Kationen Propranolol, Pyrilamin und Chinidin sind starke Inhibitoren der Codeinaufnahme an Caco-2-Zellen. Clonidin, β -Phenylethylamin, Diphenhydramin und andere kationische Arzneistoffe reduzieren die Aufnahme deutlich. Dixon-Plots zeigten, dass die Hemmung durch Clonidin und β -Phenylethylamin kompetitiver Art ist.
- Die Inhibitoren der Codeinaufnahme an Caco-2-Zellen hemmen ebenso die Codeinaufnahme an RBE4-Zellen. Generell ist die beobachtete inhibitorische Potenz bzw. die Affinität eines einzelnen Inhibitors zum verantwortlichen Transportsystem an den RBE4-Zellen höher.

Quaternäre Amine wie MPP⁺, TEA, Carnitin und Cholin beeinflussten keinen der untersuchten Transportprozesse. Eine Beteiligung der bekannten Transporter für organische Kationen - OCT, OCTN, PMAT, MATE, CTL1 oder CHT1 - ist demnach auszuschließen.

Vermutlich ist in den Transport von Clonidin, β -Phenylethylamin und Codein jeweils ein molekular noch nicht identifizierter, stark pH-abhängiger Mechanismus involviert. Möglicherweise handelt es sich bei den verantwortlichen Systemen um H⁺-Antiporter.

4. Transport von Valproinsäure

- Sowohl Caco-2- als auch RBE4-Zellen akkumulieren Valproinsäure.
- Die Valproinsäureaufnahme verläuft unabhängig von Na⁺- oder Cl⁻-Gradienten, jedoch deutlich pH-abhängig. Ein einwärts gerichteter H⁺-Gradient stimuliert die Valproinsäureaufnahme stark.
- Die kinetischen Parameter der Valproinsäureaufnahme an Caco-2- und RBE4-Zellen sind vergleichbar: Die ermittelten Michaelis-Konstanten betragen 0,6 mM (Caco-2) und 0,8 mM (RBE4). Die maximalen Transportgeschwindigkeiten sind 146 nmol/2 min (Caco-2) und 245 nmol/min pro mg Protein (RBE4).
- Der transepitheliale J_{a-b} Flux der Valproinsäure durch Caco-2-Zellen überstieg den Mannitolflux 150-fach. Zudem überwog der absorptive Valproinsäureflux den sekretorischen 14-fach.
- Neben nicht-steroidalen Antiphlogistika wie Diclofenac und Ibuprofen hemmten verschiedene Monocarboxylate wie Salicylat, Benzoat und Acetat die Aufnahme der Valproinsäure in beiden Zelltypen.
- Lactat und Pyruvat erwiesen sich als potente Inhibitoren der Valproinsäureaufnahme an RBE4-Zellen, während sie die Aufnahme an Caco-2-Zellen nicht beeinflussten.

Vermutlich wird die Valproinsäureaufnahme in Caco-2-Zellen durch ein spezifisches, H⁺-abhängiges Transportsystem für Monocarboxylate vermittelt, das nicht mit MCT1 identisch ist, jedoch möglicherweise als H⁺-Symporter agiert. Für den Transport an RBE4-Zellen ist wahrscheinlich das Transportsystem MCT1 verantwortlich.

9 AUSBLICK

Um die für den Transport der untersuchten Substrate verantwortlichen Systeme eindeutig zu identifizieren, würden sich für zukünftige Studien folgende molekularbiologische Methoden, kombiniert mit anschließenden Transportmessungen, anbieten:

- Untersuchung potentiell involvierter *orphan* Transporter in heterolog transfizierten Expressionssystemen.
- Gezielte Verminderung der Genexpression potentiell involvierter *orphan* Transporter in SH-SY5Y-, Caco-2- und RBE4-Zellen durch Transfektion spezifischer siRNA.

Potentiell beteiligte Transportsysteme wären:

- *Orphan* Mitglieder der Genfamilien SLC22 und SLC44 für den Transport der kationischen Substrate.
- MCT5, MCT7, MCT9 sowie MCT11-14 für den intestinalen Transport der Valproinsäure.

Um Kenntnisse über die strukturellen Anforderungen der Transportsysteme zu erhalten, könnten basierend auf den dargestellten Daten zur Spezifität Molekulardesign-Studien (*Molecular Modeling*) durchgeführt werden.

Weiterführend sollte der Identifizierung der endogenen Substrate der untersuchten Transportsysteme besonderes Interesse gelten. Die inhibitorisch wirksamen Substanzen könnten zudem auf ihre Eigenschaften als mögliche Substrate geprüft werden.

10 LITERATUR

Weiterführende Literatur findet sich in den anliegenden Publikationen.

- Abbott, F.S. und Acheampong, A.A., 1988. Quantitative structure-anticonvulsant activity relationships of valproic acid, related carboxylic acids and tetrazoles. *Neuropharmacology* 27, 287-294.
- Adkison, K.D. und Shen, D.D., 1996. Uptake of valproic acid into rat brain is mediated by a medium-chain fatty acid transporter. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 276, 1189-1200.
- Andre, P., Debray, M., Scherrmann, J.M., Cisternino, S., 2009. Clonidine transport at the mouse blood-brain barrier by a new H⁺ antiporter that interacts with addictive drugs. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 29, 1293-1304.
- Apparsundaram, S., Ferguson, S.M., George, A.L., Jr., Blakely, R.D., 2000. Molecular cloning of a human, hemicholinium-3-sensitive choline transporter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 276, 862-867.
- Bahn, A., Hagos, Y., Reuter, S., Balen, D., Brzica, H., Krick, W., Burckhardt, B.C., Sabolic, I., Burckhardt, G., 2008. Identification of a new urate and high affinity nicotinate transporter, hOAT10 (SLC22A13). *J. Biol. Chem.* 283, 16332-16341.
- Ben-Harari, R.R. und Bakhle, Y.S., 1980. Uptake of beta-phenylethylamine in rat isolated lung. *Biochem. Pharmacol.* 29, 489-494.
- Berry, M.D., 2004. Mammalian central nervous system trace amines. Pharmacologic amphetamines, physiologic neuromodulators. *J. Neurochem.* 90, 257-271.
- Blais, A., Bissonnette, P., Berteloot, A., 1987. Common characteristics for Na⁺-dependent sugar transport in Caco-2 cells and human fetal colon. *J. Membr. Biol.* 99, 113-125.
- Bolanos, J.P. und Medina, J.M., 1997. Effect of valproate on the metabolism of the central nervous system. *Life Sci.* 60, 1933-1942.
- Bolser, D.C. und Davenport, P.W., 2007. Codeine and cough: an ineffective gold standard. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 7, 32-36.
- Branchek, T.A. und Blackburn, T.P., 2003. Trace amine receptors as targets for novel therapeutics: legend, myth and fact. *Curr. Opin. Pharmacol.* 3, 90-97.
- Bretschneider, B., Brandsch, M., Neubert, R., 1999. Intestinal transport of beta-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.
- Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM), 2010. Arzneimittel, die Valproinsäure oder Valproate enthalten: Wechselwirkungen mit Carbapenemen. Anhörung vom 15.06.2010.
- Burchett, S.A. und Hicks, T.P., 2006. The mysterious trace amines: protean neuromodulators of synaptic transmission in mammalian brain. *Prog. Neurobiol.* 79, 223-246.
- Burris, J.F., 1993. The USA experience with the clonidine transdermal therapeutic system. *Clin. Auton. Res.* 3, 391-396.
- Cato, A., III, Pollack, G.M., Brouwer, K.L., 1995. Age-dependent intestinal absorption of valproic acid in the rat. *Pharm. Res.* 12, 284-290.

- Chen, Z.R., Somogyi, A.A., Reynolds, G., Bochner, F., 1991. Disposition and metabolism of codeine after single and chronic doses in one poor and seven extensive metabolisers. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 31, 381-390.
- Cornford, E.M., Diep, C.P., Pardridge, W.M., 1985. Blood-brain barrier transport of valproic acid. *J. Neurochem.* 44, 1541-1550.
- Covanis, A., Gupta, A.K., Jeavons, P.M., 1982. Sodium valproate: monotherapy and polytherapy. *Epilepsia* 23, 693-720.
- Da Prada, M., Obrist, R., Pletscher, A., 1975. Discrimination of monoamine uptake by membranes of adrenal chromaffin granules. *Br. J. Pharmacol.* 53, 257-265.
- Dale, O., Nilsen, T., Olaussen, G., Tvedt, K.E., Skorpen, F., Smidsrod, O., Varum, K.M., 2006. Transepithelial transport of morphine and mannitol in Caco-2 cells: the influence of chitosans of different molecular weights and degrees of acetylation. *J. Pharm. Pharmacol.* 58, 909-915.
- Daniel, H., Fett, C., Kratz, A., 1989. Demonstration and modification of intervillous pH profiles in rat small intestine in vitro. *Am. J. Physiol.* 257, G489-G495.
- De Duve, C., De Barsey, T., Poole, B., Trouet, A., Tulkens, P., Van Hoof, F., 1974. Commentary. Lysosomotropic agents. *Biochem. Pharmacol.* 23, 2495-2531.
- Enerson, B.E. und Drewes, L.R., 2003. Molecular features, regulation, and function of monocarboxylate transporters: implications for drug delivery. *J. Pharm. Sci.* 92, 1531-1544.
- Engel, K. und Wang, J., 2005. Interaction of organic cations with a newly identified plasma membrane monoamine transporter. *Mol. Pharmacol.* 68, 1397-1407.
- Fischer, W., Metzner, L., Hoffmann, K., Neubert, R.H., Brandsch, M., 2006. Substrate specificity and mechanism of the intestinal clonidine uptake by Caco-2 cells. *Pharm. Res.* 23, 131-137.
- Fischer, W., Neubert, R.H.H., Brandsch, M., 2007. Clonidine accumulation in human neuronal cells. *Eur. J. Pharm. Sci.* 32, 291-295. (**Anlage 11.1**)
- Fischer, W., Praetor, K., Metzner, L., Neubert, R.H.H., Brandsch, M., 2008. Transport of valproate at intestinal epithelial (Caco-2) and brain endothelial (RBE4) cells: Mechanism and substrate specificity. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 70, 486-492. (**Anlage 11.4**)
- Fischer, W., Neubert, R.H.H., Brandsch, M., 2010a. Transport of phenylethylamine at intestinal epithelial (Caco-2) cells: Mechanism and substrate specificity. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 74, 281-289. (**Anlage 11.2**)
- Fischer, W., Bernhagen, J., Neubert, R.H.H., Brandsch, M., 2010b. Uptake of codeine at intestinal epithelial (Caco-2) and brain endothelial (RBE4) cells. *Eur. J. Pharm. Sci.* 41, 31-42. (**Anlage 11.3**)
- Foltz, M., Boll, M., Raschka, L., Kottra, G., Daniel, H., 2004. A novel bifunctionality: PAT1 and PAT2 mediate electrogenic proton/amino acid and electroneutral proton/fatty acid symport. *FASEB J.* 18, 1758-1760.
- Gerhart, D.Z., Enerson, B.E., Zhdankina, O.Y., Leino, R.L., Drewes, L.R., 1997. Expression of monocarboxylate transporter MCT1 by brain endothelium and glia in adult and suckling rats. *Am. J. Physiol.* 273, E207-E213.

- Gibbs, J.P., Adeyeye, M.C., Yang, Z., Shen, D.D., 2004. Valproic acid uptake by bovine brain microvessel endothelial cells: role of active efflux transport. *Epilepsy Res.* 58, 53-66.
- Gill, R.K., Saksena, S., Alrefai, W.A., Sarwar, Z., Goldstein, J.L., Carroll, R.E., Ramaswamy, K., Dudeja, P.K., 2005. Expression and membrane localization of MCT isoforms along the length of the human intestine. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 289, C846-C852 .
- Gopal, E., Fei, Y.J., Miyauchi, S., Zhuang, L., Prasad, P.D., Ganapathy, V., 2005. Sodium-coupled and electrogenic transport of B-complex vitamin nicotinic acid by slc5a8, a member of the Na/glucose co-transporter gene family. *Biochem. J.* 388, 309-316.
- Grafe, F., Wohlrab, W., Neubert, R., Brandsch, M., 2004. Carrier-mediated transport of clonidine in human keratinocytes. *Eur. J. Pharm. Sci.* 21, 309-312.
- Guyenet, P.G., 1997. Is the hypotensive effect of clonidine and related drugs due to imidazoline binding sites? *Am. J. Physiol.* 273, R1580-R1584.
- Hadjiagapiou, C., Schmidt, L., Dudeja, P.K., Layden, T.J., Ramaswamy, K., 2000. Mechanism(s) of butyrate transport in Caco-2 cells: role of monocarboxylate transporter 1. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 279, G775-G780.
- Hagenbuch, B. und Meier, P.J., 2004. Organic anion transporting polypeptides of the OATP/SLC21 family: phylogenetic classification as OATP/SLCO superfamily, new nomenclature and molecular/functional properties. *Pflugers Arch.* 447, 653-665.
- Halestrap, A.P. und Meredith, D., 2004. The SLC16 gene family-from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond. *Pflugers Arch.* 447, 619-628.
- Han, Y.H., Sweet, D.H., Hu, D.N., Pritchard, J.B., 2001. Characterization of a novel cationic drug transporter in human retinal pigment epithelial cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 296, 450-457.
- Heikkinen, A.T., Monkkonen, J., Korjamo, T., 2009. Kinetics of cellular retention during Caco-2 permeation experiments: role of lysosomal sequestration and impact on permeability estimates. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 328, 882-892.
- Hoffmann, K., Grafe, F., Wohlrab, W., Neubert, R.H., Brandsch, M., 2002. Functional characterization of a high-affinity choline transport system in human keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 119, 118-121.
- Hogben, C.A., Tocco, D.J., Brodie, B.B., Schanker, L.S., 1959. On the mechanism of intestinal absorption of drugs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 125, 275-282.
- Huwylar, J., Fricker, G., Torok, M., Schneider, M., Drewe, J., 1997. Transport of clonidine across cultured brain microvessel endothelial cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 282, 81-85.
- Inazu, M., Takeda, H., Matsumiya, T., 2005. Molecular and functional characterization of an Na⁺-independent choline transporter in rat astrocytes. *J. Neurochem.* 94, 1427-1437.
- Ishida, K., Takaai, M., Hashimoto, Y., 2006. Pharmacokinetic analysis of transcellular transport of quinidine across monolayers of human intestinal epithelial Caco-2 cells. *Biol. Pharm. Bull.* 29, 522-526.
- Janssen, P.A., Leysen, J.E., Megens, A.A., Awouters, F.H., 1999. Does phenylethylamine act as an endogenous amphetamine in some patients? *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2, 229-240.

- Katsura, T., Mizuuchi, H., Hashimoto, Y., Inui, K.I., 2000. Transport of procainamide via H⁺/tertiary amine antiport system in rabbit intestinal brush-border membrane. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 279, G799-G805.
- Kim, I., Barnes, A.J., Oyler, J.M., Schepers, R., Joseph, R.E., Jr., Cone, E.J., Lafko, D., Moolchan, E.T., Huestis, M.A., 2002. Plasma and oral fluid pharmacokinetics and pharmacodynamics after oral codeine administration. *Clin. Chem.* 48, 1486-1496.
- Kittams, D.W. und Vidaver, G.A., 1969. Inhibition by beta-phenylethylamine and similar compounds of glycine transport by pigeon red cells. *Biochim. Biophys. Acta* 173, 540-547.
- Klaassen, C.D. und Aleksunes, L.M., 2010. Xenobiotic, bile acid, and cholesterol transporters: function and regulation. *Pharmacol. Rev.* 62, 1-96.
- Koepsell, H., 2004. Polyspecific organic cation transporters: their functions and interactions with drugs. *Trends Pharmacol. Sci.* 25, 375-381.
- Koepsell, H. und Endou, H., 2004. The SLC22 drug transporter family. *Pflugers Arch.* 447, 666-676.
- Koepsell, H., Lips, K., Volk, C., 2007. Polyspecific organic cation transporters: structure, function, physiological roles, and biopharmaceutical implications. *Pharm. Res.* 24, 1227-1251.
- Kornhuber, J., Henkel, A.W., Groemer, T.W., Stadtler, S., Welzel, O., Tripal, P., Rotter, A., Bleich, S., Trapp, S., 2010. Lipophilic cationic drugs increase the permeability of lysosomal membranes in a cell culture system. *J. Cell Physiol.* 224, 152-164.
- Kotlyar, M. und Hatsukami, D.K., 2002. Managing nicotine addiction. *J. Dent. Educ.* 66, 1061-1073.
- Kouji, H., Inazu, M., Yamada, T., Tajima, H., Aoki, T., Matsumiya, T., 2009. Molecular and functional characterization of choline transporter in human colon carcinoma HT-29 cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 483, 90-98.
- Kuwayama, K., Inoue, H., Kanamori, T., Tsujikawa, K., Miyaguchi, H., Iwata, Y., Miyauchi, S., Kamo, N., Kishi, T., 2008. Uptake of 3,4-methylenedioxymeth-amphetamine and its related compounds by a proton-coupled transport system in Caco-2 cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1778, 42-50.
- Liang, E., Liu, P., Dinh, S., 2007. Use of a pH-sensitive fluorescent probe for measuring intracellular pH of Caco-2 cells. *Int. J. Pharm.* 338, 104-109.
- Lin, C.J., Tai, Y., Huang, M.T., Tsai, Y.F., Hsu, H.J., Tzen, K.Y., Liou, H.H., 2010. Cellular localization of the organic cation transporters, OCT1 and OCT2, in brain microvessel endothelial cells and its implication for MPTP transport across the blood-brain barrier and MPTP-induced dopaminergic toxicity in rodents. *J. Neurochem.*, 114, 717-727.
- Liu, J., Subir, M., Nguyen, K., Eisenthal, K.B., 2008. Second harmonic studies of ions crossing liposome membranes in real time. *J. Phys. Chem. B* 112, 15263-15266.
- Lu, M., Choo, C.H., Hu, L.F., Tan, B.H., Hu, G., Bian, J.S., 2010. Hydrogen sulfide regulates intracellular pH in rat primary cultured glia cells. *Neurosci. Res.* 66, 92-98.
- Mansoor, G.A. und Frishman, W.H., 2002. Comprehensive management of hypertensive emergencies and urgencies. *Heart Dis.* 4, 358-371.

- Marks, M.J. und Medzihradsky, F., 1974. Transport and interaction of drugs in leukocytes. *Biochem. Pharmacol.* 23, 2951-2962.
- Martel, F., Calhau, C., Azevedo, I., 2000. Characterization of the transport of the organic cation [³H]MPP⁺ in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 361, 505-513.
- Martel, F., Monteiro, R., Lemos, C., 2003. Uptake of serotonin at the apical and basolateral membranes of human intestinal epithelial (Caco-2) cells occurs through the neuronal serotonin transporter (SERT). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 306, 355-362.
- Mason, M., Wolf, M.E., Mosnaim, A.D., 1983. Studies in the mechanism of phenylethylamine uptake by rabbit erythrocytes. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 76, 215-219.
- Merezhinskaya, N. und Fishbein, W.N., 2009. Monocarboxylate transporters: past, present, and future. *Histol. Histopathol.* 24, 243-264.
- Michel, V., Yuan, Z., Ramsubir, S., Bakovic, M., 2006. Choline transport for phospholipid synthesis. *Exp. Biol. Med. (Maywood.)* 231, 490-504.
- Michel, V. und Bakovic, M., 2009. The solute carrier 44A1 is a mitochondrial protein and mediates choline transport. *FASEB J.* 23, 2749-2758.
- Mizuuchi, H., Katsura, T., Saito, H., Hashimoto, Y., Inui, K.I., 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., Inui, K., 2000. Diphenhydramine transport by pH-dependent tertiary amine transport system in Caco-2 cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 278, G563-G569.
- Morris, M.E. und Felmler, M.A., 2008. Overview of the proton-coupled MCT (SLC16A) family of transporters: characterization, function and role in the transport of the drug of abuse γ -hydroxybutyric acid. *AAPS. J.* 10, 311-321.
- Müller, J., Neubert, R., Brandsch, M., 2004. Transport of clonidine at cultured epithelial cells (JEG-3) of the human placenta. *Pharm. Res.* 21, 692-694.
- Müller, J., Lips, K.S., Metzner, L., Neubert, R.H., Koepsell, H., Brandsch, M., 2005. Drug specificity and intestinal membrane localization of human organic cation transporters (OCT). *Biochem. Pharmacol.* 70, 1851-1860.
- Murakami, Y., Kohyama, N., Kobayashi, Y., Ohbayashi, M., Ohtani, H., Sawada, Y., Yamamoto, T., 2005. Functional characterization of human monocarboxylate transporter 6 (SLC16A5). *Drug Metab. Dispos.* 33, 1845-1851.
- Nakamura, H., Ushigome, F., Koyabu, N., Satoh, S., Tsukimori, K., Nakano, H., Ohtani, H., Sawada, Y., 2002. Proton gradient-dependent transport of valproic acid in human placental brush-border membrane vesicles. *Pharm. Res.* 19, 154-161.
- Nakazawa, Y., Okura, T., Shimomura, K., Terasaki, T., Deguchi, Y., 2009. Drug-drug interaction between oxycodone and adjuvant analgesics in blood-brain barrier transport and antinociceptive effect. *J. Pharm. Sci.* 99, 467-474.
- Nalivaeva, N.N., Belyaev, N.D., Turner, A.J., 2009. Sodium valproate: an old drug with new roles. *Trends Pharmacol. Sci.* 30, 509-514.

- Naora, K., Ichikawa, N., Nishimura, N., Hirano, H., Shen, D.D., Iwamoto, K., 1996. Saturable transport of valproic acid in rat choroid plexus in vitro. *J. Pharm. Sci.* 85, 423-426.
- Neumann, J., Bruch, M., Gebauer, S., Brandsch, M., 2004. Transport of the phosphono-dipeptide alfosfalin by the H⁺/peptide cotransporters PEPT1 and PEPT2 in intestinal and renal epithelial cells. *Eur. J. Biochem.* 271, 2012-2017.
- Nilsson, M., Hansson, E., Ronnback, L., 1992. Interactions between valproate, glutamate, aspartate, and GABA with respect to uptake in astroglial primary cultures. *Neurochem. Res.* 17, 327-332.
- Nishimura, M. und Naito, S., 2005. Tissue-specific mRNA expression profiles of human ATP-binding cassette and solute carrier transporter superfamilies. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 20, 452-477.
- Okamura, A., Emoto, A., Koyabu, N., Ohtani, H., Sawada, Y., 2002. Transport and uptake of nateglinide in Caco-2 cells and its inhibitory effect on human monocarboxylate transporter MCT1. *Br. J. Pharmacol.* 137, 391-399.
- Okuda, T. und Haga, T., 2000. Functional characterization of the human high-affinity choline transporter. *FEBS Lett.* 484, 92-97.
- Okura, T., Hattori, A., Takano, Y., Sato, T., Hammarlund-Udenaes, M., Terasaki, T., Deguchi, Y., 2008. Involvement of the pyrilamine transporter, a putative organic cation transporter, in blood-brain barrier transport of oxycodone. *Drug Metab. Dispos.* 36, 2005-2013.
- Oldendorf, W.H., Hyman, S., Braun, L., Oldendorf, S.Z., 1972. Blood-brain barrier: penetration of morphine, codeine, heroin, and methadone after carotid injection. *Science* 178, 984-986.
- Parker, C.A., Anderson, N.J., Robinson, E.S., Price, R., Tyacke, R.J., Husbands, S.M., Dillon, M.P., Eglen, R.M., Hudson, A.L., Nutt, D.J., Crump, M.P., Crosby, J., 2004. Harmane and harmalan are bioactive components of classical clonidine-displacing substance. *Biochemistry* 43, 16385-16392.
- Petzinger, E. und Geyer, J., 2006. Drug transporters in pharmacokinetics. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 372, 465-475.
- Pierre, K. und Pellerin, L., 2005. Monocarboxylate transporters in the central nervous system: distribution, regulation and function. *J. Neurochem.* 94, 1-14.
- Powers, J.L., Plaskon, R.R., Olsen, G.A., May, S.W., 1995. Structural requirements for cocaine-sensitive and -insensitive uptake of phenethylamines into the adrenal chromaffin cell. *J. Neurochem.* 65, 2031-2042.
- Putnam, W.S., Ramanathan, S., Pan, L., Takahashi, L.H., Benet, L.Z., 2002. Functional characterization of monocarboxylic acid, large neutral amino acid, bile acid and peptide transporters, and P-glycoprotein in MDCK and Caco-2 cells. *J. Pharm. Sci.* 91, 2622-2635.
- Regunathan, S. und Reis, D.J., 1996. Imidazoline receptors and their endogenous ligands. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 36, 511-544.

- Remko, M., Swart, M., Bickelhaupt, F.M., 2006. Theoretical study of structure, pK_a , lipophilicity, solubility, absorption, and polar surface area of some centrally acting antihypertensives. *Bioorg. Med. Chem.* 14, 1715-1728.
- Rogers, J.F., Findlay, J.W., Hull, J.H., Butz, R.F., Jones, E.C., Bustrack, J.A., Welch, R.M., 1982. Codeine disposition in smokers and nonsmokers. *Clin. Pharmacol. Ther.* 32, 218-227.
- Romero, M.F., Fulton, C.M., Boron, W.F., 2004. The SLC4 family of HCO_3^- transporters. *Pflugers Arch.* 447, 495-509.
- Sai, Y., Kaneko, Y., Ito, S., Mitsuoka, K., Kato, Y., Tamai, I., Artursson, P., Tsuji, A., 2006. Predominant contribution of organic anion transporting polypeptide OATP-B (OATP2B1) to apical uptake of estrone-3-sulfate by human intestinal Caco-2 cells. *Drug Metab. Dispos.* 34, 1423-1431.
- Schinkel, A.H. und Jonker, J.W., 2003. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55, 3-29.
- Scrafani, J.T. und Hug, C.C., Jr., 1968. Active uptake of dihydromorphine and other narcotic analgesics by cerebral cortical slices. *Biochem. Pharmacol.* 17, 1557-1566.
- Seithel, A., Karlsson, J., Hilgendorf, C., Bjorquist, A., Ungell, A.L., 2006. Variability in mRNA expression of ABC- and SLC-transporters in human intestinal cells: comparison between human segments and Caco-2 cells. *Eur. J. Pharm. Sci.* 28, 291-299.
- Shore, P.A., Brodie, B.B., Hogben, C.A., 1957. The gastric secretion of drugs: a pH partition hypothesis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 119, 361-369.
- Shugarts, S. und Benet, L.Z., 2009. The role of transporters in the pharmacokinetics of orally administered drugs. *Pharm. Res.* 26, 2039-2054.
- Smith, J.P. und Drewes, L.R., 2006. Modulation of monocarboxylic acid transporter-1 kinetic function by the cAMP signaling pathway in rat brain endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 281, 2053-2060.
- Somogyi, A.A., Barratt, D.T., Collier, J.K., 2007. Pharmacogenetics of opioids. *Clin. Pharmacol. Ther.* 81, 429-444.
- Spahn, H., Altmayer, P., Cattarius-Korb, S., Kruger, B., Lang, E., Mutschler, E., Sorgel, F., 1985. The bioavailability of combination preparations of acetylsalicylic acid and codeine phosphate. *Arzneimittelforschung* 35, 973-976.
- Srimaroeng, C., Perry, J.L., Pritchard, J.B., 2008. Physiology, structure, and regulation of the cloned organic anion transporters. *Xenobiotica* 38, 889-935.
- Stapleton, S.L., Thompson, P.A., Ou, C.N., Berg, S.L., McGuffey, L., Gibson, B., Blaney, S.M., 2007. Plasma and cerebrospinal fluid pharmacokinetics of valproic acid after oral administration in non-human primates. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 61, 647-652.
- Stein, J., Zores, M., Schroder, O., 2000. Short-chain fatty acid (SCFA) uptake into Caco-2 cells by a pH-dependent and carrier mediated transport mechanism. *Eur. J. Nutr.* 39, 121-125.
- Suzuki, T., Ohmuro, A., Miyata, M., Furuishi, T., Hidaka, S., Kugawa, F., Fukami, T., Tomono, K., 2010. Involvement of an influx transporter in the blood-brain barrier transport of naloxone. *Biopharm. Drug Dispos.* 31, 243-252.

- Takanaga, H., Tamai, I., Tsuji, A., 1994. pH-dependent and carrier-mediated transport of salicylic acid across Caco-2 cells. *J. Pharm. Pharmacol.* 46, 567-570.
- Tamai, I., Takanaga, H., Maeda, H., Yabuuchi, H., Sai, Y., Suzuki, Y., Tsuji, A., 1997. Intestinal brush-border membrane transport of monocarboxylic acids mediated by proton-coupled transport and anion antiport mechanisms. *J. Pharm. Pharmacol.* 49, 108-112.
- Tanihara, Y., Masuda, S., Sato, T., Katsura, T., Ogawa, O., Inui, K., 2007. Substrate specificity of MATE1 and MATE2-K, human multidrug and toxin extrusions/H⁺-organic cation antiporters. *Biochem. Pharmacol.* 74, 359-371.
- Terasaki, T., Takakuwa, S., Moritani, S., Tsuji, A., 1991. Transport of monocarboxylic acids at the blood-brain barrier: studies with monolayers of primary cultured bovine brain capillary endothelial cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 258, 932-937.
- Thorn, C.F., Klein, T.E., Altman, R.B., 2009. Codeine and morphine pathway. *Pharmacogenet. Genomics* 19, 556-558.
- Thwaites, D.T. und Anderson, C.M., 2007. H⁺-coupled nutrient, micronutrient and drug transporters in the mammalian small intestine. *Exp. Physiol.* 92, 603-619.
- Torii, M., Takiguchi, Y., Izumi, M., Fukushima, T., Yokota, M., 2002. Carbapenem antibiotics inhibit valproic acid transport in Caco-2 cell monolayers. *Int. J. Pharm.* 233, 253-256.
- Trapp, S., Rosania, G.R., Horobin, R.W., Kornhuber, J., 2009. Quantitative modeling of selective lysosomal targeting for drug design. *Eur. Biophys. J.* 37, 1317-1328.
- Tsuji, A., Simanjuntak, M.T., Tamai, I., Terasaki, T., 1990. pH-dependent intestinal transport of monocarboxylic acids: carrier-mediated and H⁺-cotransport mechanism versus pH-partition hypothesis. *J. Pharm. Sci.* 79, 1123-1124.
- Tsuji, A., Takanaga, H., Tamai, I., Terasaki, T., 1994. Transcellular transport of benzoic acid across Caco-2 cells by a pH-dependent and carrier-mediated transport mechanism. *Pharm. Res.* 11, 30-37.
- Utoguchi, N. und Audus, K.L., 2000. Carrier-mediated transport of valproic acid in BeWo cells, a human trophoblast cell line. *Int. J. Pharm.* 195, 115-124.
- Wang, Y., Cao, J., Wang, X., Zeng, S., 2009. Stereoselective transport and uptake of propranolol across human intestinal Caco-2 cell monolayers. *Chirality* 22, 361-368.
- Xia, L., Engel, K., Zhou, M., Wang, J., 2007. Membrane localization and pH-dependent transport of a newly cloned organic cation transporter (PMAT) in kidney cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 292, F682-F690.
- Xie, R. und Hammarlund-Udenaes, M., 1998. Blood-brain barrier equilibration of codeine in rats studied with microdialysis. *Pharm. Res.* 15, 570-575.
- Yabuuchi, H., Tamai, I., Sai, Y., Tsuji, A., 1998. Possible role of anion exchanger AE2 as the intestinal monocarboxylic acid/anion antiporter. *Pharm. Res.* 15, 411-416.
- Yamazaki, M., Fukuoka, H., Nagata, O., Kato, H., Ito, Y., Terasaki, T., Tsuji, A., 1994a. Transport mechanism of an H₁-antagonist at the blood-brain barrier: transport mechanism of mepyramine using the carotid injection technique. *Biol. Pharm. Bull.* 17, 676-679.

- Yamazaki, M., Terasaki, T., Yoshioka, K., Nagata, O., Kato, H., Ito, Y., Tsuji, A., 1994b. Carrier-mediated transport of H₁-antagonist at the blood-brain barrier: a common transport system of H₁-antagonists and lipophilic basic drugs. *Pharm. Res.* 11, 1516-1518.
- Yamazaki, M., Terasaki, T., Yoshioka, K., Nagata, O., Kato, H., Ito, Y., Tsuji, A., 1994c. Carrier-mediated transport of H₁-antagonist at the blood-brain barrier: mepyramine uptake into bovine brain capillary endothelial cells in primary monolayer cultures. *Pharm. Res.* 11, 975-978.
- Yang, H.Y. und Neff, N.H., 1973. Beta-phenylethylamine: a specific substrate for type B monoamine oxidase of brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 187, 365-371.
- Zaccara, G., Messori, A., Moroni, F., 1988. Clinical pharmacokinetics of valproic acid-1988. *Clin. Pharmacokinet.* 15, 367-389.
- Zucchi, R., Chiellini, G., Scanlan, T.S., Grandy, D.K., 2006. Trace amine-associated receptors and their ligands. *Br. J. Pharmacol.* 149, 967-978.

11 ANLAGEN

11.1 Clonidine accumulation in human neuronal cells

Fischer, W., Neubert, R.H.H., Brandsch, M., 2007
European Journal of Pharmaceutical Sciences 32, 291–29569

11.2 Transport of phenylethylamine at intestinal epithelial (Caco-2) cells: Mechanism and substrate specificity

Fischer, W., Neubert, R.H.H., Brandsch, M., 2010
European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 74, 281–28974

11.3 Uptake of codeine at intestinal epithelial (Caco-2) and brain endothelial (RBE4) cells

Fischer, W., Bernhagen, J., Neubert, R.H.H., Brandsch, M., 2010
European Journal of Pharmaceutical Sciences 41, 31–4283

11.4 Transport of valproate at intestinal epithelial (Caco-2) and brain endothelial (RBE4) cells: Mechanism and substrate specificity

Fischer, W., Praetor, K., Metzner, L., Neubert, R.H.H., Brandsch, M., 2008
European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 70, 486–49295

DANKSAGUNG

In erster Linie danke ich Herrn Priv.-Doz. Dr. Matthias Brandsch für die Ermöglichung dieser Arbeit sowie für die hervorragende Betreuung in allen Phasen meiner Promotionszeit. In zahlreichen instruktiven und motivierenden Diskussionen gab er wertvolle Anregungen und Hilfestellungen und inspirierte stets zu neuen Denkansätzen. Seine allzeitige Unterstützung und sein Vertrauen formten mich wesentlich in meinem wissenschaftlichen Werdegang.

Mein großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Reinhard Neubert für die Überlassung der interessanten Aufgabenstellung, für sein reges Interesse am Fortgang der Arbeit und die wertvollen fachlichen Anregungen sowie für die Gewährung der nötigen Freiheit bei der Bearbeitung des Themas.

Bedanken möchte ich mich bei Dr. Petra Froberg und Herrn Prof. Dr. Meinhardt Zenk; sie stellten mir freundlicherweise Chemikalien für meine Untersuchungen zur Verfügung.

Für die schöne Zeit und das angenehme, fröhliche Miteinander innerhalb und außerhalb des Labors danke ich allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Membrantransport sehr herzlich, besonders Dr. Linda Laug und Katja Zebisch. Ebenso danke ich den Mitarbeitern der Arbeitsgruppen Biopharmazie und Technologie des Institutes für pharmazeutische Technologie und Biopharmazie für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Meinen ehemaligen Pharmazie-Diplomanden Katrin Schramm und Jennifer Bernhagen möchte ich ebenso herzlich danken wie allen bislang nicht erwähnten Personen, die mir bei der Durchsicht des Manuskriptes behilflich waren oder mich anderweitig während meiner Promotionszeit unterstützten.

Von ganzem Herzen danke ich meinen lieben Eltern und meiner Schwester für die mir gegebene Liebe und Geborgenheit und besonders für ihre Geduld, ihr Verständnis und für all die Zeit, in der sie immer für mich da waren.

Meinem Freund Burkart danke ich sehr, für seine Geduld, sein Verständnis und dafür, dass er für mich da war, mich gegebenenfalls neu motivierte und mir den nötigen Rückhalt gab.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft bin ich dankbar für die Bereitstellung der finanziellen Mittel.

LEBENS LAUF

<i>Name</i>	Wiebke Fischer
<i>Geboren</i>	02.05.1980 in Köthen (Anhalt)
<i>Familienstand</i>	ledig
<i>Staatsangehörigkeit</i>	Bundesrepublik Deutschland
<i>Wohnsitz</i>	Kardinal-Albrecht-Str. 41, 06108 Halle (Saale)

Schulbildung

<i>1986-1990</i>	POS Ernst-Thälmann, Köthen (Anhalt)
<i>1990-1998</i>	Gymnasium an der Rüsternbreite, Köthen (Anhalt)
<i>1998</i>	Abitur, Gymnasium an der Rüsternbreite, Köthen (Anhalt)

Studium

<i>1998–2000</i>	Betriebswirtschaftslehre, Hochschule Anhalt und Universität Leipzig
<i>10/2000–11/2005</i>	Pharmazie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
<i>08/2002</i>	1. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
<i>09/2004</i>	2. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
<i>10/2004-04/2005</i>	Diplomarbeit, Biozentrum und Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, „Substratspezifität des intestinalen Clonidin-Transporters“
<i>05/2005-10/2005</i>	Praktische Ausbildung in der Lilien-Apotheke, Halle (Saale)
<i>11/2005</i>	3. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung

Berufliche Stationen

<i>11/2005-11/2006</i>	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pharmazie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Pharmazeutische Biologie
<i>Seit 11/2006</i>	Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Biozentrum der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Halle (Saale), 27. Juli 2010

Wiebke Fischer

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, Wiebke Fischer, an Eides statt, dass die vorliegende Arbeit selbständig, ohne fremde Hilfe und nur unter Zuhilfenahme der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt wurde. Die aus fremden Quellen übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

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

Halle (Saale), 27. Juli 2010

Wiebke Fischer