

Aus dem Institut für Klinische Pharmakologie

(Prof. Dr. J. Brockmöller)

der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**In-vitro-Analysen des organischen
Kationentransporters OCT1 als hepatischer
Aufnahmetransporter von Triptanen**

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

David Kuron

aus

Gütersloh

Göttingen 2016

Dekan:	Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer
Referent/in:	PD Dr. Mladen V. Tzvetkov
Ko-Referent/in:	Prof. Dr. Gerhard Burckhardt
Drittreferent/in:	Prof. Dr. Martin Oppermann

Datum der mündlichen Prüfung: Dienstag, 23.05.2017

Publikation:

Matthaei J¹, Kuron D¹, Faltraco F, Knoch T, Dos Santos Pereira JN, Abu Abed M, Prukop T, Brockmüller J, und Tzvetkov MV (2016): OCT1 mediates hepatic uptake of sumatriptan and loss-of-function OCT1 polymorphisms affect sumatriptan pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther* 99(6), 633-641

¹Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu der Veröffentlichung beigetragen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	iii
Abbildungsverzeichnis	vi
Tabellenverzeichnis	vii
Abkürzungsverzeichnis	viii
1 Einleitung	1
1.1 Epidemiologie der Volkskrankheit Migräne	1
1.2 Die Pathophysiologie der Migräne	2
1.3 Historische Entwicklung der Migränetherapie	4
1.3.1 Ergotamin	4
1.3.2 Die Entdeckung des Sumatriptans und die Erforschung der Serotoninrezeptoren	5
1.4 In der Migränetherapie relevante Serotoninrezeptortypen	6
1.5 Behandlung von Migräne mit Sumatriptan	8
1.5.1 Pharmakokinetik, Nebenwirkungen und Kontraindikationen von Sumatriptan	10
1.5.2 Metabolisierung und Transport von Sumatriptan	11
1.6 Triptane der zweiten Generation	12
1.7 Der organische Kationentransporter OCT1	15
1.8 Andere organische Kationentransporter in der menschlichen Leber . .	18
1.9 Ziel der Arbeit	19
2 Material und Methoden	20
2.1 Material	20
2.2 Methoden	23
2.2.1 Zellkultur	23
2.2.1.1 Kultivierung der Zellen	23
2.2.1.2 Bestimmung der Zellzahl	23
2.2.1.3 Ausplattieren der Zellen	23
2.2.2 Bestimmung der zellulären Aufnahme von Triptanen	24
2.2.2.1 Transportexperimente mit OCT1-überexprimierenden HEK293-Zellen	24

2.2.2.2	Transportexperiment mit primären humanen Hepatozyten	25
2.2.2.3	Vorbereitung der Zellysate für die Messung mittels HPLC-MS/MS	26
2.2.3	Inhibition der OCT1-vermittelten Aufnahme von MPP ⁺	27
2.2.4	Proteinmessungen	27
2.2.5	Bestimmung der Triptankonzentration mittels HPLC-MS/MS	29
2.2.5.1	High-Performance Liquid Chromatography	29
2.2.5.2	Tandem-Massenspektrometrie	30
2.2.5.3	Durchführung der Messungen und Auswertung der Ergebnisse	32
2.2.6	Parallel Artificial Membrane Permeability Assay	35
2.2.7	Berechnung grundlegender Enzymkinetikparameter	37
2.2.8	EDV-gestützte Berechnungen	38
2.2.8.1	ADMET-Predictor™	38
2.2.8.2	Statistische Analysen	38
3	Ergebnisse	39
3.1	Aufnahme von Sumatriptan in OCT1-überexprimierende Zellen	39
3.2	Aufnahme von Sumatriptan in primäre humane Hepatozyten	41
3.3	Aufnahme von Sumatriptan in OCT3-überexprimierende Zellen	42
3.4	Effekt der Allelvarianten des OCT1 auf die zelluläre Aufnahme von Sumatriptan	44
3.5	Charakterisierung der Sumatriptanaufnahme durch die Variante OCT1*2	46
3.6	Inhibition der zellulären Sumatriptanaufnahme durch andere Medikamente	49
3.7	Interaktion anderer Triptane mit dem OCT1	51
3.7.1	Inhibition des OCT1-vermittelten Transports von MPP ⁺ durch Triptane	51
3.7.2	Bestimmung der transporterunabhängigen Membranpermeabilität der Triptane	52
3.7.3	Triptane als Substrate des OCT1	52
4	Diskussion	55
4.1	Bedeutung des OCT1 für den zellulären Transport von Sumatriptan	55
4.2	Einfluss von Polymorphismen des OCT1 auf die zelluläre Aufnahme von Sumatriptan	58
4.3	Effekt von OCT1-Polymorphismen auf die Pharmakokinetik von Sumatriptan	59
4.4	Migräneprophylaktika beeinflussen die zelluläre Aufnahme von Sumatriptan durch den OCT1	62
4.5	Bedeutung des OCT1 für den Transport anderer Triptane	64
4.6	Triptane als Inhibitoren des OCT1	66
4.7	Sumatriptan und die Blut-Hirn-Schranke	68

4.8	Limitierungen und Ausblick	68
5	Zusammenfassung	70
6	Literaturverzeichnis	72

Abbildungsverzeichnis

1.1	Europaweite Arztbesuche infolge von Kopfschmerzerkrankungen	3
1.2	Vergleich der weltweiten Nutzung von Ergotamin und Sumatriptan .	5
1.3	Verlauf der Verordnungshäufigkeit von Triptanen	9
1.4	Strukturformel Sumatriptan	10
1.5	Vergleich der Verordnung von Triptanen nach Tagesdosis	11
1.6	Strukturformel Zolmitriptan	13
1.7	Strukturformel Naratriptan	13
1.8	Strukturformel Rizatriptan	14
1.9	Strukturformel Eletriptan	14
1.10	Sekundärstruktur des organischen Kationentransporters OCT1	16
2.1	Mikroskopische Aufnahme der primären humanen Hepatozyten	26
2.2	Schemazeichnung des Tandem-Massenspektrometers	31
2.3	Beispielchromatogramm für Sumatriptan und Sumatriptan-d6	33
2.4	Kalibratorfunktion im Massenspektrometer	35
2.5	Schemazeichnung des PAMPA	36
3.1	Zelluläre Aufnahme von Sumatriptan durch OCT1	40
3.2	Zelluläre Aufnahme von Sumatriptan in primäre humane Hepatozyten	42
3.3	Zelluläre Aufnahme von Sumatriptan durch OCT3	43
3.4	Zelluläre Aufnahme von Sumatriptan bei verschiedenen Allelen des OCT1	45
3.5	Charakterisierung der Sumatriptanaufnahme durch Variante OCT1*2	48
3.6	Inhibition der OCT1-vermittelten Aufnahme von Sumatriptan durch klinisch relevante Medikamente: Übersicht	49
3.7	Inhibition der OCT1-vermittelten Aufnahme von Sumatriptan durch klinisch relevante Medikamente: Detaillierte Charakterisierung	50
3.8	Interaktion anderer Triptane mit OCT1	51
3.9	Transport verschiedener Triptane durch OCT1	53
3.10	Transport verschiedener Triptane durch den OCT1: OCT1-abhängige Transportrate	54

Tabellenverzeichnis

1.1	Mittlere Ein-Jahres-Prävalenz verschiedener Kopfschmerzen weltweit .	2
1.2	Übersicht der Allele des organischen Kationentransporters OCT1 . . .	17
2.1	Geräte	20
2.2	Reagenzien und Medien	21
2.3	Zelllinien	21
2.4	Verbrauchsmaterialien	22
2.5	Software	22
2.6	Verwendete Puffer und Lösungen	22
3.1	Vergleich enzymkinetischer Parameter zwischen OCT1- und OCT3- überexprimierenden Zellen	44
3.2	Vergleich enzymkinetischer Parameter zwischen OCT1*1 und der OCT1*2- Variante	47
3.3	Vergleich des Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten $\log D_{\text{pH}7,4}$ mit dem Permeabilitätskoeffizienten P_e der Triptane	52
4.1	Vergleich der Transportkinetik verschiedener Substrate des OCT1 . .	57
4.2	Auswirkungen einer Leberinsuffizienz auf die Pharmakokinetik von Triptanen	60
4.3	Vergleich der Inhibitionspotentiale (IC_{50}) einer Auswahl von Migräneprophylaktika	63
4.4	Inhibitorisches Potential von Triptanen am OCT1	66

Abkürzungsverzeichnis

5HT	5-Hydroxytryptamin
ASP ⁺	(4-(4-(Dimethylamino)styryl)-N-Methylpyridiniumiodid
AUC	Area Under the Curve
BCA	Bichinolindicarbonsäure
BSA	Bovine Serum Albumin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CGRP	Calcitonin Gene Related Peptide
CHPM	Cryopreserved Hepatocyte Plating Medium
CHRM	Cryopreserved Hepatocyte Recovery Medium
C _{max}	maximale Plasmakonzentration
CYP	Cytochrom P
DDD	Daily Drug Dose
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	Fetal Calf Serum
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HEK	Human Embryonic Kidney
HEPES	Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure
hOCT	humaner organischer Kationentransporter
HPLC	High-Performance Liquid Chromatographie
HBSS ⁺	HEPES-gepuffertes HBSS
K _M	Michaeliskonstante
MAO	Monoaminoxidase
MATE	Multi-Antimicrobial Extrusion Protein
MPP ⁺	1-Methyl-4-phenylpyridinium
MS	Massenspektrometer
NET	Norepinephrintransporter

NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
OATP	Organo-Anionen-Transporter
OCT	organischer Kationentransporter
PAMPA	Parallel Artificial Membrane Permeability Assay
PBS	Phosphate-buffered Saline
RIPA	Radioimmunoprecipitation Assay
SERT	Serotonintransporter
SEV	Sekundärelektronenvervielfacher
SLC	Solute Carrier
TEA ⁺	Tetraethylammoniumion
t_{\max}	Zeitpunkt des Erreichens der maximalen Plasmakonzentration
TMD	Transmembrandomäne
v_{\max}	maximale Umsatzgeschwindigkeit
WHO	World Health Organization
YLD	Years Lost due to Disability
ZNS	zentrales Nervensystem

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Epidemiologie der Volkskrankheit Migräne

Kopfschmerzen in ihren verschiedenen Varianten sind eine global vorkommende Belastung im Alltag vieler Menschen. Sie können entweder als Symptom einer anderen Grunderkrankung oder alleine als primärer Kopfschmerz in Erscheinung treten. Die globale Ein-Jahres-Prävalenz für primäre Kopfschmerzen liegt bei 47%, weltweit sind also ungefähr 3,4 Milliarden Menschen von solchen Kopfschmerzen betroffen (Jensen und Stovner 2008). Neben Spannungskopfschmerzen und chronischen Kopfschmerzen gehört auch Migräne in die Kategorie der primären Kopfschmerzen.

Migräne ist charakterisiert durch wiederholtes Auftreten von häufig einseitigen, pulsierenden bis pochenden Schmerzen. Sie kann sich bei einigen Patienten durch eine Prodromal- oder Migräneauraphase ankündigen. Ein Anfall dauert zwischen vier und 72 Stunden, die Migräneattacken werden dabei oft von einer starken Licht-, Lärm- und Geruchsempfindlichkeit sowie Übelkeit und Erbrechen begleitet. Die Patienten leiden unter Schmerzen von mittlerer bis starker Intensität, unter Stress, und durch körperliche Anstrengungen können diese weiter zunehmen. Die Lebenszeitprävalenz von Migräne liegt bei 14%, die globale Ein-Jahres-Prävalenz wird auf etwa 10% geschätzt (Jensen und Stovner 2008). Frauen erkranken zwei- bis dreimal häufiger als Männer (Jensen und Stovner 2008). Die größte Zahl an Migränepatienten findet sich in der Altersklasse von 40-50 Jahren, jedoch sind auch schon 3-8% aller Kinder im Grundschulalter betroffen (Abu-Arefeh und Russell 1994, Sillanpää 1976). In Afrika und den östlichen Mittelmeerstaaten ist die Prävalenz mit 4-7% etwas geringer als in den westlichen Ländern und den asiatischen Staaten (Tabelle 1.1). Für die USA wurde ein reziproker Zusammenhang zwischen dem Einkommen und der Prävalenz der Migräne nachgewiesen. In der Einkommensgruppe <10.000 \$ wurden 60% mehr

Tabelle 1.1 – Mittlere Ein-Jahres-Prävalenz verschiedener Kopfschmerzen weltweit

	Afrika	Amerika	östl. Mittelmeer	Europa	Süd-Ost-Asien	West-Pazifik
Alle Kopfschmerzarten	21,6	46,5	78,8	56,1	63,9	52,8
Migräne	4	10,6	6,8	14,9	10,9	10,4
Spannungskopfschmerz	o.A.	32,6	o.A.	80*	34,8	19,7
Med.ind. Kopfschmerz	o.A.	o.A.	o.A.	1	1,2	o.A.

Mittlere Ein-Jahres-Prävalenz (in Prozent) verschiedener Kopfschmerzen bei Erwachsenen (18-65 Jahre), basierend auf Populationsstudien nach WHO-Regionen (WHO 2011)
o.A.: ohne Angabe, Med.ind.: Medikamenteninduzierter Kopfschmerz

*Die Diskrepanz zwischen 80% Spannungskopfschmerz und 56,1% für alle Kopfschmerzarten ist auf die Verwendung unterschiedlicher Studien für die Metanalyse der WHO zurückzuführen.

Erkrankte gefunden als in höheren Einkommensklassen ≥ 30.000 \$ (Stewart et al. 1992).

Von allen Kopfschmerzarten ist Migräne der Hauptgrund für Betroffene in Europa, sich in professionelle Behandlung zu begeben (Abbildung 1.1). Die WHO listet Migräne unter den 20 häufigsten Krankheiten, die das Leben im Alltag behindern (*Years Lost due to Disability*, YLD's) und alleine in England summieren sich die migränebedingten Arbeitsausfälle auf 25 Millionen Tage (Steiner et al. 2003, WHO 2001). In Deutschland werden die durch Migräne verursachten volkswirtschaftlichen Gesamtkosten auf etwa 6,72 Mrd. Euro pro Jahr geschätzt (bei einer Prävalenz von 9,8%) (Goebel 2012). Damit liegt die gesellschaftliche Belastung durch Migräne etwa auf einem ähnlichen Niveau wie die Belastung durch Diabetes Mellitus (Hu et al. 1999).

1.2 Die Pathophysiologie der Migräne

Migräne ist das Resultat von vaskulären, neuronalen und biochemischen Veränderungen im zentralen Nerven- und kranialen Gefäßsystem. Im Zentrum steht vermutlich die Aktivierung des trigemino-vaskulären Systems durch eine Vasodilatation kranialer Gefäße und direkter Veränderungen an Neuronen. Der Nervus Trigemini spielt eine Schlüsselrolle in diesem System. Er besitzt perivaskuläre Endungen an kranialen Arterien und ist für die schmerz sensible Innervation der Meningen zuständig. Werden diese Endungen durch einen bisher unbekanntem Mechanismus sensibilisiert, schütten sie Neurotransmitter wie Calcitonin Gene Related Peptide (CGRP), Substanz P und Neurokinin A aus. Zusätzlich kommt es zu einer Freisetzung von NO aus

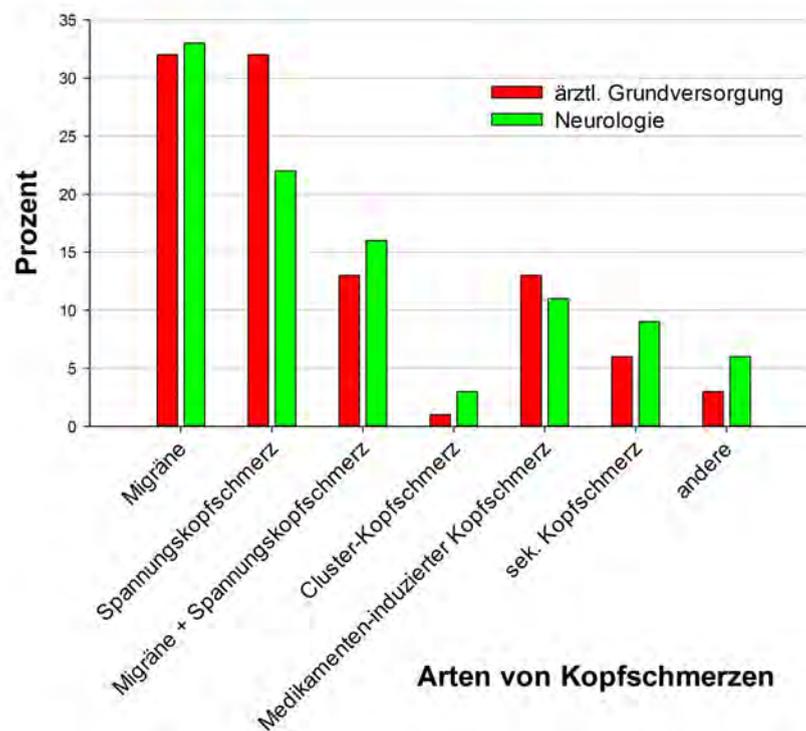


Abbildung 1.1 – Anteil der verschiedenen Kopfschmerzarten an allen Arztbesuchen in Europa infolge von Kopfschmerzen. Dargestellt sind die verschiedenen Arten von Kopfschmerzen, welche zu einem Arztbesuch in der Primärversorgung oder zur Vorstellung bei einem Spezialisten führen. Vor allem an Migräne erkrankte Patienten suchen häufiger einen Spezialisten auf - modifiziert nach (WHO 2011).

Endothelzellen, welches zusammen mit den freigesetzten Neurotransmittern (CGRP, Substanz P, Neurokinin A) eine Vasodilatation der kranialen Gefäße induziert. Diese Dilatation führt zu einer mechanischen Reizung der Meningen und es kommt zu einer starken Aktivierung der bereits sensibilisierten afferenten Neuronen des Nervus Trigeminus. Die freigesetzten Neurotransmitter können zudem eine Plasmaextravasation durch eine Permeabilitätssteigerung der Gefäßwände bedingen. Die austretende Flüssigkeit steht im Verdacht, eine neurogene aseptische Entzündung zu induzieren, was zu einer weiteren Stimulierung der trigeminalen Nervenfasern führt. Die Summe dieser Reize projiziert über die trigeminalen Neurone hauptsächlich in den Nucleus caudalis des Nucleus spinalis Nervi Trigemini. Dieser Hirnnervenkern verarbeitet die protopathischen Reize des Nervus Trigeminus und ist die erste zentrale Station in der Schmerzwahrnehmung bei Migräneattacken (Goadsby 2005, Goadsby et al. 2002, Humphrey 2007).

Die pathophysiologischen Mechanismen der Migräne sind noch nicht abschließend geklärt und werden weiter erforscht. Der Vollständigkeit halber sei noch das

Modell der *cortical-spreading-depression* als Erklärungsansatz für die Migräneaura und anderer Symptome wie visuellen Beeinträchtigungen erwähnt (Silberstein 2004). Die Wirkung der Triptane kann durch diese Modelle jedoch nicht vollständig erklärt werden.

1.3 Historische Entwicklung der Migränetherapie

1.3.1 Ergotamin

Die erste spezifischere Behandlungsmöglichkeit, um die Beschwerden von Migrärepatienten zu lindern, bot die Entdeckung von aus dem Mutterkornpilz gewonnenen Alkaloiden durch den Arzt W.H. Thomson im Jahr 1884. Die Isolierung eines einzelnen Alkaloids, des Ergotamins, gelang etwas später dem Chemiker Arthur Stoll im Jahr 1918. Ab 1920 verkaufte die Firma Sandoz dann ein Präparat auf Ergotaminbasis unter dem Namen „Gynergen[®]“. Verordnet wurde es zunächst aufgrund seiner tonussteigernden Wirkung auf die Uterusmuskulatur unter der Geburt, nach einigen Jahren stellte man auch eine Linderung von Kopfschmerzen bei Migrärepatienten fest (Tfelt-Hansen und Koehler 2008, Villalón und Centurión 2002). Ergotamin ist preiswert, gut verfügbar und bis heute mit Ausnahme der Westpazifikregion und Westeuropa ein weltweit sehr häufig eingesetztes Medikament gegen Migräne (Abbildung 1.2).

Die unspezifischen Interaktionen von Ergotamin mit verschiedensten Transmittersystemen des menschlichen Körpers führen jedoch häufig zu starken Nebenwirkungen (Silberstein 1997). Es sind Wechselwirkungen mit vielen Serotonin-, Adrenalin- und Dopaminrezeptoren beschrieben (Dahlöf und Maassen Van Den Brink 2012, Tfelt-Hansen et al. 2000). Neben Übelkeit und Erbrechen als häufigste unerwünschte Wirkung kann insbesondere eine Überdosierung oder dauerhafte Einnahme von Ergotamin zu einer unkontrollierten Vasokonstriktion von Gefäßen überall im Körper führen. Dies begünstigt kardiale Ereignisse wie Myokardinfarkte, kann aber auch zu Gangränen führen. Das Vollbild einer Vergiftung mit Mutterkornalkaloiden wird unter dem Krankheitsbild des Ergotismus zusammengefasst (Meyler 1996, Roberto et al. 2015). Die große Anzahl verschiedenster Nebenwirkungen ließ den Wunsch nach besseren Alternativen aufkommen.

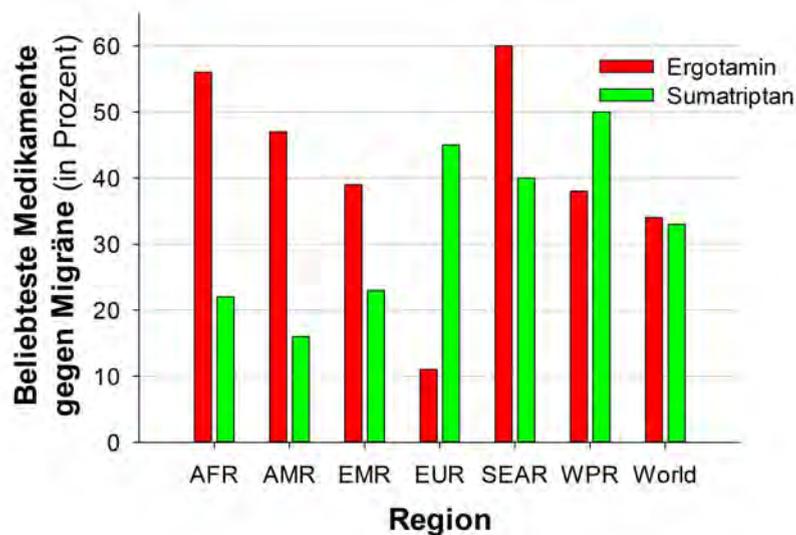


Abbildung 1.2 – Ergotamin und Sumatriptan sind die bevorzugt eingesetzten spezifischen Anti-Migräne Medikamente weltweit (AFR: Afrika, AMR: Amerika, EMR: östlicher Mittelmeerraum, EUR: Europa, SEAR: Süd-Ost-asiatischer Raum, WPR: West-Pazifik-Region) modifiziert nach (WHO 2011).

1.3.2 Die Entdeckung des Sumatriptans und die Erforschung der Serotoninrezeptoren

Bei der Erforschung der Migräne stellte man früh eine Verbindung zwischen den Schmerzen und einer Vasodilatation kranialer Gefäße her. Schon 1938 wurde ein Zusammenhang zwischen Migräneattacken, Pulsationen in der Arteria temporalis superficialis und der Gabe von Ergotamin zum Stoppen von Attacken publiziert (Graham und Wolff 1938). Etwas später konnten Vasodilatoren wie Alkohol als Auslöser für Migräneattacken identifiziert werden (Blau 1971, Humphrey 2007). Auf Basis dieser Beobachtungen entwickelte man in den 70er Jahren die Theorie, dass eine Vasodilatation kranialer Gefäße eine Attacke auslöst und eine Vasokonstriktion selbiger diese Attacken unterbrechen müsste (Humphrey 2007). In Versuchen testete man nun verschiedene Substanzen auf ihre vasokonstriktorische Wirkung und die Fähigkeit, Migräneattacken zu unterbrechen. Neben Ergotamin und Noradrenalin konnte auch für Serotonin ein gefäßverengender Effekt nachgewiesen werden, und die Gabe von Serotonin führte zu einer deutlichen Verkürzung von Migräneanfällen (Lance et al. 1967). Zudem wurde beobachtet, dass es zu Beginn einer Migräneattacke zu einer überschießenden Freisetzung von Serotonin in den zerebralen Gefäßen kommt. Im Verlauf eines Migräneanfalls kann dann eine Abnahme der Serotoninkonzentration im Blut

registriert werden (Anthony et al. 1967, Curran et al. 1965). Eine Verbindung des Serotonins zur Pathogenese der Migräne schien vor dem Hintergrund dieser Ergebnisse wahrscheinlich. Da Serotonin kaum die Blut-Hirn-Schranke passieren kann, machte man vor allem seine vasokonstriktorisches Eigenschaften für die Wirksamkeit bei Migräneattacken verantwortlich. Zentrale Effekte an Neuronen wurden ausgeschlossen (Humphrey 2007, Kriegebaum et al. 2010). Allerdings werden Serotoninrezeptoren in beinahe jedem Organsystem exprimiert, sodass Serotonin verschiedenste Reaktionen im Körper beeinflusst (Hoyer et al. 1994). Um die große Zahl von unerwünschten Wirkungen nach Gabe von Serotonin zu umgehen, suchte man ein Serotoninanalogon, das nur die gewünschte vasokonstriktorisches Wirkung in kranialen Gefäßen entfaltet. Bis zu diesem Zeitpunkt waren Serotoninrezeptoren weitgehend unerforscht. Man konzentrierte sich daher zunächst auf deren Klassifikation, um im Anschluss gezielt ein Medikament entwickeln zu können (Humphrey 2007).

Die Arbeitsgruppe um Patrick Humphrey entdeckte und unterschied zunächst drei 5HT-Rezeptoren. Das Ziel war, ein Medikament zu entwickeln, welches selektiv mit dem 5HT₁-Rezeptor interagiert. Dieser Rezeptor schien ein geeignetes Ziel zu sein, da man ihn nach Vorversuchen mit Methysergid, einem Partialagonisten an verschiedenen Serotoninrezeptoren, mit einer Vasokonstriktion insbesondere in den zerebralen Arterien in Verbindung bringen konnte (Saxena 1974). Daraufhin synthetisierte man Sumatriptan. Es zeigte in Tierversuchen die gewünschte selektive Wirkung auf 5HT₁-Rezeptoren und hatte die erhofften vasokonstriktiven Effekte (Humphrey 2007). Auch die im folgenden durchgeführten klinischen Studien verliefen zufriedenstellend und es zeichnete sich ein deutlicher Fortschritt in der medikamentösen Therapie der Migräne ab. Im Vergleich zu Ergotamin zeigte sich eine deutlich gesteigerte Wirksamkeit bei günstigerem Nebenwirkungsprofil (Glaxo, Group Research Ltd. 1991). Ab 1991 setzte sich Sumatriptan als Referenzmedikament in der Behandlung von Migräneattacken durch (Cady RK et al. 1991, Ensink 1991, Visser et al. 1992).

1.4 In der Migränetherapie relevante Serotoninrezeptortypen

Insgesamt kennt man heute sieben verschiedene Serotoninrezeptoren, die sich weiter in verschiedene Subtypen unterteilen lassen. Die für die Wirkung von Sumatriptan interessante 5HT₁-Rezeptorgruppe setzt sich aus fünf Subtypen (A, B, D, E und F) zusammen und ist G-Protein gekoppelt (Hoyer et al. 1994). Werden diese Rezeptoren

aktiviert, induzieren sie eine Inhibition der Adenylatcyclase und senken den Spiegel von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) in Zellen (Hoyer et al. 1994).

5HT_{1A}-Rezeptoren findet man vor allem auf Neuronen, sie werden sowohl prä- als auch postsynaptisch exprimiert. Sie sind mit Lernvorgängen, der Regulierung der Körpertemperatur und verschiedenen Signalweiterleitungen assoziiert. 5HT_{1B}-Rezeptoren sind mit den 5HT_{1D}-Rezeptoren phylogenetisch eng verwandt und bilden zusammen mit den 5HT_{1D}-Rezeptoren die zentralen Angriffspunkte für die Migräne-Therapie. Man findet beide an Basalganglien, trigeminalen Neuronen und im Gefäßsystem (Bonaventure et al. 1997, Hoyer et al. 1994). Der 5HT_{1E}-Rezeptor und der 5HT_{1F}-Rezeptor werden im Hippocampus und entorhinalen Kortexarealen exprimiert, über ihre Funktion ist nur wenig bekannt. Sumatriptan hat eine hohe Affinität zum 5HT_{1F}-Rezeptor, die Rolle dieses Rezeptors in der Migränepathophysiologie und -therapie ist aber nicht abschließend geklärt (Adham et al. 1993). Ein spezifischer 5HT_{1F}-Rezeptoragonist konnte in Versuchen Migräneattacken unterbrechen (Goldstein et al. 2001). Bisher hat sich aus diesem Wissen jedoch noch kein therapeutischer Nutzen ableiten lassen.

Für die Pathophysiologie der Migräne spielt die Gruppe der 5HT₂-Rezeptoren möglicherweise ebenfalls eine Rolle. Die Rezeptoren sind G_q-Protein gekoppelt, die Bindung eines Substrats führt zu einer Steigerung des Ca²⁺-Levels in der Zelle und aktiviert die Phospholipase C. Es werden drei Subtypen unterschieden: Während der 5HT_{2C}-Rezeptor bisher nur im ZNS nachgewiesen wurde, findet man die beiden anderen Rezeptoren (5HT_{2A}, _{2B}) auch in der Peripherie, beispielsweise im Gefäßsystem, im Gastrointestinaltrakt oder auf Thrombozyten (Hoyer et al. 1994).

Über eine Aktivierung von 5HT_{1B}-Rezeptoren und 5HT_{2A}-Rezeptoren wird die glatte Muskulatur in Blutgefäßen einiger Organsysteme zur Kontraktion gebracht (Chester et al. 1990, Tanaka et al. 2008). Während diese Kontraktion in der Peripherie eher durch 5HT_{2A}-Rezeptoren vermittelt wird, zeigen sich für den vasokonstriktiven Effekt im kranialen Gefäßsystem 5HT_{1B}-Rezeptoren hauptverantwortlich (Connor et al. 1989, Hargreaves und Shephard 1999, Nilsson et al. 1999). Die 5HT_{2A}-Rezeptoren scheinen im kranialen Gefäßsystem hingegen durch eine Freisetzung von NO eine Vasodilatation zu bewirken. Für 5HT_{2B}-Rezeptoren wurde ein ähnlicher Effekt nachgewiesen (Schmuck et al. 1996, Srikiatkachorn et al. 2002). Die Verbindung zwischen den einzelnen Rezeptoren, der Pathophysiologie der Migräne und dem Einfluss der Rezeptoren auf den Gefäßdurchmesser ist nicht endgültig geklärt. Nur die Bedeutung der 5HT_{1B}, _{1D}-Rezeptoren als Wirkort der Triptane in der Migränetherapie gilt als gesichert.

Die Serotoninrezeptoren der 5HT₃ bis 5HT₇-Gruppe sind ebenfalls im zentralen Nervensystem, aber auch peripher im Gastrointestinaltrakt, in Thrombozyten und glatter Muskulatur zu finden. Mit ihnen werden verschiedenste Effekte wie zum Beispiel eine Bronchokonstriktion, eine Thrombozytenaggregation, die Regulation des Tag-Nacht-Rhythmus oder eine Beschleunigung der Herzfrequenz in Verbindung gebracht (Barnes und Sharp 1999). Eine Verbindung zwischen diesen Rezeptoren mit den Pathomechanismen der Migräne konnte bisher nicht hergestellt werden.

1.5 Behandlung von Migräne mit Sumatriptan

Sumatriptan ist ein spezifischer 5HT_{1B}/5HT_{1D}/5HT_{1F}-Agonist, es kam 1993 unter dem Handelsnamen „Imigran[®]“ auf den deutschen Markt. Trotz des zunächst hohen Preises setzte es sich schnell wegen seiner außerordentlich guten Wirksamkeit im Vergleich zu bis dato bekannten Migränetherapeutika durch (Spiegel 1993). Bis Sumatriptan erhältlich war, standen neben Ergotamin und Prophylaktika wie Methysergid nur unspezifische Schmerzmitteln wie Aspirin, Naproxen und andere nicht-steroidale Antirheumatika für die Therapie der Migräne zur Verfügung. Diese Schmerzmittel bilden nach wie vor eine wichtige Säule in der Migränetherapie, ihre Wirkung ist aber nicht immer zufriedenstellend und die Gabe dieser Medikamente teilweise mit unerwünschten Nebenwirkungen behaftet (Damen et al. 2005, Lipton et al. 2004, Tfelt-Hansen 2008). Triptane gewinnen daher in der medikamentösen Therapie der Migräne immer stärker an Bedeutung (Abbildung 1.3).

Sumatriptan basiert wie auch Serotonin auf einer Indolringstruktur (Abbildung 1.4). Die Rezeptorselektivität des Sumatriptans für 5HT_{1B}-, 5HT_{1D}- und 5HT_{1F}-Rezeptoren wird vor allem auf den Rest an Position 5' des Indolrings zurückgeführt (Wang et al. 2013). Nach wie vor ist der exakte Wirkmechanismus von Sumatriptan nicht bekannt. Zum einen kommt es zu einer durch den 5HT_{1B}-Rezeptor vermittelten Vasokonstriktion an kranialen Blutgefäßen (Hamel 1999). Die Vasokonstriktion reduziert vermutlich den Reiz, der durch die Dilatation der kranialen Blutgefäße auf die Meningen entsteht. Zum anderen wird wahrscheinlich die Freisetzung von vasoaktiven Transmittern wie CGRP, Substanz P und Neurokinin A aus trigeminalen Neuronen durch Interaktion von Sumatriptan mit dem 5HT_{1D}- und dem 5HT_{1F}-Rezeptor reduziert. (Cady und Schreiber 2006, Goldstein et al. 2001, Williamson und Hargreaves 2001). Insbesondere die Hemmung der Freisetzung von CGRP scheint ein wichtiger Mechanismus für die Unterbrechung einer Migräneattacke zu sein (Arulmani et al. 2004, Olesen et al. 2004).

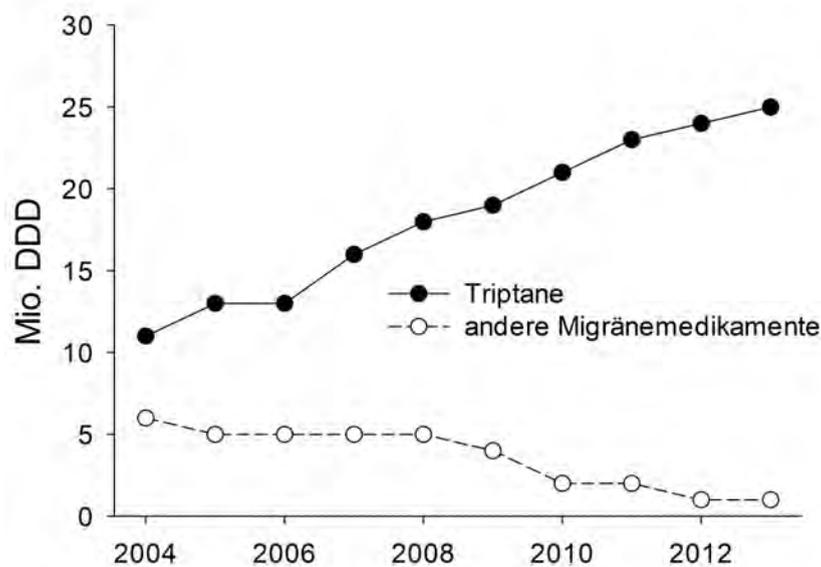


Abbildung 1.3 – Dargestellt ist die Gesamtverordnung von Migränetherapeutika nach definierten Tagesdosen in Mio. DDD (Defined Daily Doses). Während seit 2004 zunehmend mehr Triptane verschrieben werden, verlieren alternative Medikamente zur Behandlung von Migräne an Bedeutung - modifiziert nach (Günther 2014).

Sumatriptan kann zudem die Expression von *c-fos*, einem Immediate Early Gene, welches nach einem Reiz des Nervus Trigemini in Neuronen des Nucleus caudalis im Nucleus spinalis Nervi Trigemini verstärkt exprimiert wird, wieder herunterregulieren (Hoskin et al. 1996). Das Gen wird im Zusammenhang mit nozizeptiver Wahrnehmung gesehen und auch als neuronaler Marker für Schmerzempfinden genutzt (Harris 1998, Mitsikostas und Sanchez del Rio 2001).

Diskutiert wird außerdem eine direkte Inhibition oder zumindest Beeinflussung von C- und A δ -meningealen Nozizeptoren des Nervus Trigemini durch Sumatriptan (Burstein et al. 2005). Ob Sumatriptan jedoch die Blut-Hirn-Schranke überwinden kann, um direkt inhibitorisch an entsprechenden neuronalen Rezeptoren zu wirken, ist nicht abschließend geklärt. In früheren Versuchen konnte ein zentraler Effekt an Neuronen nur nach Zerstörung der Blut-Hirn-Schranke gezeigt werden, bei Migräneanfällen bleibt diese jedoch intakt (Kaube et al. 1993, Tfelt-Hansen 2010). Zwar können Sumatriptan und Triptane der 2. Generation wie Eletriptan oder Zolmitriptan nach intravenöser Applikation ohne vorherige Zerstörung der Blut-Hirn-Schranke im zentralen Nervensystem von Ratten nachgewiesen werden, doch nur die Triptane der 2. Generation zeigen dort auch serotonerge Effekte (Johnson et al. 2001). Die Autoren der Studie vermuten, dass Sumatriptan ebenfalls über die Blut-Hirn-Schranke gelangt, jedoch aufgrund seiner im Vergleich zu anderen Triptanen schwächeren

Affinität zu 5HT_{1B}- und 5HT_{1D}-Rezeptoren keine *in vitro* messbaren serotonergen Effekte zeigt. Bisher ist daher nur das häufigere Auftreten von ZNS-Nebenwirkungen nach Gabe von Sumatriptan im Vergleich zu Placebo-Präparaten ein indirekter Beleg für zentrale Effekte von Sumatriptan *in vivo* (Ferrari et al. 2002). Letztendlich scheint die Wirkung von Sumatriptan bei einer Migräneattacke auf eine Kombination aus neuronalen und vaskulären Effekten zurückzuführen zu sein.

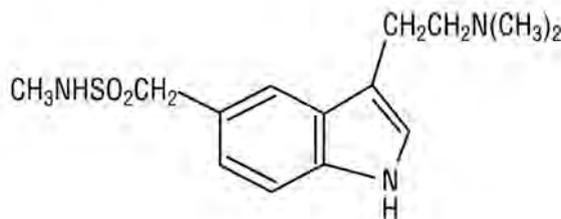


Abbildung 1.4 – Strukturformel von Sumatriptan (GlaxoSmithKline Inc. 2014b)

1.5.1 Pharmakokinetik, Nebenwirkungen und Kontraindikationen von Sumatriptan

Wegen seiner schlechten oralen Bioverfügbarkeit von weniger als 15% (Lacey et al. 1995) wurde Sumatriptan zunächst nur als Medikament zur subkutanen Injektion verordnet. Mittlerweile ist es auch als Tablette und Nasenspray zugelassen, kostengünstig erhältlich und das am häufigsten verschriebene Triptan in Deutschland (Abbildung 1.5).

Nach Applikation von Sumatriptan sind bis zu 70% der Patienten innerhalb von 2 Stunden schmerzfrei. Nach der oralen Einnahme von Sumatriptan werden 70% der maximalen Plasmakonzentration innerhalb von 45 Minuten und die maximale Plasmakonzentration nach 0,5-2 Stunden erreicht. Die Halbwertszeit liegt bei etwa 1,5-2 Stunden. Nach oraler Gabe von 100 mg Sumatriptan findet man im Körper eine maximale Plasmakonzentration von 50-100 µg/l. Bis zu einer oralen Dosis von 400 mg nimmt die maximale Plasmakonzentration (C_{\max}) und die Area Under the Curve (AUC) in Abhängigkeit von der gegebenen Dosis linear zu. Zwischen 14% und 17% des Sumatriptans bindet im Gefäßsystem an Plasmaproteine und das mittlere Verteilungsvolumen liegt bei 170 Litern (Lacey et al. 1995, Rapoport und Tepper 2001). Sumatriptan wird durch die Monoaminoxidase-A zu seinem Indolessigsäure-Analogon metabolisiert (Dixon et al. 1994). Der Metabolit wird entweder als freie

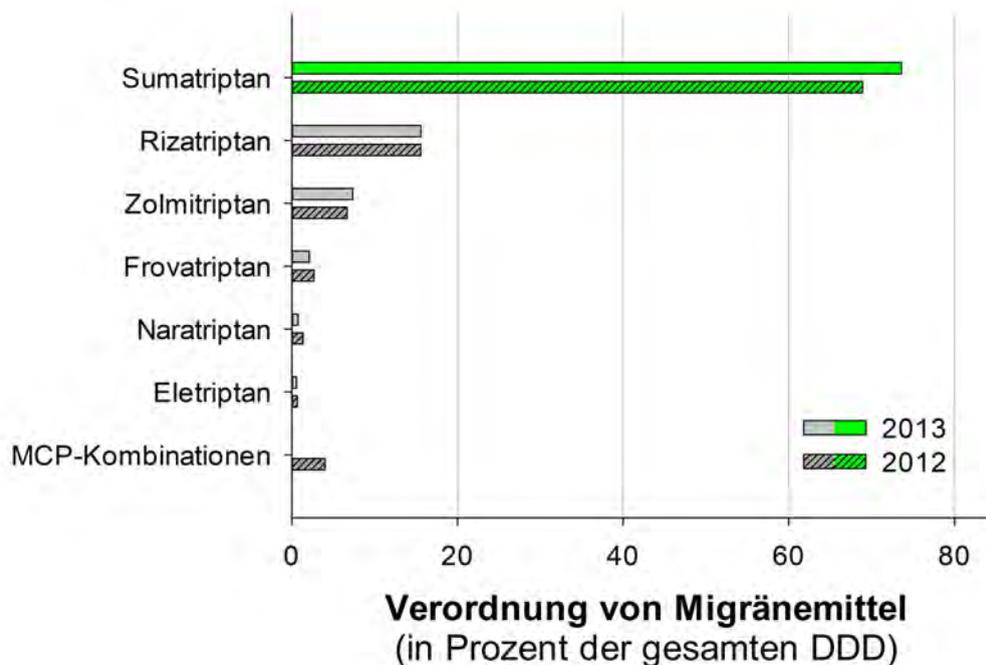


Abbildung 1.5 – Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Tagesdosis (daily drug dose, DDD) der häufigsten im Jahr 2012 und 2013 verordneten Triptane an der Gesamtsumme aller hier aufgeführten Triptane in Deutschland - modifiziert nach (Günther 2014)

Säure oder als Glukuronidkonjugat über den Urin und die Galle ausgeschieden. Die Metabolite haben keine bekannte Aktivität an 5HT-Rezeptoren (Fowler et al. 1991).

Aufgrund der vasokonstriktiven Eigenschaften ist die Gabe von Sumatriptan bei Patienten mit ischämischen Herzerkrankungen sowie Schlaganfällen oder transienten ischämischen Attacken in der Anamnese kontraindiziert, des Weiteren sollte Sumatriptan nicht zusammen mit Monoaminoxidasehemmern oder Ergotaminderivaten eingenommen werden. Häufige beobachtete unerwünschte Nebenwirkungen sind Schwindel, Schläfrigkeit, Sensibilitätsstörungen und ein der Angina pectoris ähnliches Engegefühl in der Brust (GlaxoSmithKline Inc. 2014b). Für die Wirkung des Sumatriptans und auch der anderen Triptane ist das schnelle Erreichen eines hohen Plasmaspiegels wichtig. Gelingt das nicht, ist die Wirksamkeit von Triptanen eingeschränkt (Dodick 2005).

1.5.2 Metabolisierung und Transport von Sumatriptan

Die niedrige orale Bioverfügbarkeit von Sumatriptan ist einer der Schwachpunkte dieses Medikaments. Das Problem der geringen oralen Bioverfügbarkeit ist aber nicht oder nicht ausschließlich in einer schlechten Resorption begründet. Nach oraler Gabe findet man sehr hohe Konzentrationen des Indolessigsäure-Metaboliten in Plasma

und Urin (Humphrey et al. 1991, Lacey et al. 1995) und nur 9% der verabreichten Dosis werden unverändert mit dem Stuhl ausgeschieden (Fowler et al. 1991). Das lässt darauf schließen, dass Sumatriptan einem starken First-Pass-Effekt durch Metabolisierung in der Leber und dem Magen-Darm-Trakt unterliegt.

Sumatriptan ist eine schwache Base. Es existiert eine protonierte und eine unprotonierte Form des Moleküls. Die unprotonierte Form kann begrenzt per Diffusion die Membran von Zellen wie beispielsweise Hepatozyten durchdringen. Der pKS-Wert von Sumatriptan wird auf über 8,9 geschätzt (8,9 ADMET-Predictor, 9,54 Marvin view), damit liegt es bei physiologischem pH-Wert (7,4) zu 96,8% in seiner protonierten Form vor (nach Henderson-Hasselbalch-Gleichung: pH 7,4; pKs 8,9). Zudem ist Sumatriptan mit einem logD-Wert von -1,3 (Ferrari et al. 2002) (ADMET-Predictor: -1,2 bei pKS-Wert 9,54) ein eher hydrophiles Molekül. Um in größeren Mengen in Hepatozyten zu gelangen, muss es einen Transportmechanismus in die Zelle geben. Geladene hydrophile Moleküle können Zellmembranen kaum durchdringen. Eine wichtige bekannte Transportergruppe um Substrate mit diesen Eigenschaften zu transportieren ist die Familie der organischen Kationentransporter. Auf der sinusoidalen Seite der Hepatozyten ist der organische Kationentransporter OCT1 der am stärksten exprimierte Transporter dieser Familie. (Hilgendorf et al. 2007, Schaefer et al. 2012, Tzvetkov et al. 2013).

1.6 Triptane der zweiten Generation

Im Laufe der Zeit wurden weitere Triptane mit veränderten pharmakokinetischen Eigenschaften auf den Markt gebracht. Heute sind in Deutschland neben Sumatriptan die Triptane Almotriptan, Eletriptan, Frovatriptan, Naratriptan, Rizatriptan und Zolmitriptan erhältlich. Die Grundstruktur auf Basis des Indolrings ist allen Triptanen gemein, die Unterschiede liegen in den Restgruppen an Position 3' und 5' des Indolrings. Im Bezug auf die pharmakologische Wirkung verhalten sich alle Triptane sehr ähnlich, die Unterschiede zwischen den einzelnen Vertretern dieser Gruppe sind eher gering und bei weitem nicht so ausgeprägt wie in anderen Medikamentengruppen.

Etwa sieben Jahre nach der Einführung von Sumatriptan 1993 war Zolmitriptan auf dem deutschen Markt erhältlich (Abbildung 1.6). Die orale Bioverfügbarkeit liegt bei 40% - 48% und ist somit gegenüber der oralen Bioverfügbarkeit von Sumatriptan deutlich erhöht. Zolmitriptan ist lipophiler als Sumatriptan, das Ansprechverhalten aber ähnlich. Auch bei Zolmitriptan sind 62% bis 67% der Patienten zwei Stunden

nach der Einnahme schmerzfrei. Hervorzuheben ist das dauerhaft gute Ansprechverhalten bei Patienten, die mit Zolmitriptan über einen langen Zeitraum immer wieder eine Verbesserung ihrer Kopfschmerzen erreichen konnten. Nach Gabe von Zolmitriptan findet man drei verschiedene Metabolite im Plasma, von denen nur das N-Desmethyl-Zolmitriptan Aktivität an Serotonin-Rezeptoren zeigt. Die Metabolisierung wird von Cytochrom P-450 (CYP) Enzymen und der Monoaminoxidase-A katalysiert. (Dixon und Warrander 1997, Rapoport und Tepper 2001).

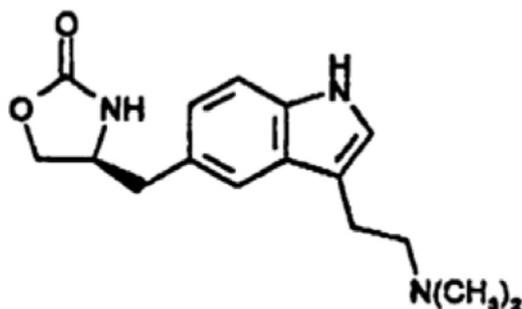


Abbildung 1.6 – Strukturformel von Zolmitriptan (AstraZeneca Canada Inc. 2014)

Naratriptan kam zwei Monate nach Zolmitriptan auf den Markt (Abbildung 1.7). Die Bioverfügbarkeit liegt mit 74% bei Frauen um elf Prozentpunkte höher als bei Männern (63%). Naratriptan ist lipophiler als Sumatriptan und besitzt mit fünf bis sechs Stunden eine vergleichsweise lange Halbwertszeit. Von allen Triptanen hat es die geringsten Nebenwirkungen, spricht aber auch am langsamsten an. Nach zwei Stunden sind 48% der Patienten beschwerdefrei, erst nach vier Stunden sind bei 66% der Patienten die Migräneattacken beendet. Bis zu 50% des Naratriptans wird unverändert über die Nieren ausgeschieden, etwa 30% werden zuvor durch verschiedene CYP-Enzyme der Leber verstoffwechselt. Es kann im Gegensatz zu anderen Triptanen wie Sumatriptan oder Zolmitriptan zusammen mit Monoaminoxidase-A Inhibitoren gegeben werden (Christensen et al. 2001, Dulli 1999).

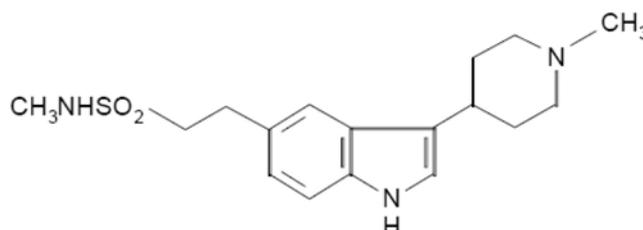


Abbildung 1.7 – Strukturformel von Naratriptan (GlaxoSmithKline Inc. 2014a)

Ein Jahr später (1998) war Rizatriptan erhältlich (Abbildung 1.8). Die orale Bioverfügbarkeit ist mit 45% ähnlich wie bei Zolmitriptan. Nach zwei Stunden sind zwischen 67% und 77% der Migräne-Patienten schmerzfrei. Die Wahrscheinlichkeit nach Gabe eines Triptans auch über ein 2-Stunden-Intervall hinaus schmerzfrei zu bleiben, ist bei Rizatriptan am größten. Von allen Triptanen hat es insgesamt das schnellste Ansprechverhalten (Vyas et al. 2000).

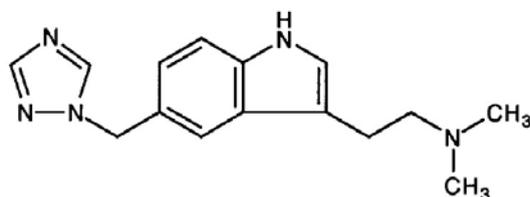


Abbildung 1.8 – Strukturformel von Rizatriptan (Merck Canada Inc. 2013)

Almotriptan war ab dem Jahr 2001 verfügbar. Es hat mit 70% - 80% die höchste orale Bioverfügbarkeit und mit 57% - 65% Schmerzfreiheit zwei Stunden nach Einnahme ein ähnliches Ansprechverhalten wie Sumatriptan. Es wird sowohl über die Nieren als auch die Leber ausgeschieden, in der es durch CYP-3A4 und die Monoaminoxidase-A metabolisiert wird (McEnroe und Fleishaker 2005).

Als bisher letzte Triptane kamen Eletriptan und Frovatriptan auf den Markt. Eletriptan hat eine Bioverfügbarkeit von 50% und eine Halbwertszeit von 3,6 – 5,5 Stunden (Abbildung 1.9). Es ist das lipophilste aller Triptane und wird vor allem durch CYP-3A4 abgebaut. Frovatriptan hat mit 24% - 30% eine eher schlechte orale Bioverfügbarkeit und mit 26 Stunden eine sehr lange Halbwertszeit. In der Leber wird es durch CYP-1A2 metabolisiert. Das Ansprechverhalten ist vergleichbar mit dem von Naratriptan, auch bei Frovatriptan sind erst nach vier Stunden 60% der Patienten schmerzfrei (Balbisi 2006, Milton et al. 2002, Rapoport und Tepper 2001).

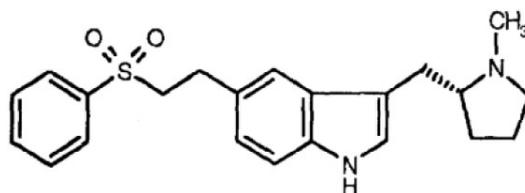


Abbildung 1.9 – Strukturformel von Eletriptan (Pfizer Canada Inc. 2013)

1.7 Der organische Kationentransporter OCT1

Der organische Kationentransporter 1 gehört zur Gruppe der polyspezifischen Solute Carrier der Familie 22 (SLC22) und wird vor allem in der sinusoidalen Membran humaner Hepatozyten exprimiert (Hilgendorf et al. 2007, Nies et al. 2009, Zhang et al. 1997). OCT1 vermittelt den bidirektionalen Transport kleinerer hydrophiler endogener und exogener Substanzen bis zu einem Volumen von 500 \AA^3 (Hendrickx et al. 2013). Die molekulare Größe einer Substanz ist dabei ein entscheidender Faktor für einen OCT1-vermittelten Transport.

Exprimiert wird der OCT1 im Menschen vor allem in der Leber (Nies et al. 2009, Zhang et al. 1997), darüber hinaus wurden geringere Mengen OCT1-mRNA in der Niere und im Intestinum nachgewiesen (Drozdik et al. 2014, Tzvetkov et al. 2009). Wie alle Transporter aus der SLC22-Familie setzt sich auch der OCT1 aus 12 α -helikalen transmembranären Domänen (TMD) zusammen (Abbildung 1.10). Zwischen den ersten beiden TMDs existiert eine extrazelluläre Schleife mit 3 N-Glykosylierungsstellen. Zwischen der 6. und 7. TMD liegt eine große intrazelluläre phosphorylierte Schleife. Sowohl das N- als auch das C-terminale Ende liegen intrazellulär (Gorboulev et al. 1997, Zhang et al. 1997). Die extrazelluläre Schleife beeinflusst die Oligomerisierung und korrekte Lokalisation des OCT1 in der Zellmembran (Keller et al. 2011).

Die treibende Kraft für organische Kationentransporter wie den OCT1 ist der Konzentrationsgradient des Substrats und das Transmembranpotential über der Zelle. Aufgrund des negativen Zellpotentials werden Kationen bevorzugt in die Zelle transportiert (Koepsell et al. 2007). Damit ist der OCT1 in erster Linie ein Aufnahmetransporter, grundsätzlich kann der OCT1 aber auch als Effluxtransporter agieren. Natrium- und Chloridionen haben keinen Einfluss auf die Transportleistung des OCT1, vermutlich spielt auch der Protonengradient keine Rolle. Eine spezifische Substratbindestelle scheint es nicht zu geben, vielmehr sind unterschiedliche, aber teilweise überlappende Substraterkennungsstellen für das Andocken von Substraten vorhanden (Koepsell 2011). Nachgewiesen ist ein Transport durch den OCT1 für die Toxine MPP⁺ und TEA⁺, Vitamin B1 und klinisch relevante Medikamente wie Metformin, Aciclovir und Ganciclovir, Morphin, Ranitidin, Tiotropium, Tramadol, Debrisoquin und Amisulprid (Koepsell et al. 2007, Takeda et al. 2002, Tzvetkov et al. 2013, 2011, Zhang et al. 1997).

Der Transport von Substraten des OCT1 kann gehemmt werden. Eine starke positive Ladung und lipophile Eigenschaften scheinen dabei die wichtigsten Merkmale für eine inhibitorische Wirkung von Substanzen am OCT1 zu sein (Ahlin et al. 2008,

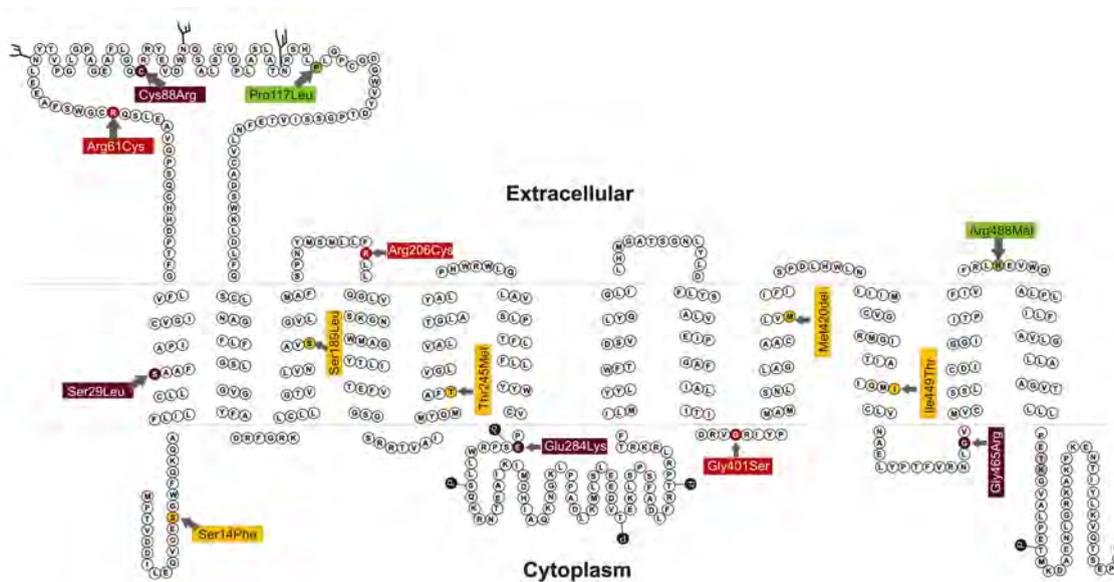


Abbildung 1.10 – Sekundärstruktur des organischen Kationentransporters OCT1. Farblich markiert sind die Lokalisationen von Aminosäureveränderungen, die zu Änderungen in der Aktivität des OCT1 führen: Substratspezifischer Aktivitätsverlust - orange, teilweiser substratunabhängiger Aktivitätsverlust - rot, völliger substratunabhängiger Aktivitätsverlust - dunkelrot, Zunahme der Transportaktivität - grün (Seitz et al. 2015).

Hendrickx et al. 2013). Ein hohes Dipolmoment und viele Wasserstoffbrückenbindungen sind hingegen negativ mit der Wahrscheinlichkeit, den Transport von Substanzen via OCT1 zu inhibieren, korreliert. Viele der inhibierenden Substanzen werden selbst nur schlecht oder gar nicht transportiert. Beispielhaft können hier NMDA-Rezeptor Antagonisten wie Ketamin und Memantin, der Ca^{2+} -Kanalblocker Verapamil oder auch antivirale Medikamente wie Aquinavir und Ritonavir genannt werden (Ahlin et al. 2008, Koepsell et al. 2007).

Im Menschen liegt das für den OCT1 kodierende Gen (SLC22A1) auf Chromosom 6, es enthält 11 Exons und 10 Introns. Im SLC22A1-Gen ist eine große Zahl von Polymorphismen bekannt, von denen einige zu einer Aminosäuredeletion oder dem Austausch einer Aminosäure führen. Als Folge kann die Affinität des OCT1 zu Substraten beeinflusst werden, eine Veränderung der Transportaktivität ist ebenfalls möglich. Bei den Allelen OCT1*5, OCT1*6, OCT1*12, OCT1*14 und OCT1*15 wird der OCT1 zwar exprimiert, jedoch ist der intrazelluläre Transport des OCT1 gestört und der Transporter ist nicht in der Zellmembran lokalisiert (Kerb et al. 2002, Seitz et al. 2015). Die häufigste weltweit verbreitete *loss-of-function*-Variante des OCT1 ist OCT1*2, diese ist durch eine Met420-Deletion charakterisiert. Andere häufige Polymorphismen sind Aminosäuresubstitutionen wie beispielsweise Arg61Cys, Gly465Arg, Ser14Phe oder Gly401Ser (Tabelle 1.2). In der europäischen Bevölkerung

tragen etwa 53% zwei aktive OCT1-Allele. Weitere 38% sind heterozygote Träger mit nur einem als funktionsfähig klassifiziertem Allel und 8% der Europäer besitzen kein aktives OCT1-Allel (Kerb et al. 2002, Seitz et al. 2015, Tzvetkov et al. 2012). Ein Verlust der OCT1-Aktivität wird mit einer verminderten Aufnahme von Medikamenten in die Leber und einer dadurch veränderten Metabolisierung in Verbindung gebracht (Shu et al. 2007, Tzvetkov et al. 2013, 2012, 2011).

Tabelle 1.2 – Übersicht der Allele des organischen Kationentransporters OCT1

Haplotype	Ser14Phe	Ser29Leu	Arg61Cys	Cys88Arg	Gln97Lys	Pro117Leu	Phe160Leu	Ser189Leu	Arg206Cys	Gly220Val	Thr245Met	Glu284Lys	Pro341Leu	Arg342His	Gly401Ser	Met408Val	Gly414Ala	Met420del	Ile449Thr	Gly465Arg	Arg488Met
OCT1*1A	Ser	Ser	Arg	Cys	Gln	Pro	Phe	Ser	Arg	Gly	Thr	Glu	Pro	Arg	Gly	Val	Gly	Met	Ile	Gly	Arg
1B	Ser	Ser	Arg	Cys	Gln	Pro	Phe	Ser	Arg	Gly	Thr	Glu	Pro	Arg	Gly	Met	Gly	Met	Ile	Gly	Arg
1C	Ser	Ser	Arg	Cys	Gln	Pro	Leu	Ser	Arg	Gly	Thr	Glu	Pro	Arg	Gly	Met	Gly	Met	Ile	Gly	Arg
1D	Ser	Ser	Arg	Cys	Gln	Pro	Phe	Ser	Arg	Gly	Thr	Glu	Leu	Arg	Gly	Val	Gly	Met	Ile	Gly	Arg
1E	Ser	Ser	Arg	Cys	Gln	Pro	Leu	Ser	Arg	Gly	Thr	Glu	Pro	Arg	Gly	Val	Gly	Met	Ile	Gly	Arg
1F	Ser	Ser	Arg	Cys	Gln	Pro	Phe	Ser	Arg	Gly	Thr	Glu	Pro	His	Gly	Val	Gly	Met	Ile	Gly	Arg
1G	Ser	Ser	Arg	Cys	Gln	Pro	Phe	Ser	Arg	Gly	Thr	Glu	Leu	Arg	Gly	Met	Gly	Met	Ile	Gly	Arg
OCT1*2A	Ser	Ser	Arg	Cys	Gln	Pro	Phe	Ser	Arg	Gly	Thr	Glu	Pro	Arg	Gly	Val	Gly	del	Ile	Gly	Arg
2B	Ser	Ser	Arg	Cys	Gln	Pro	Leu	Ser	Arg	Gly	Thr	Glu	Pro	Arg	Gly	Val	Gly	del	Ile	Gly	Arg
2C	Ser	Ser	Arg	Cys	Gln	Pro	Phe	Ser	Arg	Gly	Thr	Glu	Pro	Arg	Gly	Val	Ala	del	Ile	Gly	Arg
OCT1*3A	Ser	Ser	Cys	Cys	Gln	Pro	Leu	Ser	Arg	Gly	Thr	Glu	Pro	Arg	Gly	Met	Gly	Met	Ile	Gly	Arg
3B	Ser	Ser	Cys	Cys	Gln	Pro	Phe	Ser	Arg	Gly	Thr	Glu	Pro	Arg	Gly	Val	Gly	Met	Ile	Gly	Arg
OCT1*4A	Ser	Ser	Arg	Cys	Gln	Pro	Leu	Ser	Arg	Gly	Thr	Glu	Pro	Arg	Ser	Met	Gly	Met	Ile	Gly	Arg
4B	Ser	Ser	Arg	Cys	Gln	Pro	Phe	Ser	Arg	Gly	Thr	Glu	Pro	Arg	Ser	Met	Gly	Met	Ile	Gly	Arg
OCT1*5	Ser	Ser	Arg	Cys	Gln	Pro	Phe	Ser	Arg	Gly	Thr	Glu	Pro	Arg	Gly	Val	Gly	del	Ile	Arg	Arg
OCT1*6	Ser	Ser	Arg	Arg	Gln	Pro	Phe	Ser	Arg	Gly	Thr	Glu	Pro	Arg	Gly	Val	Gly	del	Ile	Gly	Arg
OCT1*7A	Phe	Ser	Arg	Cys	Gln	Pro	Phe	Ser	Arg	Gly	Thr	Glu	Pro	His	Gly	Val	Gly	Met	Ile	Gly	Arg
7B	Phe	Ser	Arg	Cys	Gln	Pro	Phe	Ser	Arg	Gly	Thr	Glu	Pro	Arg	Gly	Val	Gly	Met	Ile	Gly	Arg
7C	Phe	Ser	Arg	Cys	Gln	Pro	Leu	Ser	Arg	Gly	Thr	Glu	Pro	Arg	Gly	Met	Gly	Met	Ile	Gly	Arg
OCT1*8A	Ser	Ser	Arg	Cys	Gln	Pro	Phe	Ser	Arg	Gly	Thr	Glu	Pro	Arg	Gly	Met	Gly	Met	Ile	Gly	Met
8B	Ser	Ser	Arg	Cys	Gln	Pro	Phe	Ser	Arg	Gly	Thr	Glu	Pro	Arg	Gly	Val	Gly	Met	Ile	Gly	Met
8C	Ser	Ser	Arg	Cys	Gln	Pro	Phe	Ser	Arg	Gly	Thr	Glu	Pro	His	Gly	Val	Gly	Met	Ile	Gly	Met
OCT1*9	Ser	Ser	Arg	Cys	Gln	Leu	Leu	Ser	Arg	Gly	Thr	Glu	Pro	Arg	Gly	Met	Gly	Met	Ile	Gly	Arg
OCT1*10	Ser	Ser	Arg	Cys	Gln	Pro	Phe	Leu	Arg	Gly	Thr	Glu	Pro	Arg	Gly	Met	Gly	Met	Ile	Gly	Arg
OCT1*11	Ser	Ser	Arg	Cys	Gln	Pro	Phe	Ser	Arg	Gly	Thr	Glu	Pro	Arg	Gly	Met	Gly	Met	Thr	Gly	Arg
OCT1*12	Ser	Leu	Arg	Cys	Gln	Pro	Phe	Ser	Arg	Gly	Thr	Glu	Leu	Arg	Gly	Val	Gly	Met	Ile	Gly	Arg
OCT1*13	Ser	Ser	Arg	Cys	Gln	Pro	Phe	Ser	Arg	Gly	Met	Glu	Pro	Arg	Gly	Val	Gly	Met	Ile	Gly	Arg
OCT1*14	Ser	Ser	Arg	Cys	Gln	Pro	Phe	Ser	Cys	Gly	Thr	Glu	Pro	Arg	Gly	Val	Gly	del	Ile	Gly	Arg
OCT1*15	Ser	Ser	Arg	Cys	Gln	Pro	Phe	Ser	Arg	Gly	Thr	Lys	Pro	Arg	Gly	Val	Gly	Met	Ile	Gly	Arg
OCT1*16	Ser	Ser	Arg	Cys	Gln	Pro	Phe	Ser	Arg	Val	Thr	Glu	Pro	Arg	Gly	Val	Gly	Met	Ile	Gly	Arg

Übersicht der bekannten Polymorphismen des organischen Kationentransporters OCT1. Gezeigt sind 16 major- und 14 sub-Allele, sortiert nach ihrer weltweiten Häufigkeit. Gelb gefärbt sind Polymorphismen mit einem Einfluss auf die OCT1-Aktivität, weiß gefärbt sind Polymorphismen ohne Einfluss auf die OCT1-Aktivität (Seitz et al. 2015).

Für verschiedene klinisch relevante Medikamente wurden bereits die Effekte von Varianten des OCT1 auf die pharmakologischen Parameter der Medikamente untersucht. Für das Biguanid Metformin konnte ein Zusammenhang zwischen der OCT1-Aktivität und der Pharmakodynamik *in vitro*, im Mausmodell und in klinischen Studien an gesunden Probanden gezeigt werden (Shu et al. 2007, Wang et al. 2002).

OCT1-überexprimierenden Zelllinien akkumulieren gegenüber Zellen ohne überexprimiertem OCT1 deutlich mehr Metformin über einen bestimmten Inkubationszeitraum. Während in Mäusen mit zwei aktiven OCT1-Allelen die Plasmaglukoselevel nach Metformingabe reduziert sind, bleiben die nüchtern gemessenen Plasmaglukoselevel in Mäusen mit zwei defekten OCT1-Allelen auch nach Metformingabe unverändert (Shu et al. 2007). In gesunden Probanden mit defekten Varianten des OCT1 werden nach einem oralen Glukosetoleranztest und Metformingabe signifikant höhere Plasmaglukoselevel gemessen als in einer Kontrollgruppe mit zwei als funktionsfähig klassifizierten OCT1-Allelen. Der OCT1 spielt damit eine wichtige Rolle in der therapeutischen Wirksamkeit von Metformin.

Auch die hepatozelluläre Aufnahme von Morphin ist OCT1-abhängig und bei *loss-of-function*-Varianten des OCT1 vermindert (Fukuda et al. 2013, Tzvetkov et al. 2013). Damit ist die Metabolisierung von Morphin verlangsamt und die Clearance von Morphin erniedrigt. Als Folge akkumuliert Morphin im Blut, und es können erhöhte Morphinplasmaspiegel nachgewiesen werden.

1.8 Andere organische Kationentransporter in der menschlichen Leber

Neben dem OCT1 finden sich in Hepatozyten noch zwei weitere genetisch eng verwandte Kationentransporter: Die organischen Kationentransporter OCT2 und OCT3. Mit 551 Aminosäuren ist der OCT3 der kleinste der organischen Kationentransporter. Seine Aminosäuresequenz stimmt zu 48% mit der des OCT1 überein (Jonker und Schinkel 2004). Während OCT1 und OCT2 vor allem in exkretorischen Organen zu finden sind, wird der OCT3 auch in anderen Organsystemen exprimiert. Er wurde bisher beispielsweise im Gehirn, im Herz, in der Leber, außerdem in der Aorta, dem Skelettmuskeln und auch der Lunge nachgewiesen. Im Vergleich zum OCT1 ist der OCT3 in der Leber etwa zehnfach geringer exprimiert (Ahlin et al. 2008, Hilgendorf et al. 2007, Tzvetkov et al. 2013). Der OCT2 wird nicht in der Leber exprimiert (Tzvetkov et al. 2013).

In geringerem Maße können in Hepatozyten noch weitere organische Kationentransporter nachgewiesen werden. Zur selben Familie wie der OCT1 gehören die organischen Kationen- und Carnitintransporter OCTN1 und OCTN2. Neben der Leber werden diese Transporter in vielen weiteren Organsystemen exprimiert, beispielsweise in Nierengewebe oder Skelettmuskelzellen (Koepsell et al. 2007, Tzvetkov et al. 2013). Eine andere Familie (SLC47) wird von den Protonen-Kationen-Antiportern

MATE1 und MATE2K gebildet. Diese Transporter sind jedoch auf der kanalikulären Seite der Hepatozyten lokalisiert und haben keinen Einfluss auf die Aufnahme von Substanzen auf der sinusoidalen Seite der Hepatozyten (Otsuka et al. 2005, Tzvetkov et al. 2013).

Die organischen Kationentransporter unterscheiden sich im Bezug auf ihre Affinität zu verschiedenen Substanzen. Einige wenige Substrate wie MPP⁺ werden von allen organischen Kationentransportern ähnlich gut transportiert, die Mehrheit der Substrate bindet aber unterschiedlich stark an die verschiedenen Transporter. So zeigt der OCT3 im Vergleich zum OCT1 beispielsweise eine höhere Affinität zu Epinephrin und Histamin (Amphoux et al. 2006). Andere Substanzen wie Serotonin oder Dopamin werden hingegen durch den OCT1 besser transportiert (Busch et al. 1996, Koepsell et al. 2007, Wu et al. 1998). Unter Berücksichtigung der verschiedenen Expressionsmuster, der maximalen Transportkapazität und der Substrataffinität muss daher für jeden dieser Kationentransporter die Relevanz des Transporters für den Transport von verschiedenen Substanzen in der Leber betrachtet und bewertet werden.

1.9 Ziel der Arbeit

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob Sumatriptan einem Transport durch den organischen Kationentransporter OCT1 unterliegt. Dafür wurden *in-vitro*-Experimente mit OCT1 überexprimierenden Zellen und primären humanen Hepatozyten durchgeführt. Es wurde die Zeit- und die Konzentrationsabhängigkeit eines OCT1-vermittelten Transports untersucht und mit dem Transport durch den ebenfalls in der Leber exprimierten organischen Kationentransporter OCT3 verglichen. Des Weiteren wurde die Abhängigkeit des OCT1-vermittelten Transports von verschiedenen Polymorphismen des OCT1 und die Inhibition des Transports durch verschiedene Medikamente ermittelt. Der Transport von Sumatriptan und die Inhibition der zellulären Aufnahme von MPP⁺ durch Sumatriptan wurden jeweils mit dem Transport und der Inhibition der zellulären Aufnahme von MPP⁺ mit einer Auswahl anderer Triptane verglichen.

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Material

Tabelle 2.1 – Geräte

Geräte	Hersteller
API4000 Tandem Mass Spectrometer	Applied Biosystems, Darmstadt
arium [®] pro VF	Sartorius, Göttingen
Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Biofuge pico	Heraeus, Hanau
Centrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg
CO2-Inkubator BBD 6220	Heraeus, Hanau
Feinwaage	Sartorius, Göttingen
Fresco 17	Heraeus, Hanau
HPLC-Anlage	Perkin Elmer, Waltham, MA, USS
Liquid Scintillation Counter Beckman LS5000TD	Beckman Coulter, Krefeld
Membran-Vakuumpumpe	Vacuubrand, Wertheim
Microskop Axiovert 40 CFL	Zeiss, Jena
MS2 Minishaker-Vortexer	IKA, Staufen
Neubauer-Zählkammer	Schütt, Göttingen
Objektträger-Streichtisch OTS 40	Medite, Burgdorf
Photometer Tecan Ultra Microplate Reader	TECAN, Crailsheim
Sterilbank Clean Air type DFL/REC4 KL2A	Mahl, Trendelburg
Wasserbad GFL 1083	Schütt, Göttingen

Tabelle 2.2 – Reagenzien und Medien

Reagenzien und Medien	Lieferant/Hersteller
³ H-markiertes Methylphenylpyridinium	Hartmann Analytic, Braunschweig
Acetonitril	Merck, Darmstadt
Ameisensäure 100%	Merck, Darmstadt
Amitriptylin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Aquasafe 500+ liquid scintillator	Zinsser Analytics, Frankfurt a. M.
Bichinolindicarbonsäure (BCA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bisoprolol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Cryopreserved Hepatocyte Plating Medium (CHPM)	Life Technologies, Darmstadt
Cryopreserved Hepatocyte Recovery Medium (CHRM)	Life Technologies, Darmstadt
Desipramin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Domperidon	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Life Technologies, Darmstadt
Eletriptan	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Fetal Calf Serum (FCS)	Life Technologies, Darmstadt
Flunarizin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Gabapentin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)	Life Technologies, Darmstadt
Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure (HEPES)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Kupfersulfat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Methanol	Merck, Darmstadt
Metoclopramid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Metoprolol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Naratriptan	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
PAMPA-Platten	DB Biosciences
Phosphate-buffered saline (PBS)	AppliChem, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Invitrogen, Karlsruhe
Poly-D-Lysin Hydrobromid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Propranolol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Rizatriptan	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Sumatriptan	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypanblau-Lösung (0,4%)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypsin	Life Technologies, Darmstadt
Zolmitripan	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Tabelle 2.3 – Zelllinien

Zelllinie	Bezug/Lieferant
HEK293 T-REx TM Zellen überexprimierend OCT1 *1 (Wild-typ), *3, *4, *5, *6	(Saadatmand et al. 2012)
HEK293 T-REx TM Zellen überexprimierend OCT1 *2, *7, *9, *10, *11, *12, *13, *14, *15	(Seitz et al. 2015)
primäre humane Hepatozyten (Lot# Hu 8117)	Life Technologies, Darmstadt

Tabelle 2.4 – Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Lieferant/Hersteller
50-ml-Zentrifugenröhrchen	Beckman, München
5-ml-Zentrifugenröhrchen	Beckman, München
96-Well Costar [®] UV Platten	Corning, New York, USA
Glas Pasteur Pipetten 230 mm	WU, Mainz
Gewebekulturflaschen 75 cm ²	Sarstedt, Nümbrecht
12-Well-Platten Nunc [™] Zellkultur-Multischalen	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Reagiergefäße 1,5 ml und 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Sterile Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Vorsäule Phenomenex SecurityGuard Standard	Phenomenex, Aschaffenburg
Vorsäule (C18, ODS, 4x2 mm, KJO-4282)	
Hauptsäule Brownlee SPP RP-Amide Säule (4.6x100 mm, 2.7 µm Partikel-Größe)	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA

Tabelle 2.5 – Software

Software	Lieferant/Hersteller
ADMET Predictor Software 4.0	Simulations Plus, Lancaster, CA, USA
Analyst [®] Version 1.4.2	Applied Biosystems, Darmstadt
IBM SPSS Statistics Version 22	SPSS Inc., IBM, Chicago, IL, USA
OpenOffice 3.5	Freeware/LGPL v3, Apache Lizenz Version 2.0
SigmaPlot 12	Systath, Erkrath
XFlour4 Software	Tecan, Crailsheim

Tabelle 2.6 – Verwendete Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Bestandteile	Konzentration/Verhältnis
HBSS ⁺	HBSS	
	HEPES (pH 7,4)	10 mM
Lysislösung	Acetonitril	80%
	H ₂ O	20%
	Sumatriptan-d6	10 ng/ml
RIPA-Puffer	Tris-HCl	50 mM
	NP-40 (Nonoxinol 40)	1%
	Natrium-Desoxycholat	0,25%
	Natrium-Chlorid	150 mM
	EDTA	1 mM
Phosphate-buffered saline	Natrium-Chlorid	8,0 g/l
	Kalium-Chlorid	0,2 g/l
	Dinatriumhydrogenphosphat	1,42 g/l
	Kaliumdihydrogenphosphat	0,27 g/l

Verwendete Abkürzungen: HBSS (Hank's Balanced Salt Solution), HEPES (Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure), RIPA (Radioimmunoprecipitation assay), EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure), PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung)

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Kultivierung der Zellen

Für die Vorbereitung der Versuche wurden HEK293-Zellen in 75-cm²-Gewebekulturflaschen kultiviert. Als Medium wurde Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) verwendet, welches mit 10% Fetal Calf Serum (FCS) und 1% Penicillin/Streptomycin versetzt war. Die Zellen wurden bei einer Temperatur von 37 °C in einer Atmosphäre von 95% Umgebungsluft und 5% CO₂ bei einer Luftfeuchtigkeit von 95% im Inkubator gezüchtet. Zweimal pro Woche wurden die Zellen bei einer Konfluenz von etwa 80% im Verhältnis von 1:6 bis 1:2 gesplittet. Dazu wurden die Zellen nach Entfernung des alten Mediums vom Gewebekulturflaschenboden mit 12 ml Medium abgewaschen. Anschließend wurden je nach gewünschtem Splitverhältnis und geplantes Experiment 2 bis 6 ml der Zellsuspension in neue und mit 15 ml frischem Medium befüllte Zellkulturflaschen überführt.

2.2.1.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Anzahl der Zellen in einer Zellsuspension wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (0,0225 mm² Fläche, 0,1 mm Tiefe) unter einem Mikroskop ermittelt. Dazu wurden 20 µl der in Medium gelösten Zellen mit 20 µl Trypanblau gemischt und von der Seite unter ein auf der Zählkammer liegendes Deckglas pipettiert. Gezählt wurden nur lebendige Zellen, also solche, die das Trypanblau nicht aufgenommen hatten:

$$\begin{aligned} \text{lebende Zellen} &= \text{Mittelwert lebendiger Zellen pro Quadrant} \times 10^4 \times 2 \\ 10^4 &= \text{Umrechnungsfaktor Volumen einer Kammer/Quadrant} \\ 2 &= \text{Verdünnungsfaktor der Zellen} \end{aligned}$$

2.2.1.3 Ausplattieren der Zellen

Um die Zellen für die Experimente vorzubereiten, wurden sie auf 12-Well-Platten (12-Well Nunc™ Zellkultur-Multischalen) ausplattiert. Der Boden der Wells wurde zunächst mit Poly-D-Lysine (1-4 kD) beschichtet, um eine optimale Anheftung der Zellen während des Experiments zu gewährleisten. Dazu wurde jedes Well der 12-Well-Platten mit 0,5 ml einer Poly-D-Lysin-Lösung (200 mg Poly-D-Lysin Hydrobromid in 100 ml sterilem H₂O) befüllt und für 15 Minuten bei 37 °C im Inkubator gelagert. Um die Zellen vom Gewebekulturflaschenboden und dem Zellverbund zu lösen, wurden die Zellen trypsinisiert. Dazu wurde aus den Gewebekulturflaschen das

Medium entfernt und durch 3,5 ml Trypsin ersetzt. Anschließend wurden die Zellen mit der Trypsinlösung für 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Trypsinreaktion wurde durch Hinzufügen von 10 ml Medium gestoppt und die 13,5 ml der so gewonnenen Lösung aus Zellen, Trypsin und Medium in ein 50-ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellzahl dieser Lösung wurde ermittelt und die gewünschte Menge an Zellen in ein weiteres 50-ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Das Zentrifugenröhrchen wurde dann bei 300 g für 3 min unter Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand entfernt. Die Zellen wurden mit 2 ml Medium pro 0,6 Millionen Zellen resuspendiert und jeweils 2 ml dieser Zellsuspension wurden in jedes Well der 12-Well-Platte pipettiert. Die Zellen wurden dann für 2 Tage bei 37 °C, einer Luftfeuchtigkeit von 95% und 5% CO₂ inkubiert und am Folgetag sowie am Tag des Experiments unter einem Mikroskop auf gleichmäßiges, regelhaftes Wachstum hin kontrolliert. Bei einer Konfluenz von 100% am 2. Tag nach dem Ausplattieren wurden die Zellen für die Aufnahmeexperimente verwendet.

2.2.2 Bestimmung der zellulären Aufnahme von Triptanen

2.2.2.1 Transportexperimente mit OCT1-überexprimierenden HEK293-Zellen

Für die Versuche zur Aufnahme von Sumatriptan in die verschiedenen Zelllinien und die Inhibition der Sumatriptanaufnahme durch verschiedene Medikamente wurden die Zellen in 12-Well-Platten kultiviert und je nach Versuch mit verschiedenen Lösungen inkubiert. Für die Inkubation und zum Erstellen der Lösungen wurde mit Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure (HEPES) gepuffertes Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) verwendet (im Folgenden als HBSS⁺ bezeichnet). Alle Experimente wurden bei einem pH-Wert von 7,4 durchgeführt.

Für die Versuche wurden die mit 0,6 Millionen Zellen pro Well ausplattierten 12-Well-Platten nach 2 Tagen Inkubationszeit auf einen 37 °C warmen Objektträger-Streichtisch gestellt. Im Anschluss wurde jedes Well nach Entfernen des Mediums mit 1 ml 37 °C warmem HBSS⁺ gewaschen. Das zum Waschen genutzte HBSS⁺ wurde vor Beginn des Experiments wieder entfernt. Bei den Experimenten waren jeweils zwei Wells (in der Regel das erste und das letzte Well) für die spätere Messung des Proteinanteils der Zellen zur Normalisierung der Ergebnisse reserviert. Die Aufnahmereaktion in den restlichen Wells wurde durch Hinzufügen von 400 µl einer 37 °C warmen Lösung aus HBSS⁺-Puffer und Sumatriptan oder einem anderen Triptan gestartet. Nach 2 Minuten Inkubationszeit wurde die Reaktion durch Hinzufügen von

2 ml eiskaltem HBSS⁺ gestoppt und jedes Well zweimal mit 2 ml eiskaltem HBSS⁺ gewaschen. Im nächsten Schritt wurden die Zellen der Wells, die nicht zur Proteinmessung benötigt wurden, mit Hilfe von 500 µl Lysislösung lysiert. Die Lysislösung diente außerdem zur Denaturierung der Zellproteine. Die so erhaltenen Proben wurden dann für die Bestimmung der Triptanmenge in den Zellen mit Hilfe des HPLC-MS/MS vorbereitet. Die Wells, die für spätere Proteinmessungen reserviert waren, wurden für 2 Minuten mit 400 µl 37 °C warmem HBSS⁺ ohne weitere Substanzen inkubiert und insgesamt dreimal mit 2 ml eiskaltem HBSS⁺ gewaschen.

2.2.2.2 Transportexperiment mit primären humanen Hepatozyten

Für die Versuche zur Aufnahme von Sumatriptan in primäre menschliche Hepatozyten wurden die Zellen in mit Kollagen beschichteten 24-Well-Platten kultiviert und mit steigenden Konzentrationen von Sumatriptan inkubiert.

Die tiefgefrorenen humanen Hepatozyten (Cryopreserved Human Hepatocytes) wurden von der Firma Life Technologies bezogen und entsprechend den Anweisungen des Lieferanten wie im folgenden beschrieben für das Transportexperiment vorbereitet. Die Hepatozyten lagerten bei -180 °C in flüssigem Stickstoff und wurden zunächst aufgetaut, um sie im Anschluss zählen und ausplattieren zu können. Nachdem die Hepatozyten aus dem flüssigen Stickstoff genommen wurden, wurden sie schnellstmöglich in einem 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut. Die Hepatozyten wurden in 47 ml CHRM (Cryopreserved Hepatocyte Recovery Medium) überführt und für 10 Minuten bei 100 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die Zellen in 2 ml CHPM (Cryopreserved Hepatocyte Plating Medium) resuspendiert. Um die Zahl der Hepatozyten in der Suspension zu bestimmen, wurden 20 µl der Zellen mit 20 µl Trypanblau vermischt und in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Die Zellsuspension wurde auf eine Konzentration von $0,2 \times 10^6$ Zellen pro ml Medium (CHPM) verdünnt und 0,5 ml der Suspension vorsichtig in jedes Well pipettiert. Zur Entfernung von Ablagerungen und losen Zellen wurde die Platte nach 4 Stunden geschwenkt und das Medium gewechselt. Die ausplattierten Hepatozyten wurden dann ohne weitere Inkubationszeit für das Transportexperiment verwendet. Auch die Transportexperimente mit den Hepatozyten wurden bei einem pH-Wert von 7,4 durchgeführt. Die so vorbereiteten 24-Well-Platten wurden auf einen 37 °C warmen Objektträger-Strecktisch gestellt und das Medium (CHPM) entfernt. Dann wurden die Zellen jedes Wells mit 1 ml 37 °C warmem HBSS⁺ gewaschen. Das zum Waschen genutzte HBSS⁺ wurde vor Beginn der Inkubation wieder entfernt. Die Wells wurden mit jeweils 200 µl einer 37 °C warmen Lösung mit Sumatriptan oder MPP⁺ inkubiert.

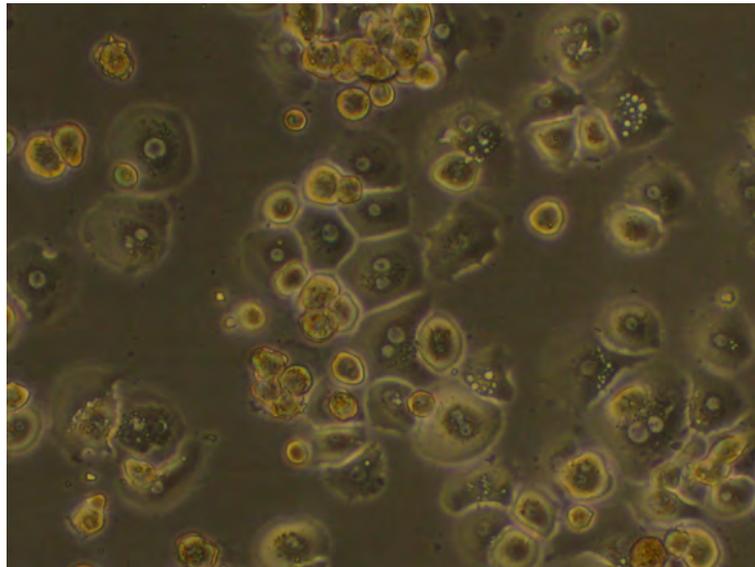


Abbildung 2.1 – Abgebildet sind die ausplattierten primären humanen Hepatozyten vor Beginn des Experiments. Zellen, die nicht optimal anheften konnten, imponieren als heller gefärbte Objekte und erscheinen unscharf.

Die Reaktion wurde nach 2 Minuten durch Hinzufügen von 2 ml eiskaltem HBSS⁺ gestoppt und jedes Well zweimal mit eiskaltem HBSS⁺ gewaschen. Die Konzentration des ³H-MPP⁺ in den Hepatozyten wurde wie unten beschrieben mit Hilfe eines Liquid Scintillation Counter bestimmt. Aus dem Transportversuch der Hepatozyten mit ³H-MPP⁺ wurden auch die Proben für die Proteinmessung der Hepatozyten der Sumatriptan-Aufnahmeexperimente gewonnen.

2.2.2.3 Vorbereitung der Zelllysate für die Messung mittels HPLC-MS/MS

Für die Messungen mit Hilfe des HPLC-MS/MS wurden die Proben aus den Aufnahme-Experimenten weiter aufbereitet. Aus den Wells wurden 400 µl des Lysats in 1,5 ml Reagiergefäße überführt und abzentrifugiert (16,000 g, 10 min). Der so gewonnene Überstand wurde anschließend aufgeteilt. Während 300 µl der Proben für mögliche spätere Messungen in einem 1,5 ml Reagiergefäß bei -20 °C gelagert wurden, wurden 50 µl des Überstandes in einem weiteren Reagiergefäß im Verhältnis von 1:10 mit 450 µl 0,1% Ameisensäure verdünnt. Von der Lösung wurden anschließend 100 µl in die Probengläschen des HPLC-MS/MS Systems überführt. Waren sehr geringe Konzentrationen von Sumatriptan oder den anderen Triptanen in den Zellen zu erwarten, wurden die Proben verdampft und so aufkonzentriert. Insbesondere bei den Inhibitionsexperimenten und den Transportexperimenten mit primären humanen

Hepatozyten war das erforderlich. Die Proben wurden dafür in Reagenzgläser überführt und für mindestens 40 Minuten in einem Heizblock bei 35-40 °C mit Stickstoff bedampft. Nach dem Bedampfen wurden die Ablagerungen aus jedem Reagenzglas in 200 µl 0,1% Ameisensäure gelöst. Die daraus gewonnenen Lösungen wurden in die entsprechenden Messröhrchen für das HPLC-MS/MS-System überführt und anschließend wie die anderen Proben gemessen.

2.2.3 Inhibition der OCT1-vermittelten Aufnahme von MPP⁺

Um die Inhibition der OCT1-vermittelten Aufnahme von ³H-markiertem 1-Methyl-4-Phenylpyridinium (³H-MPP⁺) zu messen, wurden zunächst 12-Well-Platten wie oben beschrieben (siehe Kapitel 2.2.1.3) für die Versuche vorbereitet. Für die Versuche wurden die vorbereiteten 12-Well-Platten auf einen 37 °C warmen Objektträger-Streichtisch gestellt. Die Zellen jedes Wells wurden nach Entfernen des Mediums mit 1 ml 37 °C warmem HBSS⁺ gewaschen. Das zum Waschen genutzte HBSS⁺ wurde vor Beginn der Inkubation wieder entfernt. Die Experimente wurden bei einem pH-Wert von 7,4 durchgeführt. Der Versuch wurde durch Hinzufügen von 400 µl einer Lösung aus HBSS⁺, das ³H-MPP⁺ in einer Konzentration von 5 nM und jeweils eine der zu untersuchenden Inhibitorsubstanzen in einer Konzentration zwischen 5 µM und 1000 µM enthielt, gestartet. Nach 2 Minuten wurde der Versuch durch Hinzufügen von 2 ml eiskaltem HBSS⁺ gestoppt und die Lösung in den Wells wieder entfernt. Danach wurde jedes Well zweimal mit eiskaltem HBSS⁺ gewaschen.

Die Zellen in den Wells wurden mit 500 µl einer 0,1 M NaOH-Lösung, welche mit 0,1% SDS versetzt war, lysiert. Es wurden 400 µl des Lysats in 9 ml Aquasafe 500+ Liquid Scintillator (Zinsser Analytics, Frankfurt am Main, Deutschland) gegeben und die Menge des intrazellulär aufgenommenen ³H-MPP⁺ mit Hilfe eines Liquid Scintillation Counter quantifiziert. Dieses Ergebnis wurde mit der Proteinmenge in den Wells normalisiert.

Auf Grund des Verfahrens zur Lysierung der Zellen konnte die Lösung der lysierten Zellen jedes Wells auch direkt für die Proteinmessungen verwendet werden.

2.2.4 Proteinmessungen

Der Proteinanteil in den Zellen wurde mit Hilfe des Bicinchoninsäure-Assays (BCA-Assay) bestimmt (Smith et al. 1985). Bei dieser Methode reagieren zweiwertige Kupferionen mit den Proteinen der Zellen zu einwertigen Kupferionen. Dabei ist die Menge

der so entstehenden einwertigen Kupferionen proportional zur absoluten Proteinmenge in den Zellen. Durch Hinzugeben von Bicinchoninsäure (BCA) bilden je zwei Moleküle der Bicinchoninsäure einen Chelatkomplex mit je einem einwertigen Kupferion. Die so gebildeten Chelatkomplexe führen zu einer violetten Färbung der Lösung. Die Absorption des violetten Farbstoffes kann bei einer Wellenlänge von 562 nm mit Hilfe eines Photometers bestimmt werden und ist direkt proportional zur Proteinmenge in den Zellen.

Nach der Lyse der Zellen entweder durch RIPA-Puffer oder durch 0,1 M NaOH mit 0,1% SDS wurden aus jedem Well, das zur Proteinmessung reserviert war, jeweils dreimal 10 μ l des Lysats auf eine 96-Well-Platte überführt. Wenn ein Versuch mit mehreren Zelllinien und 12-Well-Platten zur selben Zeit absolviert wurde, wurde dieser Schritt für jede Platte durchgeführt, sodass auf der 96-Well-Platte die Proteinmenge für das gesamte Experiment gleichzeitig bestimmt werden konnte. Auf die Platte wurden außerdem zwei Verdünnungsreihen mit Konzentrationen von jeweils 1 μ l, 3 μ l, 5 μ l und 10 μ l Bovine Serum Albumin (BSA, 1 mg/ml) pipettiert. Die bekannte Menge an Protein diente als externer Standard, um eine Kalibratorfunktion zu bilden und die absolute Proteinmenge zu berechnen. In die nun mit 10 μ l Lysat gefüllten Wells der 96-Well-Platte und die Reihen mit BSA wurden je 200 μ l (BCA + Kupfersulfat, im Verhältnis 50:1) pipettiert, um die BCA-Reaktion einzuleiten. Die Platte wurde dann für 25 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Messung der Absorption erfolgte mit Hilfe des Photometers TECAN Ultra Microplate Reader bei 570 nm (562 nm wie in der Literatur angegeben waren mit dem Photometer auf Grund technischer Einschränkungen nicht möglich). Aus den drei Messwerten jeder Proteinprobe wurde ein Mittelwert gebildet, die Ergebnisse der Messung des Photometers wurden in Form einer Exceltabelle ausgegeben.

Die Auswertungen der Proteinmessungen erfolgten mit Hilfe von OpenOffice Calc (Version 3.5). Zunächst wurde die Absorption einer Reihe von leer gebliebenen Wells der 96-Well-Platte gemittelt und von jedem Wert der zu messenden Wells subtrahiert, um die Absorptionswerte bereinigt von der Absorption der Platte zu erhalten. Aus den zwei Standardreihen wurde ebenfalls für jede Konzentration ein Mittelwert gebildet und daraus eine lineare Kalibratorfunktion erstellt. Die Absorption bei 570 nm bildete dabei die Ordinate, auf der Abszisse wurde die Proteinmenge in μ g aufgetragen. Das Quadrat des Korrelationskoeffizienten r wurde berechnet und das Bestimmtheitsmaß R^2 ausgegeben. Die Kalibratorfunktion musste ein Bestimmtheitsmaß R^2 von $\geq 95\%$ haben, um für die Auswertung verwendet zu werden. Der Mittelwert aus den drei Absorptionsmessungen jeder Proteinprobe wurde durch das

Produkt aus der Steigung der Graden und dem Volumen, welches zur Proteinmessung verwendet wurde (10 μl), dividiert. Das Ergebnis dieser Rechnung war die Proteinmenge in μg pro μl Lösung. Der Mittelwert der drei Ergebnisse pro Well wurde nun mit 500 μl multipliziert, um die Menge an Protein in μg pro einem Well der 12-Well-Platte zu berechnen. Die Ergebnisse wurden in mg umgerechnet, aus den zwei Wells pro 12-Well-Platte ein Mittelwert gebildet und so eine durchschnittliche Proteinmenge pro Well der Platte kalkuliert. Dieser wurde dann für die Berechnung der in die Zellen aufgenommenen Triptan- oder MPP⁺-Menge verwendet.

2.2.5 Bestimmung der Triptankonzentration mittels HPLC-MS/MS

Der Nachweis und die Quantifizierung von Substanzen mit Hilfe eines an eine HPLC-Anlage (High-Performance Liquid Chromatography) gekoppelten Tandem-Massenspektrometers ist eine gut etablierte, sensitive und häufig angewandte Methode in der Pharmakologie und Toxikologie. Die HPLC dient dabei zur chromatografischen Auftrennung eines Probengemisches. Das nachgeschaltete Massenspektrometer detektiert und quantifiziert anschließend die Substanzen aus der Probe.

2.2.5.1 High-Performance Liquid Chromatography

Eine Chromatografie dient dazu, ein Stoffgemisch in seine Einzelbestandteile aufzutrennen. Das wird mit Hilfe einer mobilen Phase und einer stationären Phase realisiert. Die Substanzen einer Probe befinden sich in der mobilen Phase, die dem Transport der zu untersuchenden Substanzen über die stationäre Phase dient. Die mobile Phase tritt dann mit der stationären Phase in Wechselwirkungen und je nach Eigenschaften werden Substanzen in der mobilen Phase unterschiedlich stark von der stationären Phase zurückgehalten. Je stärker die Wechselwirkungen einer Substanz mit der stationären Phase sind, desto länger benötigt sie für den Weg durch die stationäre Phase. Enthält eine Probe mehrere unterschiedliche Substanzen, treten diese Substanzen je nach Eigenschaften unterschiedlich stark mit der stationären Phase in Wechselwirkung. Mit Hilfe eines geeigneten Detektors können die daraus resultierenden Zeitunterschiede beim Passieren der Säule zwischen den Substanzen registriert werden.

Die Technik der High-Performance Liquid Chromatography ist ein chromatografisches Trennverfahren, das einen hohen Probendurchsatz bei gleichbleibender analytischer Qualität ermöglicht. Eine HPLC-Anlage lässt sich in verschiedene funktionelle

Abschnitte unterteilen. Das Fließmittel der mobilen Phase (der Eluent) wird zunächst von Pumpen aus einem oder mehreren Eluentengefäßen über einen Entgaser durch eine Vorsäule geleitet. Ein Entgaser soll Luftblasen im System verhindern, um den Druck und das transportierte Volumen im System möglichst konstant zu halten. Die Zusammensetzung des Fließmittels kann während einer Messung durch Variation des Zustroms aus den einzelnen Eluentengefäßen variiert werden. Die Vorsäule wird vor die Hauptsäule geschaltet, um Verunreinigungen von der Hauptsäule fernzuhalten. Die zu untersuchende Probe wird vor der Vorsäule automatisiert zur mobilen Phase hinzugegeben. Es muss ein exakt definiertes Volumen ohne Unterbrechung des Eluentenstroms unter hohem Druck eingebracht werden, was in der Regel durch Mehrkammerventile realisiert wird. In der Hauptsäule findet die physikalisch-chemische Trennung der zu untersuchenden Substanzen zwischen mobiler und stationärer Phase statt. Die stationäre Phase hat bei HPLC-Anlagen häufig die Form eines Rohres (die Säule), das mit einem speziellen Füllmaterial gepackt ist. Je nachdem welche Substanzen man untersuchen möchte, kann das Füllmaterial der Säule variieren und so der stationären Phase unterschiedliche chemische Eigenschaften geben. Säulen können außerdem nach ihrem hauptsächlichen Trennmechanismus unterteilt werden. Die gebräuchlichsten Phasen sind Normalphasen, Umkehrphasen und polare gebundene Phasen. In Umkehrphasensäulen sind unpolare Seitenketten an ein Kieselgel oder Polymer gebunden, was der stationären Phase hydrophobe Eigenschaften verleiht. Der Vorteil gegenüber Normalphasensäulen liegt in der universellen Anwendbarkeit für polare und unpolare Substanzen. Für die Auftrennung der Substanzen und die Wechselwirkungen der Substanz in der Umkehrphasensäule sind vor allem Van-der-Waals-Kräfte verantwortlich. Polare Stoffe treten mit einer Umkehrphase nur schwach in Wechselwirkung und verbringen daher weniger Zeit in der stationären Phase als unpolare Substanzen. Durch Variation des organischen Anteils in der mobilen Phase kann diese Zeit beeinflusst werden. Um bei jedem Durchgang vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, müssen die Bedingungen bei verschiedenen Durchläufen möglichst identisch sein. Daher sollte die Temperatur der Säule, die Zusammensetzung des Fließmittels und das von den Pumpen geförderte Volumen konstant gehalten werden (Snyder et al. 2009).

2.2.5.2 Tandem-Massenspektrometrie

In einem Massenspektrometer wird eine Probe zunächst ionisiert, dann anhand ihrer Masse zu Ladungsverhältnisse selektiert und am Ende von einem Detektor registriert (Abbildung 2.2). Zunächst muss die Probe über ein geeignetes Einlasssystem

in das Massenspektrometer eingebracht und dort ionisiert werden. Dabei darf das im Massenspektrometer herrschende Hochvakuum nicht beeinträchtigt werden. Das Hochvakuum ist erforderlich, um Wechselwirkungen oder einer Beeinflussungen der Flugbahn der Ionen durch Umgebungsluft vorzubeugen. Die Proben aus einer HPLC-Anlage sind noch in ihrem Eluenten gelöst, somit werden jedesmal große Volumina in das System eingeleitet. Um die Proben verarbeiten zu können, muss daher der Eluent entfernt werden, ohne die Probe selbst zu beschädigen oder chemisch zu verändern. Für die Messungen in dieser Arbeit wurde der Eluent mit Hilfe des Elektronensprayverfahrens verdampft und die Probe zeitgleich ionisiert.

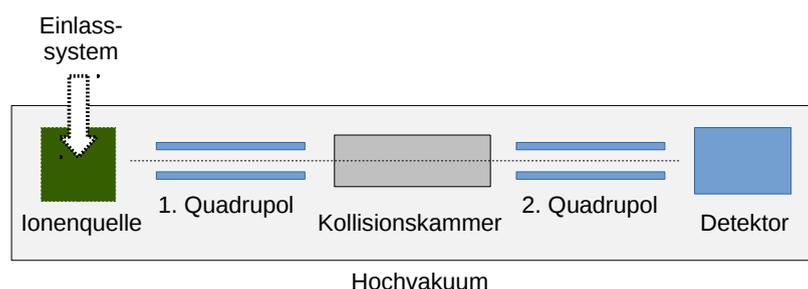


Abbildung 2.2 – Schemazeichnung des Tandem-Massenspektrometers

Die von der Ionenquelle ionisierten Probenmoleküle werden anschließend im Massenanalysator nach ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis getrennt. Das verwendete API4000 Massenspektrometer nutzt dazu zwei identische Massenfilterquadrupole, die durch eine Kollisionskammer voneinander getrennt sind. Ein Quadrupol besteht aus vier zylindrisch oder hyperbolisch geformten Stäben, die in den Ecken eines gedachten Quadrates parallel zueinander verlaufen. Durch den zwischen den Stäben befindlichen Raum werden die Ionen geleitet. Den jeweils diagonal gegenüberliegenden Stäben liegt eine Gleichspannung an, die von einer hochfrequenten Wechselspannung überlagert wird. Durch Variation des elektrischen Feldes im Quadrupol erfolgt die Ablenkung der Ionen auf stabile oder instabile Flugbahnen durch das Quadrupol. So kann das Quadrupol nur von Ionen mit dem gewünschten Masse-zu-Ladungsverhältnis passiert werden. Will man Ionen mit unterschiedlichem Masse/Ladungsverhältnissen untersuchen, können sie durch Variation der Gleich- und Wechselstrompotenziale nacheinander auf stabile Flugbahnen gebracht werden. Da so bestimmte Massen gefiltert werden, spricht man in diesem Zusammenhang auch von einem Massenfilterquadrupol.

Die Kollisionskammer wird in der Regel ebenfalls durch ein Quadrupol gebildet. Im Gegensatz zu dem davor und dahinter liegenden Quadrupol wird hier aber die Gleichstromspannung in den gegenüberliegenden Stäben des Quadrupols auf Null gesetzt (RF-Quadrupol). Dadurch passieren die Ionen die Kammer ohne in ihrer Flugbahn abgelenkt zu werden. In der Kollisionskammer trifft der vom ersten Massenfilterquadrupol kommende Ionenstrahl auf ein inertes Gas wie beispielsweise Stickstoff und es kommt zu einer stoßinduzierten Dissoziation *collision-induced dissociation* (CID) der zu untersuchenden Moleküle. Eine in der Nähe befindliche Vakuumpumpe saugt das Gas wieder ab, um weiterhin das Hochvakuum innerhalb des Systems zu gewährleisten. Die so fragmentierten Ionen verlassen die Kollisionskammer anschließend durch eine Austrittsspalte und gelangen dann in das zweite Massenfilterquadrupol. Dort werden die Fragmente wieder nach ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis aufgetrennt. Die zwei hintereinandergeschalteten Massenfilterquadrupole können für verschiedene Analysemethoden verwendet werden, je nach Fragestellung können das Ausgangsmolekül selbst oder auch die Fragmente untersucht werden.

Am Ende des Massenspektrometers werden die Ionen von einem Detektor registriert. Im API4000 Massenspektrometer ist dieser Detektor ein Kanalelektronenvervielfacher (Channeltron). Das Prinzip ähnelt dabei dem eines Sekundärelektronenvervielfachers (SEV). Trifft ein energiereiches Partikel wie beispielsweise ein Ion auf eine Metalloberfläche, kann es von dieser Oberfläche Sekundärelektronen losschlagen. Durch den speziellen Aufbau von SEV und Channeltrons treffen diese Sekundärelektronen wieder auf eine Metalloberfläche und können dort weitere Elektronen freisetzen. Es wird eine lawinenartige Reaktion ausgelöst, die das Ausgangssignal um ein Vielfaches verstärken kann. Die Vorteile eines Channeltrons gegenüber einem klassischen Sekundärelektronenvervielfacher liegen in der kompakteren Bauweise und der preiswerteren Herstellung. Am Ende erhält man ein messbares Potential, welches mit Hilfe einer Computersoftware ausgewertet werden kann (Abbildung 2.3). Die Summe der registrierten Ionen, aufgetragen gegen die Zeit, bildet eine Kurve, deren Integral die Gesamtmenge des Analyten in der untersuchten Probe repräsentiert. Durch Vergleich mit Chromatogrammen einer bekannten Menge des Analyten kann die Konzentration in der Probe berechnet werden (Gross 2013).

2.2.5.3 Durchführung der Messungen und Auswertung der Ergebnisse

Für die Messungen der Proben mit Sumatriptan wurde eine wässrige Lösung aus 0,1% Ameisensäure, 6,67% Acetonitril und 1,33% Methanol als Eluent verwendet. Als interner Standard wurde sowohl für die Versuche mit Sumatriptan als auch

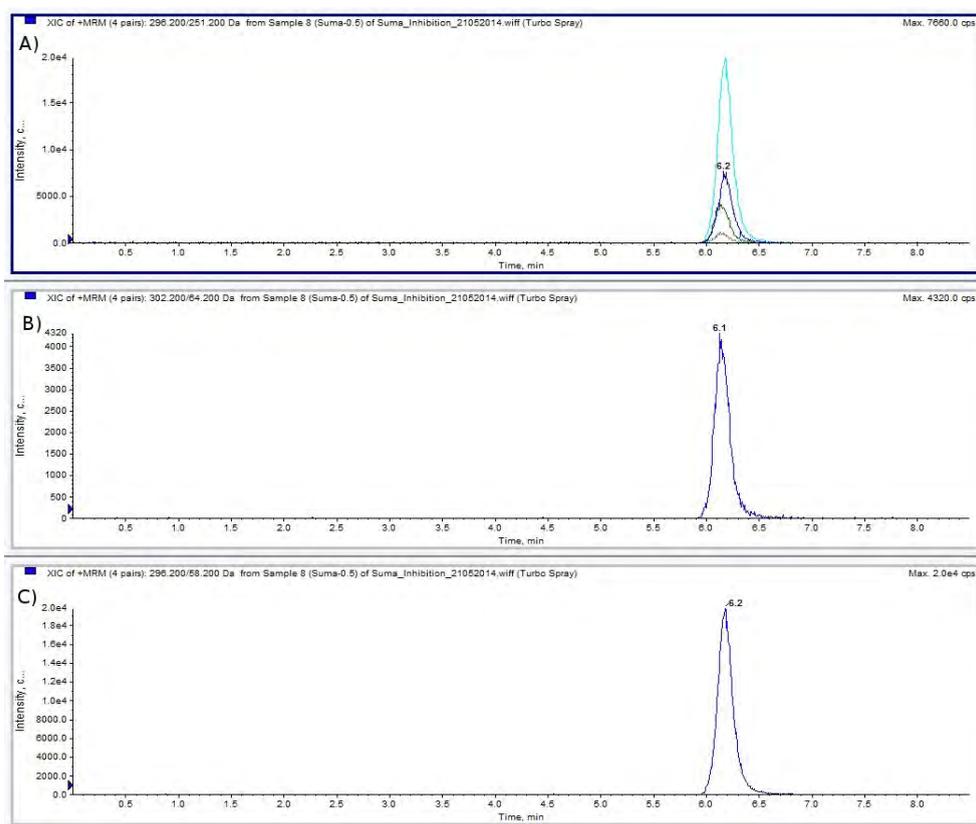


Abbildung 2.3 – Dargestellt ist ein Chromatogramm der Analyse einer Kalibratorkonzentration (0,5 μM)

- A) Parallel übereinander dargestellt sind die Chromatogramme aller untersuchten Masse-zu-Ladungsverhältnisse von Sumatriptan und Sumatriptan-d6 für eine Probe.
 B) Dargestellt ist das Chromatogramm für Sumatriptan-d6 (10 ng/ml) bei $m/z = 302,2 > 64,2$
 C) Dargestellt ist das Chromatogramm für Sumatriptan (0,5 μM) bei $m/z = 296,2 > 58,2$

für die anderen untersuchten Triptane 6-fach deuteriertes Sumatriptan (Sumatriptan-d6) eingesetzt. Die Retentionszeit von Sumatriptan und Sumatriptan-d6 lag unter diesen Bedingungen bei 6,3 Minuten. Sumatriptan wurde bei einem Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) von $296,2 > 58,2$ (DP von 50 V, CE von 30) untersucht, für den internen Standard Sumatriptan-d6 lag das Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) bei $302,2 > 64,2$ (DP von 70 V, CE von 30). Für die restlichen Triptane wurden folgende Masse-zu-Ladungsverhältnisse untersucht: Eletriptan ($383,2 > 84,3$), Naratriptan ($336 > 70$), Rizatriptan ($270 > 58$), Zolmitriptan ($288 > 58$). Der organische Anteil in der mobilen Phase für Eletriptan wurde auf 16,7% Acetonitril und 3,33% Methanol erhöht, für die Triptane Naratriptan, Rizatriptan und Zolmitriptan wurde der organische Anteil der mobilen Phase auf 9,58% Acetonitril und 1,92% Methanol festgelegt. Als Kalibrator (externer Standard) wurde eine in destilliertem Wasser gelöste Verdünnungsreihe Sumatriptan genutzt (0,01 μM , 0,02 μM , 0,05 μM , 0,1 μM , 0,2 μM ,

0,5 μM , 1 μM , 2 μM , 5 μM). Wie auch in den Zellysaten war hier der interne Standard in einer Konzentration von 10 ng/ml enthalten und die Lösungen wurden im Verhältnis von 1:10 mit 0,1% Ameisensäure verdünnt.

Die Proben und die externen Standardlösungen wurden im Autosampler auf eine Temperatur von 10 °C heruntergekühlt. Die Säulen der HPLC-Anlage wurden auf eine Temperatur von 40 °C erhitzt. Die mobile Phase wurde mit einem Fluss von 300 $\mu\text{l}/\text{min}$ durch die Säulen geleitet. Über den Autosampler wurden jeweils 10 μl der Proben in die Anlage injiziert. Die Steuerung der HPLC-Anlage und des Massenspektrometers sowie die Auswertung der Chromatogramme wurde mit Hilfe der Computersoftware Analyst[®] (Version 1.4.2) durchgeführt. Vor jedem Probensatz wurde eine Verdünnungsreihe des untersuchten Triptans im HPLC-MS/MS gemessen. Aus den Chromatogrammen dieser externen Standardlösungen wurde dann eine lineare Kalibrierfunktion generiert, mit deren Hilfe die Konzentrationen des Triptans in den Proben durch die Software errechnet wurde (Abbildung 2.4). Die Kalibratorfunktion musste ein Bestimmtheitsmaß R^2 von $\geq 95\%$ erreichen, um für die Auswertung verwendet zu werden. Die Integrale der durch die Analyten erzeugten Chromatogramme wurden automatisiert berechnet. Diese Berechnungen wurden durch die Software auch visualisiert ausgegeben und gegebenenfalls manuell korrigiert. Die Software normierte den Anteil der in jeder Probe gemessenen Analytenkonzentration mit Hilfe des internen Standards und errechnete mit Hilfe des Kalibrators eine „Calculated Concentration“ (μM), abhängig von der Größe des Integrals für jede Probe.

Die von der Software Analyst[®] errechnete Konzentration in den Proben wurde anhand der Proteinmenge und Inkubationszeit nach folgender Formel in pmol/mg Protein/min umgerechnet:

$$\text{pmol/mg Protein/min} = \frac{\text{Calc.Conc.} * \text{Inject.Vol.} * \text{Well}}{\text{Proteinmenge} * \text{Inkubationszeit}}$$

- *Calc.Conc.* ist die Konzentration in der Probe in μM
- *Inject.Vol.* ist die in die HPLC-MS/MS-Anlage injizierte Menge der Probe (10 μl)
- *Well* ist die Hochrechnung der injizierten Menge auf das Volumen eines Wells (insgesamt 500 μl , in der Formel Faktor 50)
- *Proteinmenge* ist die gemittelte Proteinmenge pro Well in mg
- *Inkubationszeit* ist die Inkubationszeit der Versuche (2 Minuten)

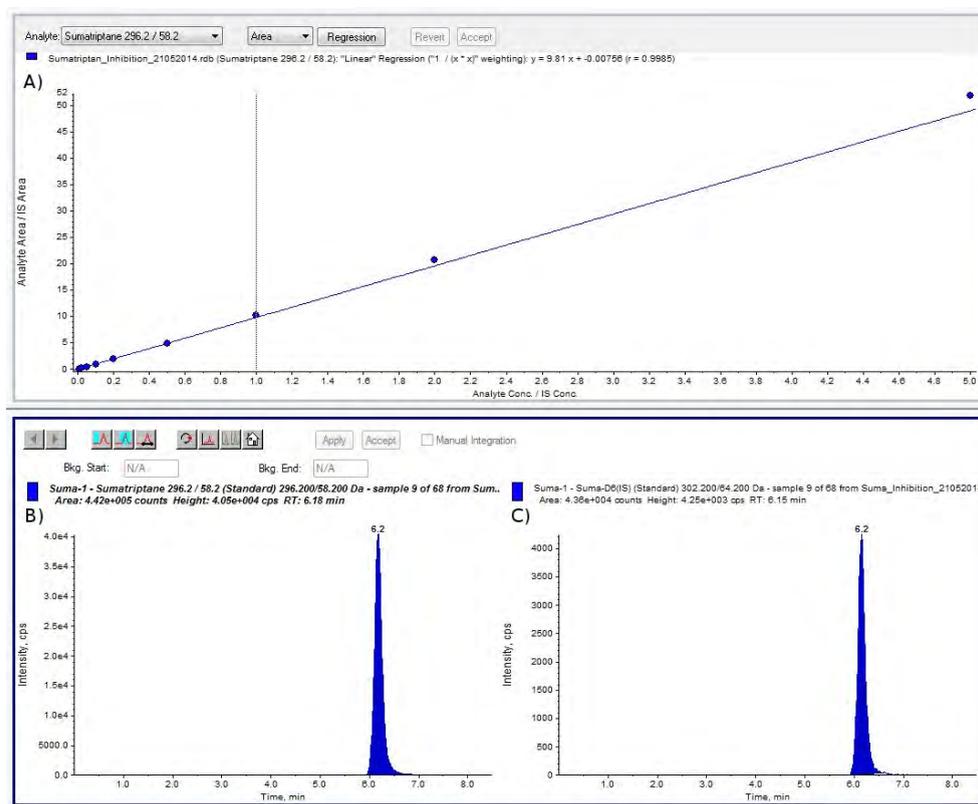


Abbildung 2.4 – Dargestellt ist eine Kalibratorfunktion für Sumatriptan mit Sumatriptan-d6 als internem Standard

A) Übersicht über die gemessenen Kalibratorkonzentrationen. Auf der Abszisse ist das Verhältnis des Analyten-Integrals zum Integral des internen Standards aufgetragen, auf der Ordinate der Quotient aus der Konzentration des Analyten und der Konzentration des internen Standards.

B) Dargestellt ist ein Integral für Sumatriptan (1 μ M) bei $m/z = 296,2 > 58,2$

C) Dargestellt ist ein Integral für Sumatriptan-d6 (10 ng/ml) bei $m/z = 302,2 > 64,2$ des Kalibrators 1 μ M Sumatriptan

2.2.6 Parallel Artificial Membrane Permeability Assay

Das Parallel Artificial Membrane Permeability Assay (PAMPA) ist ein Modell, um die passive Diffusion einer Substanz durch Zellmembranen abzuschätzen (Abbildung 2.5). Das Assay wurde mit 96-Well-Platten nach den Anweisungen des Herstellers (DB Biosciences) durchgeführt. Dazu wurden je 300 μ l phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) mit einem pH-Wert von 7,4 und steigenden Konzentrationen der verschiedenen Triptane in die Spender-Wellen pipettiert. Die Empfänger-Wellen wurden nur mit 200 μ l PBS befüllt. Die Empfängerplatte wurde auf die Spenderplatte gelegt und beide zusammen für 300 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In jedem der Spender- und Empfänger-Wellen sowie in den Ausgangslösungen wurde anschließend die Konzentration der untersuchten Triptane mittels HPLC-MS/MS gemessen. Für jedes Triptan

wurden drei Konzentrationen analysiert (125 μM , 250 μM , 500 μM) und die Membranpermeabilität P_e aus den Mittelwerten aller gemessenen Konzentrationen mit Hilfe folgender Formel berechnet:

$$P_e = \frac{-\ln(1 - C_A / (1 - (0.3 \times C_D + 0.2 \times C_A) / 0.3 \times C_0))}{(A \times (1/V_D + 1/V_A) \times t)}$$

- C_0 ist die Ausgangskonzentration des Spender-Wells
- C_D und C_A sind die Endkonzentrationen im Spender- und Empfänger-Well
- A ist die Fläche jedes Wells ($0,3 \text{ cm}^2$)
- V_D und V_A sind die Volumina in Spender- und Empfänger-Well (V_D 0,3 ml, V_A 0,2 ml)
- t ist die Inkubationszeit in Sekunden (18 000 Sekunden = 5 Stunden)

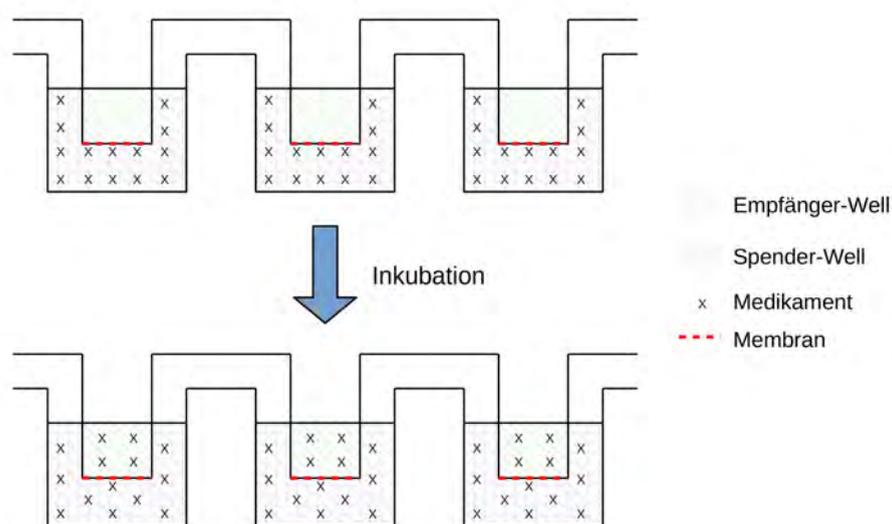


Abbildung 2.5 – Schemazeichnung des Parallel Artificial Membrane Permeability Assay.

2.2.7 Berechnung grundlegender Enzymkinetikparameter

Die Berechnung der Michaeliskonstante K_M zur Angabe der Substrataffinität einer Substanz zu einem Enzym oder einem Transporter und der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit v_{max} erfolgten durch eine nicht-lineare Regression nach Michaelis-Menten. Die Berechnungen wurden mit SigmaPlot™ (Version 12.0) und OpenOffice (Version 3.5) durchgeführt.

$$v_0 = \frac{v_{max} \times [S]}{K_M + [S]}$$

- v_{max} ist die maximale Reaktionsgeschwindigkeit
- S ist die Substratkonzentration in mol/l
- K_M ist die Michaeliskonstante in mol/l

Die halbmaximalen Inhibitionskurven wurden mit Hilfe von SigmaPlot und der folgenden Gleichung erstellt:

$$Y(C) = Y_{min} + \frac{Y_{max} - Y_{min}}{1 + (C/IC_{50})^{-H}}$$

- $Y(C)$ beschreibt die Aufnahme des Substrats (in diesem Fall MPP^+) in die Zellen abhängig von der Konzentration C des Inhibitors
- Y_{min} und Y_{max} sind die minimale und maximale Substrat-Aufnahme in die Zellen
- $-H$ (*hill slope*) beschreibt die Steigung der Funktionskurve

Für die Berechnung der maximalen Plasmakonzentration des nicht an Proteine gebundenen Anteils eines Medikaments wurde C_{max} mit der Menge der ungebundenen Fraktion f_u multipliziert. Zur Berechnung der maximalen ungebundenen Plasmakonzentration der Medikamente in der Pfortader der Leber ($C_{max \text{ Port. Unb.}}$) wurde die folgende Formel nach (Ahlin et al. 2011, Ito et al. 1998) verwendet:

$$C_{max \text{ Port. Unb.}} = f_u \times \left(C_{Max} + \frac{k_a \times D \times F_a}{Q_h} \right)$$

- f_u ist die Fraktion im Plasma, die nicht an Proteine gebunden ist
- C_{max} ist die maximale Plasmakonzentration
- k_a ist die Absorptionsrate (hier $0,1 \text{ min}^{-1}$)

- D ist die Dosis in nmol
- F_a ist der Anteil des Medikaments, welcher vom Magen-Darm-Trakt in die Pfortader der Leber gelangt (hier 0,99)
- Q_h ist der Blutfluss durch die Leber (festgelegt auf 1610 ml/min)

2.2.8 EDV-gestützte Berechnungen

2.2.8.1 ADMET-Predictor™

ADMET ist die englische Abkürzung für „Absorption, Distribution, Metabolism, Elimination and Toxicity“. ADMET Predictor™ ist eine Computersoftware, um Vorhersagen über die chemischen und pharmakologischen Eigenschaften einer Substanz im Körper zu treffen. Die Software wurde dazu verwendet, um die $\log D_{7,4}$ und $\log P$ -Werte für die Triptane abzuschätzen und pK_s -Werte zu berechnen.

2.2.8.2 Statistische Analysen

Die statistischen Analysen wurden mit Hilfe der Software IBM SPSS Statistics™ Version 22 durchgeführt. Bei einem Vergleich von zwei Mittelwerten wurde der Zweistichproben-Test „Student’s t-test“ genutzt. Bei einem Vergleich von drei oder mehr Messergebnissen (z.B. aus Versuchen mit OCT1-Allelen oder Triptan-Aufnahmeexperimenten) wurde eine Varianzanalyse (analysis of variance, ANOVA) gekoppelt mit einem Tukey’s Post-hoc-Test durchgeführt. Ab einem p -Wert $p < 0,05$ galten Unterschiede zwischen den Messergebnissen als statistisch signifikant.

Kapitel 3

Ergebnisse

3.1 Aufnahme von Sumatriptan in OCT1-überexprimierende Zellen

Zunächst wurde untersucht, ob Sumatriptan ein Substrat des OCT1 ist, um anschließend den Transport von Sumatriptan durch den OCT1 zu charakterisieren. Dazu wurde die Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der Aufnahme von Sumatriptan in OCT1-überexprimierende HEK293-Zellen analysiert. Für die Untersuchung der Zeitabhängigkeit des Transports wurden die Zellen mit einer konstanten Konzentration (1 μM) über einen Zeitraum von einer bis 20 Minuten inkubiert. Die Konzentrationsabhängigkeit des Transports wurde untersucht, indem Zellen für 2 Minuten mit steigenden Konzentrationen (0,5; 1; 5; 20; 40; 60; 80; 100; 200; 400 μM) von Sumatriptan inkubiert wurden. Um die vom OCT1 unabhängige Aufnahme von Sumatriptan in Zellen zu messen, wurden HEK293-Kontrollzellen eingesetzt, die mit dem leeren Vektor pcDNA5 transfiziert waren. Es war eine starke Aufnahme von Sumatriptan in die OCT1-überexprimierenden Zellen zu beobachten (Abbildung 3.1).

Bei der Betrachtung des Transports von Sumatriptan in die Zellen in Abhängigkeit von der Zeit konnte ein großer Unterschied zwischen den beiden Zelllinien gezeigt werden. Bereits nach fünf Minuten war die Sumatriptankonzentration in den OCT1-überexprimierenden Zellen um den Faktor 11,5 höher als in den Kontrollzellen ($2,8 \pm 0,9$ pmol/mg Protein in den Kontrollzellen gegenüber $32,2 \pm 6,2$ pmol/mg Protein in den OCT1-überexprimierenden Zellen). In den Kontrollzellen war nach 10 Minuten keine weitere Aufnahme von Sumatriptan zu beobachten. In den OCT1-überexprimierenden Zellen stieg die Konzentration hingegen bis 20 Minuten nach Start des Experiments. Zu diesem Zeitpunkt wurde mit $110,1 \pm 12,6$ pmol/mg Protein die

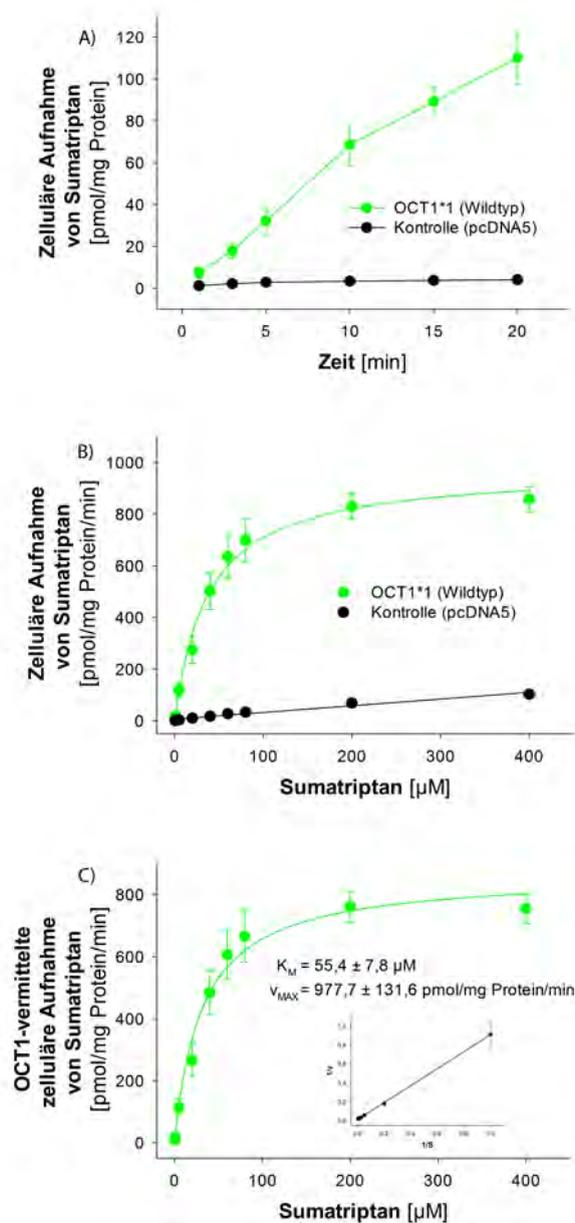


Abbildung 3.1 – Charakterisierung der Aufnahme von Sumatriptan in OCT1-überexprimierende HEK293-Zellen

A) Zeitabhängigkeit der zellulären Aufnahme von Sumatriptan durch OCT1. OCT1-überexprimierende HEK293-Zellen (grün) wurden im Vergleich mit Kontrollzellen (schwarz), welche mit dem leeren Vektor pcDNA5 transfiziert sind, analysiert. Beide Zelllinien wurden zwischen einer und 20 Minuten mit $1 \mu\text{M}$ Sumatriptan inkubiert.

B) Konzentrationsabhängigkeit der zellulären Aufnahme von Sumatriptan durch OCT1. Die Zelllinien wurden für jeweils 2 Minuten mit steigenden Konzentrationen von Sumatriptan inkubiert.

C) Konzentrationsabhängigkeit des OCT1-vermittelten Anteils der zellulären Aufnahme von Sumatriptan. Der OCT1-vermittelte Anteil wurde durch Subtrahieren der Aufnahme von Sumatriptan in die Kontrollzellen (pcDNA5) von der Aufnahme des Sumatriptans in die OCT1-überexprimierenden Zellen ermittelt. Die maximale Transportrate (v_{max}) und die Michaelis-Menten-Konstante (K_M) wurden berechnet.

Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardfehler von mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

höchste Konzentration in den Zellen gemessen. Nach der Inkubation der OCT1-überexprimierenden Zellen und der Kontrollzellen mit steigenden Konzentrationen von Sumatriptan konnte ebenfalls ein deutlicher Unterschied in der Aufnahme von Sumatriptan zwischen den beiden Zelllinien nachgewiesen werden. In den Kontrollzellen wurde ein linearer Anstieg des intrazellulären Sumatriptans mit der typischen Charakteristik einer diffusionsvermittelten Aufnahme gemessen. Die Aufnahme von Sumatriptan in die OCT1-überexprimierenden Zellen zeigte hingegen den Verlauf eines starken, sättigbaren Transports.

Beide Versuche bestätigten die Annahme, dass Sumatriptan ein Substrat des OCT1 ist. Um die Transportleistung des OCT1 im Bezug auf Sumatriptan zu ermitteln, wurde die konzentrationsabhängige Aufnahme in die Kontrollzellen von der konzentrationsabhängigen Aufnahme in die OCT1-überexprimierende Zellen subtrahiert. Die durch den OCT1 vermittelte Aufnahme folgte mit einem K_M -Wert von $55,4 \pm 7,89 \mu\text{M}$ und einer maximalen Transportrate v_{max} von $977,7 \pm 131,6 \text{ pmol/mg Protein/min}$ der typischen Michaelis-Menten-Kinetik.

3.2 Aufnahme von Sumatriptan in primäre humane Hepatozyten

Um die Bedeutung von organischen Kationentransportern bei der Aufnahme von Sumatriptan in Hepatozyten zu untersuchen, wurden primäre humane Hepatozyten mit Sumatriptan inkubiert und untersucht, ob sich die Aufnahme von Sumatriptan in die Zellen mit dem OCT1-Modellsubstrat und -inhibitor MPP^+ beeinflussen lässt. Betrachtet wurden drei Konzentrationen von $0,1 \mu\text{M}$, $1 \mu\text{M}$, $9 \mu\text{M}$ Sumatriptan. Die Experimente wurden mit und ohne 1 mM MPP^+ als Inhibitor durchgeführt. Bei jeder der untersuchten Konzentrationen konnte eine Aufnahme von Sumatriptan in die primären humanen Hepatozyten beobachtet werden. Bei gleichzeitiger Inkubation der Zellen mit Sumatriptan und MPP^+ als Inhibitor organischer Kationentransporter war die gemessene Sumatriptankonzentration in den Hepatozyten um das 6,5- bis 11,9-Fache erniedrigt (Abbildung 3.2 A) ($p < 0,01$, Student's t-test). Eine Sättigung des Transports war bei den untersuchten Konzentrationen noch nicht zu beobachten. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass organische Kationentransporter der wichtigste Weg für Sumatriptan in Hepatozyten sind. Zudem ist die Stärke der Inhibition der Sumatriptanaufnahme durch MPP^+ vergleichbar mit der Inhibition der Aufnahme von 5 nM ^3H -markiertem MPP^+ durch 1 mM MPP^+ (Abbildung 3.2 B).

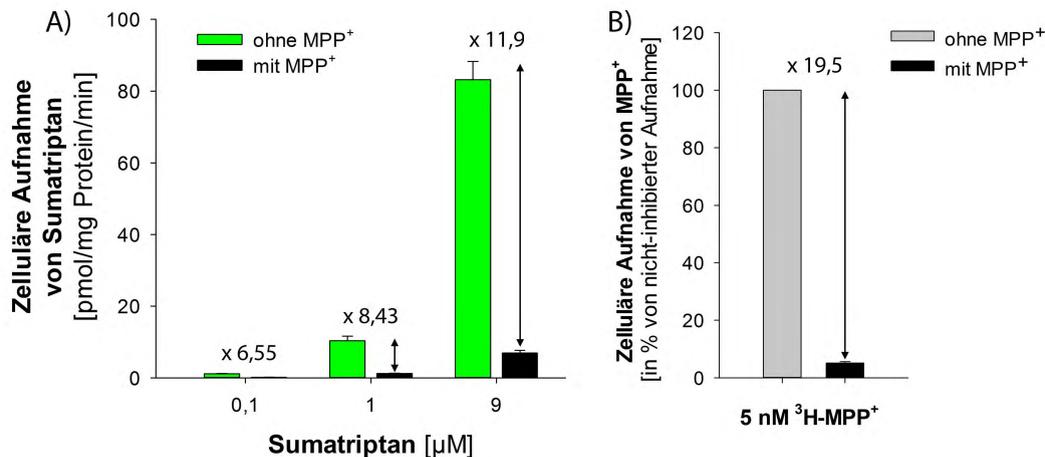


Abbildung 3.2 – Charakterisierung der zellulären Aufnahme von Sumatriptan in primäre humane Hepatozyten

A) Die primären humanen Hepatozyten wurden für 2 Minuten mit drei verschiedenen Konzentrationen (0,1 µM, 1 µM, 9 µM) Sumatriptan inkubiert (grün). Außerdem wurde die Aufnahme von Sumatriptan bei gleichzeitiger Inhibition mit 1 mM MPP⁺ betrachtet (schwarz). Angegeben ist jeweils das Vielfache der Konzentrationen in den Zellen nach Inhibition der Aufnahme von Sumatriptan durch MPP⁺.

B) Zum Vergleich wurde die Aufnahme von 5 nM ³H-markiertem MPP⁺ in primäre humane Hepatozyten und die Inhibition dieser Aufnahme mit nicht radioaktiv markiertem 1 mM MPP⁺ gemessen.

3.3 Aufnahme von Sumatriptan in OCT3-überexprimierende Zellen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Sumatriptan ein Substrat des organischen Kationentransporters OCT1 ist, wurde der Transport von Sumatriptan durch den organischen Kationentransporter OCT3 untersucht. Dieser Transporter ist nach dem OCT1 der am zweitstärksten exprimierte organische Kationentransporter in der sinusoidalen Zellmembran der Hepatozyten (Hilgendorf et al. 2007, Schaefer et al. 2012, Tzvetkov et al. 2013) und könnte ebenfalls zur Aufnahme von Sumatriptan in Hepatozyten beitragen. Zum Vergleich der Transportleistung wurden OCT1*1- und OCT3-überexprimierende Zellen sowie Kontrollzellen für 2 Minuten mit steigenden Konzentrationen (0,5; 1; 5; 20; 40; 60; 80; 100; 200; 400 µM) Sumatriptan inkubiert.

In den Versuchen wurde eine deutlich geringere Transportaktivität des OCT3 für Sumatriptan im Vergleich zum OCT1*1 nachgewiesen (Abbildung 3.3). Die aufgenommene Menge von Sumatriptan in den OCT3-überexprimierenden HEK293-Zellen war je nach Inkubationskonzentration zwischen 33% und 65% höher als die Aufnahme von Sumatriptan in die Kontrollzellen, im Vergleich zu den OCT1*1-überexprimierende Zellen war die Aufnahme von Sumatriptan jedoch deutlich niedriger. OCT1*1

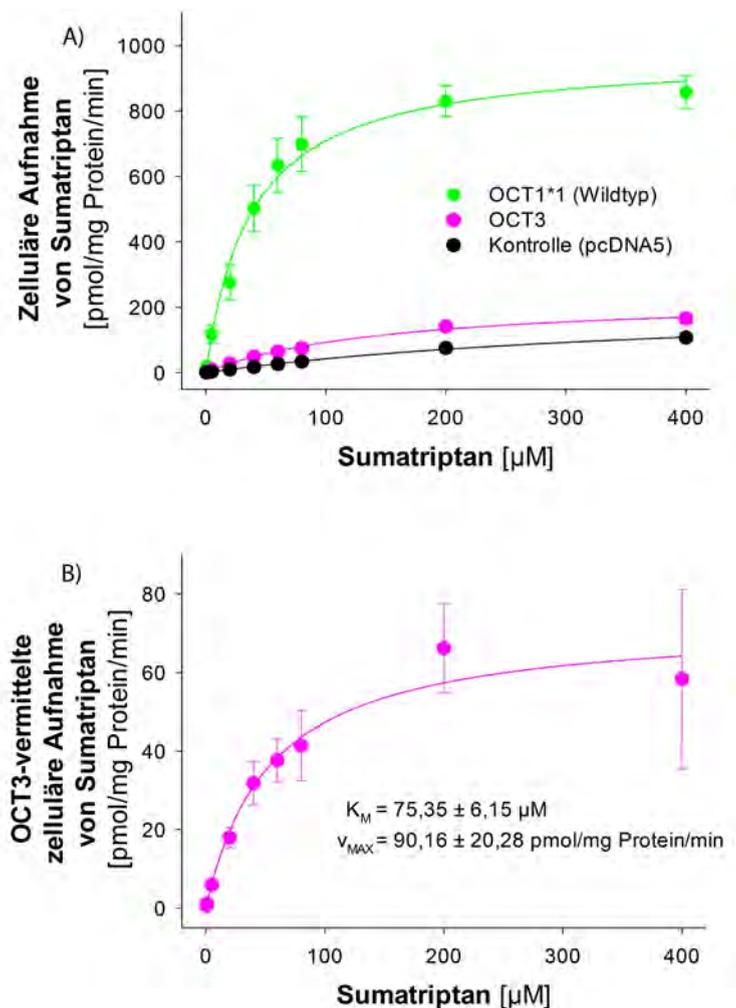


Abbildung 3.3 – Charakterisierung der Aufnahme von Sumatriptan in OCT3-überexprimierende HEK293-Zellen

A) Vergleich der Konzentrationsabhängigkeit der OCT1*1-vermittelten (grün) und OCT3-vermittelten (pink) zellulären Aufnahme von Sumatriptan zusammen mit Kontrollzellen (schwarz), welche mit dem leeren Vektor pcDNA5 transfiziert sind. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardfehler von mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

B) Konzentrationsabhängigkeit des OCT3-vermittelten Anteils der zellulären Aufnahme von Sumatriptan. Der OCT3-vermittelte Anteil wurde durch Subtrahieren der Aufnahme von Sumatriptan in die Kontrollzellen (pcDNA5) von der Aufnahme des Sumatriptans in die OCT3-überexprimierenden Zellen berechnet. Die maximale Transportrate (v_{max}) und die Michaelis-Menten-Konstante (K_M) wurden berechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardfehler von mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

hatte einen K_M -Wert von $55,4 \pm 7,89 \mu\text{M}$, der OCT3 hatte einen K_M -Wert von $75,4 \pm 6,15 \mu\text{M}$. Die Kapazität des OCT3 war mit $v_{\max} = 90,2 \pm 20,28 \text{ pmol/mg Protein/min}$ deutlich geringer als die des OCT1*1 ($v_{\max} 977,7 \pm 131,6 \text{ pmol/mg Protein/min}$) (Tabelle 3.1). Da die Transportleistung des organischen Kationentransporters OCT3 für Sumatriptan deutlich niedriger war und die Expression des Transporters in den sinusoidalen Membranen der Leber 10-fach geringer ausfällt (Hilgendorf et al. 2007, Schaefer et al. 2012, Tzvetkov et al. 2013), ist davon auszugehen, dass der organische Kationentransporter OCT3 für den Transport von Sumatriptan in der Leber keine Rolle spielt.

Tabelle 3.1 – Vergleich der enzymkinetischen Parameter zwischen OCT1- und OCT3-überexprimierenden Zellen

	OCT1*1	OCT3	p-Wert (Student's t-test)
K_M [μM]	$55,4 \pm 7,89$	$75,4 \pm 6,15$	0,088
v_{\max} [$\text{pmol/mg Protein/min}$]	$977,7 \pm 131,6$	$90,2 \pm 20,28$	0,001
Cl_{int} [$\mu\text{l/mg Protein/min}$]	$18,6 \pm 2,25$	$1,17 \pm 0,18$	0,001

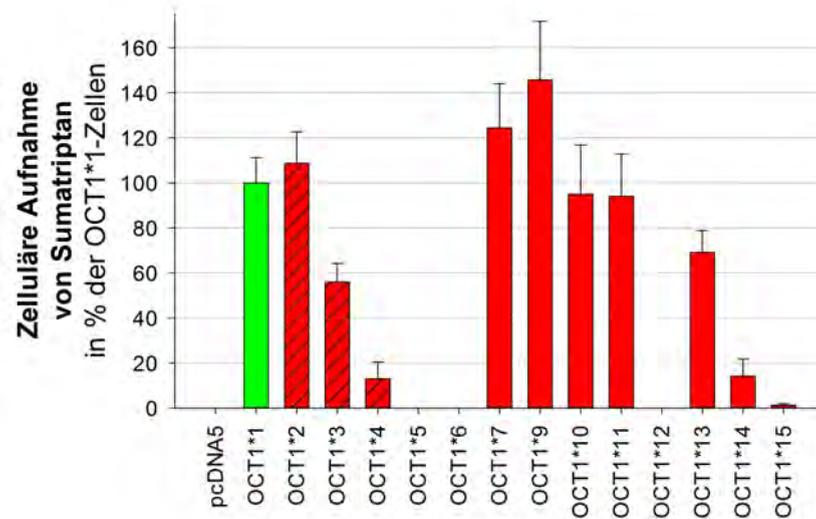
3.4 Effekt der Allelvarianten des OCT1 auf die zelluläre Aufnahme von Sumatriptan

Das humane OCT1-Gen ist sehr polymorph. Ein Teil der Allelvarianten führt zu Änderungen in der Aminosäuresequenz des Transporters und diese können möglicherweise auch die Transportkapazität des OCT1 für Sumatriptan beeinflussen. In Tabelle 1.2 sind die bekannten Varianten des OCT1 nach Allelfrequenz sortiert aufgelistet.

HEK293-Zellen, die jeweils eines der verschiedenen Allele des OCT1 überexprimieren, wurden mit zwei verschiedenen Sumatriptankonzentrationen ($0,1 \mu\text{M}$ (Abbildung 3.4 A) und $9 \mu\text{M}$ Sumatriptan (Abbildung 3.4 B)) für 2 Minuten inkubiert und die in die Zellen gelangte Menge Sumatriptan per HPLC-MS/MS bestimmt. Während $0,1 \mu\text{M}$ der maximalen Plasmakonzentration C_{\max} nach oraler Gabe von 100 mg Sumatriptan entspricht (Lacey et al. 1995), ist $9 \mu\text{M}$ gerundet die errechnete maximale Konzentration von Sumatriptan in der Pfortader bei gleicher Dosis und Applikationsform ($C_{\max \text{ Port. Unb.}}$), (Tabelle 4.4), (Ahlin et al. 2011, Ito et al. 1998).

Die verschiedenen Allele unterschieden sich deutlich im Bezug auf die intrazellulär gemessene Sumatriptankonzentration, die Transportleistung eines einzelnen Alleles für beide Inkubationskonzentrationen war jedoch vergleichbar. Die Allele OCT1*4,

A) Zelluläre Aufnahme von 0,1 μM Sumatriptan in verschiedene Allele des OCT1



B) Zelluläre Aufnahme von 9 μM Sumatriptan in verschiedene Allele des OCT1

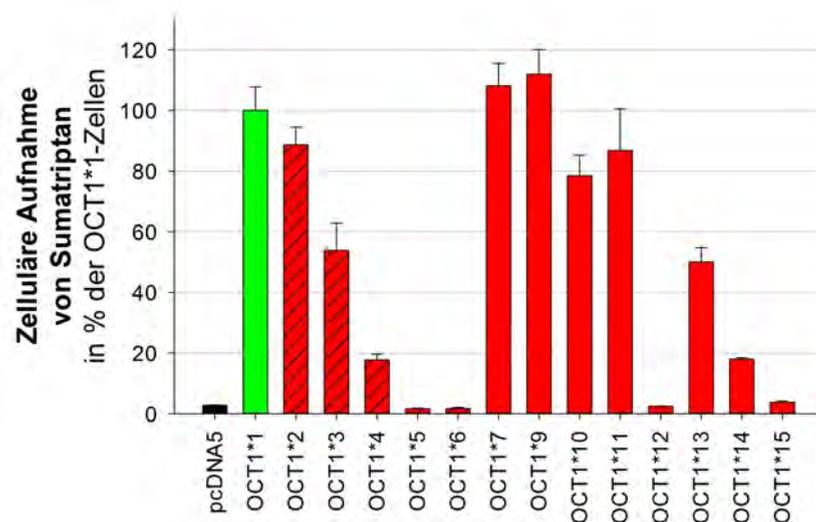


Abbildung 3.4 – Effekt der loss of function Polymorphismen des organischen Kationentransporters OCT1 auf die *in-vitro*-Aufnahme von Sumatriptan. OCT1-Wildtyp-überexprimierende Zellen und Zelllinien mit verschiedenen Allelen des OCT1 wurden im Vergleich mit Kontrollzellen, welche mit dem leeren Vektor pcDNA5 transfiziert waren, untersucht. Die Zellen wurden für 2 Minuten mit A) 0,1 μM oder B) 9 μM Sumatriptan inkubiert.

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler von mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

OCT1*5, OCT1*6, OCT1*12, OCT1*14 und OCT1*15 wiesen sowohl nach Inkubation mit 0,1 μM als auch nach Inkubation mit 9 μM Sumatriptan eine deutlich verminderte Transportaktivität im Vergleich zu den OCT1*1-Wildtypzellen auf ($p < 0,001$, ANOVA). Darüber hinaus zeigten diese Allele keinen signifikanten Unterschied zu den pcDNA5-Kontrollzellen ($p > 0,05$, ANOVA), sie waren daher funktionell inaktiv. Für die Allele OCT1*2, OCT1*7, OCT1*9, OCT1*10 und OCT1*11 wurden hingegen ähnliche intrazelluläre Konzentrationen wie für die OCT1*1-Wildtypzellen gemessen und es konnte kein signifikanter Unterschied zu den OCT1*1-Wildtypzellen festgestellt werden ($p > 0,05$, ANOVA). Für das OCT1*3- und das OCT1*13-Allel wurde für die 9 μM Inkubationskonzentration eine auf $53,9 \pm 8,97\%$ bzw. $50,0 \pm 4,76\%$ reduzierte Transportaktivität beobachtet ($p < 0,001$, ANOVA), für die 0,1 μM Inkubationskonzentration war der Unterschied zu den OCT1*1-Wildtypzellen jedoch nicht signifikant ($p > 0,05$, ANOVA). Im Bezug auf die pcDNA5-Kontrollzellen war für die 9 μM Inkubationskonzentration ebenfalls ein signifikanter Unterschied zu verzeichnen ($p < 0,001$, ANOVA). Vermutlich waren diese beiden Allele in ihrer Transportaktivität reduziert, aber nicht inaktiv. Der Unterschied zeigte sich jedoch erst bei der höheren der untersuchten Konzentrationen.

Die fünf häufigsten Allelvarianten in Kaukasiern (OCT1*2 bis OCT1*6) sind damit sehr unterschiedlich im Hinblick auf ihre Transportaktivität zu bewerten. Während das OCT1*2-Allel keine signifikante Einschränkung des Transports von Sumatriptan zeigte, war für das OCT1*3-Allel eine reduzierte Transporteraktivität zu beobachten. Die Allele OCT1*4 bis OCT1*6 waren funktionell inaktiv. Diese *in-vitro*-Experimente zeigen, dass die Aufnahme von Sumatriptan durch Polymorphismen des organischen Kationentransporters OCT1 beeinflusst wurde.

3.5 Charakterisierung der Sumatriptanaufnahme durch die Variante OCT1*2

Die in der kaukasischen Bevölkerung häufigste Variante des OCT1, das Allel OCT1*2 wurde detaillierter untersucht. Für die Untersuchung der Zeitabhängigkeit des Transports wurden die Zellen mit einer konstanten Konzentration (1 μM) über einen Zeitraum von einer bis 20 Minuten inkubiert. Die Konzentrationsabhängigkeit des Transports wurde untersucht, indem die Zellen für 2 Minuten mit steigenden Konzentrationen (0,5; 1; 5; 20; 40; 60; 80; 100; 200; 400 μM) von Sumatriptan inkubiert wurden. Um die vom OCT1 unabhängige Aufnahme von Sumatriptan in Zellen zu messen,

wurden HEK293-Kontrollzellen eingesetzt, die mit dem leeren Vektor pcDNA5 transfiziert waren. Sowohl bei der konzentrationsabhängigen als auch bei der zeitabhängigen Inkubation der OCT1*2-überexprimierenden Zellen mit Sumatriptan war ein starker Transport durch die OCT1*2-Variante zu messen (Abbildung 3.5).

Die OCT1*2-überexprimierenden Zellen zeigten in den Versuchen eine nahezu identische Aufnahme von Sumatriptan wie die OCT1*1-Wildtypzellen. Während der Inkubation der Zelllinien mit 1 μM Sumatriptan über einen zunehmenden Zeitraum kumulierte Sumatriptan in beiden Zelllinien fast identisch. Erst nach 15 Minuten war die Konzentration in den OCT1*2-überexprimierenden Zellen signifikant niedriger als in den OCT1*1-Wildtypzellen ($p < 0,05$, Student's t-test). Die Endkonzentration nach 20 Minuten Inkubationszeit in den OCT1*2-überexprimierenden Zellen betrug 67,1% der OCT1*1-Wildtyp Konzentration von Sumatriptan, der Unterschied war jedoch nicht signifikant ($p > 0,05$, Student's t-test). Die Inkubation der Zelllinien mit steigenden Konzentrationen von Sumatriptan zeigte, dass OCT1*2-Zellen Sumatriptan bei fast allen Konzentrationen ähnlich gut wie die OCT1*1-Wildtypzellen aufnahmen. Nur nach Inkubation der Zellen mit 200 μM Sumatriptan war zwischen den beiden Zelllinien ein signifikanter Unterschied messbar ($p < 0,05$, Student's t-test). Die K_M -Werte der OCT1*1-Wildtypzellen und der OCT1*2-überexprimierenden Zellen wiesen einen geringen, aber nicht signifikanten Unterschied auf ($55,4 \pm 7,89 \mu\text{M}$ für OCT1*1 gegenüber $27,9 \pm 8,21 \mu\text{M}$ für OCT1*2) (Tabelle 3.2). Die maximale Transportrate v_{max} von $649,0 \pm 43,5 \text{ pmol/mg Protein/min}$ für die OCT1*2-Variante war um 66,4% niedriger als die Transportrate v_{max} des OCT1*1-Wildtyps ($977,7 \pm 131,6 \text{ pmol/mg Protein/min}$), der Unterschied war jedoch ebenfalls nicht signifikant. Für den OCT1*1 ergab sich aus den Daten eine intrinsische Clearance (Cl_{int}) von $0,0186 \text{ ml/mg Protein/min}$, für die OCT1*2-Variante errechnete sich eine intrinsische Clearance von $0,0264 \text{ ml/mg Protein/min}$. In den Experimenten konnten zwischen den beiden Zelllinien keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden, sodass die OCT1*2-Variante des OCT1 im Hinblick auf den Transport von Sumatriptan als völlig aktives Allel des OCT1 zu betrachten ist.

Tabelle 3.2 – Vergleich der enzymkinetischen Parameter zwischen OCT1*1-Wildtypzellen und der OCT1*2-Variante (Met420del)

	OCT1*1	OCT1*2	p-Wert (Student's t-test)
K_M [μM]	$55,4 \pm 7,89$	$27,9 \pm 8,21$	0,055
v_{max} [$\text{pmol/mg Protein/min}$]	$977,7 \pm 131,6$	$649,0 \pm 43,5$	0,056
Cl_{int} [$\mu\text{l/mg Protein/min}$]	$18,6 \pm 2,25$	$26,4 \pm 5,26$	0,274

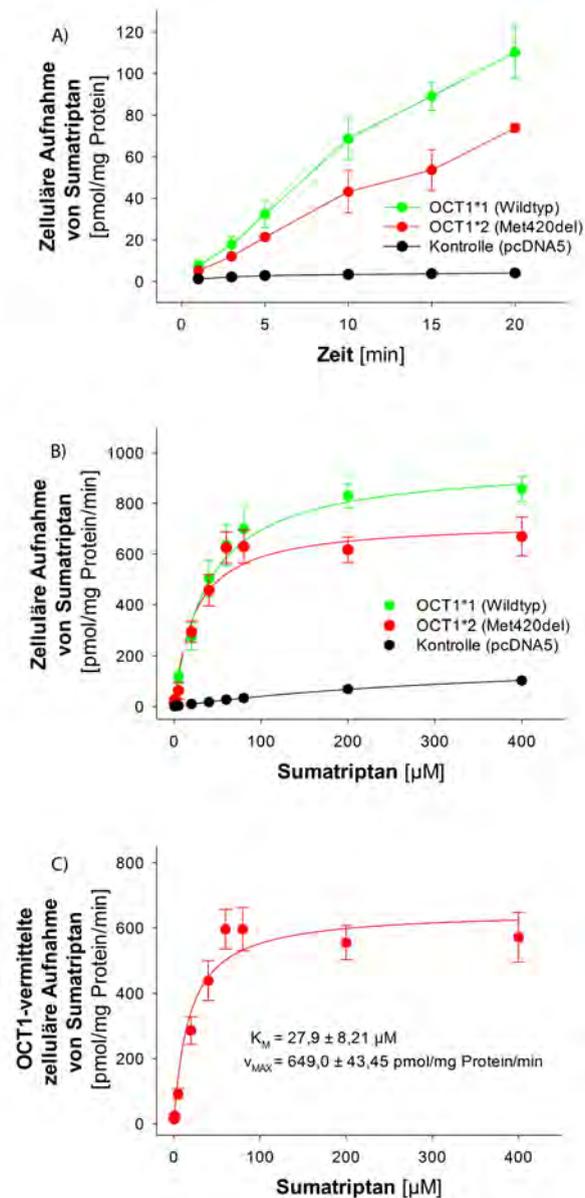


Abbildung 3.5 – Vergleichende Charakterisierung der Aufnahme von Sumatriptan in OCT1*1-überexprimierende HEK293-Zellen und OCT1*2-überexprimierende HEK293-Zellen

A) Zeitabhängigkeit der zellulären Aufnahme von Sumatriptan durch OCT1*2. OCT1*2-überexprimierende HEK293-Zellen (rot) wurden im Vergleich mit OCT1*1-überexprimierende HEK293-Zellen (grün) und Kontrollzellen (schwarz), welche mit dem leeren Vektor pcDNA5 transfiziert sind, analysiert. Beide Zelllinien wurden zwischen einer und 20 Minuten mit 1 μM Sumatriptan inkubiert.

B) Konzentrationsabhängigkeit der zellulären Aufnahme von Sumatriptan durch OCT1*2. Die Zelllinien wurden für jeweils 2 Minuten mit steigenden Konzentrationen von Sumatriptan inkubiert.

C) Konzentrationsabhängigkeit des OCT1*2-vermittelten Anteils der zellulären Aufnahme von Sumatriptan. Der OCT1*2-vermittelte Anteil wurde durch Subtrahieren der Aufnahme von Sumatriptan in die Kontrollzellen (pcDNA5) von der Aufnahme des Sumatriptans in die OCT1*2-überexprimierenden Zellen ermittelt. Die maximale Transportrate (v_{max}) und die Michaelis-Menten-Konstante (K_M) wurden berechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardfehler von mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

3.6 Inhibition der zellulären Sumatriptanaufnahme durch andere Medikamente

Nach der Identifikation von Sumatriptan als Substrat des OCT1 stellte sich die Frage, ob die durch den organischen Kationentransporter OCT1 vermittelte Aufnahme von Sumatriptan durch andere Medikamente beeinflussbar ist. Es wurde eine Auswahl von Medikamenten, die zur Prophylaxe und Behandlung vor oder während einer Migräneattacke gegeben werden, auf ihr Potential die OCT1-vermittelte Aufnahme von Sumatriptan zu inhibieren, untersucht (Abbildung 3.6). Basierend auf den aktuellen Leitlinien zur Prophylaxe und Behandlung von Migräne der Deutschen Gesellschaft für Neurologie wurden folgende Medikamente zur weiteren Analyse ausgewählt: Amitriptylin, Bisoprolol, Domperidon, Flunarizin, Gabapentin, Metoclopramid, Metoprolol und Propranolol (DGN-Leitlinie 2012). Durch die Analyse bekannter Substrate und Inhibitoren des OCT1 (Ahlin et al. 2008, Koepsell et al. 2007) können bestimmte Gruppen von Molekülen wie beispielsweise Substanzen mit sauren Eigenschaften als Substrate und Inhibitoren des OCT1 ausgeschlossen werden. Daher wurden einige weitere Migräneprophylaktika wie Topiramat oder Valproinsäure nicht berücksichtigt. Um einen Vergleich zu einem bekannten Inhibitor des OCT1 zu erhalten, wurde zusätzlich MPP⁺ in den Versuch aufgenommen.

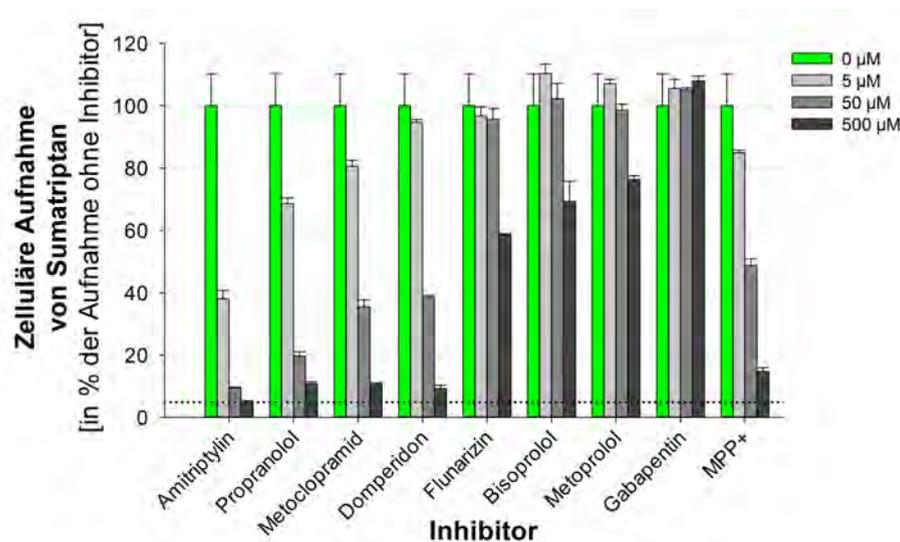


Abbildung 3.6 – Inhibition der OCT1-vermittelten Aufnahme von Sumatriptan durch eine Auswahl klinisch relevanter Medikamente. Die OCT1-überexprimierenden Zellen wurden für 2 Minuten mit 1 µM Sumatriptan und jeweils 3 verschiedenen Konzentrationen einer Auswahl von Medikamenten inkubiert. Die gepunktete Linie zeigt die in die Kontrollzellen (pcDNA5) aufgenommene Menge Sumatriptan. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardfehler von mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

Die untersuchten Medikamente verhielten sich im Hinblick auf ihr inhibitorisches Potential sehr heterogen. Bei Flunarizin, Bisoprolol und Metoprolol war eine Inhibition des OCT1-vermittelten Transports von Sumatriptan nur bei der höchsten betrachteten Konzentration (500 μM) zu erkennen, die Aufnahme von Sumatriptan war auf 58% bis 76% reduziert. Gabapentin hat die Aufnahme von Sumatriptan in die OCT1-überexprimierenden Zellen nicht beeinflusst. Amitriptylin, Propranolol, Metoprolol und Domperidon zeigten eine typische konzentrationsabhängige Inhibition der Aufnahme von Sumatriptan und wurden daher detaillierter untersucht (Abbildung 3.7). Die Stärke der Inhibition des Sumatriptantransports dieser vier Medikamente war vergleichbar zu der des Modellsubstrats MPP^+ .

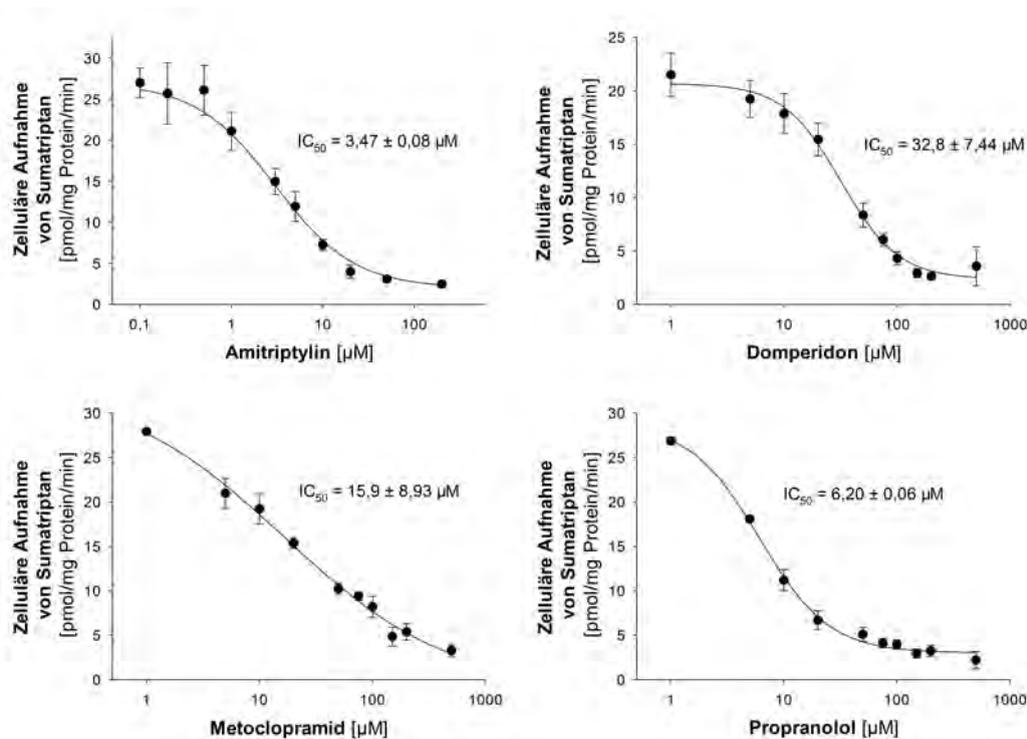


Abbildung 3.7 – Detaillierte Charakterisierung der Inhibition der OCT1-vermittelten zellulären Aufnahme von Sumatriptan durch Amitriptylin, Domperidon, Metoclopramid und Propranolol. Die OCT1-überexprimierenden Zellen wurden für 2 Minuten mit 1 μM Sumatriptan und steigenden Konzentrationen des Medikaments inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardfehler von mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

Amitriptylin und Propranolol waren mit einer mittleren inhibitorischen Konzentration IC_{50} von $3,47 \pm 0,08 \mu\text{M}$ bzw. IC_{50} von $6,20 \pm 0,06 \mu\text{M}$ die stärksten Inhibitoren des Transports von Sumatriptan in die OCT1-überexprimierenden Zellen. Für Metoclopramid ($\text{IC}_{50} = 15,9 \pm 8,93 \mu\text{M}$) und Domperidon ($\text{IC}_{50} = 32,8 \pm 7,44 \mu\text{M}$) wurde erst bei höheren Konzentrationen eine halbmaximale Inhibition

der Sumatriptanaufnahme in die OCT1-überexprimierenden Zellen beobachtet. Die Versuche zeigten, dass der Transport von Sumatriptan durch den OCT1 mit den vier untersuchten Medikamenten gehemmt werden kann.

3.7 Interaktion anderer Triptane mit dem OCT1

Neben Sumatriptan wurden im Laufe der Zeit weitere Triptane mit ähnlicher Grundstruktur entwickelt. In den Versuchen wurden die Triptane Eletriptan, Naratriptan, Rizatriptan und Zolmitriptan im Bezug auf ihre Interaktion am OCT1 im Vergleich zu Sumatriptan untersucht. Ermittelt wurde die Inhibition der zellulären Aufnahme von MPP^+ durch andere Triptane, die transporterunabhängige Membranpermeabilität und der Transport der Triptane durch den OCT1 selbst.

3.7.1 Inhibition des OCT1-vermittelten Transports von MPP^+ durch Triptane

Um die Inhibition des OCT1-vermittelten Transports von MPP^+ durch Triptane zu bestimmen, wurden OCT1-überexprimierende Zellen mit 5 nM 3H - MPP^+ und Sumatriptan oder einem anderen Triptan inkubiert. Anschließend wurde die intrazelluläre Konzentration von 3H - MPP^+ bestimmt (Abbildung 3.8).

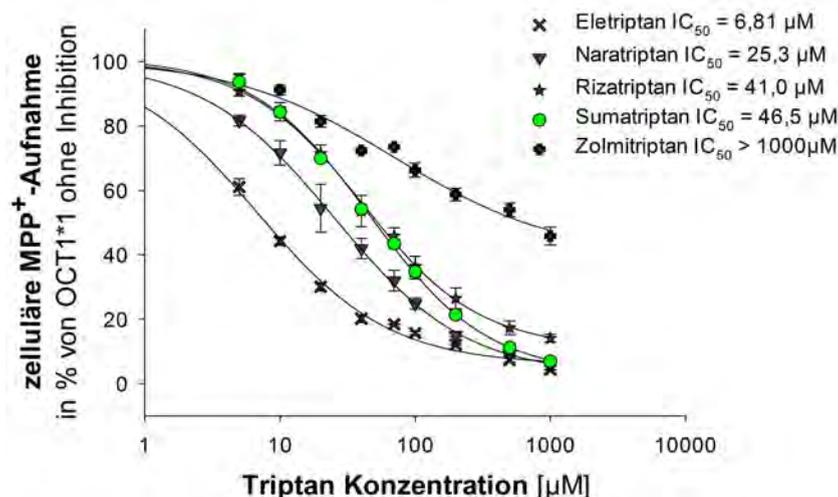


Abbildung 3.8 – Triptane als Inhibitoren des OCT1-vermittelten Transports von MPP^+ . Die Inhibition der OCT1 vermittelten Aufnahme von MPP^+ wurde durch 2-minütige Inkubation von OCT1-überexprimierenden HEK293-Zellen mit 5 nM 3H -markiertem 1-Methyl-4-Phenylpyridinium (MPP^+) bei steigender Konzentrationen der Triptane gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardfehler von mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

Während Sumatriptan ($IC_{50} = 46,45 \pm 3,21 \mu\text{M}$) und Rizatriptan ($IC_{50} = 41,0 \pm 7,2 \mu\text{M}$) die Aufnahme von $^3\text{H-MPP}^+$ via OCT1 in die Zellen beinahe gleich stark inhibierten, zeigten Eletriptan ($IC_{50} = 6,81 \pm 0,61 \mu\text{M}$) und Naratriptan ($IC_{50} = 25,3 \pm 6,29 \mu\text{M}$) eine stärkere Inhibition als Sumatriptan und Rizatriptan. Mit einem IC_{50} -Wert von $>1000 \mu\text{M}$ war für Zolmitriptan nur eine sehr begrenzte Inhibition nachweisbar. Daher kann konkludiert werden, dass die untersuchten Triptane mit Ausnahme von Zolmitriptan potente Inhibitoren des OCT1-vermittelten Transports des Modellsubstrats $^3\text{H-MPP}^+$ *in vitro* waren.

3.7.2 Bestimmung der transporterunabhängigen Membranpermeabilität der Triptane

Die transporterunabhängige Membranpermeabilität der Triptane wurde mit einem Parallel Artificial Membrane Permeability Assay (PAMPA) untersucht. Für jedes Triptan wurden drei Konzentrationen (125; 250; 500 μM) betrachtet (Tabelle 3.3).

Tabelle 3.3 – Vergleich des Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten $\log D_{\text{pH}7,4}$ mit dem Permeabilitätskoeffizienten P_e der Triptane

Triptan	$\log D_{\text{pH}7,4}$	P_e [10^{-6} cm/s]
Eletriptan	0,5	$4,20 \pm 0,47$
Naratriptan	-0,2	$0,05 \pm 0,04$
Rizatriptan	-0,7	$0,87 \pm 0,35$
Sumatriptan	-1,5	$0,005 \pm 0,001$
Zolmitriptan	-1	$0,18 \pm 0,03$

$\log D_{\text{pH}7,4}$ aus (Pascual und Muñoz 2005)

Eletriptan wurde mit einem Permeabilitätskoeffizienten von $P_e = 4,20 \pm 0,47 \times 10^{-6}$ cm/s die höchste Membranpermeabilität gemessen. Sumatriptan wies mit einem Permeabilitätskoeffizienten von $P_e = 0,005 \pm 0,001 \times 10^{-6}$ cm/s die geringste Membranpermeabilität auf.

3.7.3 Triptane als Substrate des OCT1

Nachdem gezeigt wurde, dass Triptane Inhibitoren des OCT1 sind, wurde untersucht, ob diese Triptane auch einem Transport durch dem OCT1 unterliegen. Betrachtet wurde die Aufnahme der Triptane in OCT1-überexprimierende Zellen und Kontrollzellen (pcDNA5) bei einer Konzentration von 1 μM (Abbildung 3.9).

Jedes der untersuchten Triptane wurde in die OCT1-überexprimierenden Zellen aufgenommen. Die höchste intrazelluläre Konzentration wurde für Eletriptan

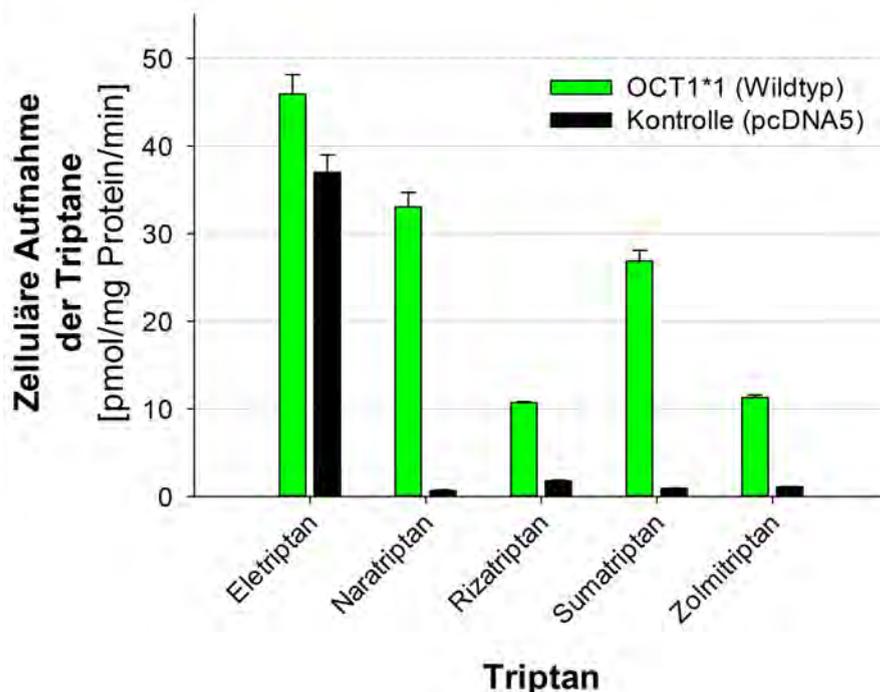


Abbildung 3.9 – Triptane als Substrate des OCT1-vermittelten Transports. Die Zelllinien wurden für jeweils 2 Minuten einer Konzentration von 1 μM des jeweiligen Triptans inkubiert. OCT1-überexprimierende HEK293-Zellen (grün) werden im Vergleich mit Kontrollzellen (schwarz), welche mit dem leeren Vektor pcDNA5 transfiziert sind, analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardfehler von mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

gemessen ($45,9 \pm 2,20$ pmol/mg Protein/min), die niedrigste Konzentration wurde nach Inkubation der OCT1-überexprimierenden Zellen mit Rizatriptan ($10,7 \pm 0,11$ pmol/mg Protein/min) beobachtet. Eletriptan erreichte auch in den Kontrollzellen eine sehr hohe Konzentration. Während die anderen Triptane Konzentrationen zwischen $0,65 \pm 0,09$ pmol/mg Protein/min (Naratriptan) bis $1,77 \pm 0,08$ pmol/mg Protein/min (Rizatriptan) erreichten (im Mittel $1,11$ pmol/mg Protein/min), wurde für Eletriptan mit $36,9 \pm 2,03$ pmol/mg Protein/min eine im Vergleich zu den anderen Triptanen 33,7-fach höhere Konzentration in den Kontrollzellen gemessen.

Um den OCT1-vermittelten Anteil an der Aufnahme der Triptane in die OCT1-überexprimierenden Zellen abschätzen zu können, wurde der Quotient aus den Konzentrationen in den Kontrollzellen und den OCT1-überexprimierenden Zellen gebildet (Abbildung 3.10 A)). Naratriptan schien von den betrachteten Triptanen dem stärksten Transport zu unterliegen. In den OCT1-überexprimierenden Zellen wurde das 54,4-Fache der Konzentration in den Kontrollzellen erreicht. Damit wurde

es auch deutlich besser als Sumatriptan transportiert, für das in den OCT1-überexprimierenden Zellen eine 29,6-fach höhere Konzentration als in den Kontrollzellen gemessen wurde. Eletriptan erreichte hingegen in beiden Zelllinien hohe Konzentrationen, dementsprechend war die in den OCT1-überexprimierenden Zellen gemessene Konzentration nur um Faktor 1,24 höher als in den Kontrollzellen. Für alle Triptane war der Unterschied zwischen den beiden Zelllinien signifikant ($p < 0,05$, ANOVA).

Setzt man den OCT1-vermittelten Anteil der zellulären Aufnahme der Triptane mit der Transporter-unabhängigen Membranpermeabilität der Triptane ins Verhältnis, scheint die Transportrate eines Triptans tendenziell negativ mit der Membranpermeabilität zu korrelieren (Abbildung 3.10 B)).

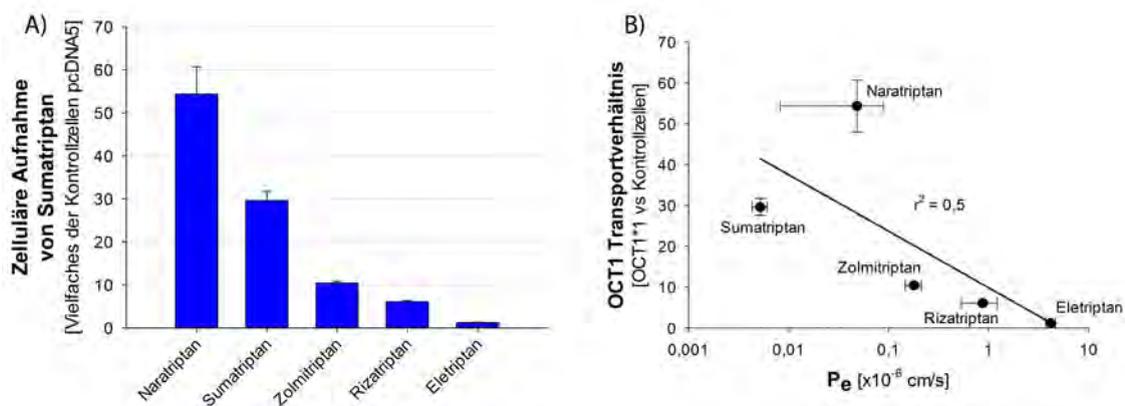


Abbildung 3.10 – OCT1-abhängige Transportrate verschiedener Triptane

A) Die Zelllinien wurden für jeweils 2 Minuten mit 1 μ M des jeweiligen Triptans inkubiert. Dargestellt ist das Vielfache der in den pcDNA5-Zellen gemessenen Konzentrationen für jedes Triptan.

B) Verhältnis der OCT1-vermittelten Transportrate zur Transporter-unabhängigen Diffusion der Triptane (Tabelle 3.3). Es zeichnet sich ein reziproker Zusammenhang zwischen der Membranpermeabilität und der OCT1-Transportrate ab.

Kapitel 4

Diskussion

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Sumatriptan ein Substrat des organischen Kationentransporters OCT1 ist. Der OCT1-vermittelte Transport von Sumatriptan kann durch Polymorphismen des OCT1 beeinflusst werden und lässt sich durch Medikamente und Substrate des OCT1 inhibieren. Der OCT1 kann neben Sumatriptan auch andere Triptane transportieren.

4.1 Bedeutung des OCT1 für den zellulären Transport von Sumatriptan

Es konnte gezeigt werden, dass Sumatriptan auf einen aktiven Transport angewiesen ist, um intrazellulär zu akkumulieren. Während lipophile, unpolare Substanzen in großer Menge per Diffusion in Zellen gelangen können, ist dieser Weg für Sumatriptan kaum relevant. Sumatriptan ist ein polares und mit einem $\log D_{\text{pH}7,4}$ Wert von -1,5 (Pascual und Muñoz 2005) hydrophiles Molekül, eine Diffusion über Zellmembranen ist nur in geringem Maße zu erwarten. Es liegt zudem bei physiologischem pH-Wert zu mehr als 95% in seiner protonierten Form vor. Dementsprechend wurde für Sumatriptan im PAMPA ein geringer Permeabilitätskoeffizient $P_e = 0,005 \pm 0,001 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ gemessen (Tabelle 3.3). Dieser niedrige Permeabilitätskoeffizient weist auf eine schlechte Zellmembrangängigkeit von Sumatriptan hin. Der Vergleich der Sumatriptanaufnahme zwischen OCT1-überexprimierenden Zellen und Kontrollzellen zeigte die geringe Diffusionsrate von Sumatriptan sehr deutlich (Abbildung 3.1).

Für die Aufnahme von Sumatriptan in primäre humane Hepatozyten ist der OCT1 der wichtigste Transporter. Die durchgeführten Versuche zeigten eine starke, zum Modellsubstrat MPP^+ vergleichbare Aufnahme von Sumatriptan in primäre humane Hepatozyten. Dabei konnte die Aufnahme von Sumatriptan durch MPP^+ als

bekanntem Inhibitor des OCT1 um das 6,5- bis 11,9-Fache gehemmt werden (Abbildung 3.2). Als zweithäufigster organischer Kationentransporter auf der sinusoidalen Membran von Hepatozyten wird der OCT3 exprimiert (Nies et al. 2009, Tzvetkov et al. 2013). Die in den OCT3-überexprimierenden Zellen gemessenen Konzentrationen waren um den Faktor 4,9 bis 13,8 niedriger als in den OCT1-überexprimierenden Zellen (Abbildung 3.3), die intrinsische Clearance um den Faktor 15,9 geringer (Tabelle 3.1). Darüber hinaus ist der OCT3 in Hepatozyten mehr als 12-fach schwächer exprimiert als der OCT1 (Hilgendorf et al. 2007, Schaefer et al. 2012, Tzvetkov et al. 2013). Damit ist der OCT3 für den Transport von Sumatriptan im Vergleich zum OCT1 vernachlässigbar. In der Leber werden noch einige weitere potentielle Sumatriptantransporter exprimiert. Für den Organo-Anion-Transporter (OATP1A2) wurde ein Transport von Sumatriptan nachgewiesen (Cheng et al. 2012), der OATP1A2 ist jedoch nur in Cholangiozyten der Leber nachweisbar und nicht in den sinusoidalen Membranen von Hepatozyten (Lee et al. 2005). Damit ist der OATP1A2 für die Aufnahme von Substanzen aus dem Blut in die Leber nicht relevant. Gleiches gilt für den nur in der apikalen Membran der Hepatozyten nachweisbaren Kationentransporter MATE (Tzvetkov et al. 2013). Andere mögliche Transporter wie der Serotonintransporter (SERT), der Norepinephrintransporter (NET), der PMAT oder der OCTN2 sind entweder nur in sehr geringen Mengen oder überhaupt nicht in den sinusoidalen Membranen von Hepatozyten exprimiert (Otsuka et al. 2005, Ramamoorthy et al. 1993, Tzvetkov et al. 2013). Diese Transporter spielen daher für die hepatozelluläre Aufnahme von Sumatriptan ebenfalls keine Rolle und wurden nicht untersucht.

In den OCT1-überexprimierenden Zellen wurde eine starke Aufnahme von Sumatriptan gemessen (Abbildung 3.1). Sumatriptan hat mit einem K_M -Wert von $55,4 \pm 7,89 \mu\text{M}$ eine relativ hohe Affinität zum OCT1. Auffällig ist eine gleichzeitig hohe maximale Transportrate v_{max} (Tabelle 4.1). Mit Hilfe der Michaelis-Menten-Gleichung kann die Transportkinetik einer Substanz abgeschätzt und eingeordnet werden (Kapitel 2.2.7). Die Umsatzgeschwindigkeit (v) eines Transporters oder Enzyms ist dabei abhängig von v_{max} , K_M und der Substratkonzentration. Wenn die maximal erreichte Konzentration einer Substanz im Plasma C_{max} dabei einen deutlich kleineren Wert als K_M einnimmt, kann die Transportleistung für eine Substanz näherungsweise nur mit dem Quotient aus v_{max} und K_M (Cl_{int}) beschrieben werden. Die intrinsische Clearance von Sumatriptan ist mit $18,6 \mu\text{l}/\text{mg Protein}/\text{min}$ vergleichbar mit der intrinsischen Clearance des Modellsubstrates MPP^+ , 6,9-fach höher als die intrinsische Clearance von Metformin ($2,69 \mu\text{l}/\text{mg Protein}/\text{min}$) und 2,2-fach höher als die intrinsische Clearance von Morphin (Tabelle 4.1).

Tabelle 4.1 – Vergleich der Transportkinetik verschiedener Substrate des OCT1

Substrat	K_M [μM]	v_{max} [pmol/mg Protein/min]	Cl_{int} [$\mu\text{l}/\text{mg Protein}/\text{min}$]	Referenz
Morphin	$3,4 \pm 0,3$	$29,0 \pm 2,8$	8,53	(Tzvetkov et al. 2013)
Debrisoquin	$5,9 \pm 1,5$	$41,9 \pm 4,5$	7,10	(Saadatmand et al. 2012)
Sumatriptan	$55,4 \pm 7,89$	$977,7 \pm 131,6$	$18,6 \pm 2,25$	diese Arbeit
MPP ⁺	$78,8 \pm 17,0$	1870 ± 233	23,7	(Koepsell et al. 2007), (Matthaei et al. 2016)
Sulpirid	$259,7 \pm 5,4$	$1081,4 \pm 188$	4,16	(Pereira et al. 2014)
Metformin	1470 ± 190	3960 ± 400	2,69	(Kimura et al. 2005)
TEA ⁺	1750 ± 70	8610 ± 700 (10 min)	4,92 (10 min)	(Yasujima et al. 2011)

Damit ist Sumatriptan ein high-capacity-Substrat des OCT1 und unterliegt einem starken Transport durch den OCT1. Da die mRNA-Expression des OCT1 in den OCT1-überexprimierenden HEK293-Zellen mit der Expression in primären humanen Hepatozyten vergleichbar ist (Tzvetkov et al. 2013), können die *in-vitro*-Daten eine Schätzung für die Kinetik der Sumatriptanaufnahme in der Leber bieten.

Die Ergebnisse stehen mit Messungen von Hendrickx et al. im Einklang. Nach Inkubation von OCT1-überexprimierenden HEK293-Zellen mit 2,5 μM Sumatriptan für 4 Minuten maß die Arbeitsgruppe eine um 41,3-fach erhöhte Konzentration von Sumatriptan in OCT1-überexprimierenden Zellen gegenüber Kontrollzellen und zeigte somit einen Transport von Sumatriptan durch den OCT1 (Hendrickx et al. 2013). In dieser Arbeit wurde nach Inkubation von OCT1-überexprimierenden Zellen mit 1 μM Sumatriptan für 2 Minuten eine 29,6-fach erhöhte Konzentration in den OCT1-überexprimierenden Zellen gemessen (Abbildung 3.10). Sumatriptan wurde als Serotoninanalogon entwickelt, dementsprechend ähneln sich Sumatriptan und Serotonin in Struktur, chemischen Eigenschaften und Molekülgröße sehr. Daher kann für beide Substanzen eine vergleichbare Kinetik am OCT1 erwartet werden. Serotonin ist ebenfalls ein Substrat des OCT1, nach Inkubation von hOCT1-überexprimierenden HEK293-Zellen mit Serotonin wurde ein K_M -Wert von 197 μM und eine maximale Transportrate v_{max} von 561 pmol/mg Protein/min gemessen (Boxberger et al. 2014) (zum Vergleich rOCT1: $K_M = 37,6 \mu\text{M}$ (Busch et al. 1996)). Die Affinität von Serotonin zum OCT3 ist wie auch die Affinität von Sumatriptan zum OCT3 hingegen eher gering ($K_M = 988 \mu\text{M}$ (Duan und Wang 2010)).

4.2 Einfluss von Polymorphismen des OCT1 auf die zelluläre Aufnahme von Sumatriptan

Polymorphismen des organischen Kationentransporters OCT1 beeinflussen den Transport von Sumatriptan. Für diese Arbeit wurden die Effekte von 15 verschiedenen Polymorphismen, kombiniert in 14 Allelen des OCT1, auf den Transport von Sumatriptan untersucht. Für zwei der untersuchten Allele (OCT1*3 und OCT1*13) wurde eine Verringerung der Transportleistung beobachtet, sechs weitere Allele (OCT1*4, OCT1*5, OCT1*6, OCT1*12, OCT1*14 und OCT1*15) zeigten keine statistisch signifikante Transportaktivität (Abbildung 3.4). Damit verhält sich Sumatriptan ähnlich wie andere Substrate des OCT1. Sowohl für Modellsubstrate wie MPP^+ und TEA^+ (Kerb et al. 2002), als auch für klinisch relevante Medikamente wie beispielsweise Metformin (Shu et al. 2007), Morphin (Tzvetkov et al. 2013), Tropisetron (Tzvetkov et al. 2012) sowie O-Desmethyltramadol (Tzvetkov et al. 2011) ist ein Einfluss der OCT1-Allele auf die Affinität und Transportfähigkeit beschrieben.

Die Ursache für die fehlende Transportaktivität von fünf der sechs loss-of-function OCT1-Allele (OCT1*5, OCT1*6, OCT1*12, OCT1*14, OCT1*15) liegt in der zellulären Lokalisation des OCT1 begründet. Zellen mit diesen OCT1-Allelen besitzen keine nennenswerte Menge des OCT1 in der Zellmembran, der OCT1 kann in diesen Zellen hauptsächlich im endoplasmatischen Retikulum nachgewiesen werden (Seitz et al. 2015). Das OCT1*4-Allel ist hingegen in der Zellmembran lokalisiert, zeigt jedoch keine oder nur eine geringe Transportaktivität für Sumatriptan und andere Substanzen wie MPP^+ , Tropisetron oder Morphin (Kerb et al. 2002, Seitz et al. 2015). Hier kann ein genereller Defekt der Proteinstruktur des OCT1*4 vermutet werden. Bei den restlichen, funktionsfähigen oder substratabhängig inaktiven OCT1-Allelen wird eine vollständige Expression des OCT1 in der Zellmembran beschrieben (Seitz et al. 2015). Hier sind vermutlich veränderte Substratbindungsstellen und eine veränderte Proteinstruktur für die variable Transportaktivität verantwortlich.

Die häufigste Variante des OCT1 in der europäischen Bevölkerung ist das Allel OCT1*2, definiert durch einen Met420del-Polymorphismus mit einer Allelfrequenz von 14,1% (Seitz et al. 2015). Das OCT1*2-Allel zeigt keine signifikante Beeinflussung des Transports von Sumatriptan und ist damit als voll aktives Allel zu betrachten. In dieser Arbeit wurde für das OCT1*2-Allel eine tendenziell niedrigere maximale Transportrate v_{max} und ein niedrigerer K_M -Wert für Sumatriptan gemessen, die Unterschiede zum OCT1*1-Allel waren jedoch nicht statistisch signifikant (Abbildung 3.5). Entsprechend war bei einem Vergleich der intrinsischen Clearance kein

signifikanter Unterschied zwischen den OCT1*1-überexprimierenden Zellen und den OCT1*2-überexprimierenden Zellen zu erkennen (Tabelle 3.2).

Die Transportleistung des OCT1*2-Allels zeigt in *in-vitro*-Versuchen substratspezifische Effekte. Für das Modellsubstrat MPP⁺ als Substrat des OCT1*2 wird ein vollständig aktiver Transport beschrieben (Shu et al. 2003). Bei klinisch relevanten Substraten des OCT1 wie beispielsweise Tropisetron, Metformin oder Morphin wird hingegen entweder ein völliger Verlust oder eine stark reduzierte Transportleistung beobachtet (Ahlin et al. 2011, Seitz et al. 2015, Shu et al. 2007, Tzvetkov et al. 2013, 2012). Bisher wurde der OCT1*2-Genotyp daher im Bezug auf klinisch relevante Substanzen als inaktiv bzw. defekt klassifiziert und Patienten mit diesem Genotyp zur Gruppe der „poor-transporters“ gerechnet. Mit der Beobachtung, dass der Transport von Sumatriptan durch die OCT1*2-Variante *in vitro* jedoch keine relevante Einschränkung erfährt, sollte diese Klassifikation zum Teil revidiert werden.

4.3 Effekt von OCT1-Polymorphismen auf die Pharmakokinetik von Sumatriptan

Im Rahmen einer im Anschluss zu dieser Arbeit durchgeführten klinischen Studie konnten große Unterschiede in der Sumatriptanplasmakonzentration in Abhängigkeit vom OCT1-Genotyp beobachtet werden (Matthaei et al. 2016). Für die Studie wurden freiwillige Probanden genotypisiert und bekamen 50 mg Sumatriptan per os verabreicht. Im Anschluss wurde die Plasmakonzentration von Sumatriptan zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Es wurden 21 Träger mit zwei aktiven Allelen, 16 Träger mit einem aktiven Allel und 7 Träger mit keinem aktiven Allel in die Studie eingeschlossen. Die Einordnung der Varianten des OCT1 in aktive und inaktive Allele beruhte auf den Ergebnissen dieser Arbeit.

Die Allele OCT1*1 und OCT1*2 waren analog zu den in dieser Arbeit gemessenen *in-vitro*-Daten voll funktionsfähig, es wurden keine erhöhten Plasmakonzentrationen C_{\max} von Sumatriptan beobachtet. Auch bei Probanden, die nur ein als inaktiv klassifiziertes Allel trugen, wurden keine erhöhten Plasmakonzentration von Sumatriptan gemessen. Bei Probanden mit zwei inaktiven Allelen (OCT1*3, OCT1*4, OCT1*5 oder OCT1*6) konnten hingegen durchschnittlich um 176% erhöhte maximale Plasmakonzentrationen und um 215% erhöhte AUCs nachgewiesen werden. Die gemessenen Differenzen sind vergleichbar zu den bei schwer leberinsuffizienten Patienten beobachteten Änderungen der Pharmakokinetik von Sumatriptan (Tabelle 4.2). Auffällig ist, dass bereits die für das OCT1*3 Allel *in vitro* beobachtete Reduktion

der Transportleistung ausreicht, um zu erhöhten Sumatriptanplasmakonzentrationen zu führen.

Die Leber ist das wichtigste Organ für die Metabolisierung von Sumatriptan. Sumatriptan gelangt als aktive Substanz in das Blut und wird hauptsächlich durch das Enzym Monoaminoxidase A (MAO-A) in seinen inaktiven Metaboliten überführt. Alle Organsysteme mit MAO-A-Expression sind daher grundsätzlich in der Lage, Sumatriptan zu metabolisieren (Dixon et al. 1994, Fowler et al. 1991). Vergleicht man die mRNA-Menge der MAO-A in verschiedenen Organsystemen, findet man die größte Menge im Magen-Darm-Trakt gefolgt von Plazenta, Lunge und Muskel. In der Leber ist hingegen eher wenig mRNA der MAO-A nachweisbar (Grimsby et al. 1990). Die quantitative Bestimmung der MAO-A-mRNA lässt daher nicht sicher den Schluss zu, dass die Leber der wichtigste Ort der Metabolisierung von Sumatriptan ist. Betrachtet man zusätzlich die tatsächliche Proteinmenge des Enzyms, ist eine hauptsächlich hepatische Metabolisierung aber wahrscheinlich. In der Leber wurden mit etwa 5 pmol/mg Protein die größten Mengen an MAO-A-Protein nachgewiesen, die Konzentration in den restlichen Organen (z.B. 0,5-2,5 pmol/mg Protein im Duodenum, 2 pmol/mg Protein in der Milz) ist deutlich geringer (Saura et al. 1996).

Der Leber kommt eine zentrale Rolle in der Metabolisierung von Sumatriptan zu. Es ist jedoch nicht sicher, was letztendlich zu der deutlich veränderten Pharmakokinetik von Sumatriptan in Probanden mit zwei inaktiven OCT1-Allelen führt. Ursächlich könnte ein verminderter hepatischer First-Pass-Effekt, ein verändertes Verteilungsvolumen oder eine veränderte systemische Elimination von Sumatriptan sein. Nach oraler Gabe von Sumatriptan können innerhalb von 24 Stunden ausgehend von der

Tabelle 4.2 – Auswirkungen einer Leberinsuffizienz auf die Pharmakokinetik von Triptanen

Triptan	<i>in-vitro</i> -Daten (x-fach pcDNA5)	Leberinsuff. Pat.		Referenz
		(AUC)	(C _{max})	
Eletriptan	1,24 ± 0,09	+ 34%	+ 18%	(Pfizer Canada Inc. 2013)
Naratriptan	54,4 ± 6,33	+ 40%	o.A.	(GlaxoSmithKline Inc. 2014a)
Rizatriptan	6,09 ± 0,31	o.A.	+ 30%	(Merck Canada Inc. 2013)
Sumatriptan	29,6 ± 2,07	+ 181%	+ 176%	(GlaxoSmithKline Inc. 2014b)
Zolmitriptan	10,4 ± 0,41	+ 226%	+ 47%	(AstraZeneca Canada Inc. 2014)

x-fach pcDNA5, Vielfaches der Triptanaufnahme in den OCT1-überexprimierenden Zellen im Vergleich zu den pcDNA5-Kontrollzellen; AUC, Zunahme der Area Under Curve der Triptane bei Patienten mit schwerer Leberinsuffizienz im Vergleich zu lebergesunden Patienten; C_{max}, Zunahme der maximalen Plasmakonzentration der Triptane bei Patienten mit schwerer Leberinsuffizienz im Vergleich zu lebergesunden Patienten; o.A., ohne Angabe

gegebenen Dosis im Urin 2% unverändertes Sumatriptan und 35% des Metaboliten nachgewiesen werden. Demgegenüber wurden nach subkutaner Applikation von Sumatriptan 22% der Ausgangsdosis Sumatriptan und 41,2% des Metaboliten im Urin gefunden (Lacey et al. 1995). Nach 96 Stunden sind im Urin 57,2% der verabreichten Dosis nachweisbar (Sumatriptan und Metabolit) (Dixon et al. 1994). Diese Daten weisen auf eine hohe First-Pass-Metabolisierungsrate nach oraler Gabe von Sumatriptan hin. Dafür spricht auch der höhere Anteil unveränderten Sumatriptans in den Ausscheidungen nach intravenöser Applikation im Vergleich zu oraler Applikation von Sumatriptan (Dixon et al. 1994). Gleichzeitig können im Tiermodell nach intravenöser Gabe von radioaktiv markiertem Sumatriptan sehr hohe Konzentrationen dieses Sumatriptans in der Leber beobachtet werden (Dixon et al. 1993). Dadurch hätte ein verminderter Transport von Sumatriptan in die Leber auch ein vermindertes Verteilungsvolumen zur Folge. Die renale Elimination von nicht metabolisiertem Sumatriptan macht maximal 20% der gesamten Elimination von Sumatriptan aus (Lacey et al. 1995). Damit spielt auch für die Elimination von Sumatriptan die Leber sicherlich eine große Rolle.

Bei Patienten mit Leberfunktionsstörungen können Unterschiede in den Plasmaspiegeln nach subkutaner und oraler Gabe von äquivalenten Dosen Sumatriptan nachgewiesen werden (GlaxoSmithKline Inc. 2014b). Während nach subkutaner Gabe die Plasmakonzentration zwischen leberinsuffizienten und lebergesunden Patienten vergleichbar war, wurde nach oraler Gabe eine erhöhte Plasmakonzentration in der Patientengruppe mit Leberfunktionsstörungen gemessen. Bei diesen Patienten war zudem die AUC nach oraler Gabe im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht (Tabelle 4.2). Für Patienten mit beeinträchtigter Leberfunktion ist die orale Gabe von Sumatriptan daher kontraindiziert, diese würde zu deutlich erhöhten maximalen Plasmaspiegeln führen (GlaxoSmithKline Inc. 2014b). Die Beeinträchtigung der Metabolisierung bzw. die Zunahme der Plasmakonzentration ist dabei vergleichbar mit den Veränderungen in der Sumatriptankinetik bei den gesunden Probanden mit zwei inaktiven OCT1-Allelen aus der Studie (Tabelle 4.2).

Für die Therapie von Migränepatienten lassen sich aus diesen Ergebnissen zwei Überlegungen ableiten. Zum einen sollten Träger von zwei inaktiven Allelen möglicherweise auf die orale Einnahme von Sumatriptan verzichten oder entsprechend den Anweisungen des Herstellers für Patienten mit Leberschäden die orale Therapie mit verringerten Dosen beginnen (GlaxoSmithKline Inc. 2014b). Alternativ ist wie auch bei Patienten mit Leberschäden die subkutane Applikation von Sumatriptan zu empfehlen (GlaxoSmithKline Inc. 2014b). Zum anderen könnten sich positive

Effekte für die Therapie ergeben. Wenn Sumatriptan langsamer metabolisiert wird, werden schneller ausreichend hohe Plasmaspiegel erreicht. Das wird als ein wichtiges Kriterium für eine gelungene Therapie mit Triptanen angesehen (Dodick 2005).

Diese Überlegungen auf Basis der *in vitro* und *in vivo* gewonnenen Daten sind jedoch spekulativ und sollten in weiteren klinisch-randomisierten Studien überprüft werden.

4.4 Migräneprophylaktika beeinflussen die zelluläre Aufnahme von Sumatriptan durch den OCT1

Der Transport von Sumatriptan durch den OCT1 kann durch andere Medikamente inhibiert werden. Lässt sich *in vitro* eine Inhibition des Transports von Sumatriptan zeigen, findet eine solche Interaktion möglicherweise auch *in vivo* statt. Werden zwei oder mehr parallel verabreichte Substanzen über den gleichen Transporter in Hepatozyten aufgenommen, kann der Transport jeder dieser Substanzen beeinträchtigt werden. Wird dadurch die Aktivierung oder Inaktivierung einer Substanz verlangsamt oder beschleunigt, kann das zu unerwünschten Arzneimittelwirkungen führen. Diese Wechselwirkungen sind für den organischen Kationentransporter OCT1 schon für einige Medikamente gezeigt worden. So kommt es bei gleichzeitiger Inkubation von OCT1-überexprimierenden Zellen mit Morphin und Irinotecan, Ondansetron oder Verapamil zu einer Inhibition der OCT1-vermittelten Aufnahme von Morphin (Tzvetkov et al. 2013). Die Aufnahme von Metformin in OCT1-überexprimierende Zellen kann durch Repaglinid inhibiert werden (Bachmakov et al. 2008).

Die untersuchten Medikamente zur Prophylaxe bei Migräne oder gegen Übelkeit während einer Migräneattacke unterschieden sich stark in ihrem Einfluss auf die Aufnahme von Sumatriptan über den OCT1. Während für Flunarizin, Bisoprolol, Metoprolol und Gabapentin kein inhibitorischer Effekt auf die OCT1-vermittelte Aufnahme von Sumatriptan gemessen werden konnte, zeigten Amitriptylin, Propranolol, Domperidon und Metoclopramid eine vergleichbare oder sogar stärkere Inhibition des Sumatriptantransports als die Modellsubstanz MPP⁺ (Abbildung 3.6). Die Plasmakonzentrationen der vier Medikamente sind bei normaler Dosierung allerdings zu niedrig, um auch *in vivo* Wechselwirkungen am OCT1 mit Sumatriptan hervorrufen zu können (Tabelle 4.3). Nach oraler Gabe erreichen Medikamente in der Pfortader häufig jedoch deutlich höhere Konzentrationen. Relevante Interaktionen in der Leber von parallel applizierten Medikamenten können ab einer maximalen Pfortaderkonzentration ($C_{\max \text{ port. unb.}}$) von 10% der mittleren inhibitorischen Konzentration IC_{50}

nicht mehr ausgeschlossen werden ($C_{\max \text{ port. unb.}}/IC_{50} \geq 0,1$) (Tweedie et al. 2013). Die Versuche legen eine nach dieser Definition mögliche Interaktion am OCT1 für Amitriptylin, Propranolol und Metoclopramid nahe. Für Domperidon sind auch dann keine Wechselwirkungen zu erwarten ($C_{\max \text{ port. unb.}}/IC_{50} < 0,1$).

Tabelle 4.3 – Vergleich der Inhibitionspotentiale (IC_{50}) einer Auswahl von Migräneprophylaktika

	Amitriptylin	Propranolol	Metoclopramid	Domperidon
IC_{50} [μ M]	3,47	6,20	15,9	32,8
orale Dosis [mg]	100	80	20	10
$C_{\max \text{ unb.}}$ [μ M]	0,012	0,022	0,160	0,004
$C_{\max \text{ unb.}}/IC_{50}$	0,0039	0,0036	0,0084	0,0001
$C_{\max \text{ port. unb.}}$ [μ M]	1,19	1,99	2,62	0,12
$C_{\max \text{ port. unb.}}/IC_{50}$	0,34	0,32	0,16	0,004

$C_{\max \text{ unb.}}$, maximale Plasmakonzentration des frei im Plasma vorliegenden Medikaments;
 $C_{\max \text{ port. unb.}}$, maximale Plasmakonzentration des frei im Plasma vorliegenden Medikaments in der Vena Portae Hepatis.

Die maximalen Plasmakonzentrationen und die Proteinbindungsraten der Medikamente wurden aus „Goodman and Gilman’s - The Pharmacological Basis of Therapeutics“ (Brunton et al. 2005) entnommen. Die Werte für Domperidon sind dem Paper „Pharmacokinetics and dose proportionality of domperidone in healthy volunteers“ (Huang et al. 1986) entnommen.

Auch wenn *in vitro* eine deutliche Inhibition des Transports von Sumatriptan gezeigt werden konnte, sind die Folgen für Patienten *in vivo* nicht sicher abzuschätzen. Zu erwarten wäre eine höhere maximale Plasmakonzentration und eine größere AUC auf Grund der langsameren Aufnahme von Sumatriptan in die Hepatozyten. Für Sumatriptan und Propranolol konnten allerdings in einer Patientenstudie keine Arzneimittel-Wechselwirkungen nachgewiesen werden (Scott et al. 1991). In dieser Studie wurde jedoch nur eine geringe Dosis Propranolol (80 mg) bei einer gleichzeitig sehr hohen Sumatriptandosis (300 mg) verabreicht. Andere Studien konnten *in vivo* sowohl für Rizatriptan als auch für Zolmitriptan eine Veränderung der Pharmakokinetik nach gleichzeitiger Gabe von höheren Dosen Propranolol (120 - 160 mg) zeigen (Goldberg et al. 2001, Peck et al. 1997). Die Autoren dieser Studien machen vor allem die Inhibitionswirkung von Propranolol an verschiedenen CYP-Enzymen und der Monoaminoxidase-A für die vergrößerte AUC und die höheren maximalen Plasmakonzentrationen C_{\max} verantwortlich. Die Ergebnisse dieser Arbeit können einen weiteren Erklärungsansatz liefern. Es konnte für alle Triptane ein Transport durch den OCT1 gezeigt werden. Propranolol kann den Transport von Sumatriptan durch den OCT1 inhibieren und es ist möglich, dass Propranolol auch den Transport von

anderen Triptanen am OCT1 inhibieren kann. Möglicherweise führt also eine Kombination aus Transport- und Enzymhemmung durch Propranolol zu einer veränderten Pharmakokinetik der Triptane.

In dieser Arbeit wurden nur typischerweise mit Sumatriptan verabreichte Medikamente auf Interaktionen am OCT1 untersucht. Grundsätzlich könnten jedoch auch beliebige andere Substanzen zusammen mit Sumatriptan verabreicht werden und den OCT1-vermittelten Transport von Sumatriptan inhibieren. Es ist eine Vielzahl weiterer klinischer Medikamente beschrieben, die den Transport von Modellsubstanzen wie MPP⁺ und ASP⁺ oder klinisch relevanter Medikamente wie Morphin beeinflussen können. Darunter fallen verschiedenste Substanzen wie Tropisetron, Irinotecan oder Fluoxetin (Tzvetkov et al. 2013). Diese Medikamente sind somit auch potentielle Inhibitoren des OCT1-vermittelten Sumatriptantransports und sollten daher auf ihr Interaktionspotential untersucht werden.

Sumatriptan hat eine hohe Affinität zum OCT1. Wenn die Aufnahme von Sumatriptan durch OCT1-vermittelten Transport von den vier oben genannten Medikamenten gehemmt werden kann, ist auch für andere Substrate des OCT1 eine Inhibition durch diese Medikamente denkbar. Für Amitriptylin, Metoclopramid und Propranolol wurde eine Inhibition der Aufnahme des Modellsubstrats ASP⁺ gezeigt (Ahlin et al. 2008). Auch die Stärke der Inhibition verhält sich ähnlich wie für Sumatriptan: Während Amitriptylin in der Untersuchung das stärkste Potential zur Inhibition zeigt, sind Metoclopramid und Propranolol schwächere Inhibitoren. Für Domperidon ist eine Inhibition der organischen Kationentransporter OCT2, MATE1 und MATE2K beschrieben, bisher wurde aber keine direkte Arzneimittel-Wechselwirkung am OCT1 gezeigt (Wittwer et al. 2013). Es ist daher überlegenswert, die Inhibitoren der OCT1-vermittelten Sumatriptanaufnahme auch auf Interaktionen mit anderen bekannten Substraten des OCT1 zu prüfen.

4.5 Bedeutung des OCT1 für den Transport anderer Triptane

Neben Sumatriptan sind auch Naratriptan, Rizatriptan und Zolmitriptan Substrate des OCT1. Für Sumatriptan, Naratriptan, Rizatriptan und Zolmitriptan konnte eine 6- bis 54-fach erhöhte intrazelluläre Konzentration in OCT1-überexprimierenden HEK293-Zellen gegenüber pcDNA5-Kontrollzellen gemessen werden (Abbildung 3.9).

Damit unterliegen diese Triptane einem Transport durch den OCT1. Eletriptan erreichte in beiden Zelllinien ähnliche Konzentrationen, damit findet vermutlich kein oder nur ein sehr geringer Transport statt (Abbildung 3.10).

Die Medikamentengruppe der Triptane ist durch eine hohe Ähnlichkeit zwischen den einzelnen Vertretern gekennzeichnet. Die Basis bildet ein Indolring, die chemischen Eigenschaften der Restgruppen an Position 3' und 5' unterscheiden sich nicht wesentlich. Im Zentrum der Restgruppe an Position 3' steht eine Aminogruppe, die Restgruppe an Position 5' ist tendenziell hydrophil. Diese Eigenschaften werden mit einer hohen Affinität zum OCT1 in Verbindung gebracht (Jonker und Schinkel 2004).

Eletriptan weicht von diesem Schema ab. Es ist wesentlich lipophiler als die anderen Triptane (Tabelle 3.3) und kann alleine durch Diffusion sehr hohe Konzentrationen in Zellen erreichen. Die in den Kontrollzellen gemessene Konzentration überstieg die von Sumatriptan oder den anderen Triptanen in den OCT1-überexprimierenden Zellen um das 1,1- bis 3,5-Fache. Damit ist der OCT1 für den Transport von Eletriptan in Hepatozyten irrelevant. Ein gegensätzliches Bild zeigte sich für die anderen Triptane, insbesondere Naratriptan unterlag einem starken Transport durch OCT1 (Abbildung 3.10).

Da Naratriptan, Rizatriptan und Zolmitriptan einem Transport durch den OCT1 unterliegen, kann davon ausgegangen werden, dass für diese Triptane der Transport bei inaktiven Allelen des OCT1 in ähnlicher Weise eingeschränkt ist wie für Sumatriptan. Wie auch nach oraler Gabe von Sumatriptan erreichen diese Triptane bei Patienten mit Leberinsuffizienz höhere Plasmaspiegel als bei Lebergesunden (Tabelle 4.2). Die untersuchten Triptane werden entweder durch die Monoaminoxidase A metabolisiert oder im Fall von Eletriptan und Naratriptan durch Cytochrom-P450 Enzyme. Diese Enzyme sind vor allem in der Leber exprimiert, somit ist die Leber vermutlich auch das zentrale Organ zur Metabolisierung dieser Triptane (Nishimura et al. 2003, Saura et al. 1996). Der größte Effekt bei Patienten mit inaktiven OCT1-Allelen wäre wegen der im Vergleich zu den anderen Triptanen extrem hohen Transportrate für Naratriptan zu erwarten. Da Naratriptan nur zu etwa 30% in der Leber metabolisiert und zu 50% unverändert renal ausgeschieden wird, beobachtet man bei leberinsuffizienten Patienten jedoch nur eine um 40% höhere AUC (Dulli 1999, GlaxoSmithKline Inc. 2014a). Inaktive OCT1-Allele haben daher vermutlich einen geringeren Einfluss auf die Pharmakokinetik als es bei Sumatriptan der Fall ist. Rizatriptan und Zolmitriptan unterlagen einem Transport durch den OCT1, die Transportrate war mit dem 6,1- bzw. 10,4-Fachen geringer als die von Sumatriptan (Tabelle 4.2). Leberinsuffiziente Patienten hatten nach Gabe von Rizatriptan eine um

30% erhöhte maximale Plasmakonzentration. Für Zolmitriptan wurde bei leberinsuffizienten Patienten eine um 226% vergrößerte AUC gemessen. Wenn der OCT1 in Hepatozyten der wichtigste Transporter für Rizatriptan und Zolmitriptan ist, wäre eine Veränderung der Pharmakokinetik im Sinne von erhöhten Plasmakonzentrationen zu erwarten.

4.6 Triptane als Inhibitoren des OCT1

In dieser Arbeit wurde die Inhibition der Aufnahme des Modellsubstrats MPP⁺ in OCT1-überexprimierende Zellen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Triptane mit Ausnahme von Zolmitriptan potente Inhibitoren des OCT1 sind (Abbildung 3.8).

Damit Triptane *in vivo* eine Inhibition des OCT1-vermittelten Transports eines Medikamentes herbeiführen können, müssen ausreichend hohe Konzentrationen des Triptans an den Hepatozyten erreicht werden. Hierfür wurde die maximale Pfortaderkonzentration betrachtet und mit der mittleren inhibitorischen Konzentration verglichen (Tabelle 4.4). Für Naratriptan, Rizatriptan und Zolmitriptan liegt der Quotient aus $C_{\max \text{ port. unb.}}$ und IC_{50} deutlich unter der geltenden Schwelle ($C_{\max \text{ port. unb.}}/IC_{50} > 0,1$ (Tweedie et al. 2013)). Für diese Triptane ist eine Arzneimittel-Wechselwirkung *in vivo* sehr unwahrscheinlich. Jedoch liegt der für Sumatriptan und Eletriptan errechnete $C_{\max \text{ port. unb.}}/IC_{50}$ -Quotient über diesem Grenzwert, damit ist eine Interaktion dieser Triptane mit anderen Medikamenten denkbar. Da hier nur die Inhibition der Aufnahme von MPP⁺ untersucht wurde, lässt sich lediglich eine Tendenz ableiten. Ein fragliches Medikament müsste in gesonderten Experimenten auf eine Inhibition des Transports durch Triptane untersucht werden.

Tabelle 4.4 – Inhibitorisches Potential von Triptanen am OCT1

	Eletriptan	Naratriptan	Rizatriptan	Sumatriptan	Zolmitriptan
IC_{50} [μM]	6,81	25,3	41,0	46,5	> 1000
Dosis [mg]	80	2,5	10	100	5
$C_{\max \text{ unb.}}$ [μM]	0,061	0,015	0,044	0,157	0,017
$C_{\max \text{ unb.}}/IC_{50}$	0,0089	0,0006	0,0011	0,0034	< 0,0001
$C_{\max \text{ port. unb.}}$ [μM]	1,65	0,31	1,39	9,11	0,82
$C_{\max \text{ port. unb.}}/IC_{50}$	0,24	0,01	0,03	0,20	< 0,01

$C_{\max \text{ unb.}}$, maximale Plasmakonzentration des frei im Plasma vorliegenden Medikaments;
 $C_{\max \text{ port. unb.}}$, maximale Plasmakonzentration des frei im Plasma vorliegenden Medikaments in der Vena Portae Hepatis.

Die maximalen Plasmakonzentrationen und die Proteinbindungsdaten der Triptane stammen aus: (Dixon und Warrander 1997, GlaxoSmithKline Inc. 2014a,b, Merck Canada Inc. 2013, Pfizer Canada Inc. 2013)

MPP⁺ besitzt eine hohe Affinität zum OCT1. Eine Interaktion der Triptane mit anderen Medikamenten mit vergleichbarer oder schlechterer Affinität als MPP⁺ zum OCT1 ist deswegen denkbar. Bekannte Substrate des OCT1, für die ein Transport durch OCT1 direkt gezeigt wurde, sind beispielsweise Morphin, Metformin oder Amisulprid. Während Morphin mit einem K_M -Wert von 3,4 μM (Tzvetkov et al. 2013) eine höhere Affinität zum OCT1 als MPP⁺ aufweist, hat Amisulprid eine vergleichbare (K_M : 31,3 μM (Pereira et al. 2014)) und Metformin eine viel geringere Affinität zum OCT1 (K_M : 1470 μM (Shu et al. 2007)). Wenn die Inhibition des Transports wesentlich von der Affinität des Substrats zum Transporter abhängig ist, wäre für Morphin nur eine geringe und für Metformin eine stärkere Inhibition durch Triptane zu erwarten. Die Aufnahme von Amisulprid würde sich durch Sumatriptan ähnlich wie die Aufnahme von MPP⁺ inhibieren lassen.

Diese Art der Vorhersage ist jedoch nur bedingt richtig, eine vergleichbare Affinität zum OCT1 muss aufgrund der verschiedenen Substratbindungsstellen am OCT1 nicht zwingend auch zu einer vergleichbaren Inhibition durch die Triptane führen (Kopsell 2011). Beispielhaft können hier Zolmitriptan und Eletriptan angeführt werden. Zolmitriptan zeigte im Inhibitionsexperiment mit MPP⁺ praktisch keine Inhibition, es ist jedoch ein Substrat des OCT1. Es bindet möglicherweise an anderer Stelle des OCT1 als MPP⁺ und kann so zwar transportiert werden, die Aufnahme von MPP⁺ in Zellen aber nicht beeinflussen.

Umgekehrt fällt das hohe inhibitorische Potential von Eletriptan bei einer gleichzeitig nur sehr geringen Transportrate auf (Abbildung 3.8, Abbildung 3.10). Eletriptan könnte den Transport von MPP⁺ im Sinne einer allosterischen Inhibition beeinflussen, ohne selbst Substrat des OCT1 zu sein. Die alleinige Betrachtung der Transportrate lässt diesen Schluss aber nicht sicher zu. Eletriptan könnte trotz des lipophilen Charakters einem Transport unterliegen, da sich die Transportrate nur aus dem Quotienten der intrazellulären Konzentrationen zwischen den beiden Zelllinien (OCT1-überexprimierende Zellen und pcDNA5-Kontrollzellen) errechnet. Ein Transport und somit auch eine hohe Affinität zum OCT1 würde durch die gute Membrangängigkeit von Eletriptan in einem solchen Versuchsaufbau maskiert werden. Um diese Frage zu klären, müsste man eine genaue Untersuchung der Substratbindungsstelle von Eletriptan am OCT1 durchführen.

4.7 Sumatriptan und die Blut-Hirn-Schranke

Für Sumatriptan werden auch zentrale Wirkungen postuliert (Kaube et al. 1993). Um diese entfalten zu können, muss es über die Blut-Hirn-Schranke gelangen. Sumatriptan ist jedoch kaum membrangängig und in früheren Versuchen konnte ein zentraler Effekt nur nach Zerstörung der Blut-Hirn-Schranke nachgewiesen werden (Kaube et al. 1993). Die Auswertung der klinischen Erfahrungen haben jedoch gezeigt, dass es unter Sumatriptan häufiger zu zentralen Nebenwirkungen wie Verwirrtheit, Schwindel oder lebhaften Träumen kam als unter Placeboeinsatz (Ferrari et al. 2002). Das kann als Beleg für zentrale Effekte gesehen werden und ist somit ein Hinweis für eine Überwindung der Blut-Hirn-Schranke durch Sumatriptan. Man geht jedoch nicht davon aus, dass die Blut-Hirn-Schranke, wie früher vermutet, während einer Migräne-Attacke geschädigt wird (Edvinsson und Tfelt-Hansen 2008). Für einige Triptane konnte bereits nachgewiesen werden, dass sie in den durch die Blut-Hirn-Schranke geschützten Bereich des Gehirn gelangen können, um eine Wirkung an Serotoninrezeptoren zu entfalten (Tfelt-Hansen 2010). Eletriptan, Zolmitriptan und Sumatriptan wurden nach intravenöser Gabe im Kortex von Ratten nachgewiesen (Johnson et al. 2001). Für lipophile Moleküle wie Eletriptan ist Diffusion ein Weg, um über die Blut-Hirn-Schranke zu gelangen. Sumatriptan kann jedoch als hydrophiles Molekül die Membran der Endothelzellen kaum per Diffusion überwinden, daher kann ein Transport vermutet werden. Für Sumatriptan wurde bereits ein Transport durch den in den Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke exprimierten organischen Anionentransporter OATP1A2 gezeigt (Cheng et al. 2012). Es gibt Hinweise, dass der OCT1 ebenfalls in der Membran der Endothelzellen exprimiert ist (Dickens et al. 2012, Lin et al. 2010). Sumatriptan kann also möglicherweise mit Hilfe dieser beiden Transporter über die Blut-Hirn-Schranke gelangen und zentrale Effekte direkt an Neuronen auslösen.

4.8 Limitierungen und Ausblick

In-vitro-Studien können nur einen Teil der Vorgänge in Organismen abbilden und sind daher nur beschränkt auf Menschen übertragbar. *In vivo* kann es Einflüsse geben, die in *in-vitro*-Studien nicht berücksichtigt werden können oder sollen.

In den Versuchen konnte ein Transport von Sumatriptan durch OCT1 gemessen werden, der Leitsubstanz aus der Medikamentengruppe der Triptane. Die für diese Arbeit durchgeführten Experimente haben aber große Unterschiede im Bezug auf die Transportkinetik der Triptane am OCT1 gezeigt. Eine mögliche Weiterführung der

Forschung wären daher Transportexperimente mit den Triptanen der 2. Generation an Hepatozyten und die Bestimmung der Transportkinetik dieser Triptane am OCT1. Darüber hinaus sollten auch die verschiedenen Allelvarianten des OCT1 auf die Transportleistung für diese Triptane untersucht werden.

Die in dieser Arbeit beobachteten Interaktionen zwischen Migräneprophylaktika und Sumatriptan sind ein starker Hinweis auf mögliche Interaktionen *in vivo*. Ob tatsächlich relevante Interaktionen auftreten, müsste durch entsprechende Inhibitionsexperimente im Tiermodell und klinischen Studien untersucht werden. Des Weiteren wäre auch die Identifikation weiterer Inhibitoren des OCT1-vermittelten Triptantransports ein sinnvoller Anknüpfungspunkt, um Aussagen über Interaktionen der Triptane am OCT1 mit weiteren Medikamenten treffen zu können. Domperidon konnte als Inhibitor des OCT1 identifiziert werden, auch für dieses Medikament wäre eine genauere Klassifizierung der Enzymkinetik am OCT1 interessant.

Mit Blick auf die Ergebnisse dieser Arbeit und denen der durchgeführten klinischen Studie wäre eine weitere klinische Studie wünschenswert, in der die Pharmakokinetik von Sumatriptan genauer betrachtet wird. So könnte die Aufnahme, Metabolisierung und Elimination von Sumatriptan in Probanden mit zwei inaktiven Allelen durch Analyse der Ausscheidungen und Plasmakonzentrationen vergleichend nach oraler und intravenöser Gabe von Sumatriptan untersucht werden. Perspektivisch könnte zudem untersucht werden, ob Migränepatienten, die unter starken Nebenwirkungen einer Triptantherapie leiden, einen auffälligen OCT1-Status aufweisen. Ein besonderes Augenmerk sollte dann auf die alternativ verabreichten Medikamente oder Triptane gelegt werden. Dadurch könnten möglicherweise Rückschlüsse auf den Zusammenhang zwischen dem Erfolg einer triptanbasierten Migränetherapie und der OCT1-Transportaktivität gezogen werden.

Kapitel 5

Zusammenfassung

Migräne ist mit einer weltweiten Prävalenz von 10% eine häufige Erkrankung und führt alleine in Deutschland zu volkswirtschaftlichen Gesamtkosten von geschätzt 6,72 Mrd. Euro pro Jahr. Für die Behandlung der Migräne spielen Triptane eine entscheidende Rolle. Am häufigsten wird in Deutschland das älteste Triptan Sumatriptan verschrieben. Sumatriptan unterliegt einem hohen First-Pass-Effekt, der auf einen ausgeprägten Lebermetabolismus zurückzuführen ist. Sumatriptan ist ein hydrophiles Molekül, das nur begrenzt durch zelluläre Membranen diffundieren kann und auf einen aktiven Transport angewiesen ist. Es liegt bei physiologischem pH-Wert zu mehr als 95% in seiner protonierten Form als Kation vor. Der in der Leber am stärksten exprimierte organische Kationentransporter ist der OCT1. Dieser ist genetisch sehr polymorph und Varianten des OCT1 beeinflussen die Pharmakokinetik und Wirkung von verschiedenen Medikamenten wie Metformin, Morphin, Tramadol und Tropisetron.

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob Sumatriptan einem hepatischen Transport durch den humanen organischen Kationentransporter OCT1 unterliegt und ob Polymorphismen des OCT1 einen Einfluss auf die Transportaktivität von Sumatriptan haben. Darüber hinaus wurden Arzneimittel-Wechselwirkungen von typischen Komedikamenten und Sumatriptan am OCT1 untersucht und der Transport anderer Triptane durch den OCT1 betrachtet.

Für die Experimente wurden primäre humane Hepatozyten und HEK293-Zellen, die den Wildtyp und Allelvarianten des OCT1 überexprimierten, verwendet. Es wurden 14 verschiedene Allelvarianten des OCT1 untersucht: OCT1-Allel *1 bis *7 und *9 bis *15. Die Zellen wurden mit Sumatriptan inkubiert und die zelluläre Aufnahme von Sumatriptan mittels HPLC-MS/MS quantifiziert.

Die Aufnahme von Sumatriptan in primäre humane Hepatozyten lässt sich durch das OCT1-Modellsubstrat MPP⁺ inhibieren. In hOCT1-überexprimierenden Zellen ist die Aufnahme von Sumatriptan zeit- und konzentrationsabhängig und folgt einer typischen Michaelis-Menten-Kinetik ($K_M = 55,4 \pm 7,89 \mu\text{M}$, $v_{\text{max}} = 977,7 \pm 131,6 \text{ pmol/mg Protein/min}$). Sumatriptan unterliegt einem Transport durch den hepatischen organischen Kationentransporter OCT3. Die Transportleistung ist im Vergleich zum OCT1 jedoch deutlich geringer ($K_M = 75,4 \pm 6,15 \mu\text{M}$, $v_{\text{max}} = 90,2 \pm 20,28 \text{ pmol/mg Protein/min}$). Die OCT1-vermittelte Aufnahme von Sumatriptan ist für die Allele OCT1*3 und OCT1*13 vermindert und für die Allele OCT1*4, OCT1*5, OCT1*6, OCT1*12, OCT1*14 und OCT1*15 vollständig aufgehoben. Die restlichen untersuchten Allele zeigen eine gegenüber dem OCT1*1-Wildtypallel nicht veränderte Aufnahme von Sumatriptan. Der Sumatriptantransport durch OCT1 kann durch die Migräneprophylaktika Amitriptylin ($\text{IC}_{50} = 3,47 \pm 0,08 \mu\text{M}$) und Propranolol ($\text{IC}_{50} = 6,20 \pm 0,06 \mu\text{M}$) und die Antiemetika Domperidon ($\text{IC}_{50} = 32,8 \pm 7,44 \mu\text{M}$) und Metoclopramid ($\text{IC}_{50} = 15,9 \pm 8,93 \mu\text{M}$) inhibiert werden. Die Zweitgenerationstriptane Naratriptan, Rizatriptan und Zolmitriptan unterliegen ebenfalls einem Transport durch den OCT1. Dabei beobachtet man für Naratriptan die höchste Transportrate. Es erreicht eine um Faktor 54,4-fach höhere Konzentration in OCT1-überexprimierenden Zellen gegenüber Kontrollzellen.

Der organische Kationentransporter OCT1 ist ein high-capacity-Transporter von Sumatriptan und für die Aufnahme von Sumatriptan in die Leber entscheidend. Polymorphismen des OCT1 können diese Aufnahme stark beeinflussen, ebenso typische Komedikationen in der Migränetherapie. Auch Zweitgenerationstriptane unterliegen einem Transport durch den OCT1.

Kapitel 6

Literaturverzeichnis

- Abu-Arefeh I, Russell G (1994): Prevalence of headache and migraine in schoolchildren. *BMJ* 309(6957) 765–769
- Adham N, Kao HT, Schechter LE, Bard J, Olsen M, Urquhart D, Durkin M, Hartig PR, Weinshank RL, Branchek TA (1993): Cloning of another human serotonin receptor (5-HT_{1F}): a fifth 5-HT₁ receptor subtype coupled to the inhibition of adenylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA* 90(2) 408–412
- Ahlin G, Karlsson J, Pedersen JM, Gustavsson L, Larsson R, Matsson P, Norinder U, Bergström CAS, Artursson P (2008): Structural requirements for drug inhibition of the liver specific human organic cation transport protein 1. *J Med Chem* 51(19) 5932–5942
- Ahlin G, Chen L, Lazorova L, Chen Y, Ianculescu AG, Davis RL, Giacomini KM, Artursson P (2011): Genotype-dependent effects of inhibitors of the organic cation transporter, OCT1: predictions of metformin interactions. *Pharmacogenomics J* 11(6) 400–411
- Amphoux A, Vialou V, Drescher E, Brüß M, Mannoury La Cour C, Rochat C, Millan MJ, Giros B, Bönisch H, Gautron S (2006): Differential pharmacological in vitro properties of organic cation transporters and regional distribution in rat brain. *Neuropharmacology* 50(8) 941–952
- Anthony M, Hinterberger H, Lance JW (1967): Plasma serotonin in migraine and stress. *Arch Neurol* 16(5) 544–552
- Arulmani U, MaassenVanDenBrink A, Villalón CM, Saxena PR (2004): Calcitonin gene-related peptide and its role in migraine pathophysiology. *Eur J Pharmacol* 500(1–3) 315–330

- AstraZeneca Canada Inc. (2014): Product Monograph Zomig[®]. AstraZeneca Canada Inc., 1004 Middlegate Road, Mississauga, Ontario L4Y 1M4. National Drug Code: 68462-498-3; Online erhältlich unter <http://www.astrazeneca.ca/en/Our-Medicines/en-Products-AZ>; abgerufen am 09. November 2015.
- Bachmakov I, Glaeser H, Fromm MF, König J (2008): Interaction of oral antidiabetic drugs with hepatic uptake transporters focus on organic anion transporting polypeptides and organic cation transporter 1. *Diabetes* 57(6) 1463–1469
- Balbisi EA (2006): Frovatriptan: A review of pharmacology, pharmacokinetics and clinical potential in the treatment of menstrual migraine. *Ther Clin Risk Manag* 2(3) 303–308
- Barnes NM, Sharp T (1999): A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* 38(8) 1083–1152
- Blau JN (1971): Migraine-Research. *BMJ* 2(5764) 751–754
- Bonaventure P, Voorn P, Luyten WHML, Jurzak M, Schotte A, Leysen JE (1997): Detailed mapping of serotonin 5-HT_{1B} and 5-HT_{1D} receptor messenger RNA and ligand binding sites in guinea-pig brain and trigeminal ganglion: clues for function. *Neuroscience* 82(2) 469–484
- Boxberger KH, Hagenbuch B, Lampe JN (2014): Common Drugs Inhibit Human Organic Cation Transporter 1 (OCT1)-Mediated Neurotransmitter Uptake. *Drug Metab Dispos* 42(6) 990–995
- Brunton LL, Lazo JS, Parker K: *Goodman and Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics*. McGraw-Hill Publ. Comp., Auflage: 11th ed., rev. New York 2005
- Burstein R, Jakubowski M, Levy D (2005): Anti-migraine action of triptans is preceded by transient aggravation of headache caused by activation of meningeal nociceptors. *Pain* 115(1-2) 21–28
- Busch AE, Quester S, Ulzheimer JC, Gorboulev V, Akhoundova A, Waldegger S, Lang F, Koepsell H (1996): Monoamine neurotransmitter transport mediated by the polyspecific cation transporter rOCT1. *FEBS Lett* 395(2-3) 153–156
- Cady R, Schreiber C (2006): Sumatriptan: update and review. *Expert Opin Pharmacother* 7(11) 1503–1514

- Cady RK, Wendt JK, Kirchner JR, Sargent JD, Rothrock JF, Skaggs H, Jr (1991): Treatment of acute migraine with subcutaneous sumatriptan. *JAMA* 265(21) 2831–2835
- Cheng Z, Liu H, Yu N, Wang F, An G, Xu Y, Liu Q, Guan Cb, Ayrton A (2012): Hydrophilic anti-migraine triptans are substrates for OATP1A2, a transporter expressed at human blood-brain barrier. *Xenobiotica* 42(9) 880–890
- Chester AH, Martin GR, Bodelsson M, Arneklo-Nobin B, Tadjkarimi S, Tornebrandt K, Yacoub MH (1990): 5-hydroxytryptamine receptor profile in healthy and diseased human epicardial coronary arteries. *Cardiovasc Res* 24(11) 932–937
- Christensen ML, Eades SK, Fuseau E, Kempford RD, Phelps SJ, Hak LJ (2001): Pharmacokinetics of naratriptan in adolescent subjects with a history of migraine. *J Clin Pharmacol* 41(2) 170–175
- Connor HE, Feniuk W, Humphrey PP (1989): 5-hydroxytryptamine contracts human coronary arteries predominantly via 5-HT₂ receptor activation. *Eur J Pharmacol* 161(1) 91–94
- Curran DA, Hinterberger H, Lance JW (1965): Total plasma serotonin, 5-hydroxyindoleacetic acid and p-hydroxy-m-methoxymandelic acid excretion in normal and migrainous subjects. *Brain* 88(5) 997–1010
- Dahlöf C, Maassen Van Den Brink A (2012): Dihydroergotamine, ergotamine, methysergide and sumatriptan – basic science in relation to migraine treatment. *Headache* 52(4) 707–714
- Damen L, Bruijn JKJ, Verhagen AP, Berger MY, Passchier J, Koes BW (2005): Symptomatic treatment of migraine in children: A systematic review of medication trials. *Pediatrics* 116(2) e295–e302
- DGN-Leitlinie: *Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie, LL55: Kopfschmerzen und andere Schmerzen*. Thieme Stuttgart 2012
- Dickens D, Owen A, Alfirevic A, Giannoudis A, Davies A, Weksler B, Romero IA, Couraud PO, Pirmohamed M (2012): Lamotrigine is a substrate for OCT1 in brain endothelial cells. *Biochem Pharmacol* 83(6) 805–814
- Dixon R, Warrander A (1997): The clinical pharmacokinetics of zolmitriptan. *Cephalalgia* 17(18 suppl) 15–20

- Dixon CM, Saynor DA, Andrew PD, Oxford J, Bradbury A, Tarbit MH (1993): Disposition of sumatriptan in laboratory animals and humans. *Drug Metab Dispos* 21(5) 761–769
- Dixon CM, Park GR, Tarbit MH (1994): Characterization of the enzyme responsible for the metabolism of sumatriptan in human liver. *Biochem Pharmacol* 47(7) 1253–1257
- Dodick DW (2005): Triptan nonresponder studies: Implications for clinical practice. *Headache* 45(2) 156–162
- Drozdik M, Gröer C, Penski J, Lapczuk J, Ostrowski M, Lai Y, Prasad B, Unadkat JD, Siegmund W, Oswald S (2014): Protein Abundance of Clinically Relevant Multidrug Transporters along the Entire Length of the Human Intestine. *Mol Pharm* 11(10) 3547–3555
- Duan H, Wang J (2010): Selective transport of monoamine neurotransmitters by human plasma membrane monoamine transporter and organic cation transporter 3. *J Pharmacol Exp Ther* 335(3) 743–753
- Dulli DA (1999): Naratriptan: An alternative for migraine. *Ann Pharmacother* 33(6) 704–711
- Edvinsson L, Tfelt-Hansen P (2008): The blood–brain barrier in migraine treatment. *Cephalalgia* 28(12) 1245–1258
- Ensink FB (1991): Subcutaneous sumatriptan in the acute treatment of migraine. sumatriptan international study group. *J Neurol* 238(1 suppl) S66–69
- Ferrari MD, Goadsby PJ, Roon KI, Lipton RB (2002): Triptans (serotonin, 5-HT_{1B/1D} agonists) in migraine: Detailed results and methods of a meta-analysis of 53 trials. *Cephalalgia* 22(8) 633–658
- Fowler PA, Lacey LF, Thomas M, Keene ON, Tanner RJ, Baber NS (1991): The clinical pharmacology, pharmacokinetics and metabolism of sumatriptan. *Eur Neurol* 31(5) 291–294
- Fukuda T, Chidambaran V, Mizuno T, Venkatasubramanian R, Ngamprasertwong P, Olbrecht V, Esslinger HR, Vinks AA, Sadhasivam S (2013): OCT1 genetic variants influence the pharmacokinetics of morphine in children. *Pharmacogenomics J* 14(10) 1141–1151

- Glaxo, Group Research Ltd. (1991): A randomized, double-blind comparison of sumatriptan and Cafergot in the acute treatment of migraine. The Multinational Oral Sumatriptan and Cafergot Comparative Study Group, Greenford, Middlesex, UK. *Eur Neurol.* 31(5) 314–322
- GlaxoSmithKline Inc. (2014a): Product Monograph Amerge®. GlaxoSmithKline Inc., 7333 Mississauga Road, Mississauga, Ontario L5N 6L4. National Drug Code: 0574-0214-09; Online erhältlich unter <http://www.gsk.ca/english/docs-pdf/product-monographs/Amerge.pdf>; abgerufen am 09. November 2015.
- GlaxoSmithKline Inc. (2014b): Product Monograph Imitrex®. GlaxoSmithKline Inc., 7333 Mississauga Road, Mississauga, Ontario L5N 6L4. National Drug Code: 0173-0736-01; Online erhältlich unter <http://www.gsk.ca/english/docs-pdf/product-monographs/Imitrex.pdf>; abgerufen am 09. November 2015.
- Goadsby PJ (2005): Migraine pathophysiology. *Headache* 45 14–24
- Goadsby PJ, Lipton RB, Ferrari MD (2002): Migraine—current understanding and treatment. *N Engl J Med* 346(4) 257–270
- Goebel H: *Migräne: Diagnostik - Therapie - Prävention*. Springer-Verlag, Berlin 2012
- Goldberg MR, Sciberras D, De Smet M, Lowry R, Tomasko L, Lee Y, Olah TV, Zhao J, Vyas KP, Halpin R, Kari PH, James I (2001): Influence of α -adrenoceptor antagonists on the pharmacokinetics of rizatriptan, a 5-HT_{1B/1D} agonist: differential effects of propranolol, nadolol and metoprolol. *British J Clin Pharmacol* 52(1) 69–76
- Goldstein DJ, Roon KI, Offen WW, Ramadan NM, Phebus LA, Johnson KW, Schaus JM, Ferrari MD (2001): Selective serotonin 1F (5-HT_{1F}) receptor agonist LY334370 for acute migraine: a randomised controlled trial. *Lancet* 358(9289) 1230–1234
- Gorboulev V, Ulzheimer JC, Akhoundova A, Ulzheimer-Teuber I, Karbach U, Quester S, Baumann C, Lang F, Busch AE, Koepsell H (1997): Cloning and Characterization of Two Human Polyspecific Organic Cation Transporters. *DNA Cell Biol* 16(7) 871–881
- Graham J, Wolff H (1938): Mechanism of migraine headache and action of ergotamine tartrate. *Arch Neurol* 39(4) 737–763
- Grimsby J, Lan NC, Neve R, Chen K, Shih JC (1990): Tissue distribution of human monoamine oxidase a and b mRNA. *J Neurochem* 55(4) 1166–1169

- Gross JH: *Massenspektrometrie - Ein Lehrbuch*. Springer Spektrum, Springer-Verlag, Berlin 2013
- Günther J: *Migränemittel*. In: Schwabe U, Paffrath D (Hrsg.): *Arzneiverordnungs-Report 2014*. Springer-Verlag, Berlin 2014, 781 - 790
- Hamel E (1999): The biology of serotonin receptors: Focus on migraine pathophysiology and treatment. *Can J Neurol Sci* 26(3) 2–6
- Hargreaves RJ, Shephard SL (1999): Pathophysiology of migraine – new insights. *Can J Neurol Sci* 26(3) 12–19
- Harris JA (1998): Using c-fos as a neural marker of pain. *Brain Res Bull* 45(1) 1–8
- Hendrickx R, Johansson JG, Lohmann C, Jenvert RM, Blomgren A, Börjesson L, Gustavsson L (2013): Identification of novel substrates and structure–activity relationship of cellular uptake mediated by human organic cation transporters 1 and 2. *J Med Chem* 56(18) 7232–7242
- Hilgendorf C, Ahlin G, Seithel A, Artursson P, Ungell AL, Karlsson J (2007): Expression of thirty-six drug transporter genes in human intestine, liver, kidney, and organotypic cell lines. *Drug Metab Dispos* 35(8) 1333–1340
- Hoskin KL, Kaube H, Goadsby PJ (1996): Sumatriptan can inhibit trigeminal afferents by an exclusively neural mechanism. *Brain* 119(5) 1419–1428
- Hoyer D, Clarke DE, Fozard JR, Hartig PR, Martin GR, Mylecharane EJ, Saxena PR, Humphrey PP (1994): International union of pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (serotonin). *Pharmacol Rev* 46(2) 157–203
- Hu XH, Markson LE, Lipton RB, Stewart WF, Berger ML (1999): Burden of migraine in the United States: disability and economic costs. *Arch Intern Med* 159(8) 813–818
- Huang YC, Colaizzi JL, Bierman RH, Woestenborghs R, Heykants JJ (1986): Pharmacokinetics and dose proportionality of domperidone in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol* 26(8) 628–632
- Humphrey PP (2007): The discovery of a new drug class for the acute treatment of migraine. *Headache* 47 10–19

- Humphrey PP, Feniuk W, Marriott AS, Tanner RJ, Jackson MR, Tucker ML (1991): Preclinical studies on the anti-migraine drug, sumatriptan. *Eur Neurol* 31(5) 282–290
- Ito K, Iwatsubo T, Kanamitsu S, Ueda K, Suzuki H, Sugiyama Y (1998): Prediction of pharmacokinetic alterations caused by drug-drug interactions: Metabolic interaction in the liver. *Pharmacol Rev* 50(3) 387–412
- Jensen R, Stovner LJ (2008): Epidemiology and comorbidity of headache. *Lancet Neurol* 7(4) 354–361
- Johnson DE, Rollema H, Schmidt AW, McHarg AD (2001): Serotonergic effects and extracellular brain levels of eletriptan, zolmitriptan and sumatriptan in rat brain. *Eur J Pharmacol* 425(3) 203–210
- Jonker JW, Schinkel AH (2004): Pharmacological and physiological functions of the polyspecific organic cation transporters: OCT1, 2, and 3 (SLC22a1-3). *J Pharmacol Exp Ther* 308(1) 2–9
- Kaube H, Hoskin KL, Goadsby PJ (1993): Inhibition by sumatriptan of central trigeminal neurones only after blood-brain barrier disruption. *Br J Pharmacol* 109(3) 788–792
- Keller T, Egenberger B, Gorboulev V, Bernhard F, Uzelac Z, Gorbunov D, Wirth C, Koppatz S, Dötsch V, Hunte C, Sitte HH, Koepsell H (2011): The large extracellular loop of organic cation transporter 1 influences substrate affinity and is pivotal for oligomerization. *J Biol Chem* 286(43) 37874–37886
- Kerb R, Brinkmann U, Chatskaia N, Gorbunov D, Gorboulev V, Mornhinweg E, Keil A, Eichelbaum M, Koepsell H (2002): Identification of genetic variations of the human organic cation transporter hOCT1 and their functional consequences. *Pharmacogenetics* 12(8) 591–595
- Kimura N, Masuda S, Tanihara Y, Ueo H, Okuda M, Katsura T, Inui KI (2005): Metformin is a superior substrate for renal organic cation transporter OCT2 rather than hepatic OCT1. *Drug Metab Pharmacokinet* 20(5) 379–386
- Koepsell H (2011): Substrate recognition and translocation by polyspecific organic cation transporters. *Biol Chem* 392(1-2) 95–101

- Koepsell H, Lips K, Volk C (2007): Polyspecific organic cation transporters: structure, function, physiological roles, and biopharmaceutical implications. *Pharm Res* 24(7) 1227–1251
- Kriegebaum C, Gutknecht L, Schmitt A, Lesch KP, Reif A (2010): Serotonin kompakt – Teil 1. *Fortschr Neurol Psyc* 78(6) 319–331
- Lacey LF, Hussey EK, Fowler PA (1995): Single dose pharmacokinetics of sumatriptan in healthy volunteers. *Eur J Clin Pharmacol* 47(6) 543–548
- Lance J, Anthony M, Gonski A (1967): Serotonin, the carotid body, and cranial vessels in migraine. *Arch Neurol* 16(5) 553–558
- Lee W, Glaeser H, Smith LH, Roberts RL, Moeckel GW, Gervasini G, Leake BF, Kim RB (2005): Polymorphisms in human organic anion-transporting polypeptide 1a2 (OATP1A2): implications for altered drug disposition and central nervous system drug entry. *J Biol Chem* 280(10) 9610–9617
- Lin CJ, Tai Y, Huang MT, Tsai YF, Hsu HJ, Tzen KY, Liou HH (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(3) 717–727
- Lipton R, Bigal M, Goadsby P (2004): Double-blind clinical trials of oral triptans vs other classes of acute migraine medication – a review. *Cephalalgia* 24(5) 321–332
- Matthaei J, Kuron D, Faltraco F, Knoch T, Dos Santos Pereira JN, Abu Abed M, Prukop T, Brockmöller J, Tzvetkov MV (2016): OCT1 mediates hepatic uptake of sumatriptan and loss-of-function OCT1 polymorphisms affect sumatriptan pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther* 99(6)
- McEnroe JD, Fleishaker DJC (2005): Clinical pharmacokinetics of almotriptan, a serotonin 5-HT_{1B/1D} receptor agonist for the treatment of migraine. *Clin Pharmacokinet* 44(3) 237–246
- Merck Canada Inc. (Date of Revision: May 08, 2013): Product Monograph Maxalt[®], page 22. Merck Canada Inc., 16750 route Transcanadienne, Kirkland, QC Canada H9H 4M7. National Drug Code: 33342-093-07; Online erhältlich unter http://www.merck.ca/assets/en/pdf/products/MAXALT-PM_E.pdf; abgerufen am 09. November 2015.

- Meyler WJ (1996): Side effects of ergotamine. *Cephalalgia* 16(1) 5–10
- Milton KA, Scott NR, Allen MJ, Abel S, Jenkins VC, James G, Rance DJ, Eve MD (2002): Pharmacokinetics, pharmacodynamics, and safety of the 5-HT_{1B/1D} agonist eletriptan following intravenous and oral administration. *J Clin Pharmacol* 42(5) 528–539
- Mitsikostas DD, Sanchez del Rio M (2001): Receptor systems mediating c-fos expression within trigeminal nucleus caudalis in animal models of migraine. *Brain Res Brain Res Rev* 35(1) 20–35
- Nies AT, Koepsell H, Winter S, Burk O, Klein K, Kerb R, Zanger UM, Keppler D, Schwab M, Schaeffeler E (2009): Expression of organic cation transporters OCT1 (SLC22A1) and OCT3 (SLC22A3) is affected by genetic factors and cholestasis in human liver. *Hepatology* 50(4) 1227–1240
- Nilsson T, Longmore J, Shaw D, Olesen IJ, Edvinsson L (1999): Contractile 5-HT_{1B} receptors in human cerebral arteries: pharmacological characterization and localization with immunocytochemistry. *Br J Pharmacol* 128(6) 1133–1140
- Nishimura M, Yaguti H, Yoshitsugu H, Naito S, Satoh T (2003): Tissue distribution of mRNA expression of human cytochrome P450 isoforms assessed by high-sensitivity real-time reverse transcription PCR. *J. Pharm. Soc. Jpn.* 123(5) 369–375
- Olesen J, Diener HC, Husstedt IW, Goadsby PJ, Hall D, Meier U, Pollentier S, Lesko LM, BIBN 4096 BS Clinical Proof of Concept Study Group (2004): Calcitonin gene-related peptide receptor antagonist BIBN 4096 BS for the acute treatment of migraine. *N Engl J Med* 350(11) 1104–1110
- Otsuka M, Matsumoto T, Morimoto R, Arioka S, Omote H, Moriyama Y (2005): A human transporter protein that mediates the final excretion step for toxic organic cations. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(50) 17923–17928
- Pascual J, Muñoz P (2005): Correlation between lipophilicity and triptan outcomes. *Headache* 45(1) 3–6
- Peck RW, Seaber EJ, Dixon R, Gillotin CG, Weatherley BC, Layton G, Posner J (1997): The interaction between propranolol and the novel antimigraine agent zolmitriptan (311c90). *British J Clin Pharmacol* 44(6) 595–599

- Pereira JNDS, Tadjerpisheh S, Abed MA, Saadatmand AR, Weksler B, Romero IA, Couraud PO, Brockmöller J, Tzvetkov MV (2014): The poorly membrane permeable antipsychotic drugs amisulpride and sulpiride are substrates of the organic cation transporters from the SLC22 family. *AAPS J* 12(6) 1–12
- Pfizer Canada Inc. (2013): Product Monograph Relpax[®]. Pfizer Canada Inc., 17300 Trans-Canada Highway, Kirkland, Quebec H9J 2M5. National Drug Code: 0049-2330-45; Online erhältlich unter http://www.pfizer.ca/en/our_products/products/monograph/139; abgerufen am 09. November 2015.
- Ramamoorthy S, Bauman AL, Moore KR, Han H, Yang-Feng T, Chang AS, Ganapathy V, Blakely RD (1993): Antidepressant- and cocaine-sensitive human serotonin transporter: molecular cloning, expression, and chromosomal localization. *Proc Natl Acad Sci USA* 90(6) 2542–2546
- Rapoport AM, Tepper SJ (2001): Triptans are all different. *Arch Neurol* 58(9) 1479–1480
- Roberto G, Raschi E, Piccinni C, Conti V, Vignatelli L, D’Alessandro R, Ponti FD, Poluzzi E (2015): Adverse cardiovascular events associated with triptans and ergotamines for treatment of migraine: Systematic review of observational studies. *Cephalalgia* 35(2) 118–131
- Saadatmand AR, Tadjerpisheh S, Brockmöller J, Tzvetkov MV (2012): The prototypic pharmacogenetic drug debrisoquine is a substrate of the genetically polymorphic organic cation transporter OCT1. *Biochem Pharmacol* 83(10) 1427–1434
- Saura J, Nadal E, van den Berg B, Vila M, Bombi JA, Mahy N (1996): Localization of monoamine oxidases in human peripheral tissues. *Life Sci* 59(16) 1341–1349
- Saxena PR (1974): Selective vasoconstriction in carotid vascular bed by methysergide: possible relevance to its antimigraine effect. *Eur J Pharmacol* 27(1) 99–105
- Schaefer O, Ohtsuki S, Kawakami H, Inoue T, Liehner S, Saito A, Sakamoto A, Ishiguro N, Matsumaru T, Terasaki T, Ebner T (2012): Absolute quantification and differential expression of drug transporters, cytochrome p450 enzymes, and UDP-glucuronosyltransferases in cultured primary human hepatocytes. *Drug Metab Dispos* 40(1) 93–103

- Schmuck K, Ullmer C, Kalkman HO, Probst A, Lübbert H (1996): Activation of meningeal 5-HT_{2B} receptors: An early step in the generation of migraine headache? *Eur J Neurosci* 8(5) 959–967
- Scott AK, Walley T, Breckenridge AM, Lacey LF, Fowler PA (1991): Lack of an interaction between propranolol and sumatriptan. *British J Clin Pharmacol* 32(5) 581–584
- Seitz T, Stalman R, Dalila N, Chen J, Pojar S, Dos Santos Pereira JN, Krätzner R, Brockmöller J, Tzvetkov MV (2015): Global genetic analyses reveal strong inter-ethnic variability in the loss of activity of the organic cation transporter OCT1. *Genome Med* 7(1) 56. Die Verwendung der Abbildungen erfolgt mit freundlicher Genehmigung der Autoren.
- Shu Y, Leabman MK, Feng B, Mangravite LM, Huang CC, Stryke D, Kawamoto M, Johns SJ, DeYoung J, Carlson E, Ferrin TE, Herskowitz I, Giacomini KM, Pharmacogenetics Of Membrane Transporters Investigators (2003): Evolutionary conservation predicts function of variants of the human organic cation transporter, OCT1. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(10) 5902–5907
- Shu Y, Sheardown SA, Brown C, Owen RP, Zhang S, Castro RA, Ianculescu AG, Yue L, Lo JC, Burchard EG, Brett CM, Giacomini KM (2007): Effect of genetic variation in the organic cation transporter 1 (OCT1) on metformin action. *J Clin Invest* 117(5) 1422–1431
- Silberstein SD (1997): The pharmacology of ergotamine and dihydroergotamine. *Headache* 37(1) 15–25
- Silberstein SD (2004): Migraine pathophysiology and its clinical implications. *Cephalalgia* 24(2) 2–7
- Sillanpää M (1976): Prevalence of migraine and other headache in finnish children starting school. *Headache* 15(4) 288–290
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150(1) 76–85
- Snyder LR, Kirkland JJ, Dolan JW: *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, Vereinigte Staaten 2009

- Spiegel (1993): Schmerzhaftes Gewitter. *Der Spiegel* 1993(21). Spiegel-Verlag Rudolf Augstein GmbH & Co. KG, Hamburg
- Srikiatkachorn A, Suwattanasophon C, Ruangpattanatawee U, Phansuwan-Pujito P (2002): 2002 Wolff Award. 5-HT_{2A} receptor activation and nitric oxide synthesis: a possible mechanism determining migraine attacks. *Headache* 42(7) 566–574
- Steiner TJ, Scher AI, Stewart WF, Kolodner K, Liberman J, Lipton RB (2003): The prevalence and disability burden of adult migraine in England and their relationships to age, gender and ethnicity. *Cephalalgia* 23(7) 519–527
- Stewart WF, Lipton RB, Celentano DD, L RM (1992): Prevalence of migraine headache in the United States: Relation to age, income, race, and other sociodemographic factors. *JAMA* 267(1) 64–69
- Takeda M, Khamdang S, Narikawa S, Kimura H, Kobayashi Y, Yamamoto T, Cha SH, Sekine T, Endou H (2002): Human organic anion transporters and human organic cation transporters mediate renal antiviral transport. *J Pharmacol Exp Ther* 300(3) 918–924
- Tanaka N, Nakamura E, Ohkura M, Kuwabara M, Yamashita A, Onitsuka T, Asada Y, Hisa H, Yamamoto R (2008): Both 5-hydroxytryptamine 5-HT_{2A} and 5-HT_{1B} receptors are involved in the vasoconstrictor response to 5-HT in the human isolated internal thoracic artery. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 35(7) 836–840
- Tfelt-Hansen P (2008): Triptans vs other drugs for acute migraine. Are there differences in efficacy? A comment. *Headache* 48(4) 601–605
- Tfelt-Hansen PC (2010): Does sumatriptan cross the blood–brain barrier in animals and man? *J Headache Pain* 11(1) 5–12
- Tfelt-Hansen PC, Koehler PJ (2008): History of the use of ergotamine and dihydroergotamine in migraine from 1906 and onward. *Cephalalgia* 28(8) 877–886
- Tfelt-Hansen P, Saxena PR, Dahlöf C, Pascual J, Láinez M, Henry P, Diener HC, Schoenen J, Ferrari MD, Goadsby PJ (2000): Ergotamine in the acute treatment of migraine: a review and European consensus. *Brain* 123(1) 9–18
- Tweedie D, Polli JW, Berglund EG, Huang SM, Zhang L, Poirier A, Chu X, Feng B, International Transporter Consortium (2013): Transporter studies in drug development: experience to date and follow-up on decision trees from the International Transporter Consortium. *Clin Pharmacol Ther* 94(1) 113–125

- Tzvetkov MV, Vormfelde SV, Balen D, Meineke I, Schmidt T, Sehrt D, Sabolić I, Koepsell H, Brockmüller J (2009): The effects of genetic polymorphisms in the organic cation transporters OCT1, OCT2, and OCT3 on the renal clearance of metformin. *Clin Pharmacol Ther* 86(3) 299–306
- Tzvetkov MV, Saadatmand AR, Lötsch J, Tegeder I, Stingl JC, Brockmüller J (2011): Genetically polymorphic OCT1: another piece in the puzzle of the variable pharmacokinetics and pharmacodynamics of the opioidergic drug tramadol. *Clin Pharmacol Ther* 90(1) 143–150
- Tzvetkov MV, Saadatmand AR, Bokelmann K, Meineke I, Kaiser R, Brockmüller J (2012): Effects of OCT1 polymorphisms on the cellular uptake, plasma concentrations and efficacy of the 5-HT₃ antagonists tropisetron and ondansetron. *Pharmacogenomics J* 12(1) 22–29
- Tzvetkov MV, dos Santos Pereira JN, Meineke I, Saadatmand AR, Stingl JC, Brockmüller J (2013): Morphine is a substrate of the organic cation transporter OCT1 and polymorphisms in OCT1 gene affect morphine pharmacokinetics after codeine administration. *Biochem Pharmacol* 86(5) 666–678
- Villalón C, Centurión D (2002): An introduction to migraine: from ancient treatment to functional pharmacology and antimigraine therapy. *Proc West Pharmacol Soc* 45 199–210
- Visser WH, Ferrari MD, Bayliss EM, Ludlow S, Pilgrim AJ (1992): Treatment of migraine attacks with subcutaneous sumatriptan: first placebo-controlled study. the subcutaneous sumatriptan international study group. *Cephalalgia* 12(5) 308–313
- Vyas KP, Halpin RA, Geer LA, Ellis JD, Liu L, Cheng H, Chavez-Eng C, Matuszewski BK, Varga SL, Guiblin AR, Rogers JD (2000): Disposition and pharmacokinetics of the antimigraine drug, rizatriptan, in humans. *Drug Metab Dispos* 28(1) 89–95
- Wang C, Jiang Y, Ma J, Wu H, Wacker D, Katritch V, Han GW, Liu W, Huang XP, Vardy E, McCorvy JD, Gao X, Zhou EX, Melcher K, Zhang C, Bai F, Yang H, Yang L, Jiang H, Roth BL, Cherezov V, Stevens RC, Xu HE (2013): Structural Basis for Molecular Recognition at Serotonin Receptors. *Science* 340(6132) 610–614
- Wang DS, Jonker JW, Kato Y, Kusuhara H, Schinkel AH, Sugiyama Y (2002): Involvement of organic cation transporter 1 in hepatic and intestinal distribution of metformin. *J Pharmacol Exp Ther* 302(2) 510–515

- WHO (2001): WHO | The world health report 2001 - Mental health: New understanding, new hope. hrsg. v. Murthy, R., Srinivasa, B., Jose, M., Epping-Jordan, J., Funk, M., Prentice, T., Saraceno, B., Saxena, S, u.a.; World Health Organization, Geneva, Schweiz 2001
- WHO (2011): WHO | Atlas of headache disorders and resources in the world 2011. hrsg. v. Steiner, T, Stovner L.J., u.a.; World Health Organization, Geneva, Schweiz 2001
- Williamson DJ, Hargreaves RJ (2001): Neurogenic inflammation in the context of migraine. *Microsc Res Tech* 53(3) 167–178
- Wittwer MB, Zur AA, Khuri N, Kido Y, Kosaka A, Zhang X, Morrissey KM, Sali A, Huang Y, Giacomini KM (2013): Discovery of potent, selective multidrug and toxin extrusion transporter 1 (MATE1, SLC47A1) inhibitors through prescription drug profiling and computational modeling. *J Med Chem* 56(3) 781–795
- Wu X, Kekuda R, Huang W, Fei YJ, Leibach FH, Chen J, Conway SJ, Ganapathy V (1998): Identity of the organic cation transporter OCT3 as the extraneuronal monoamine transporter (uptake2) and evidence for the expression of the transporter in the brain. *J Biol Chem* 273(49) 32776–32786
- Yasujima T, Ohta K, Inoue K, Yuasa H (2011): Characterization of human OCT1-mediated transport of DAPI as a fluorescent probe substrate. *J Pharm Sci* 100(9) 4006–4012
- Zhang L, Dresser MJ, Gray AT, Yost SC, Terashita S, Giacomini KM (1997): Cloning and functional expression of a human liver organic cation transporter. *Mol Pharmacol* 51(6) 913–921

Danksagung

Großer Dank gilt Herrn PD Dr. Mladen V. Tzvetkov für die fortwährende Unterstützung, für sein unermüdliches Engagement und für die konstruktiven Hilfestellungen während der Laborarbeit und dem Verfassen dieser Dissertation. Alle Phasen dieser Arbeit wurden von ihm intensiv und sachkundig betreut. Ohne seine kompetente und fachlich versierte Begleitung wäre diese Arbeit nicht gelungen.

Joao dos Santos Pereira möchte ich für die tägliche Unterstützung und Einarbeitung in die Methodiken danken. Sein kompetenter Rat und die produktive Zusammenarbeit waren zu jeder Zeit eine große Hilfe. Die Diskussion der Versuche und Ergebnisse mit ihm haben mir sehr weitergeholfen.

Für die ausgezeichnete und professionelle Hilfe bei den massenspektroskopischen Untersuchungen danke ich Ellen Bruns. Bei allen Problemen mit der Vorbereitung und Durchführung von Messungen mit dem Massenspektrometer stand sie mir mit Rat und Tat zur Seite.

Bei Karoline Jobst möchte ich mich für die kompetente und freundliche Hilfestellung bei allen Laborbelangen bedanken. Ihre Erfahrung und Hilfsbereitschaft waren stets eine große Bereicherung. Bedanken möchte ich mich auch bei Tina Seitz und Jiayin Chen. Mit ihrem Fachwissen und Engagement arbeiteten sie mich kompetent in Zellkulturarbeiten ein und unterstützen mich geduldig auch bei Schwierigkeiten.

An dieser Stelle möchte ich mich außerdem bei allen weiteren Mitarbeitern und Doktoranden des Fachbereichs "Klinische Pharmakologie" bedanken. Das Gelingen dieser Arbeit wurde maßgeblich durch die angenehme Arbeitsatmosphäre und gute Zusammenarbeit möglich.