

Expression von Aufnahme-Transportern für
Zytostatika in Mamma- und
Prostatakarzinom-Zellen und ihre Interaktion mit
Zytostatika

Dissertation
zur Erlangung des mathematisch-naturwissenschaftlichen Doktorgrades
“Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)”
der Georg-August-Universität Göttingen

im Promotionsstudiengang Molecular Medicine
der Georg-August University School of Science (GAUSS)

Vorgelegt von Judith Müller
geboren in Sögel

Göttingen, März 2017

Mitglieder des Prüfungskomitees:

Prof. Dr. Gerhard Burckhardt
Institut für Vegetative und Pathophysiologie
Universitätsmedizin Göttingen

Prof. Dr. Blanche Schwappach
Institut für Molekularbiologie
Universitätsmedizin Göttingen

Prof. Dr. Michael Müller
Institut für Neuro- und Sinnesphysiologie
Universitätsmedizin Göttingen

Publikationen

Venkata V.V.R. Marada, Saskia Flörl, Annett Kühne, Judith Müller, Gerhard Burckhardt, Yohannes Hagos. Interaction of human organic anion transporter 2 (OAT2) and sodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) with antineoplastic drugs. *Pharmacological Research*, 2015

Erklärung an Eides statt

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die Dissertation mit dem Titel „Expression von Aufnahme-Transportern für Zytostatika in Mamma- und Prostatakarzinom-Zellen und ihre Interaktion mit Zytostatika“ selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe.

Darüber hinaus erkläre ich, dass ich mich an keiner anderen Universität um einen Dokortitel beworben habe.

Judith Müller

Göttingen, März 2017

Zusammenfassung

Die Solute-Carrier-Transporter (SLC-Transporter) gehören zur großen Gruppe von integralen Membranproteinen und realisieren den Stofftransport über die Zellmembran. Die Interaktion von therapie relevanten Zytostatika und Adjuvantien mit SLC-Transportern und ihre Expression in Zelllinien aus Prostata- und Mammakarzinom-Gewebe ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit, welche aus zwei Projektteilen besteht. Im ersten Abschnitt wurden vier SLC-Transporter auf ihre Interaktion mit 26 therapie relevanten Zytostatika und Adjuvantien untersucht. Im zweiten Teil wurde die Expression von 46 SLC-Transportern in Zelllinien aus Prostata- und Mammakarzinomen analysiert. Für die Interaktionsanalyse mit Zytostatika und Adjuvantien wurden die Peptidtransporter PEPT1 (SLC15A1) und PEPT2 (SLC15A2), der L-Carnitin-Transporter OCTN2 (SLC22A5) und der nierenspezifische „Multidrug and toxin extrusion“-Transporter MATE2-K (SLC47A2) in stabil transfizierten, humanen, embryonalen Nierenzellen verwendet. Gemessen wurde hierbei die Aufnahme eines transporterspezifischen, [³H]-markierten Substrats in Ab- oder Anwesenheit von je 100 μ M der Testsubstanzen. Diejenigen Substanzen, die eine Reduktion der Aufnahme des Referenzsubstrats um mindestens 50 % bewirkten, wurden für eine Affinitätsanalyse ausgewählt. Diese erfolgte in Form der K_i -Wert-Bestimmung mit Hilfe des Dixon-Plots. Darüber hinaus wurde, durch Vergleich mit Ergebnissen aus dem Cornish-Bowden-Plot, eine Abschätzung über die Inhibitionskinetik der betreffenden Substanzen vorgenommen. Für PEPT1 konnte keine Substanz mit inhibitorischer Wirkung ermittelt werden. PEPT2 zeigte in Anwesenheit des Mitose-Inhibitors Paclitaxel und des Topoisomerase-Inhibitors Etoposid eine verringerte Aufnahme des markierten Substrates. Für diesen Transporter wurde keine Affinitätsanalyse durchgeführt. Der L-Carnitin-Transporter OCTN2 zeigte eine deutlich verringerte Aufnahme von markiertem Substrat in Anwesenheit von Paclitaxel, Etoposid, Vinblastin und Vincristin. Die K_i -Werte lagen bei $4,6 \pm 0,34 \mu$ M, $51,0 \pm 5,3 \mu$ M, $52,3 \pm 5,2 \mu$ M bzw. $52,5 \pm 5,9 \mu$ M. Der Vergleich des Dixon-Plots mit dem Cornish-Bowden-Plot ergab für Paclitaxel und Etoposid keinen Hinweis auf eine kompetitive Hemmung. Für die Vincaalkaloide Vinblastin und Vincristin ergab sich dagegen eine kompetitive Inhibition von OCTN2. Für MATE2-K konnte ein inhibitorischer Effekt unter Zugabe von Mitoxantron ($K_i = 1,28 \pm 0,41 \mu$ M), Irinotekan ($K_i = 7,41 \pm 1,3 \mu$ M), Paclitaxel ($K_i = 28,56 \pm 5,3 \mu$ M), Doxorubicin ($K_i = 52,29 \pm 5,1 \mu$ M), Vinblastin ($K_i = 91,0 \pm 8,1 \mu$ M) und Etoposid ($K_i = 107,1 \pm 4,4 \mu$ M) gezeigt werden. Eine kompetitive Inhibition wurde für Paclitaxel, Doxorubicin und Etoposid festgestellt. Die Ergebnisse der Analyse der übrigen Substanzen lassen eine gemischte Inhibition vermuten. Die Analyse der SLC-Transporter-Expression in Prostata- und Mammakarzinom-Zelllinien wurde in Kooperation mit dem Deutschen Primaten Zentrum mittels Chip-PCR durchgeführt. Zur Kontrolle

wurde kommerziell erworbene Gesamt-RNA von Nieren, Leber und Colon mitgeführt. Eine besonders starke Expression auf mRNA-Ebene konnte für den Thiamin-Transporter THTR1, die Monocarboxylat-Transporter MCT1 und MCT8, den noch wenig erforschten ORCTL2, den Carnitin-Transporter OCTN2 und die Nukleosid-Transporter ENT2 und 3 beobachtet werden. Eine etwas geringere Expression wurde für den Monocarboxylat-Transporter MCT4, den Ergothionein-Transporter OCTN1, den Prostaglandin-Transporter OATP2A1, den Aminosäure-Transporter LAT2, den Transporter organischer Kationen OCT1 und den Schilddrüsenhormon-Transporter OATP4A1 gezeigt. Die übrigen SLC-Transporter waren weniger stark bis sehr gering exprimiert. Zur Überprüfung der funktionellen Expression wurden Transportexperimente mit je einer exprimierenden und einer nicht-exprimierenden Zelllinie von Mamma- bzw. Prostatakarzinom-Zelllinien durchgeführt. Für die fünf in Prostatakarzinom-Zelllinien getesteten Transporter OAT4, OATP1B3, OATP2B1, NaCT und MATE1 konnte keine funktionelle Expression nachgewiesen werden. Die in Mammakarzinom-Zelllinien getesteten Transporter waren OCT2, OATP1B3, NaCT, PEPT1 und MATE1. Hier konnte für OCT2 und PEPT1 ein spezifisch inhibierbarer Transport des Modellsubstrats und damit eine funktionelle Expression nachgewiesen werden. Die Kenntnis über die Interaktion von Zytostatika mit SLC-Transportern und ihre Expressionsmuster in Tumorgewebe könnte für die medikamentöse Therapie von Bedeutung sein. Hierzu müsste zunächst geklärt werden, ob Zytostatika von den SLC-Transportern in die Zelle aufgenommen werden. Dessen ungeachtet könnten Zytostatika mit endogenen oder therapeutisch eingesetzten Substanzen an SLC-Transportern wechselwirken. Dies könnte sowohl zu veränderten Wirkspiegeln im Patienten-Plasma als auch zur Schädigung von Leber oder Nieren führen, wenn es in diesen Organen zur Akkumulation toxischer Substanzen kommt.

Abbildungsverzeichnis

1	Strukturmodell eines PEPT-Substrates	3
2	Inhibitionsanalyse von PEPT1 durch Alkylantien	22
3	Inhibitionsanalyse von PEPT1 durch Interkalantien und Mitose- Inhibitoren	23
4	Inhibitionsanalyse von PEPT1 durch Antimetabolite	24
5	Interaktion von PEPT1 mit Topoisomerase-Inhibitoren und Adjuvantien	25
6	Inhibitionsanalyse von PEPT2 durch Alkylantien	26
7	Inhibitionsanalyse von PEPT2 durch Interkalantien und Mitose- Inhibitoren	27
8	Inhibitionsanalyse von PEPT2 durch Antimetabolite	28
9	Inhibitionsanalyse von PEPT2 durch Topoisomerase-Inhibitoren und Adjuvantien	29
10	Inhibitionsanalyse von OCTN2 durch Alkylantien	30
11	Inhibitionsanalyse von OCTN2 durch Interkalantien und Mitose-Inhibi- toren	31
12	Inhibitionsanalyse von OCTN2 durch Antimetabolite	32
13	Inhibitionsanalyse von OCTN2 durch Topoisomerase-Inhibitoren und Adjuvantien	33
14	Interaktion von MATE2-K mit Alkylantien	34
15	Inhibitionsanalyse von MATE2-K durch Interkalantien und Mitose- Inhibitoren	35
16	Inhibitionsanalyse von MATE2-K durch Antimetabolite	36
17	Inhibitionsanalyse von MATE2-K durch Topoisomerase-Inhibitoren und Adjuvantien	37
18	Vergleich der nach Dixon und Cornish-Bowden aufgetragenen Daten zur Hemmkinetik von OCTN2 durch Paclitaxel	38
19	Vergleich der nach Dixon und Cornish-Bowden aufgetragenen Daten zur Hemmkinetik von OCTN2 durch Etoposid	39
20	Vergleich der nach Dixon und Cornish-Bowden aufgetragenen Daten zur Hemmkinetik von OCTN2 durch Vinblastin	40
21	Vergleich der nach Dixon und Cornish-Bowden aufgetragenen Daten zur Hemmkinetik von OCTN2 durch Vincristin	40
22	Vergleich der nach Dixon und Cornish-Bowden aufgetragenen Daten zur Hemmkinetik von MATE2-K durch Mitoxantron	42
23	Vergleich der nach Dixon und Cornish-Bowden aufgetragenen Daten zur Hemmkinetik von MATE2-K durch Irinotekan	43

24	Vergleich der nach Dixon und Cornish-Bowden aufgetragenen Daten zur Hemmkinetik von MATE2-K durch Paclitaxel	43
25	Vergleich der nach Dixon und Cornish-Bowden aufgetragenen Daten zur Hemmkinetik von MATE2-K durch Doxorubicin	44
26	Vergleich der nach Dixon und Cornish-Bowden aufgetragenen Daten zur Hemmkinetik von MATE2-K durch Vinblastin	44
27	Vergleich der nach Dixon und Cornish-Bowden aufgetragenen Daten zur Inhibitionskinetik von MATE2-K durch Etoposid	45
28	Expression ausgewählter SLC-Transporter auf mRNA-Ebene	47
29	Funktionelle Expressionsanalyse von OATP1B3 in Prostatakarzinom-Zelllinien	51
30	Funktionelle Expressionsanalyse von NaCT in Prostatakarzinom-Zelllinien	52
31	Funktionelle Expressionsanalyse von MATE in Prostatakarzinom-Zelllinien	54
32	Funktionelle Expressionsanalyse von OAT4 in Prostatakarzinom-Zelllinien	55
33	Funktionelle Expressionsanalyse von OATP2B1 in Prostatakarzinom-Zelllinien	56
34	Funktionelle Expressionsanalyse von OATP1B3 in Mammakarzinom-Zelllinien	58
35	Funktionelle Expressionsanalyse von NaCT in Mammakarzinom-Zelllinien	59
36	Funktionelle Expressionsanalyse von MATE in Mammakarzinom-Zelllinien	60
37	Funktionelle Expressionsanalyse von OCT2 in Mammakarzinom-Zelllinien	62
38	Funktionelle Expressionsanalyse von PEPT1 in Mammakarzinom-Zelllinien	63
39	Entscheidungsbaum zur Durchführung von <i>in vivo</i> Studien zum Auftreten von DDI	72
40	Darstellung inhibitorischer Effekte getesteter Substanzen auf MATE2-K anhand ihrer Molekularmasse	77
41	Darstellung inhibitorischer Effekte getesteter Substanzen auf MATE2-K anhand ihrer Ladung bei pH 7,4	78
42	Darstellung inhibitorischer Effekte getesteter Substanzen auf MATE2-K anhand ihrer LogP-Werte	78
43	Übersicht über die Interaktion von Zytostatika mit ausgewählten SLC-Transportern	89

Tabellenverzeichnis

2	Zusammensetzung von 250 mL Bradford-Reagenz	15
3	Transportbedingungen der getesteten SLC-Transporter	16
4	Bedingungen für Affinitätsbestimmung der getesteten SLC-Transporter	17
5	Pipettierschema für die Umschreibung von mRNA in cDNA	19
6	Temperaturprotokoll der Präamplifikation	19
7	Zusammenfassung der für OCTN2 bestimmten Affinitätskonstanten aus- gewählter inhibitorischer Substanzen	41
8	Zusammenfassung der für OCTN2 bestimmten IC ₅₀ -Werte der inhibito- rischen Substanzen	41
9	Zusammenfassung der für MATE2-K bestimmten Affinitätskonstanten ausgewählter inhibitorischer Substanzen	45
10	Zusammenfassung der für MATE2-K bestimmten IC ₅₀ -Werte der inhi- bitorischen Substanzen	46
11	Transportbedingungen der getesteten SLC-Transporter in Prostatakar- zinom-Zelllinien	50
12	Transportbedingungen der getesteten SLC-Transporter in Mammakar- zinom-Zelllinien	57
13	Vergleich zwischen Dixon-Plot und Cornish-Bowden-Plot bei unter- schiedlichen Inhibitionstypen	70
14	Zusammenfassung der für OCTN2 bestimmten IC ₅₀ -Werte und der phar- makologischen Daten ausgewählter inhibitorischer Substanzen	73
15	Zusammenfassung der für MATE2-K bestimmten IC ₅₀ -Werte und der pharmakologischen Daten ausgewählter inhibitorischer Substanzen . . .	75
16	Expressionswerte von ausgewählten SLC-Transportern in Mamma- und Prostatakarzinom-Zelllinien	105
17	Physikochemische Parameter der verwendeten Substanzen	109
18	In der vorliegenden Arbeit verwendete Substanzen mit Angabe der Be- zugsfirma	113
19	Liste der in der Arbeit verwendeten Geräte	115

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µM	Mikromolar
Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure
ASP ⁺	4-(4-(Dimethylamino)styryl)-N-methylpyridinium
bp	Basenpaare
BSP	Bromsulphthalein
bzw.	beziehungsweise
CACT1/2	Carnitin-Acylcarnitin-Transporter 1/2
CCK-8	Cholecystokinin Oktapeptid
cDNA	komplementär-Desoxyribonucleinsäure
CoA	Co-Enzym A
DDI	Drug-Drug-Interaktion
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dT	Thymidinnucleotid
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ES	Estronsulfat
ETTh	humaner Ergothionein Transporter
fmol	Femtomol
FKS	fetales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
Gly-Sar	Glycyl-Sarcosin
h	Stunde
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure
i.d.R.	in der Regel
kb	kilo Base
kDa	kilo Dalton
K _i	Inhibitionskonstante
Konz.	Konzentration
mg	Milligramm
min	Minute
mL	Milliliter
mM	Millimolar

MPP ⁺	1-Methyl-4-phenylpyridinium
mRNA	messenger Ribonucleinsäure
NaOH	Natriumhydroxid
NH ₃	Ammoniak
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
nm	Nanometer
org.	organisch
pm	Pikometer
pmol	Pikomol
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
s	Sekunde
SLC	Solute Carrier
sog.	sogenannt
TEA ⁺	Tetraethylammonium
TMH	transmembranäre α -Helices
Tyr-Phe	Tyrosin-Phenylalanin
z.B.	zum Beispiel

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung	1
1.1 Die SLC15-Familie	2
1.2 Die SLC22 Familie	5
1.3 Die SLC47 Familie	8
1.4 Zytostatika	12
2 Material und Methoden	14
2.1 Zellkultur	14
2.2 Gesamtproteinbestimmung	15
2.3 Cis-Inhibition	16
2.4 K_i -Wert Bestimmung	17
2.5 IC_{50} -Wert Berechnung	17
2.6 Expressionsanalyse Tumorzellen	18
2.6.1 mRNA-Isolation	18
2.6.2 cDNA-Synthese durch reverse Transkription	18
2.6.3 Präamplifikation der cDNA-Proben	19
2.6.4 Quantitative real time PCR	20
2.7 Statistische Auswertung	20
3 Ergebnisse	21
3.1 Interaktionsanalysen mit Zytostatika	21
3.1.1 PEPT1	21
3.1.2 PEPT2	26
3.1.3 OCTN2	29
3.1.4 MATE2-K	33
3.2 Affinitätsbestimmung interagierender Zytostatika	38
3.2.1 OCTN2	38
3.2.2 MATE2-K	41
3.3 Tumorzelllinien	46
3.3.1 Expressionsanalyse von SLC-Transportern in Tumorzelllinien	46

3.3.2	Funktionelle Expressionsanalyse ausgewählter SLC-Transporter in Karzinomzelllinien	49
3.3.3	Prostatakarzinom-Zelllinien	50
3.3.4	Mammakarzinom-Zelllinien	57
4	Diskussion	64
4.1	Die PEPT-Transporter	65
4.2	Der L-Carnitin-Transporter OCTN2	68
4.3	Der nierenspezifische Transporter MATE2-K	73
4.4	SLC-Expressionsanalyse von Mamma- und Prostatakarzinom-Zelllinien	79
5	Ausblick	88
	Literatur	91
6	Anhang	104
	Expressionswerte von SLC-Transportern in Karzinom-Zelllinien	104
	Struktur der verwendeten Zytostatika	109
	Liste der verwendeten Reagenzien	113
	Liste der verwendeten Geräte	115

1 Einleitung

Alle Substanzen, die Körperzellen für die Aufrechterhaltung ihres Stoffwechsels brauchen, müssen die sie umgebende Zellmembran überwinden. Das gilt für den Energielieferanten Glukose genauso wie für Aminosäuren, welche zum Erhalt und zum Aufbau neuer Zellstrukturen notwendig sind. Einfache Diffusion durch die Lipid-Doppelschicht ist nur für lipophile oder wenige, sehr kleine, ungeladene Moleküle möglich. Zwar erschweren derartige Barrieren die Verteilung von Substanzen im Körper, es ist jedoch diese Kompartimentierung, durch die eine Energiegewinnung durch Reaktionswege wie die Atmungskette, bei der Konzentrationsgradienten eine entscheidende Rolle spielen, überhaupt erst möglich wird. Wie die Aufnahme muss auch der Abtransport von Stoffwechsellendprodukten aus der Zelle, wie z.B. Lactat, durch Transport durch die Zellmembran realisiert werden. Aufnahme und Abgabe werden von Transportproteinen ermöglicht, welche in der Zellmembran lokalisiert sind.

Die Membrantransporter werden in primär-aktive und sekundäre Transportproteine eingeteilt. Die ATP-binding-cassette (ABC) Transporter gehören zu den primär-aktiven Transportern, welche ihre Substrate unter Energieverbrauch durch ATP-Hydrolyse aktiv über die Zellmembran bewegen. Ionenkanäle und sog. Carrier transportieren ihre Substrate entlang eines bestehenden Konzentrationsgefälles bzw. eines elektrochemischen Gradienten ohne direkten Energieverbrauch. Während Ionenkanäle auf einen entsprechenden Reiz hin Poren in der Zellmembran öffnen und schließen können, translozieren Carrier ihre Substrate durch eine Abfolge von Konformationsänderungen in festen stöchiometrischen Verhältnissen, bei denen pro Transportzyklus eine definierte Anzahl spezifischer Moleküle aufgenommen oder abgegeben wird.

Wie der Name bereits vermuten lässt, gehören auch die Solute-Carrier-Transporter (SLC-Transporter) zur letztgenannten Gruppe der Carrier. Diese große Gruppe von fast 400 Genen wird anhand ihrer Sequenzhomologie in Familien eingeteilt, von denen es bisher 52 gibt. Darunter befinden sich Uniporter, die nur eine Molekülart transportieren, Antiporter, welche ihre Substrate gegen andere Moleküle austauschen und Symporter, die zusammen mit den Substraten auch andere Moleküle in gleicher Richtung transportieren. Die Benennung folgt einem festen Schema, bei dem nach dem Präfix „SLC“ zunächst die Nummer der Familie und zuletzt, durch ein „A“ separiert, die Nummer des Transporters innerhalb seiner Familie angegeben wird. Diese Nummer richtet sich i.d.R. nach der Reihenfolge ihrer Erstbeschreibung. So ist der organische Anionen-Transporter mit dem Trivialnamen OAT1 ein SLC-Transporter der Familie 22 und innerhalb dieser das sechste in seiner Primärstruktur aufgeklärte Protein: SLC22A6.

1.1 Die SLC15-Familie

Die SLC-Familie 15 besitzt vier Mitglieder: PEPT1 (SLC15A1), PEPT2 (SLC15A2), PHT1 (SLC15A4) und PHT2 (SLC15A3). Alle transportieren Di- und Tripeptide, jedoch nur die beiden Proteine SLC15A3 (PHT2) und SLC15A4 (PHT1) akzeptieren auch die freie Aminosäure Histidin als Substrat [19]. Inwieweit sich das Substratspektrum der PEPT-Proteine mit dem der PHT-Transporter überschneidet, ist nicht bekannt, da die Peptid- und Histidin-Transporter PHT1 und PHT2 bisher noch wenig erforscht sind.

Die Proteine PEPT1 und PEPT2 besitzen eine Sequenzidentität von 50 % und sind in zwölf transmembranären α -Helices (TMH) organisiert. Die terminalen Enden der Proteine liegen auf der zytosolischen Seite. Beide Transportproteine liegen in der Membran in glykosylierter Form vor und haben Massen von 75 kDa (PEPT1, 63 kDa ohne Glykosylierung) und 107 kDa (PEPT2, 83 kDa ohne Glykosylierung) [20].

Eine Sequenzabhängigkeit für Substrate von PEPT1 und PEPT2 scheint es bezüglich Peptiden aus proteinogenen Aminosäuren kaum zu geben, da eine große Vielfalt an Kombinationen von Di- und Tripeptiden transportiert werden [6]. Als Minimalmolekül, welches an PEPT1 bindet und transloziert wird, bedarf es zweier unterschiedlich geladener, funktioneller Gruppen, welche durch eine Kette aus mindestens vier Kohlenstoffatomen getrennt im Molekül vorliegen. Der Abstand der geladenen Gruppen soll bei 500 – 635 pm liegen. Eine Peptidbindung im Substratmolekül ist für die Interaktion und den Transport über PEPT-Proteine nicht zwingend erforderlich. Liegt nur eine der beiden funktionellen Gruppen im Molekül vor, kommt es zwar zur Interaktion mit dem Transportprotein, aber i.d.R. nicht zum Transport über die Zellmembran. Wird in die 4-C Kohlenstoffkette der Minimalstruktur eine Carbonylgruppe eingefügt, bewirkt dies eine deutlich verstärkte Affinität von PEPT1, da somit die Möglichkeit einer weiteren Wasserstoffbrücke gegeben ist [2]. Eine zusätzliche positiv geladene funktionelle Gruppe in unmittelbarer Nähe zu der Carboxylgruppe führt jedoch dazu, dass keine Interaktion des Moleküls mit dem Peptidtransporter stattfindet. Der gleiche Effekt wird erreicht, wenn zwei unterschiedlich geladene funktionelle Gruppen am selben endständigen Kohlenstoffatom gebunden sind [22]. Sind die Kohlenstoffatome, welche die Amino- oder Carboxylgruppe tragen, chirale Zentren, wird in der Regel die L-Form bevorzugt. Liegt eine Peptidbindung im Substratmolekül vor, so wird an dieser Stelle auch eine Alkylierung des daran beteiligten Stickstoffes von PEPT1 akzeptiert und sowohl die Bindung als auch der Transport finden statt [2]. Zusätzlich ist ein stark hydrophober Rest (R_2) förderlich für die Eigenschaft als PEPT-Substrat.

PEPT1 und PEPT2 gehören innerhalb der Familie der SLC-Transporter zur Gruppe der Co-Transporter oder Symporter, da der Transport von Substraten gemeinsam mit der Aufnahme von Protonen stattfindet. Triebkraft für den Peptidtransport

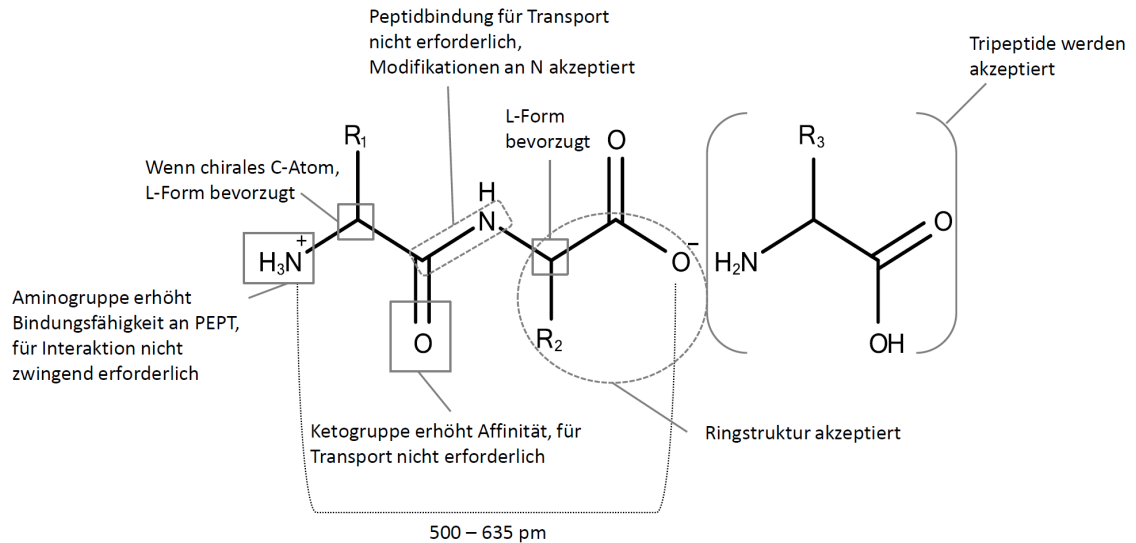


Abb. 1: Modell eines Substratmoleküls für PEPT-Proteine [2]

sind hierbei das Konzentrationsgefälle für die transportierten Peptide zwischen Zellinnerem und -äußeren und das negative Membranpotential. Der Substrattransport über PEPT1 und PEPT2 verläuft elektrogen, da zusammen mit dem Substrat auch positive Ladungen in Form von Protonen (H^+) in die Zellen aufgenommen werden.

Bei beiden Peptidtransportern existieren zwei mögliche Bindungsstellen für H^+ , eine direkte Protonenbindungsstelle und eine Möglichkeit zur Bindung an der Substratbindungsstelle. Dabei wird zunächst die Protonenbindungsstelle protoniert, bevor das Substratmolekül gebunden wird. Ob auch die Substratbindungsstelle protoniert wird, ist abhängig von der Verfügbarkeit weiterer Protonen und somit vom pH-Wert. Die Anzahl der pro transloziertem Peptid benötigten Protonen ist abhängig von der Ladung des Substrates. Im Falle von PEPT1 werden anionische (negativ geladene) Substrate mit zwei Protonen aufgenommen, eines bindet vor dem Substrat an der Protonenbindungsstelle, das zweite an der Substratbindungsstelle. Hierdurch wird die negative Ladung des Substrates ausgeglichen. Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, Anionen bei hohem pH-Wert und weniger verfügbaren H^+ mit nur einem Proton zu translozieren, wenn gleichzeitig ein negativ geladenes Ion aus der Zelle geschleust wird. Kationische (positiv geladene) Substrate brauchen hingegen nicht zwingend Protonen, um über die Zellmembran zu gelangen. Auch hier bindet zwar in der Regel ein Proton, bevor das Substrat aufgenommen wird, jedoch kann ein Kation bei niedriger Protonenkonzentration, bzw. erhöhtem pH-Wert, auch gänzlich ohne zusätzliche positive Ladung transportiert werden [57]. Für die Aufnahme neutraler Peptide (ohne Nettoladung) bedarf es eines gebundenen Protons an der entsprechenden Bindungsstelle. Wird jedoch ein weiteres Proton an der Substratbindungsstelle angelagert, kommt es nicht zum Transport [46]. So lässt sich auch die pH-Abhängigkeit von PEPT1 innerhalb der physiologi-

schen Grenzen am Expressionsort erklären. Je niedriger der pH-Wert, desto höher die Protonenkonzentration und die Transportgeschwindigkeit von anionischen Substraten, je höher der pH-Wert, desto effizienter der Transport kationischer Substrate, welche weniger auf H^+ angewiesen sind. Neutrale Peptide zeigen eine glockenförmige Kurve der Transportaktivität in Abhängigkeit des pH-Wertes, welche sowohl in niedrigeren (zwei gebundene H^+) als auch in höheren pH-Wertbereichen (zu wenig verfügbare H^+) abnimmt [46].

Auch für PEPT2 wird beim Transport neutraler Peptide ein Verhältnis zwischen Protonen und Substrat von 1:1 angegeben, und auch hier wird der Transport durch die Bindung eines zweiten Protons in niedrigen pH-Wertbereichen blockiert [85]. Detailliertere Studien zum stöchiometrischen Transportverhältnis von PEPT2 wurde jedoch an Transportproteinen von Ratten durchgeführt, für die ein Verhältnis von 2:1 für neutrale Peptide ermittelt wurde und das so vom Transportverhalten von humanem PEPT2 abweicht.

PEPT1 ist ein Peptidtransporter mit niedriger Affinität und hoher Transportkapazität, zu dem PEPT2 das Pendant mit hoher Affinität und niedriger Transportkapazität darstellt. Diese Eigenschaften bedingen auch die Expression der beiden Transportproteine. PEPT1 wird vorwiegend in der apikalen Membran von Enterozyten des Dünndarms [119], im S1-Segment des proximalen Tubulus der Niere (bei Ratten) [93] und in Gallengängen exprimiert [50]. Durch die hohe Transportkapazität realisiert dieser Transporter somit maßgeblich die Aufnahme von Peptiden aus abgebauten Nahrungsproteinen im Dünndarm und deren Rückresorption aus dem Primärharn und der Galle.

PEPT2 wird ebenfalls im proximalen Tubulus exprimiert, nach Untersuchungen an Rattentubuli allerdings in den Glomerulus-ferneren S2- und S3-Segmenten, d.h. dem PEPT1 nachgeschaltet. Der Peptidtransporter mit hoher Substrataffinität scheint hier für die effiziente Aufnahme kleinerer Peptidkonzentrationen verantwortlich zu sein, die nicht vom vorgeschalteten PEPT1 erfasst wurden [97]. Eine PEPT2-Expression im Dünndarm konnte nicht nachgewiesen werden. Dafür ist dieses Transportprotein in Astrozyten und Zellen des Plexus chorioideus im Gehirn (bei Ratten) [4], in Milchdrüsen und Epithelien der Bronchien nachweisbar [29][30]. Welche genauen Aufgaben PEPT2 dort erfüllt, ist bisher noch nicht geklärt. Es wird vermutet, dass PEPT2 durch den Efflux kurzer Peptide aus dem Liquor zur Peptidhomöostase und zur Eliminierung von abgebauten Neurotransmittern und anderen Metaboliten beiträgt [96]. Allerdings zeigen knockout-Mäuse, welche keinen funktionierenden PEPT2 besitzen, keinerlei äußerlich erkennbare Beeinträchtigungen.

Die Expression von PEPT1 in Kombination mit der breiten Substrat-Akzeptanz des Transportproteins ermöglicht eine effiziente Aufnahme von Medikamenten, die oral verabreicht werden. Substanzen, die über PEPT1 aus dem Darm aufgenommen oder

durch beide Transportproteine renal rückresorbiert werden, sind beispielsweise verschiedene β -Lactam-Antibiotika aus den Gruppen der Penicilline und Cephalosporine [9][25] oder Virostatika in Form von inaktiven Vorstufen („ProDrug“)[36]. Dabei zeigen PEPT1 und PEPT2 unterschiedliche Affinitäten zu den verschiedenen Substanzen. Aber auch Medikamente, die im Bereich der Tumorthherapie verwendet werden, wie 5-Aminolävulinsäure, sind Substrate der Peptidtransporter [21]. Dabei ermittelten Bretschneider et al. verschiedene Faktoren, die für die Interaktion von β -Lactam-Antibiotika mit PEPT-Proteinen entscheidend sind. Dazu gehören die sterische Ähnlichkeit des Moleküls mit der Grundstruktur von Peptiden, eine N-terminale Peptidbindung mit einer Aminogruppe in α -Position, eine Carboxygruppe am Dihydrothiazinring von Cephalosporinen bzw. am Thiazolidinring von Penicillinen und die Anzahl und Art von Substituenten am N-terminalen Ringsystem des Substrates [9]. Somit sind die Peptidtransporter der SLC15-Familie durch ihr Expressionsprofil und die Substrat-Akzeptanz attraktive Aufnahmesysteme für die orale Verabreichung verschiedener Medikamente, welche auch als Prodrug auf die Substratspezifität des jeweiligen Proteins zugeschnitten werden können.

1.2 Die SLC22 Familie

Die Familie 22 ist eine der größten SLC-Familien und beinhaltet Transportproteine mit unterschiedlichen Substratselektivität. Darunter befinden sich die Transporter organischer Kationen (OCTs), die Transporter organischen Anionen (OATs), sowie die Transporter von Zwitterionen und organischer Kationen (OCTNs). Die OCTs transportieren vorwiegend Kationen, jeweils entsprechend ihres Konzentrationsgefälles. Die OATs transportieren in vergleichbarer Weise vorwiegend anionische Substanzen in beide Richtungen über die Zellmembran. Innerhalb der Familie 22 gibt es jedoch nach wie vor sog. Orphan Transporter, deren Substratspektrum bisher unbekannt ist [51].

Im Folgenden soll die an dritter Stelle genannte Gruppe innerhalb der SLC-22 Familie näher betrachtet werden; die OCTN-Transporter, zu denen im humanen Bereich zwei Transportproteine gezählt werden, und die das zwitterionische Molekül L-Carnitin transportieren. Sie gehören aufgrund ihrer Sequenzübereinstimmung mit anderen Mitgliedern von $>30\%$, zur Familie 22 und erhielten ihr „N“, da sie durch das in ihrer Aminosäuresequenz enthaltene Motiv für eine Nukleotid-Bindestelle zunächst für einen funktionell neuen (Novel-)Transporter gehalten wurden. Diese Proteine sind OCTN1 (SLC22A4), welcher 1997 erstmalig beschrieben wurde, und OCTN2 (SLC22A5), welcher im darauffolgenden Jahr vorgestellt wurde. OCTN1 ist ein Transportprotein, welches aus 551 Aminosäuren besteht, elf TMH besitzt und eine Sequenzhomologie von 75,8% zu OCTN2 aufweist [102].

Die Expression von OCTN1 unterscheidet sich in fetalen und adulten Individuen.

So zeigen Feten eine starke Expression in Leber, Nieren und Lunge. In Adulten ist der Transporter vor allem in den Geweben von Nieren, Luftröhre und Knochenmark, nicht aber der Leber, deutlich nachweisbar. Weniger stark tritt er im Gewebe wie Skelettmuskel, Prostata, Lunge, Pancreas, Placenta, Herz, Uterus, Milz und Rückenmark von Erwachsenen auf. Neben dem Zwitterion L-Carnitin, zählen auch das Modellsubstrat Tetraethylammonium (TEA^+) und das Antioxidans Ergothionein zu den Substraten des OCTN1. Das Protein wird zwar als Carnitin-Transporter bezeichnet, Ergothionein wird jedoch tatsächlich sehr viel effizienter transportiert, was zu dem Synonym „Human Ergothioneine Transporter“ (ETTh) geführt hat [32]. Pharmaka, die als Substrate von OCTN1 akzeptiert werden sind unter anderem das Antiarrhythmikum Chinidin, das Antihistaminikum Pylramin (Mepyramin), der Calciumantagonist Verapamil und die antineoplastische Substanz Oxaliplatin.

Durch seine höhere Affinität ist OCTN2 der SLC-Transporter, welcher hauptverantwortlich für die Aufnahme von L-Carnitin aus der Nahrung und die Rückresorption (ca. 98%) aus dem Primärharn ist. Das Transportprotein SLC22A5 besteht aus 557 Aminosäuren, besitzt 12 TMH und zeigt, wie sein Verwandter, eine unterschiedliche Expression in fetalen und adulten Organismen. So konnte für den OCTN2 eine starke fetale Expression in den Nieren und eine schwächere in Leber, Lunge und Gehirn festgestellt werden. Bei Erwachsenen war ebenfalls eine starke Expression in den Nieren und zusätzlich in Skelettmuskel, Plazenta, Herz, Prostata und der Schilddrüse detektierbar. Schwächere Signale traten in Geweben von Pankreas, Leber, Lunge, Gehirn, Dünndarm, Uterus, Thymus, Nebenniere, Luftröhre und Rückenmark auf [101].

Trotz der großen Ähnlichkeit der beiden Transportproteine führte eine Expression von OCTN2 in Modellzellen kaum zu einem erhöhten Transport von TEA^+ , jedoch zu einer deutlich erhöhten L-Carnitin-Aufnahme verglichen mit OCTN1. Die Aufnahme von TEA^+ über beide OCTN-Transporter ist pH-abhängig und unter azidischen Bedingungen verringert. Darüber hinaus bewirkt ein niedriger extrazellulärer pH-Wert in beiden Fällen den Efflux von TEA^+ [111][113]. Aufgrund der Expression der OCTN-Proteine in der apikalen Membran proximaler Tubuluszellen der Nieren fungieren die Transporter auf diese Weise als H^+ /Kationen-Austauscher, über die positiv geladene Substanzen aus dem Intrazellulärraum in den Primärharn abgegeben werden können [100].

Das Vorhandensein des Sequenzmotivs für eine Nukleotid-Bindestelle in der Aminosäuresequenz der OCTN-Transporter wirft die Frage auf, ob es auch einen primäraktiven Transport unter Energieverbrauch durch die L-Carnitin-Transporter gibt. Für OCTN2 ist ein derartiges Transportverhalten bisher nicht beobachtet worden. Die Arbeitsgruppe um Tamai et al. konnte jedoch für OCTN1 eine, zumindest partielle, ATP-Abhängigkeit des ^{14}C TEA⁺-Transports feststellen. Die Aufnahme unter ATP-armen Bedingungen war gegenüber den Kontrollzellen um nahezu die Hälfte vermindert

und zeigte eine verstärkte Sensitivität gegenüber Änderungen des extrazellulären pH-Wertes [102]. Es ist jedoch nicht geklärt, ob dies mit dem Transportmechanismus des OCTN1 oder mit der Unfähigkeit der Aufrechterhaltung eines konstanten, intrazellulären pH-Wertes unter ATP-armen Bedingungen zusammenhängt. Diesbezüglich fehlen noch weitere Untersuchungen zur ATP-Abhängigkeit des Transportmechanismus von OCTN-Transportern.

Die Aufnahme von L-Carnitin durch OCTN2 folgt einem gänzlich anderen Mechanismus. Der Transporter ist in diesem Fall kein Austauscher von L-Carnitin gegen intrazelluläre Kationen, sondern agiert in Form eines elektrogenen Co-Transporters und realisiert die Aufnahme von Natrium-Ionen (Na^+) und L-Carnitin im Verhältnis von 1:1. Dies ist der Grund für die Na^+ -Abhängigkeit des OCTN2 in seiner Funktion als Carnitin-Transporter [100]. In Substitutionsversuchen mit anderen Kationen konnte keine Transportaktivität gemessen werden, die der in Anwesenheit von Na^+ -Ionen entsprach. Von den getesteten Ionen (Kalium, Chlorid und N-Methylglucamin), konnte nur unter Substitution von Na^+ gegen Lithium-Ionen eine geringe Carnitin-Transportaktivität aufrecht erhalten werden [101].

L-Carnitin spielt eine entscheidende Rolle bei der Energiegewinnung durch den Abbau langkettiger Fettsäuren in den Mitochondrien. Es wird entweder mit der Nahrung zugeführt oder aus den Aminosäuren L-Lysin und L-Methionin im Körper synthetisiert. Die Hauptsyntheseorgane sind Leber, Nieren und Gehirn. Carnitin ist nicht proteingebunden, sondern zirkuliert frei oder in Form von Acylcarnitin im Blut, weshalb es in den Nieren filtriert und aus dem Primärharn rückresorbiert wird. Der Abbau von Fettsäuren durch die β -Oxidation findet in den Mitochondrien statt, was bedeutet, dass die äußere und innere Membran dieser Organelle überwunden werden müssen, um eine Energiegewinnung zu ermöglichen [82]. Hierfür wird die Fettsäure zunächst enzymatisch auf das Co-Enzym A übertragen, wodurch Acyl-CoA entsteht. Diese Veresterung führt zur Aktivierung der Fettsäure. In dieser Form kann der Acylrest schließlich durch die Carnitin-Acyl-Transferase auf L-Carnitin übertragen werden, wodurch dieser zum Substrat der Carnitin-Acylcarnitin-Transporter 1 und 2 (CACT1: äußere Membran, CACT2: innere Membran) wird. Dieser realisiert den aktiven Transport in die mitochondriale Matrix. Dabei wird pro aufgenommenem Acyl-Carnitin ein vom Acylrest befreites Carnitin-Molekül zurück ins Zytosol befördert, wo es wieder für einen neuen Transportzyklus zur Verfügung steht. Dem L-Carnitin kommt hier die Funktion eines Acyl-Shuttles zu, welches zur Aufrechterhaltung der Energiegewinnung aus dem Abbau von Fettsäuren zwingend notwendig ist [42].

Es ist diese Hauptfunktion des L-Carnitin-Transports, die charakteristisch für Erkrankungen ist, welche mit einer fehlerhaften Funktion von OCTN2 in Verbindung stehen. Es wurden unterschiedliche Mutationen im *octn2*-Gen identifiziert, welche zum Verlust der Transportfunktion des translatierten Proteins führen und in Patienten ei-

ne autosomal rezessiv vererbte, primäre systemische Carnitin-Defizienz auslösen [71]. Diese Erkrankung äußert sich in Form von sehr geringen L-Carnitin-Spiegeln im Plasma und Muskelzellen von Betroffenen, was in Folge der beeinträchtigten Energiegewinnung durch β -Oxidation, zu Schwäche der Herz- und der Skelettmuskulatur führt und auch in Verbindung mit einer Fettleber (Steatose) auftreten kann. Ursächlich ist der Verlust des glomerulär filtrierte L-Carnitins, welches nicht mehr über die OCTN-Transporter rückresorbiert werden kann und so mit dem Urin ausgeschieden wird. Diese Erkrankung wird i.d.R. im frühen Kindesalter diagnostiziert und auch mit dem Auftreten des sog. plötzlichen Kindstodes in Verbindung gebracht [65]. Darüber hinaus werden Zusammenhänge zwischen fehlerhafter Funktion von OCTN-Transportern und der Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Morbus-Crohn, einer chronischen, inflammatorischen Erkrankung des Dickdarms [78][112], und männlicher Infertilität [47][91] beschrieben. Es kann jedoch auch unter Verabreichung bestimmter Medikamente zu einer sekundären Carnitin-Defizienz kommen, wenn diese durch Beeinträchtigung von OCTN-Transportern zu einer verminderten L-Carnitin-Rückresorption im Tubulussystem der Nieren führen [75]. So muss bei einer Therapie mit Substanzen, die eine inhibitorische Wirkung auf OCTN1/2 haben, darauf geachtet werden, dass die L-Carnitin-Homeostase des Patienten aufrecht erhalten bleibt, um unerwünschte Nebenwirkungen zu verhindern.

1.3 Die SLC47 Familie

Tiere wie Menschen nehmen aus ihrer Umgebung Toxine auf und produzieren Stoffwechselprodukte, welche aus dem Körper entfernt werden müssen. Um dies zu realisieren, gibt es zwei Hauptausscheidungswege aus dem Organismus. Dies ist zum einen die Leber, die aufgenommene Verbindungen prozessieren kann und über die Gallenflüssigkeit ins Darmlumen abgibt, zum anderen die Nieren, die zu eliminierende Substanzen aus dem Blut filtern und über den Urin ausscheiden. Für diese Prozesse ist die Polarisierung der Zellen an Grenzflächen wie den Gallengängen der Leber und den Tubuluszellen der Niere von großer Bedeutung, da die zu eliminierenden Substanzen basal aus dem Blut aufgenommen und apikal an die Gallenflüssigkeit bzw. den Harn wieder abgegeben werden.

Im Falle der Niere sind Transporter, die für die basolaterale Aufnahme von auszuscheidenden Substanzen verantwortlich sind, schon länger bekannt, wohingegen die Abgabe über die apikale Membran für längere Zeit ungeklärt blieb. Dabei wurde schon früh von verschiedenen Arbeitsgruppen die Existenz eines elektroneutralen H^+ /org. Kationen-Austauschers vorhergesagt. Holohan und Ross beschrieben bereits 1981 den elektroneutralen Austausch von organischen Kationen gegen Protonen [41]. Maegawa et al. zeigten 1988 an Membranvesikeln aus Rattennieren eine pH-abhängige Aufnahme

von Tetraethylammonium (TEA^+), bei der die stärkste Akkumulation dieses organischen Kations in den Vesikeln bei einem äußerem pH-Wert von 7,2 und einem inneren pH von 6,2 detektiert wurde [58]. Die gleiche pH-Abhängigkeit konnte auch von Lazaruk 1990 an renalen Bürstensaummembranvesikeln von Kaninchen gezeigt werden, wo die Aufnahme von TEA^+ und 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP^+) entgegen eines auswärtsgerichteten Protonengradienten beobachtet werden konnte [53].

Im Jahr 2005 wurde dieser Protonenaustauscher schließlich von Masuda identifiziert und als multidrug toxin and extrusion protein (MATE) beschrieben [63]. Die Arbeitsgruppe war vom Transportprotein NorM des Bakteriums *Vibrio parahaemolyticus* ausgegangen, welches ein Na^+ /Substrat-Austauscher ist und so verschiedene Substanzen aus der Zelle entfernt [69], und ist bei der Suche nach humanen orthologen Genen auf die SLC-Familie 47 gestoßen. Sie fanden zwei Gene, die auf dem Chromosom 17 lokalisiert sind und von denen eines, hMATE1 (SLC47A1), wobei h für Humanvariante steht, eine Homologie von 19,8 % und das zweite, hMATE2 (SLC47A2), eine Homologie von 18,6 % zu der Sequenz von NorM aufwies.

Die Expression von MATE1, welches ein Transkript von 4,1 kb bildet, wurde von Masuda et al. in den Organen Leber, Niere, Nebenniere und Skelettmuskel detektiert, während eine Expression vom 3,2 kb großen Transkript von MATE2 nur in der Niere gefunden wurde. Masuda et al. zeigten 2005, dass noch weitere Varianten von MATE2 mit unterschiedlichen Expressionsmustern und Transporteigenschaften existieren. So wurde die Expression von MATE2-B (brain) im Gehirn nachgewiesen. MATE2-B zeigte jedoch im Gegensatz zu MATE2 weder mit noch ohne pH-Gradienten einen messbaren Transport von TEA^+ . MATE2-K (kidney) wird ausschließlich in der Niere exprimiert, wo es zusammen mit MATE1 in der apikalen Zellmembran des proximalen Tubulus lokalisiert ist. Dieser Transporter wird durch einen pH-Gradienten stimuliert und interagiert mit einer Reihe organischer Kationen, jedoch i.d.R. nicht mit Anionen.

Beide MATE2-Varianten sind in 17 Exons organisiert und weisen Unterschiede zu MATE2 in Exon 7 auf. MATE2-B besitzt - verglichen mit MATE2 - eine Insertion von 46 bp, MATE2-K dagegen eine Deletion von 108 bp innerhalb dieses Exons. Mit einem Transkript, welches in ein Protein aus 566 Aminosäuren translatiert wird, ist MATE2-K deutlich größer als das aus 660 bp bestehende und der in ein 220 AS umfassendes Protein translatierte MATE2-B. So ist MATE2-K mit 61 kDa auch etwa zweieinhalb Mal schwerer als der 23 kDa schwere MATE2-B.

Da MATE-Transporter Exportproteine sind, die ein Substratmolekül aus dem Zellinneren gegen ein Proton aus dem Extrazellularraum austauschen, bedarf es für die Transportuntersuchung entweder eines basischen extrazellulären pH-Wertes oder einer von Roos und Boron 1981 entwickelten Technik zur transienten Ansäuerung des Zellinnenraums, die der Umkehrung des Protonengradienten dient [83]. Hierbei werden die Zellen in 30 mM Ammoniumchlorid-Lösung (NH_4Cl) bei Raumtemperatur für

30 min vorinkubiert und anschließend der Transportversuch in NH_4Cl -freiem Transportpuffer durchgeführt. Während der Vorinkubation verteilt sich das NH_4Cl bis zum Äquilibrium zwischen Zellinnerem und -äußerem. Wird die Salzlösung zu Beginn des Transportexperiments abgesaugt und durch NH_4Cl -freien Puffer ersetzt, entsteht ein auswärts gerichteter NH_4^+ -Gradient. Da Ammoniak (NH_3) im Gegensatz zu geladenen Ammonium dem Konzentrationsgefälle folgend schnell durch die Zellmembran diffundieren kann, zerfällt das Ammonium in NH_3 und lässt ein Proton im Innenraum der Zelle zurück, welches nun für den Austausch gegen extrazelluläre Substratmoleküle zur Verfügung steht. So kann durch etablierte Methoden die Aufnahme von markierten Substraten in stabil mit diesen Transportern transfizierte Zellen gemessen werden. Die Umkehrung der Triebkraft kann jedoch auch durch alkalische pH-Werte des Transportpuffers von ca. 8,5 erreicht werden.

Zur Analyse der Proteinstruktur von Säugetier-MATE wurde abermals *V. parahaemolyticus* als Ausgangsprotein herangezogen. Die Struktur des bakteriellen Na^+ /org. Kationen-Austauschers wurde von He et al. per Röntgenstrukturanalyse ermittelt und stellt ein Membranprotein mit 12 TMH dar, welches aus zwei symmetrischen Bündeln aus je sechs α -Helices besteht [39]. Diese umschließen eine Kavität, welche in Richtung des Extrazellulärtraumes geöffnet und affin für monovalente Kationen wie beispielsweise Na^+ ist. Die Bindung eines solchen Kations führt vermutlich zu einer Konformationsänderung von auswärts zu einwärts gerichteter Öffnung, in welchem Zustand eine höhere Bindungsaffinität für Substratmoleküle gegeben ist.

Untersuchungen an MATE1 von Säugetieren (Ratte, Kaninchen und Mensch) ergaben eine Proteinstruktur von 13 TMH, wobei die zusätzliche Domäne mit dem extrazellulären C-Terminus für die Transportfunktion des Proteins nicht zwingend erforderlich ist. Vergleiche zwischen MATE-Varianten mit 13 und 12 TMH ergaben, dass die verkürzte Form keine grundlegend abweichende Substratspezifität aufwies, sondern vergleichbar mit der der Langform war. Die Transportaktivität der Kurzform war zwar nur geringfügig vermindert, jedoch ließ sich eine deutlich erhöhte Proteinexpression in der Zellmembran nachweisen, weshalb für die Langform von MATE1 eine erhöhte katalytische Effizienz postuliert wird [117].

Die in Richtung des Extrazellulärtraumes geöffnete Konformation weist neben Regionen mit vorwiegend anionischen oder kationischen Seitenketten auch große Bereiche auf, die von ungeladenen und damit hydrophoben Seitenketten gebildet werden. Hydrophobizität wird somit als ein Parameter vermutet, der maßgeblichen Einfluss auf die Interaktion des Transporters mit Substrat- oder Inhibitormolekülen besitzt. Die in Richtung des Zytoplasmas geöffnete Konformation wird nach dem Modell von Zhang et al. im Inneren maßgeblich von vier azidischen Aminosäuren gebildet [117]. Diese bilden einen hydrophilen Bereich, sind in Säugetieren stark konserviert und haben großen Einfluss auf die Substrataffinität und -spezifität, was bereits von Matsumoto

et al. in verschiedenen Mutationsexperimenten gezeigt wurde [64]. Zwei der besagten Aminosäuren sind auch im bakteriellen MATE1 hoch konserviert und wirken hier als stabilisierende Elemente für monovalente Metallionen.

Unter Zuhilfenahme radioaktiv markierter Substrate wurden gängige Pharmaka identifiziert, die nachweislich über MATE-Transporter ausgeschieden werden wie z.B. Cimetidin (H_2 -Rezeptor-Antagonist), Metformin (Antidiabetikum) oder auch Procainamid (Antiarrhythmikum) [103]. Liegen die zu untersuchenden Substanzen nicht in markierter Form vor, werden in den meisten Untersuchungen die Modellsubstrate MPP^+ und TEA^+ für Transportuntersuchungen von MATE-Proteinen verwendet und die Inhibition der Aufnahme dieser Modellsubstanzen in Anwesenheit der Testsubstanzen gemessen.

Um weitere Erkenntnis über die Substratspezifität von MATE-Proteinen zu finden und so auf mögliche Wechselwirkungen zwischen Pharmaka (Drug-Drug-Interaktionen = DDI) schließen zu können, haben sowohl Astorga et al. als auch Wittwer et al. systematische Inhibitionsanalysen unter Verwendung verschiedener Substanzen durchgeführt [1][109]. Die Studien kommen zu dem Schluss, dass die vom Transportprotein gebildete Pore, in der die Substratbindungsstellen liegen, vergleichsweise groß sein und im Inneren aus verschiedenen Bindungsbereichen bestehen muss. Es wird vermutet, dass es sowohl negativ geladene als auch hydrophobe Areale gibt, wodurch es keinen einzelnen physikochemischen Parameter gibt, durch den sich eine Interaktion mit Proteinen der MATE-Familie voraussagen lässt. Es ist eher das Zusammenspiel mehrerer struktureller und physikochemischer Eigenschaften ausschlaggebend. So kamen Astorga et al. und Martinez-Guerrero et al. übereinstimmend zu einem Modell, in welchem mehrere hydrophobe Bereiche, Wasserstoffbrückenbindungen und positiv ionisierbare Eigenschaften vertreten sein müssen [1][62]. Darüber hinaus gibt es Hinweise darauf, dass sich Heterozyklen mit Stickstoff als Heteroatom als Bestandteil eines Moleküls positiv auf das Interaktionsverhalten mit MATE-Proteinen auswirken. Generell ist das Ergebnis der Berechnung eines Modells nicht abhängig vom Modellsubstrat, welches für die Inhibitionsanalyse verwendet wurde [62]. Es muss jedoch die Tatsache berücksichtigt werden, dass sämtliche Analysen mit MATE-Proteinen als Aufnahmetransporter unter Umkehrung ihres physiologischen Transportmechanismus durchgeführt wurden. Zwar ist im Falle des Modellsubstrates MPP^+ kein wesentlicher Unterschied zwischen der extrazellulären und intrazellulären Affinität des MATE1 nachweisbar, jedoch muss dies nicht zwingend für alle Substrate dieser Transportproteine der Fall sein [17].

Die Erstellung eines Pharmakophors mit der Möglichkeit Interaktionscharakteristika von Substanzen mit MATE-Proteinen vorauszusagen, ist von besonderem Interesse, da diese Transportproteine den finalen Schritt der Eliminierung vieler Pharmaka über die Leber, bzw. die Niere realisieren und DDIs in diesem Zusammenhang deutliche Auswirkungen haben können. So führt eine gleichzeitige Behandlung der beiden

MATE-Substrate Cimetidin und Metformin zu einer verminderten Ausscheidung und somit höheren Plasmakonzentrationen des Antidiabetikums [98]. In derartigen Fällen ist die Gefahr einer Überdosierung von Metformin gegeben, was zu einer verstärkten Produktion von Laktat und somit zur Ausbildung einer Azidose beim betreffenden Patienten führen kann. So konnte bei Untersuchungen an Mäusen ohne funktionell exprimierten MATE1 bei Verabreichung von Metformin die Entwicklung einer Laktatazidose beobachtet werden [106].

1.4 Zytostatika

Zytostatika sind Substanzen, die zur Behandlung unterschiedlicher Erkrankungen mit dem Ziel der Verringerung der Zellteilung eingesetzt werden. Ein Haupteinsatzgebiet dieser Substanzen ist, neben der Therapie von Autoimmun- oder Viruserkrankungen, die Chemotherapie von Patienten mit Tumorerkrankungen. Zytostatika werden in der Regel systemisch verabreicht, wodurch sie unselektiv in allen Zellen wirken, in die sie aufgenommen werden. Entartete Zellen mit einer hohen Proliferation werden dabei durch die hohe Zellteilungsaktivität stärker geschädigt als Zellen mit einer geringeren Teilungsrate. Es kommt jedoch auch in Geweben, die unter physiologischen Bedingungen eine hohe Teilungsrate aufweisen zu Schädigungen. Nebenwirkungen von Chemotherapien können so je nach verabreichter Substanz Haarausfall, Knochenmarksdepression und Veränderungen der Schleimhaut des Gastro-Intestinal-Traktes sein.

Es gibt eine große Anzahl verschiedener Pharmaka mit unterschiedlichen Wirkmechanismen, anhand derer sie eingeteilt werden. In dieser Arbeit wurden Zytostatika der Wirkstoffgruppen der Alkylantien, Antimetabolite, Mitose-Inhibitoren, Topoisomerase-Inhibitoren und der Interkalantien für die Interaktionsanalysen verwendet. Darüber hinaus wurden drei weitere Substanzen auf ihr Interaktionsverhalten getestet, die begleitend in der Tumorthherapie eingesetzt werden und im Folgenden als Adjuvantien beschrieben werden [10].

Zu den Substanzen aus der Gruppe der Alkylantien zählen Thio TEPA, Treosulfan, Busulfan, Ifosfamid, Trofosfamid, Cyclophosphamid, Bendamustin, Chlorambucil und Melphalan. Diese Zytostatika sind in der Lage, Alkylreste auf Sauerstoff- oder Stickstoffatome von Nucleobasen wie auch auf die Phosphatgruppen des Ribose-Rückgrads der DNA zu übertragen. Derartige Modifikationen können über die chemische Veränderung der Basen zu Fehlpaarungen in der DNA führen oder eine Basenpaarung vollständig verhindern. Bifunktionale Alkylantien wie die N-Lost-Verbindungen Bendamustin oder Melphalan können über die zweite Seitenkette ein weiteres Zielmolekül binden und so Quervernetzungen zu weiteren Basen oder Aminosäureseitenketten von Proteinen bilden. Diese fehlerhaften DNA-Strukturen setzen Reparaturmechanismen in Gang, wodurch Strangbrüche entstehen, und können je nach Ausmaß der Schä-

digung zum Übergang der Zelle in die Apoptose führen. Darüber hinaus können auch Enzyme alkyliert werden, die an der DNA-Replikation und der Reparatur beteiligt sind, und diese so in ihrer Funktion inhibieren [10].

Antimetabolite sind Substanzen, die natürlichen Metaboliten des Stoffwechsels ähneln und in gleicher Weise verwendet werden. Da sie jedoch nicht die gleiche biologische Funktion erfüllen, kommt es je nach Art der Substanz zu unterschiedlichen Beeinträchtigungen. Eine große Gruppe stellen die Nucleosid-Analoga dar, die in ihrer Struktur den Nucleobasen ähneln und wie diese bei der DNA-Synthese als Bausteine verwendet werden. Zu dieser Gruppe gehören die Substanzen Cladribin, Fludarabin, Fluoroadenin, 5-Fluorouracil, Gemcitabin und Cytosinarabinosid. Ihr Einbau während der DNA-Synthese führt zu Fehlpaarungen der Basen oder inhibiert auf unterschiedliche Art an der DNA-Replikation beteiligte Enzyme. Auf diese Weise wird die Replikation stark proliferierender Tumorzellen beeinträchtigt. Folsäureantagonisten wie Methotrexat sind Strukturanaloga von Folaten, welche Vorstufen des Tetrahydrofolats sind. Diese Substanz dient der *de novo*-Synthese von Purinbasen und ist so essentiell für die Synthese der DNA-Bausteine. Methotrexat inhibiert das Enzym Dihydrofolat-Reduktase und verhindert so die Oxidation von Folat zu Tetrahydrofolat, welches die aktive Vorstufe des Co-Faktors ist. Auf diese Weise wird die DNA-Replikation effizient gehemmt, was eine verringerte Proliferation zur Folge hat [10].

Interkalantien wie Mitoxantron und Doxorubicin binden an die Basen innerhalb der Doppelhelix und fügen sich zwischen die gestapelten DNA-Bausteine in die Sequenz ein. Die Bindung der DNA-Polymerase wird dadurch verhindert, wodurch eine Replikation unterbunden wird. Beide Substanzen haben noch eine weitere Wirkungsweise. Sie beeinträchtigen die Aktivität der Topoisomerase II, welche während der Replikation die Superspiralisierung der DNA durch Bildung und anschließende Ligation von Strangbrüchen entspannt, aber auch die Spiralisierung der DNA nach Bedarf verstärken kann.

Zu den klassischen Topoisomerase-Inhibitoren zählen Irinotekan und Etoposid. Wird der Spiralisierungsgrad der DNA nicht reguliert und Strangbrüche nicht ligiert, ist durch die großen Torsionskräfte und die daraus resultierende Schädigung keine Replikation mehr möglich, und die Zelle geht in die Apoptose über [10].

Mitose-Inhibitoren greifen an unterschiedlichen, für den regelgerechten Ablauf der Mitose notwendigen Strukturen an. Paclitaxel fördert durch die Bindung an β -Tubulin die Stabilität von Mikrotubuli, wodurch der Spindelapparat zur Trennung der Chromosomen bestehen bleibt und das Fortschreiten der Zellteilung verhindert wird. Die Vincaalkaloide Vinblastin und Vincristin binden ebenfalls an β -Tubulin, allerdings an einer anderen Position. Diese beiden Substanzen verhindern die Polymerisation mit α -Tubulin, wodurch kein funktionierender Spindelapparat aufgebaut werden und keine Zellteilung stattfinden kann. Das Resultat aller drei Substanzen ist gleichfalls die

Arretierung der Zellteilung und der Übergang der Zelle in die Apoptose [10].

Die in dieser Arbeit verwendeten Adjuvantien Tamoxifen, Clodronsäure und Prednison haben sehr unterschiedliche Wirkungen. Tamoxifen ist ein selektiver Östrogen-Rezeptor-Modulator, der, je nach Art des Estrogen-Rezeptors der im Gewebe exprimiert ist, als Estrogen-Agonist oder -Antagonist wirken kann. Im Brustgewebe wirkt Tamoxifen als Östrogen-Antagonist und inhibiert so effektiv das Wachstum Östrogen-abhängiger Tumore. Es wird begleitend zu anderen Zytostatika eingesetzt oder bei Patientinnen mit einem hohen Brustkrebsrisiko als präventive Therapie über einen Zeitraum von mehreren Jahren eingesetzt. Prednison gehört zu den Glucocorticoiden und zeigt insbesondere bei Leukämien im Kindesalter eine hohe Effektivität. Durch die Bindung der Glucocorticoide an ihre entsprechenden Rezeptoren wird ein anti-proliferativer Effekt ausgelöst und der Übergang der Zelle in die Apoptose bewirkt. Durch seine immunsupprimierende Wirkung wird Prednison auch zur Verminderung von Ödemen nach Radiotherapie im Bereich des Mediastinums, des Gehirns oder des Rückenmarks verwendet. Clodronsäure ist als Bisphosphonat wird nicht direkt zur Therapie von Tumorerkrankungen eingesetzt, sondern zum Schutz vor Knochenabbau, wenn dieser durch neoplastische Erkrankungen in Mitleidenschaft gezogen wird. Es wird auch häufig begleitend zu einer Therapie mit Östrogen-Antagonisten eingesetzt, um osteoporotischen Veränderungen der Knochensubstanz in Folge des Östrogenmangels entgegen zu wirken [37].

2 Material und Methoden

2.1 Zellkultur

Für die Analyse der unterschiedlichen SLC-Transporter (PEPT1, PEPT2, OCTN2 und MATE2-K) wurden stabil transfizierte, humane embryonale Nierenzellen (HEK293-Zellen) verwendet, die freundlicher Weise von der PortaCellTec Biosciences GmbH zur Verfügung gestellt wurden. Diese wurden in DMEM-Medium der Firma PAN-Biotech mit 10 % fetalem Kälberserum (FKS) und Pen/Strep kultiviert. Die Tumorzelllinien wurden in RPMI-Medium der Firma AppliChem mit 10 % FKS und Pen/Strep kultiviert und dem Medium der Zelllinien MCF-7, BT549, Hs578T und T47-D zusätzlich 10 U/L bovines Insulin der Firma Sigma-Aldrich zugesetzt. Alle Zelllinien wurden in Kulturschalen mit einem Durchmesser von 10 cm, bei 37°C und einer CO₂-Konzentration von 5,0 % kultiviert. Nach Erreichen von Konfluenz wurden die HEK293-Zellen mit 10 mL PBS der Firma AppliChem gewaschen und mit 1,0 mL Trypsin/EDTA versetzt. Nach 1 min bei 37°C wurden die Zellen durch Klopfen vom Schalenboden abgelöst und in 9,0 mL Medium aufgenommen. Nach Zentrifugation bei 110x g für 3 min wurde das Medium abgesaugt und die Zellen in 2,0 mL Medium aufge-

nommen. Die Karzinomzelllinien wurden nach dem Waschen mit PBS bis zum Ablösen von Schalenboden in 2,0 mL Trypsin/EDTA inkubiert und für 5 min bei 140 x g zentrifugiert. Zum Zählen in einer Neubauerzählkammer wurden 10 μL der Zellsuspension im Verhältnis 1:20 mit PBS verdünnt. Für Transportexperimente wurden $2 \cdot 10^5$ Zellen pro Kavität in einer Mikrotiterplatte mit 24 Kavitäten ausgesät und unter den oben beschriebenen Bedingungen für drei Tage bis zur Konfluenz kultiviert. Vor Beginn jedes Transportexperiments wurden die Zellen zweimal mit PBS und einmal mit HBSS gewaschen. Die verwendeten Zelllinien wurden von der American Type Culture Collection (ATCC) in Manassas und der deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) in Braunschweig bezogen.

2.2 Gesamtproteinbestimmung

Die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration erfolgte nach der Methode von Bradford. Das Reaktionsprinzip beruht hier auf der Komplexbildung des Farbstoffes Commassie-Brillant-Blau G250 mit kationischen und unpolare Aminosäureseitenketten von Proteinen unter sauren Bedingungen. Der ungebundene Farbstoff besitzt ein Absorptionsmaximum von 465 nm (blau), welches sich durch die Komplexbildung in den Bereich von 595 nm (gelb) verschiebt [8]. Für die Analyse wurden Zellen unter identischen Bedingungen wie zur Vorbereitung eines Transportversuches kultiviert (Abschnitt 2.1). Es wurden auch die gleichen Waschschrte wie zur Transportvorbereitung durchgeführt, woran sich die Zellyse mit 5X Passive Lysis Buffer der Firma Promega anschloss. Hierfür wurde das Pufferkonzentrat im Verhältnis 1:5 mit destilliertem Wasser verdünnt und je 100 μL direkt in die Kavität auf die Zellen gegeben. Nach 1 h Inkubation bei Raumtemperatur unter Schütteln, wurde das Lysat mit 1900 μL PBS versetzt, homogenisiert und 20 μL für die Analyse eingesetzt. Das Homogenat wurde in einer Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten mit 200 μL Bradford-Reagenz vermischt und bei 595 nm im Mikroplattenleser Mithras LB 940 der Firma Berthold Technologies gemessen. Die Rezeptur des Bradford-Reagenzes ist in Tabelle 2 beschrieben.

Tabelle 2: Zusammensetzung von 250 mL Bradford-Reagenz

Substanz	Menge
Serva Blue G	70 mg
Ethanol (96 %)	50 mL
Phosphorsäure (85 %)	100 mL

2.3 Cis-Inhibition

Für die Interaktionsanalyse der Transportproteine mit den Testsubstanzen wurde eine definierte Menge Transportpuffer mit den jeweiligen Transporter-spezifischen markierten Substraten auf die Zellen gegeben und die Aufnahme dieser in An- und Abwesenheit der untersuchten Zytostatika und Adjuvantien gemessen. Dabei wurde für jedes Transportprotein ein spezifischer Inhibitor als Inhibitionskontrolle mitgeführt und zusätzlich die Aufnahme unter gleichen Bedingungen in Leervector-transfizierten Zellen (MOCK) gemessen. Die Interaktionsanalyse wurde in Mikrotiterplatten mit 24 Kavitäten bei 37°C durchgeführt. Als Transportpuffer wurde HBSS mit 10 mL 1,0 M HEPES-Puffer der Firma Biochrom verwendet, mit einem Transportvolumen von 200 μL pro Kavität. Die Transportzeit wurde nach Aspiration des Waschpuffers mit Zugabe des Transportansatzes gestartet. Die genauen Transportbedingungen der jeweiligen Transporter können Tabelle 3 entnommen werden. Der Transport wurde beendet durch Zugabe von 500 μL 4°C kaltem PBS, womit dreimal gewaschen wurde. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 500 μL 1 M NaOH-Lösung für mindestens 2 h lysiert und in Röhrchen mit 2,5 mL Rotizint eco plus der Firma Carl Roth überführt. Die Radioaktivität der Proben wurden im TriCarb2810 der Firma Perkin Elmer bestimmt. Die Auswertung erfolgte mittels Standards, bei denen der Szintillationslösung neben 2,5 mL NaOH-Lösung, 5,0 μL des jeweiligen Transportansatzes zugegeben wurde. Pro Versuchsreihe wurde ein Ansatz ohne inhibitorische Substanzen als Referenz für 100 % Substrataufnahme mitgeführt und ein weiterer Ansatz, mit einer Transporter-spezifischen Inhibitorsubstanz, um sicherzustellen, dass die gemessene Substrataufnahme durch das getestete Transportprotein vermittelt wurde. Die gemessenen Aufnahmen wurden auf die Gesamtproteinkonzentration bezogen, um Unterschiede im Zellwachstum zwischen den transfizierten und den mit Leervector transfizierten MOCK-Zellen auszugleichen.

Tabelle 3: Transportbedingungen der getesteten SLC-Transporter

	PEPT1	PEPT2	OCTN2	MATE2-K
Substrat	Gly-Sar	Gly-Sar	L-Carnitin	MPP ⁺
Konz. [³ H]	0,25 μM	0,25 μM	5,0 nM	5,0 nM
Konz. kalt	160 μM	26 μM	1,0 μM	–
Inhibitor	Losartan	Tyr-Phe	Verapamil	Cimetidin
Inhibitorkonz.	1,5 mM	60 μM	100 μM	100 μM
Transportzeit	2 min	2 min	1 min	1 min

Die getesteten Zytostatika wurden in einer Konzentration von je 100 μM in HBSS zusammen mit der jeweiligen Konzentration an markiertem Modellsubstrat eingesetzt und der Transport bei 37°C und pH 7,4 durchgeführt. Für die Interaktionsanalyse

von MATE2-K wurde vor Transportbeginn eine Vorbehandlung mit 30 mM NH_4Cl für 30 min durchgeführt, um die physiologische Transportrichtung umzukehren (siehe Abschnitt 1.3) [83].

2.4 K_i -Wert Bestimmung

Zur Bestimmung der Affinität des getesteten Transporters gegenüber der jeweiligen interagierenden Substanz wurde der K_i -Wert mittels Dixon-Plot bestimmt. Je kleiner dabei der K_i -Wert, desto höher ist die Affinität des Transportproteins gegenüber der getesteten Substanz. Für die Analyse wurden zwei Transportansätze in Transportpuffer mit der gleichen Konzentration an markiertem Modellsubstrat hergestellt, und die Testsubstanz je in den gleichen, ansteigenden Konzentrationen zugegeben. Die Ansätze unterschieden sich in der Konzentration von unmarkiertem (kaltem) Modellsubstrat. Dabei wurden die eingesetzten Mengen so gewählt, dass sich die finalen Konzentrationen des Modellsubstrats der beiden Ansätze um den Faktor 10 unterscheiden. Die Aufnahmezeit entsprach der in Tabelle 3 für die jeweiligen Transporter angegebenen Transportzeit. Der Schnittpunkt der in den negativen Bereich extrapolierten Regressionsgeraden gibt dabei für die InhibitorKonzentration bei $-i = -K_i$ wieder.

Tabelle 4: Bedingungen für Affinitätsbestimmung der getesteten SLC-Transporter

	OCTN2	MATE2-K
Substrat [^3H]	L-Carnitin (5,0 nM)	MPP $^+$ (5,0 nM)
Substrat kalt	2,7 bzw. 27 μM	10 bzw. 100 μM
Transportdauer	1 min	1 min

2.5 IC_{50} -Wert Berechnung

Die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) gibt die Konzentration einer inhibitorischen Substanz an, bei der die halbmaximale Inhibition des Transporters beobachtet wird. Die Berechnung der IC_{50} -Werte für OCTN2 und MATE2-K wurde für die gleichen Substanzen vorgenommen, für die auch die in Abschnitt 2.4 beschriebene Affinitätsanalyse durchgeführt wurde. Für die Berechnung der Werte wurden die Daten der K_i -Wert-Bestimmung verwendet, wobei hier nur die Ergebnisse der Messung in Anwesenheit der jeweils geringeren Konzentration von unmarkiertem Modellsubstrat herangezogen wurden. So wurden für den Transporter OCTN2 die Messwerte der Affinitätsanalyse verwendet, die in Anwesenheit einer Gesamtkonzentration von 2,7 μM L-Carnitin erhalten wurden und für MATE2-K diejenigen, die bei einer Gesamtkonzentration von 10 μM MPP $^+$ bestimmt wurden. Die Berechnung der IC_{50} -Werte erfolgte nach der von Burlingham et al. beschriebenen Methode [11]. Hierbei definiert der

Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der X-Achse im Dixon-Plot bei $-i = -IC_{50}$ die entsprechende Inhibitorkonzentration.

2.6 Expressionsanalyse Tumorzellen

2.6.1 mRNA-Isolation

Zur Isolation der mRNA wurde das RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen verwendet. Hierfür wurden die Proben der sechs Mammakarzinom- und drei Prostatakarzinom-Zelllinien aus je zwei unterschiedlichen Passagen, wie unter Abschnitt 2.1 beschrieben, bis zur Konfluenz kultiviert und nach dem Waschen mit PBS mittels Trypsin vom Boden der Kulturschale abgelöst. Die nach der Zentrifugation erhaltenen Zellpellets wurden nochmals mit PBS gewaschen und in je 700 μL „RLT-Puffer“, mit einem Anteil von 1 % β -Mercaptoethanol, lysiert. Nach dem Mischen wurden 700 μL 70 % Ethanol zugegeben und jeder Zell-Ansatz, nach erneutem Mischen mittels einer Pipette, auf zwei RNeasy Mini spin Säulen pro Probe aufgeteilt und diese in 2,0 mL Reaktionsgefäße gestellt. Die Zentrifugation erfolgte für 15 s bei 16 x g; der Durchfluss wurde verworfen. Ein DNase-Verdau wurde nicht durchgeführt, sondern direkt ein Waschschritt mit je 700 μL RNA-Waschpuffer „RW1-Puffer“ angeschlossen. Nach erneuter Zentrifugation folgten zwei weitere Waschschritte mit je 500 μL „PPE-Puffer“, wobei die Zentrifugationsdauer des zweiten Schrittes 2 min betrug. Die Elution erfolgte mit je 40 μL RNase-freiem Wasser, wobei die zu Beginn der Isolation auf zwei Säulen aufgeteilten Ansätze der einzelnen Zelllinien nacheinander eluiert und so in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß vereinigt wurden. Für die Messung der mRNA-Konzentration und die Bestimmung der Qualität wurde eine photometrische Bestimmung am Photometer GeneQuant II der Firma Pharmacia Biotech mit 10 μL einer 1:10 verdünnten Lösung der isolierten mRNA durchgeführt.

2.6.2 cDNA-Synthese durch reverse Transkription

Für die Umschreibung der isolierten mRNA wurde die Super Script II reverse Transkriptase der Firma InVitrogen gemäß Herstellerangaben verwendet. Pro Zelllinie wurden zwei Ansätze zu je 20 μL Gesamtvolumen und einer eingesetzten mRNA-Konzentration von 1,5 μg vorbereitet. Hierzu wurden pro Probe in 0,5 μL Reaktionsgefäßen je 1,5 μg mRNA mit 1,0 μL Oligo dT Primer der Firma eurofin versetzt und die Ansätze mit RNase freiem Wasser auf je 8,0 μL aufgefüllt. Nach einer Inkubationszeit von 10 min bei 70°C wurde pro Ansatz je 12 μL des in Tabelle 5 aufgeführten Master-Mixes zugegeben und die Umschreibung im Thermal Cycler C1000 der Firma Bio-Rad für 50 min bei 42°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Hitzeinaktivierung bei 70°C für 15 min beendet. In gleicher Weise wurde Gesamt-RNA der Organe Leber,

Tabelle 5: Pipettierschema für die Umschreibung von mRNA in cDNA für eine Probenanzahl von 40.

	Einzelansatz	Ansatz 40 Proben
5x RT Puffer	6,0 μL	240 μL
0,1 M DTT	4,0 μL	160 μL
10 mM dNTPs	1,0 μL	40 μL
RNaseOUT	0,5 μL	20 μL
SuperScript II	0,5 μL	20 μL
Volumen	12 μL	480 μL

Colon und Niere der Firma Ambion in cDNA überführt und als Referenzgewebe in allen weiteren Analysen mitgeführt.

2.6.3 Präamplifikation der cDNA-Proben

Zur Erreichung der Nachweisgrenze des BioMark HD Systems muss, aufgrund der geringen Volumina, die für die Analyse eingesetzt werden, eine Anreicherung der cDNA vor Beginn der Analyse durchgeführt werden. Hierfür wurden zunächst ein TaqMan-Assay-Mix aus je 2,0 μL der 48 verwendeten TaqMan-Primer der Firma ThermoFisher mit 8,0 μL RNase freiem Wasser in einem 0,5 μL Reaktionsgefäß hergestellt. Es wurden Primer für 46 verschiedene SLC-Transporter und zwei nicht-regulierte, sog. Haushaltsgene, GAPDH und HPRT verwendet. Der Präamplifikationsansatz setzte sich für 48 Proben aus je 52,8 μL PreAmp MasterMix, 66 μL des vorbereiteten TaqMan-Assay-Mixes und 79,2 μL RNase freiem Wasser zusammen. Pro Probe (18 Proben der Tumorzelllinien und drei Referenzgewebe) wurden nun 3,35 μL des Präamplifikationsansatzes mit je 1,25 μL cDNA (Abschnitt 2.6.2) in einem 0,5 μL Reaktionsgefäß vermischt und 14 Zyklen nach in Tabelle 6 angegebenen Schema in Thermocycler durchgeführt.

Tabelle 6: Temperaturprotokoll der Präamplifikation

Vorinkubation		Aufbewahrung	
95°C	95°C	60°C	4°C
2 min	15 s	4 min	
14 Zyklen			

Die so präamplifizierten Proben wurden nach Verdünnen mit RNase freiem Wasser im Verhältnis 1:5 für die Expressionsanalyse per quantitativer real time PCR eingesetzt.

2.6.4 Quantitative real time PCR

Für die Expressionsanalyse der ausgewählten SLC-Transporter in Mamma- und Prostatakarzinom-Zelllinien wurde das BioMarkHD System der Firma Fluidigm verwendet. Hierbei wird die PCR-Reaktion in einem Chipsystem unter Verwendung kleinster Volumina durchgeführt, sodass in einem Experiment 48 Proben mit 48 verschiedenen Primern kombiniert werden können, wodurch eine direkte Vergleichbarkeit der Ergebnisse ohne Standard- oder Vergleichsproben möglich ist. Der 48.48-Chip wurde 60 min vor Analysebeginn an den zwei äußeren Einlassöffnungen nach Herstellerangaben mit einer speziellen Lösung (control line fluid der Firma Fluidigm) beladen und im IFC Controller MX inkubiert (Programm Prime (113x)). Währenddessen erfolgte die Vorbereitung der Primer- und Proben-Lösungen, die für die Analyse eingesetzt wurden. Der Primer-Mix bestand aus je 3,0 μL des jeweiligen TaqMan-Primers mit 3,0 μL 2X Assay Loading Reagenz der Firma Fluidigm. Für die Proben wurde ein Ansatz aus 180 μL TaqMan Fast Universal PCR Master Mix der Firma InVitrogen mit 18 μL 20X GE Sample Loading Reagenz der Firma Fluidigm hergestellt, von dem je 6,6 μL mit 5,4 μL des, wie in Abschnitt 2.6.3 beschrieben, hergestellten Präamplifikats der einzelnen Proben vermischt wurde. Nach Ablauf der Inkubation der Chipvorbeladung wurden die Kavitäten der linken Chiphälfte mittels einer 8-Kanal-Pipette mit je 5,0 μL der entsprechenden Primerlösung beladen und 5,0 μL der cDNA-Probenlösung auf die entsprechenden Kavitäten der rechten Chip-Hälfte verteilt. Die Proben der zwei unterschiedlichen Passagen der Karzinom-Zelllinien und der Referenzgewebe (Niere, Leber und Colon) wurden doppelt aufgetragen und gemessen. Es wurde eine Wasserkontrolle zur Überprüfung der verwendeten Reagenzien mitgeführt. Zum Abschluss der Beladung wurde der Chip nochmals im IFC Controller MX inkubiert (Programm Load Mix (113x)) und anschließend nach Protokoll des Herstellers im BioMarkHD mit einer Dauer von 30 Zyklen analysiert. Alle Proben wurden auf die Expression des nicht-regulierten Gens GAPDH normiert um einen Vergleich zu ermöglichen.

2.7 Statistische Auswertung

Alle statistischen Analysen wurde mit Hilfe von Microsoft Excel 2010 und SigmaPlot 11 durchgeführt. Für alle Mittelwerte wurden die Standardfehler berechnet und die Signifikanzniveaus der Ergebnisse durch den Zweistichproben-t-Test errechnet. Die Berechnung der IC_{50} -Werte erfolgte über die von Bulingham et al. publizierte Methode [11].

3 Ergebnisse

3.1 Interaktionsanalysen mit Zytostatika

Um die Rolle der stabil transfizierten SLC-Transportproteine im Zusammenspiel mit therapierelevanten Zytostatika zu untersuchen, wurde zunächst eine Interaktionsanalyse, wie unter Abschnitt 2.3 beschrieben, durchgeführt. Hierbei sollte zunächst festgestellt werden, ob die Aufnahme des markierten Referenzsubstrates in Anwesenheit der einzelnen Testsubstanzen beeinträchtigt wird. Neben den klassischen Zytostatika wurden dabei auch die Substanzen Prednison, Tamoxifen und Clodronsäure auf ihr Interaktionsverhalten mit den getesteten SLC-Transportern untersucht, da diese in der Tumorthherapie ebenfalls Verwendung finden. Alle Substanzen wurden in der Konzentration von 100 μM eingesetzt, was weit über den im therapeutischen Bereich verwendeten Dosierungen liegt. Die hohe Konzentration wurde gewählt, um sicherzustellen, dass auch schwächere Interaktionseffekte detektiert werden können. Hierbei wurden die Bedingungen für die Analysen so gewählt, dass sie dem optimalen Aktivitätsbereich des jeweilig getesteten Transporters entsprechen. Für die Darstellung wurden die Zytostatika nach Wirkstoffgruppen eingeteilt und je eine Orientierungslinie für den nicht-inhibierten Transport, der als 100 % Transportaktivität (rot) definiert wurde, und bei 50 % Transportaktivität (schwarz) im Diagramm dargestellt. Zusätzlich wurde für jede Analyse als Positivkontrolle eine bekannte Inhibitorsubstanz für das jeweilige Transportprotein mitgeführt, um sicherzustellen, dass die Aufnahme des Referenzsubstrates auch wirklich durch den zu untersuchenden SLC-Transporter vermittelt wurde. Alle Ergebnisse wurden als Mittelwerte dreier Experimente, durchgeführt in Triplikaten ($n = 3$), mit Standardfehler dargestellt.

3.1.1 PEPT1

Für die Familie der Peptidtransporter wurde als Referenzsubstrat das Tritiummarkierte Dipeptid Glycylsarcosin ($[^3\text{H}]\text{Gly-Sar}$) verwendet und als spezifischer Inhibitor für PEPT1 Losartan, eine Substanz aus der Gruppe der Sartane mitgeführt. Die Aufnahme des Referenzsubstrates ohne Testsubstanzen wurde als 100 % definiert, was einer Aufnahme von $1615,4 \pm 91,6$ pmol/mg Protein in stabil transfizierte Modellzellen entsprach. Der spezifische Inhibitor Losartan zeigte im Verlauf der Analysen eine reproduzierbare Inhibition von $51,8 \pm 1,2$ % gegenüber des Transportansatzes ohne inhibitorische Substanzen.

Innerhalb der Gruppe der getesteten Alkylantien (Abb. 2) konnte nur für die Testsubstanz Chlorambucil eine signifikante Verringerung der $[^3\text{H}]\text{Gly-Sar}$ -Aufnahme festgestellt werden. Mit einer Verringerung um $18,3 \pm 3,0\%$ zeigte diese Substanz die stärkste Reduktion in der Gruppe der Alkylantien. Keines der anderen Zytostatika er-

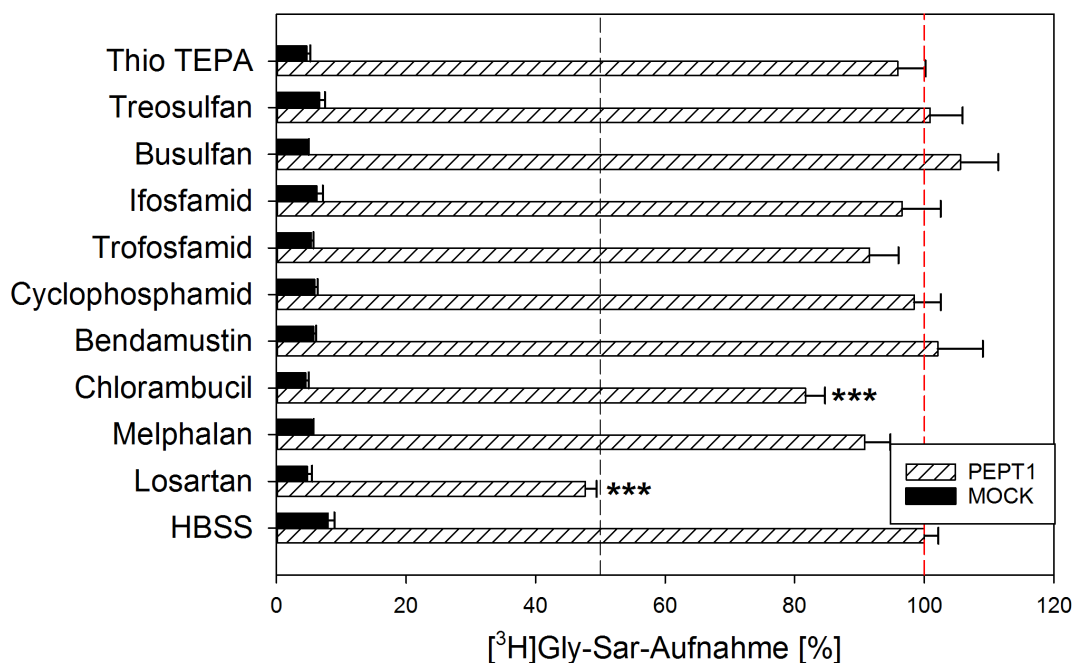


Abb. 2: Inhibitionsanalyse von **PEPT1** durch **Alkylantien** in stabil transfizierten HEK293-Zellen (schraffierte Balken) im Vergleich mit Leervector-transfizierten Zellen (MOCK; schwarze Balken) unter Verwendung von $0,25 \mu\text{M}$ $[^3\text{H}]$ Gly-Sar und $160 \mu\text{M}$ unmarkiertem Gly-Sar als Modells substrat. Als Inhibitor kontrolle wurde Losartan in einer Konzentration von $1500 \mu\text{M}$ verwendet. Alle Zytostatika wurden in einer Konzentration von $100 \mu\text{M}$ eingesetzt, die Transportdauer betrug 2 min bei 37°C . Die $[^3\text{H}]$ Gly-Sar-Aufnahme ohne Substanzzusatz von $1615,4 \pm 91,6$ pmol/mg Protein wurde auf 100 % gesetzt (rote Hilfslinie). Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte \pm Standardfehler von drei Experimenten durchgeführt in Triplikaten an unterschiedlichen Zellkulturpassagen. Die schwarze Hilfslinie liegt bei 50 % Transportaktivität.

Signifikanzen: *** $p < 0.001$

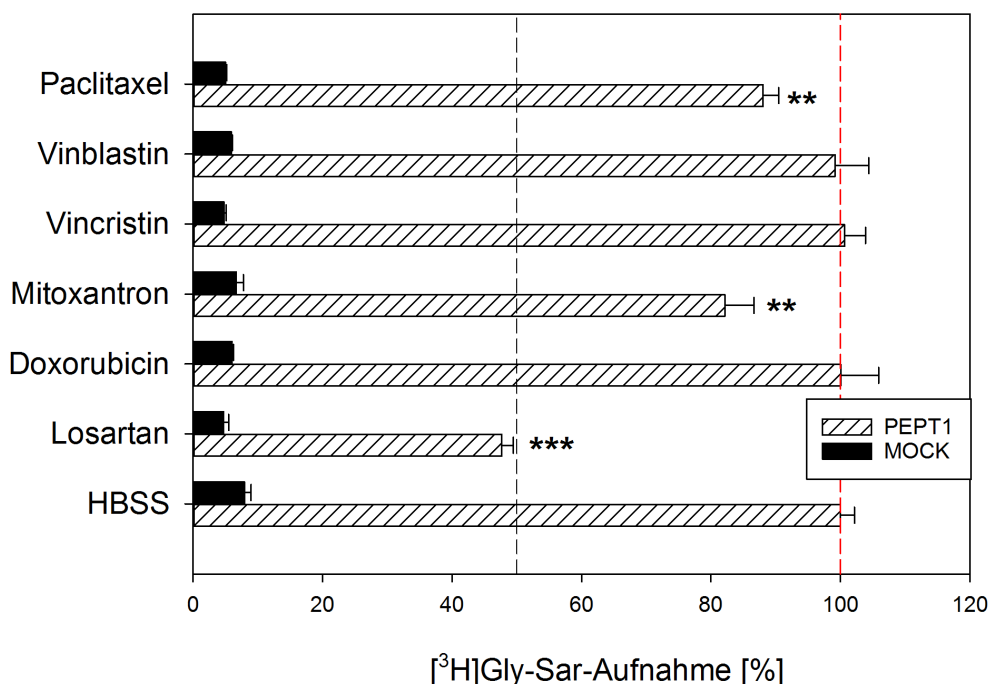


Abb. 3: Inhibitionsanalyse von **PEPT1** durch **Interkalantien und Mitose-Inhibitoren** in stabil transfizierten HEK293-Zellen (schraffierte Balken) im Vergleich mit Leervector-transfizierten Zellen (MOCK; schwarze Balken) unter Verwendung von $0,25 \mu\text{M}$ $[^3\text{H}]$ Gly-Sar und $160 \mu\text{M}$ unmarkiertem Gly-Sar als Modellssubstrat. Als Inhibitorkontrolle wurde Losartan in einer Konzentration von $1500 \mu\text{M}$ verwendet. Alle Zytostatika wurden in einer Konzentration von $100 \mu\text{M}$ eingesetzt, die Transportdauer betrug 2 min bei 37°C . Die $[^3\text{H}]$ Gly-Sar-Aufnahme ohne Substanzzusatz von $1615,4 \pm 91,6$ pmol/mg Protein wurde auf 100 % gesetzt (rote Hilfslinie). Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte \pm Standardfehler von drei Experimenten durchgeführt in Triplikaten an unterschiedlichen Zellkulturpassagen. Die schwarze Hilfslinie liegt bei 50 % Transportaktivität.

Signifikanzen: ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

reichte eine Verminderung der Modellssubstrat-Aufnahme von mehr als 10 % gegenüber des nicht-inhibierten Transports. Im Fall von Busulfan konnte eine leichte Stimulation der $[^3\text{H}]$ Gly-Sar-Aufnahme von $5,6 \pm 5,8$ % festgestellt werden, welche jedoch nicht signifikant war.

Unter den getesteten Interkalantien und Mitose-Inhibitoren (Abb. 3) konnte für Paclitaxel und Mitoxantron ein signifikanter Effekt auf die Aufnahme des Referenzsubstrates festgestellt werden. Die Aufnahme von $[^3\text{H}]$ Gly-Sar wurde in Anwesenheit von Paclitaxel um $12,0 \pm 2,4$ %, im Falle von Mitoxantron um $17,9 \pm 4,5$ % verringert. Für keine der übrigen Zytostatika dieser Gruppe konnte eine Veränderung in der Aufnahme des Referenzsubstrates durch PEPT1 gegenüber des Transportansatzes ohne Testsubstanzen gemessen werden.

Für keines der getesteten Antimetabolite (Abb. 4) konnte eine verringerte Aufnahme von $[^3\text{H}]$ Gly-Sar festgestellt werden. Außer für Methotrexat zeigten die getesteten Substanzen dieser Gruppe eine verstärkte Aufnahme des Referenzsubstrates. Sehr

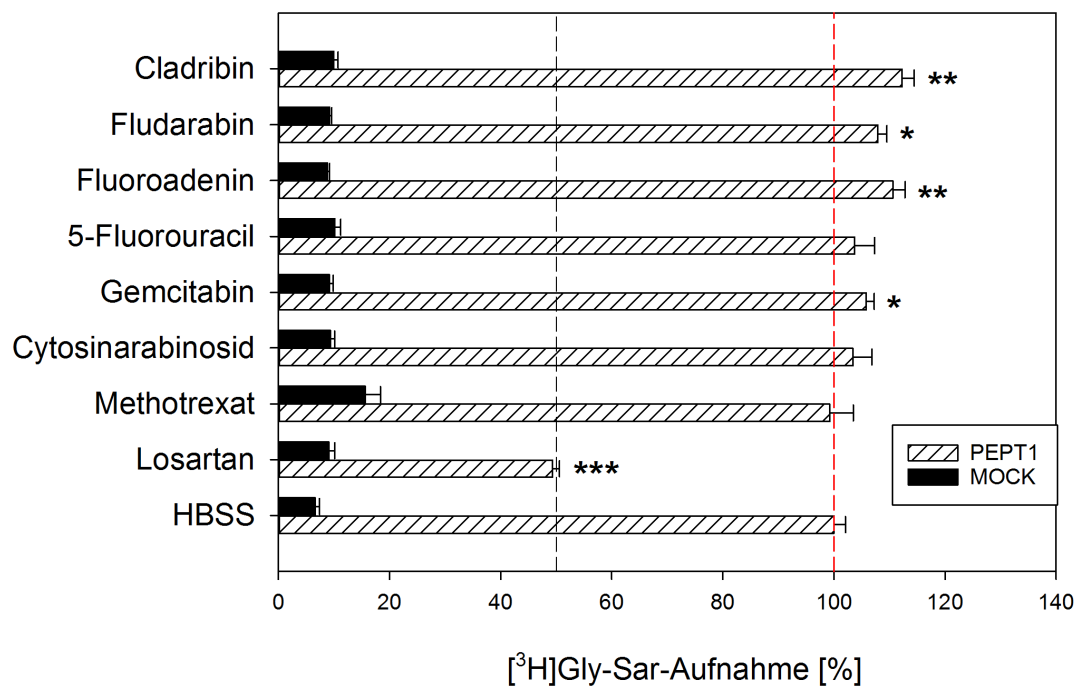


Abb. 4: Inhibitionsanalyse von **PEPT1** durch **Antimetabolite** in stabil transfizierten HEK293-Zellen (schraffierte Balken) im Vergleich mit Leervector-transfizierten Zellen (MOCK; schwarze Balken) unter Verwendung von $0,25 \mu\text{M}$ $[^3\text{H}]$ Gly-Sar und $160 \mu\text{M}$ unmarkiertem Gly-Sar als Modells substrat. Als Inhibitor kontrolle wurde Losartan in einer Konzentration von $1500 \mu\text{M}$ verwendet. Alle Zytostatika wurden in einer Konzentration von $100 \mu\text{M}$ eingesetzt, die Transportdauer betrug 2 min bei 37°C . Die $[^3\text{H}]$ Gly-Sar-Aufnahme ohne Substanzzusatz von $1615,4 \pm 91,6$ pmol/mg Protein wurde auf 100 % gesetzt (rote Hilfslinie). Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte \pm Standardfehler von drei Experimenten durchgeführt in Triplikaten an unterschiedlichen Zellkulturpassagen. Die schwarze Hilfslinie liegt bei 50 % Transportaktivität. Signifikanzen: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

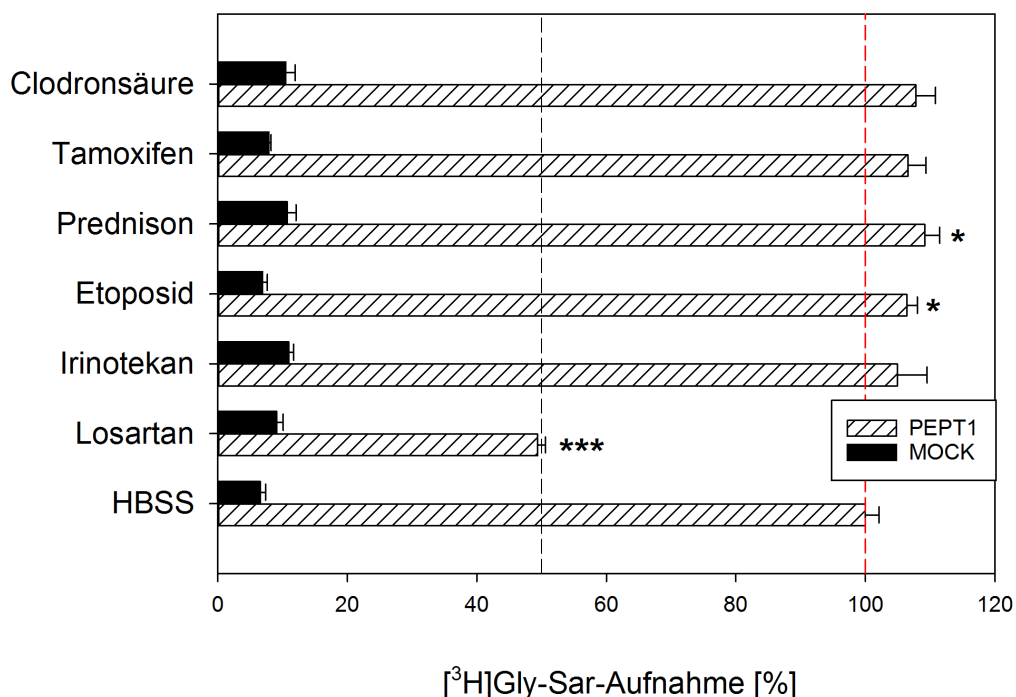


Abb. 5: Inhibitionsanalyse von **PEPT1** durch **Topoisomerase-Inhibitoren und Adjuvantien** in stabil transfizierten HEK293-Zellen (schraffierte Balken) im Vergleich mit Leervector-transfizierten Zellen (MOCK; schwarze Balken) unter Verwendung von $0,25 \mu\text{M}$ $[^3\text{H}]$ Gly-Sar und $160 \mu\text{M}$ unmarkiertem Gly-Sar als Modellsubstrat. Als Inhibitorkontrolle wurde Losartan in einer Konzentration von $1500 \mu\text{M}$ verwendet. Alle Zytostatika wurden in einer Konzentration von $100 \mu\text{M}$ eingesetzt, die Transportdauer betrug 2 min bei 37°C . Die $[^3\text{H}]$ Gly-Sar-Aufnahme ohne Substanzzusatz von $1615,4 \pm 91,6$ pmol/mg Protein wurde auf 100 % gesetzt (rote Hilfslinie). Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte \pm Standardfehler von drei Experimenten durchgeführt in Triplikaten an unterschiedlichen Zellkulturpassagen. Die schwarze Hilfslinie liegt bei 50 % Transportaktivität.

Signifikanzen: * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$

signifikant erhöhte $[^3\text{H}]$ Gly-Sar-Aufnahmen konnten bei den Substanzen Cladribin und Fluoroadenin, signifikante Effekte bei Fludarabin und Gemcitabin detektiert werden. Den stärksten Effekt zeigte dabei Cladribin, in dessen Anwesenheit die Aufnahme von $[^3\text{H}]$ Gly-Sar um $12,3 \pm 2,1$ % gesteigert war, die geringste Stimulation um $5,8 \pm 1,5$ %, wurde unter Zugabe von Gemcitabin gemessen.

Ein ähnliches Bild zeigt sich auch für die Gruppe der Topoisomerase-Inhibitoren und Adjuvantien (Abb. 5). Auch hier wurden für alle Testsubstanzen verstärkende Effekte auf die $[^3\text{H}]$ Gly-Sar-Aufnahme durch PEPT1 festgestellt. Signifikant erhöhte Aufnahmen wurden in Anwesenheit von Prednison und Etoposid detektiert. Bei diesen Substanzen konnte eine verstärkte Aufnahme um $9,2 \pm 2,3$ % für Prednison und um $6,4 \pm 1,6$ % für Etoposid festgestellt werden.

3.1.2 PEPT2

Für den Peptidtransporter PEPT2 wurde ebenfalls $[^3\text{H}]\text{Gly-Sar}$ als Referenzsubstrat verwendet. Die Aufnahme des Referenzsubstrates ohne Testsubstanzen wurde als 100 % definiert, was einer Aufnahme von $300,8 \pm 20,4$ pmol/mg Protein in stabil transfizierte Modellzellen entsprach. Als spezifischer Inhibitor kam das Dipeptid Tyrosin-Phenylalanin (Tyr-Phe) zum Einsatz, um sicherzustellen, dass die Gly-Sar-Aufnahme durch PEPT2 vermittelt wurde. Der inhibitorische Effekt durch Tyr-Phe lag im Verlauf der Analysen im Mittel bei $84,3 \pm 0,3$ %.

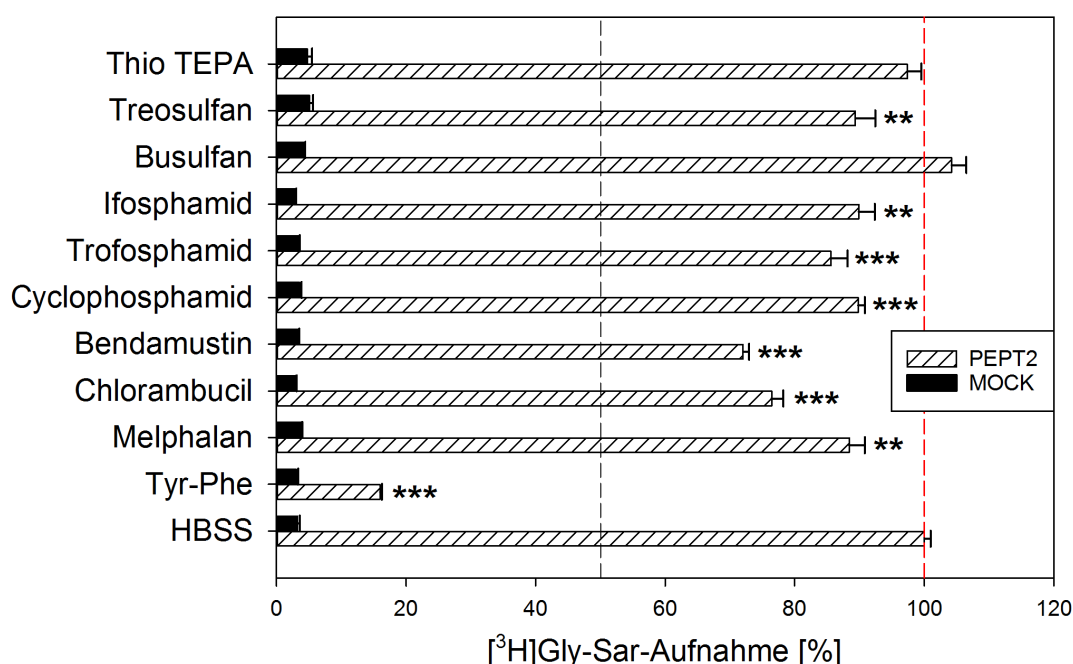


Abb. 6: Inhibitionsanalyse von **PEPT2** durch **Alkylantien** in stabil transfizierten HEK293-Zellen (schraffierte Balken) im Vergleich mit Leervektor-transfizierten Zellen (MOCK; schwarze Balken) unter Verwendung von $0,25 \mu\text{M}$ $[^3\text{H}]\text{Gly-Sar}$ und $26 \mu\text{M}$ unmarkiertem Gly-Sar als Modellssubstrat. Als Inhibitorikontrolle wurde Tyr-Phe in einer Konzentration von $60 \mu\text{M}$ verwendet. Alle Zytostatika wurden in einer Konzentration von $100 \mu\text{M}$ eingesetzt, die Transportdauer betrug 2 min bei 37°C . Die $[^3\text{H}]\text{Gly-Sar}$ -Aufnahme ohne Substanzzusatz von $300,8 \pm 20,4$ pmol/mg Protein wurde auf 100 % gesetzt (rote Hilfslinie). Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte \pm Standardfehler von drei Experimenten durchgeführt in Triplikaten an unterschiedlichen Zellkulturpassagen. Die schwarze Hilfslinie liegt bei 50 % Transportaktivität.

Signifikanzen: ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

In der Gruppe der Alkylantien (Abb. 6) konnte für alle getesteten Substanzen, mit Ausnahme von ThioTEPA und Busulfan, eine sehr bis hoch signifikante Beeinflussung der $[^3\text{H}]\text{Gly-Sar}$ -Aufnahme durch PEPT2 festgestellt werden. Die stärksten Verringerungen der Referenzsubstrat-Aufnahme bewirkten Bendamustin und Chlorambucil mit einer Verringerung um $28,0 \pm 0,9$ % und $23,6 \pm 1,8$ % gegenüber dem nicht-inhibierten Transportansatz. Die übrigen getesteten Alkylantien lagen im Bereich von $14,4 \pm 2,6$ %

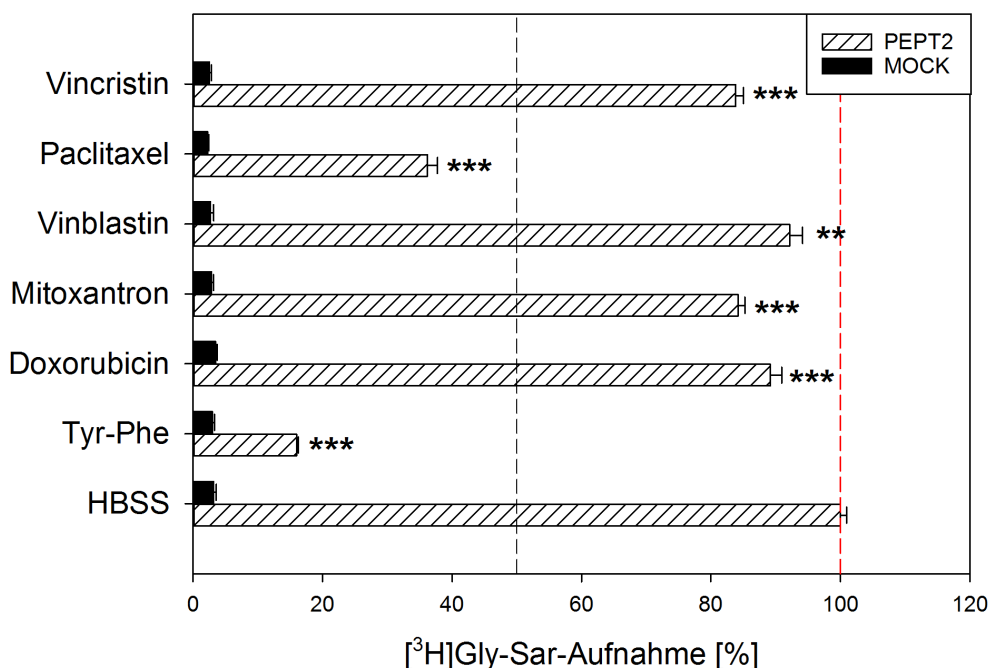


Abb. 7: Inhibitionsanalyse von **PEPT2** durch **Interkalantien und Mitose-Inhibitoren** in stabil transfizierten HEK293-Zellen (schraffierte Balken) im Vergleich mit Leervector-transfizierten Zellen (MOCK; schwarze Balken) unter Verwendung von $0,25 \mu\text{M}$ $[^3\text{H}]$ Gly-Sar und $26 \mu\text{M}$ unmarkiertem Gly-Sar als Modellsubstrat. Als Inhibitorkontrolle wurde Tyr-Phe in einer Konzentration von $60 \mu\text{M}$ verwendet. Alle Zytostatika wurden in einer Konzentration von $100 \mu\text{M}$ eingesetzt, die Transportdauer betrug 2 min bei 37°C . Die $[^3\text{H}]$ Gly-Sar-Aufnahme ohne Substanzzusatz von $300,8 \pm 20,4 \text{ pmol/mg Protein}$ wurde auf 100 % gesetzt (rote Hilfslinie). Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte \pm Standardfehler von drei Experimenten durchgeführt in Triplikaten an unterschiedlichen Zellkulturpassagen. Die schwarze Hilfslinie liegt bei 50 % Transportaktivität.

Signifikanzen: ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

bis $10,1 \pm 2,5 \%$ Reduktion der $[^3\text{H}]$ Gly-Sar-Aufnahme.

In Anwesenheit aller Testsubstanzen aus der Gruppe der Interkalantien und Mitose-Inhibitoren, mit Ausnahme von Vinblastin (Abb. 7), konnte eine hoch signifikante Reduktion der Aufnahme des Referenzsubstrates durch PEPT2 festgestellt werden. Die mit Abstand stärkste Verringerung, um $63,8 \pm 1,6 \%$, wurde in Anwesenheit von Paclitaxel festgestellt. Für die übrigen getesteten Zytostatika zeigte sich eine Reduktion im Bereich von $7,8 \pm 2,0 \%$ bis $16,2 \pm 1,2 \%$.

Innerhalb der Gruppe der Antimetabolite (Abb. 8) wurden nur für zwei Substanzen sehr signifikante Auswirkungen auf die $[^3\text{H}]$ Gly-Sar-Aufnahme durch PEPT2 festgestellt. Fluoroadenin und 5-Fluorouracil bewirkten eine vergleichbare Reduktion von $12,5 \pm 3,4 \%$ und $11,1 \pm 2,3 \%$ im Vergleich zum nicht-inhibierten Transportansatz. Für Methotrexat wurde zwar eine Verringerung der $[^3\text{H}]$ Gly-Sar-Aufnahme um $6,7 \pm 3,4 \%$ festgestellt, diese war jedoch nicht signifikant. Alle weiteren Substanzen dieser Stoffklasse zeigten keine Beeinflussung der Aufnahme des Referenzsubstrates von

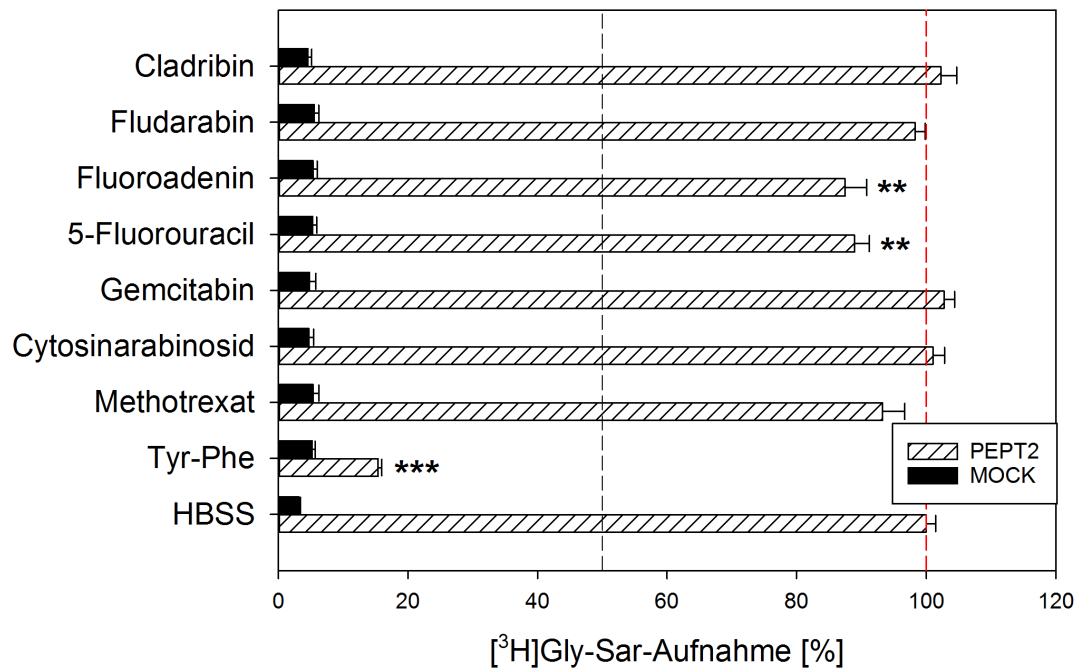


Abb. 8: Inhibitionsanalyse von **PEPT2** durch **Antimetabolite** in stabil transfizierten HEK293-Zellen (schraffierte Balken) im Vergleich mit Leervector-transfizierten Zellen (MOCK; schwarze Balken) unter Verwendung von $0,25 \mu\text{M}$ $[^3\text{H}]$ Gly-Sar und $26 \mu\text{M}$ unmarkiertem Gly-Sar als Modellsubstrat. Als Inhibitorkontrolle wurde Tyr-Phe in einer Konzentration von $60 \mu\text{M}$ verwendet. Alle Zytostatika wurden in einer Konzentration von $100 \mu\text{M}$ eingesetzt, die Transportdauer betrug 2 min bei 37°C . Die $[^3\text{H}]$ Gly-Sar-Aufnahme ohne Substanzzusatz von $300,8 \pm 20,4 \text{ pmol/mg Protein}$ wurde auf 100 % gesetzt (rote Hilfslinie). Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte \pm Standardfehler von drei Experimenten durchgeführt in Triplikaten an unterschiedlichen Zellkulturpassagen. Die schwarze Hilfslinie liegt bei 50 % Transportaktivität.

Signifikanzen: ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

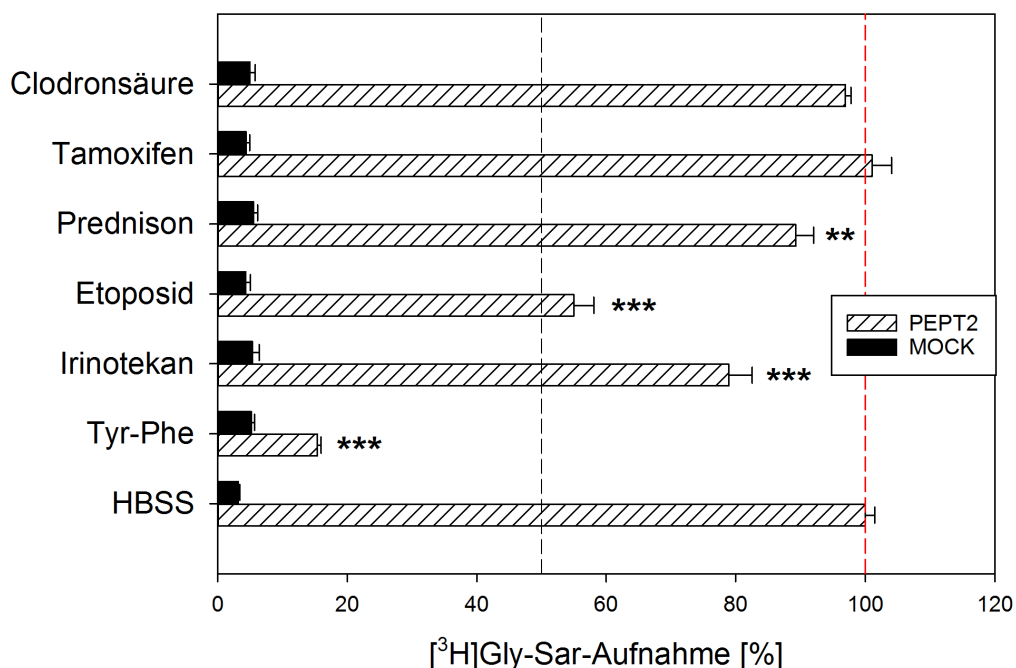


Abb. 9: Inhibitionsanalyse von **PEPT2** durch **Topoisomerase-Inhibitoren** und **Adjuvantien** in stabil transfizierten HEK293-Zellen (schraffierte Balken) im Vergleich mit Leervector-transfizierten Zellen (MOCK; schwarze Balken) unter Verwendung von $0,25 \mu\text{M}$ $[^3\text{H}]$ Gly-Sar und $26 \mu\text{M}$ unmarkiertem Gly-Sar als Modellsubstrat. Als Inhibitor-Kontrolle wurde Tyr-Phe in einer Konzentration von $60 \mu\text{M}$ verwendet. Alle Zytostatika wurden in einer Konzentration von $100 \mu\text{M}$ eingesetzt, die Transportdauer betrug 2 min bei 37°C . Die $[^3\text{H}]$ Gly-Sar-Aufnahme ohne Substanzzusatz von $300,8 \pm 20,4 \text{ pmol/mg}$ Protein wurde auf 100 % gesetzt (rote Hilfslinie). Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte \pm Standardfehler von drei Experimenten durchgeführt in Triplikaten an unterschiedlichen Zellkulturpassagen. Die schwarze Hilfslinie liegt bei 50 % Transportaktivität.

Signifikanzen: ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

mehr als 3,0 %.

Etoposid ist, innerhalb der Gruppe der Topoisomerase-Inhibitoren und Adjuvantien (Abb. 9), das Zytostatikum mit dem stärksten hoch signifikanten Effekt auf die $[^3\text{H}]$ Gly-Sar-Aufnahme. Diese ist im Vergleich zum nicht-inhibierten Transportansatz um $45,0 \pm 3,1 \%$ verringert. Neben Etoposid war nur für Prednison und Irinotekan eine hoch bzw. sehr signifikante Änderung in der Aufnahme des Referenzsubstrates durch PEPT2 feststellbar. Für diese beiden Substanzen wurden verringerte Aufnahmen um $10,7 \pm 2,8 \%$ für Prednison und um $21,1 \pm 3,6 \%$ für Irinotekan gemessen.

3.1.3 OCTN2

Die Interaktion des L-Carnitin-Transporters OCTN2 wurde in der selben Weise untersucht, wie dies für die Familie der PEPT-Proteine durchgeführt und unter Abschnitt 2.3 beschrieben wurde. Auch die getesteten Substanzen und die Einteilung dieser in Stoffgruppen ist identisch. Die Aufnahme des Referenzsubstrates ohne Testsubstanzen

wurde als 100 % definiert, was einer Aufnahme von $124,0 \pm 3,4$ pmol/mg Protein in stabil transfizierte Modellzellen entsprach. Das Referenzsubstrat, welches für den OCTN2 verwendet wurde, war ^3H Carnitin, mit dem spezifischen Inhibitor Verapamil, einem Calciumkanalblocker aus der Gruppe der Antiarrhythmika. Die inhibitorische Wirkung von Verapamil lag im Verlauf der Experimente bei $36,5 \pm 0,7$ %.

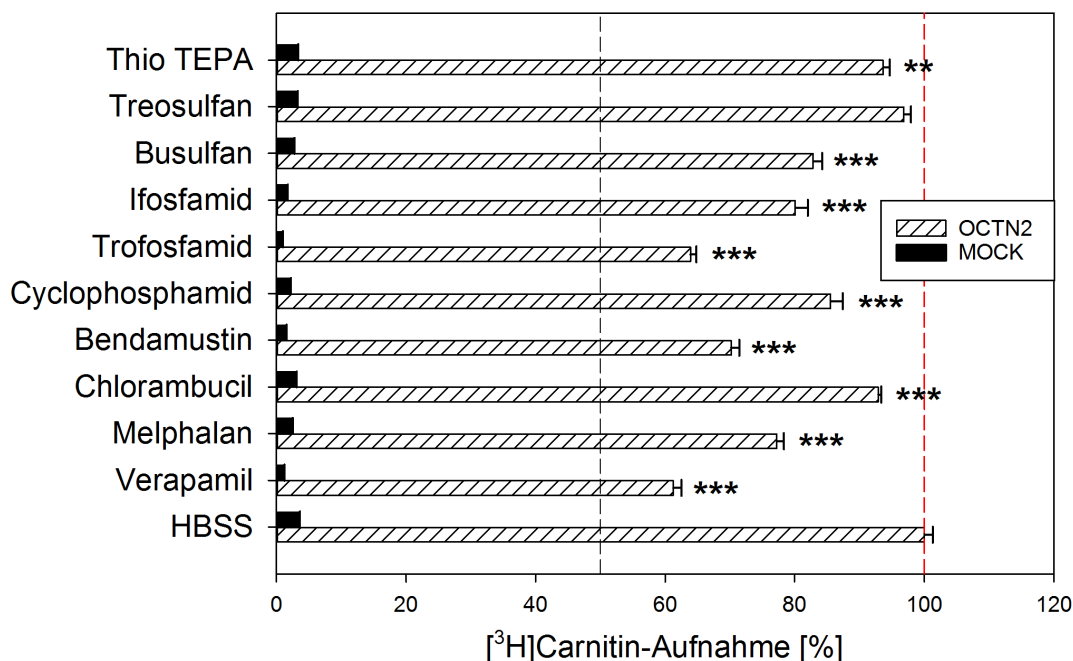


Abb. 10: Inhibitionsanalyse von **OCTN2** durch **Alkylantien** in stabil transfizierten HEK293-Zellen (schraffierte Balken) im Vergleich mit Leervector-transfizierten Zellen (MOCK; schwarze Balken) unter Verwendung von $5,0$ nM ^3H Carnitin und $1,0$ μM unmarkiertem Carnitin als Modells substrat. Als Inhibitor kontrolle wurde Verapamil in einer Konzentration von 100 μM verwendet. Alle Zytostatika wurden in einer Konzentration von 100 μM eingesetzt, die Transportdauer betrug 1 min bei 37°C . Die ^3H Carnitin-Aufnahme ohne Substanzzusatz von $124,0 \pm 3,4$ pmol/mg Protein wurde auf 100 % gesetzt (rote Hilfslinie). Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte \pm Standardfehler von drei Experimenten durchgeführt in Triplikaten an unterschiedlichen Zellkulturpassagen. Die schwarze Hilfslinie liegt bei 50 % Transportaktivität.

Signifikanzen: ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

Alle Substanzen der Gruppe der Alkylantien (Abb. 10) zeigen, mit Ausnahme von Treosulfan, eine hoch signifikante Beeinträchtigung der ^3H Carnitin-Aufnahme. Trofosfamid und Bendamustin zeigen dabei mit $36,1 \pm 0,9$ % und $29,8 \pm 1,2$ % die stärkste Reduktion der Substrataufnahme, während die übrigen Zytostatika Effekte im Bereich von $6,4 \pm 1,0$ % bis $22,8 \pm 1,1$ % Verringerung der ^3H Carnitin-Aufnahme zeigten.

Innerhalb der Interkalantien und Mitose-Inhibitoren (Abb. 11) konnten sowohl hoch signifikante verstärkende als auch reduzierende Effekte der getesteten Substanzen auf die ^3H Carnitin-Aufnahme durch OCTN2 festgestellt werden. In Anwesenheit

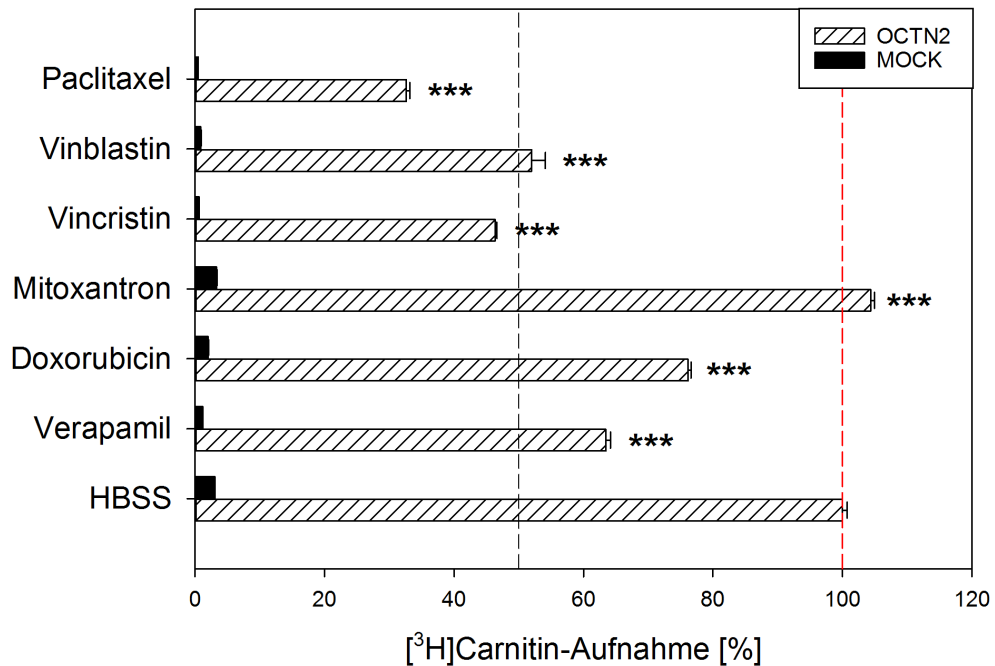


Abb. 11: Inhibitionsanalyse von **OCTN2** durch **Interkalantien und Mitose-Inhibitoren** in stabil transfizierten HEK293-Zellen (schraffierte Balken) im Vergleich mit Leervector-transfizierten Zellen (MOCK; schwarze Balken) unter Verwendung von 5,0 nM [^3H]Carnitin und 1,0 μM unmarkiertem Carnitin als Modells substrat. Als Inhibitor kontrolle wurde Verapamil in einer Konzentration von 100 μM verwendet. Alle Zytostatika wurden in einer Konzentration von 100 μM eingesetzt, die Transportdauer betrug 1 min bei 37°C. Die [^3H]Carnitin-Aufnahme ohne Substanzzusatz von $124,0 \pm 3,4$ pmol/mg Protein wurde auf 100 % gesetzt (rote Hilfslinie). Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte \pm Standardfehler von drei Experimenten durchgeführt in Triplikaten an unterschiedlichen Zellkulturpassagen. Die schwarze Hilfslinie liegt bei 50 % Transportaktivität.

Signifikanzen: *** $p < 0.001$

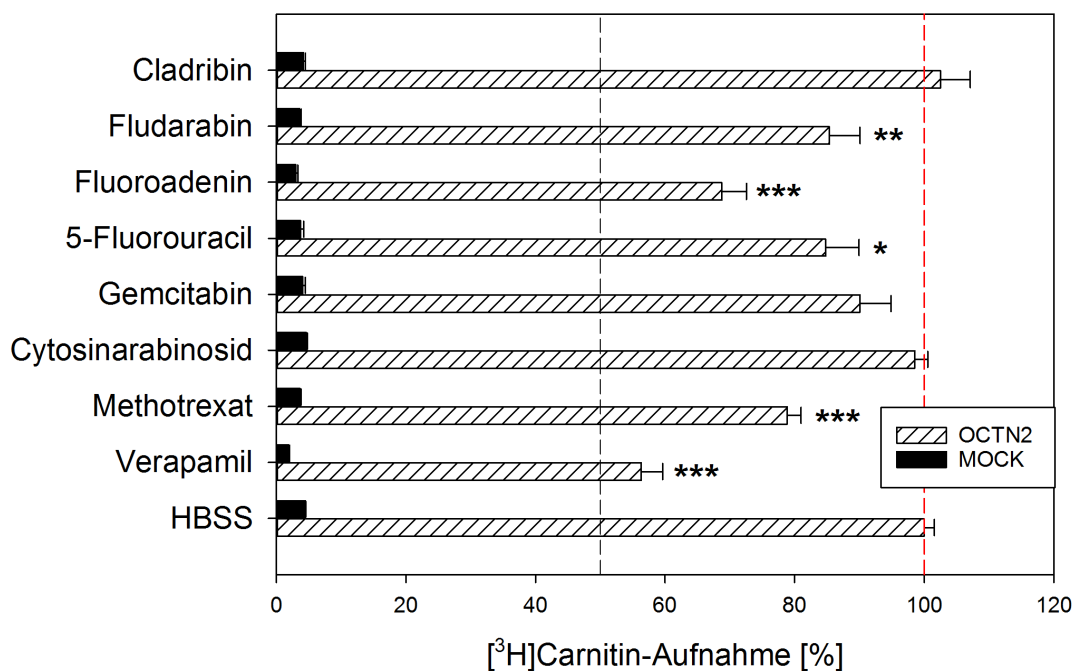


Abb. 12: Inhibitionsanalyse von **OCTN2** durch **Antimetabolite** in stabil transfizierten HEK293-Zellen (schraffierte Balken) im Vergleich mit Leervector-transfizierten Zellen (MOCK; schwarze Balken) unter Verwendung von 5,0 nM [^3H]Carnitin und 1,0 μM unmarkiertem Carnitin als Modellsubstrat. Als Inhibitorkontrolle wurde Verapamil in einer Konzentration von 100 μM verwendet. Alle Zytostatika wurden in einer Konzentration von 100 μM eingesetzt, die Transportdauer betrug 1 min bei 37°C. Die [^3H]Carnitin-Aufnahme ohne Substanzzusatz von $124,0 \pm 3,4$ pmol/mg Protein wurde auf 100 % gesetzt (rote Hilfslinie). Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte \pm Standardfehler von drei Experimenten durchgeführt in Triplikaten an unterschiedlichen Zellkulturpassagen. Die schwarze Hilfslinie liegt bei 50 % Transportaktivität.

Signifikanzen: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

von Mitoxantron wurde eine hoch signifikante Erhöhung der Aufnahme des Referenzsubstrates um $4,4 \pm 0,6$ % im Vergleich zum Transportansatz ohne Testsubstanzen festgestellt. Die stärkste Reduktion auf die [^3H]Carnitin-Aufnahme wurde mit einer Verringerung von $67,4 \pm 0,5$ % in Anwesenheit von Paclitaxel gemessen. Die Vincaalkaloide Vinblastin und Vincristin bewirkten eine Verringerung der Aufnahme des Referenzsubstrates um $48,0 \pm 2,1$ % und $53,7 \pm 0,3$ %, die Substanz Doxorubicin verursachte eine Reduktion um $23,9 \pm 0,5$ %.

In der Gruppe der getesteten Antimetabolite (Abb. 12) zeigten sich signifikante Beeinträchtigungen in der [^3H]Carnitin-Aufnahme für vier Substanzen: So verringerte sich die Aufnahme hoch signifikant in Anwesenheit von Fluoroadenin um $31,2 \pm 3,8$ % und um $21,2 \pm 2,2$ % unter Zusatz von Methotrexat. Die übrigen Substanzen mit Effekten von unterschiedlicher Signifikanz lagen im Bereich von $14,6 \pm 4,7$ % bis $15,3 \pm 5,2$ % reduzierter Aufnahme. Zwar zeigte sich auch in Anwesenheit von Gemcitabin eine verringerte Aufnahme des Referenzsubstrates um $9,9 \pm 4,8$ %, diese war jedoch nicht

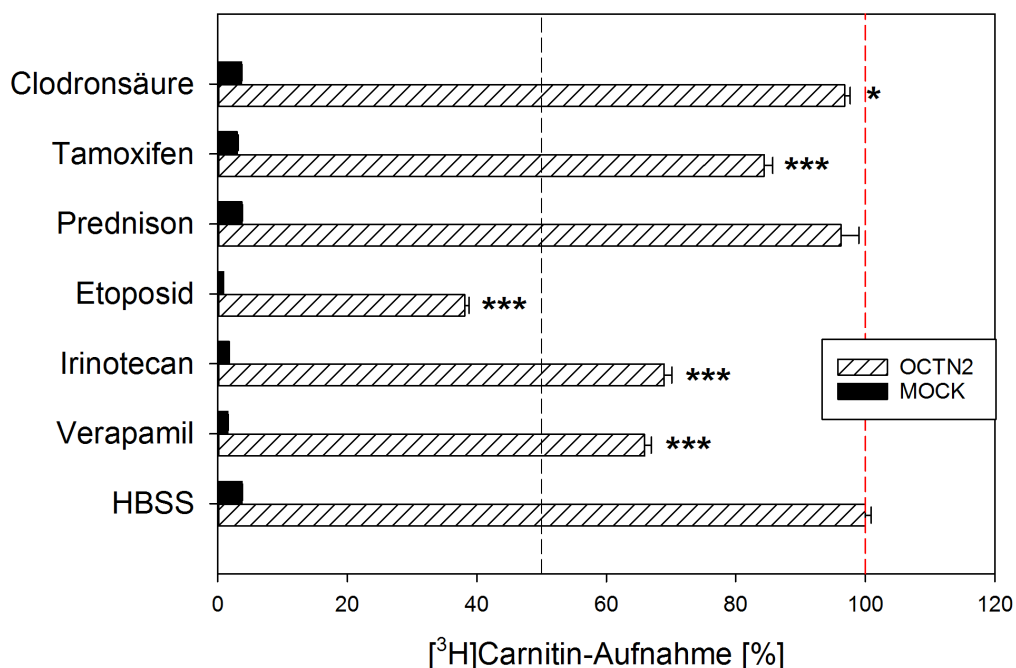


Abb. 13: Inhibitionsanalyse von **OCTN2** durch **Topoisomerase-Inhibitoren und Adjuvantien** in stabil transfizierten HEK293-Zellen (schraffierte Balken) im Vergleich mit Leervector-transfizierten Zellen (MOCK; schwarze Balken) unter Verwendung von 5,0 nM $[^3\text{H}]$ Carnitin und 1,0 μM unmarkiertem Carnitin als Modellsubstrat. Als Inhibitorkontrolle wurde Verapamil in einer Konzentration von 100 μM verwendet. Alle Zytostatika wurden in einer Konzentration von 100 μM eingesetzt, die Transportdauer betrug 1 min bei 37°C. Die $[^3\text{H}]$ Carnitin-Aufnahme ohne Substanzzusatz von $124,0 \pm 3,4$ pmol/mg Protein wurde auf 100 % gesetzt (rote Hilfslinie). Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte \pm Standardfehler von drei Experimenten durchgeführt in Triplikaten an unterschiedlichen Zellkulturpassagen. Die schwarze Hilfslinie liegt bei 50 % Transportaktivität.

Signifikanzen: * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$

signifikant.

Prednison war die einzige Substanz in der Gruppe der Topoisomerase-Inhibitoren und Adjuvantien (Abb. 13), welche keinen signifikanten Effekt auf die $[^3\text{H}]$ Carnitin-Aufnahme durch OCTN2 aufwies. Clodronsäure bewirkt mit einer Verringerung um $3,2 \pm 0,9$ % zwar eine signifikante, jedoch minimale Verringerung der Aufnahme des Referenzsubstrates. Der stärkste Effekt wurde, mit einer Reduktion um $61,9 \pm 0,7$ %, unter Zugabe von Etoposid bewirkt. Irinotecan und Tamoxifen verminderten die Aufnahme um $31,1 \pm 1,2$ % und $15,6 \pm 1,3$ %.

3.1.4 MATE2-K

Die Interaktionsanalysen von MATE2-K mit den oben verwendeten Zytostatika wurde mit dem Referenzsubstrat 1-Methyl-4-phenylpyridinium als Iodidsalz (MPP^+), in Tritium-markierter Form verwendet. Als spezifischer Inhibitor wurde der H_2 -Rezeptor-Antagonist Cimetidin eingesetzt. Die Aufnahme von $[^3\text{H}]\text{MPP}^+$ ohne Testsubstanzen

wurde als 100 % definiert, was einer Aufnahme von $91,3 \pm 6,7$ fmol/mg Protein in stabil transfizierte Modellzellen entsprach. Wie unter Abschnitt 1.3 beschrieben, wurde von Beginn des Transportexperimentes eine Vorinkubation von 30 min mit 30 mM NH_4Cl bei 37°C und pH 7,4 durchgeführt. Die inhibitorische Wirkung von Cimetidin lag im Verlauf der Experimente bei $71,6 \pm 1,3$ %.

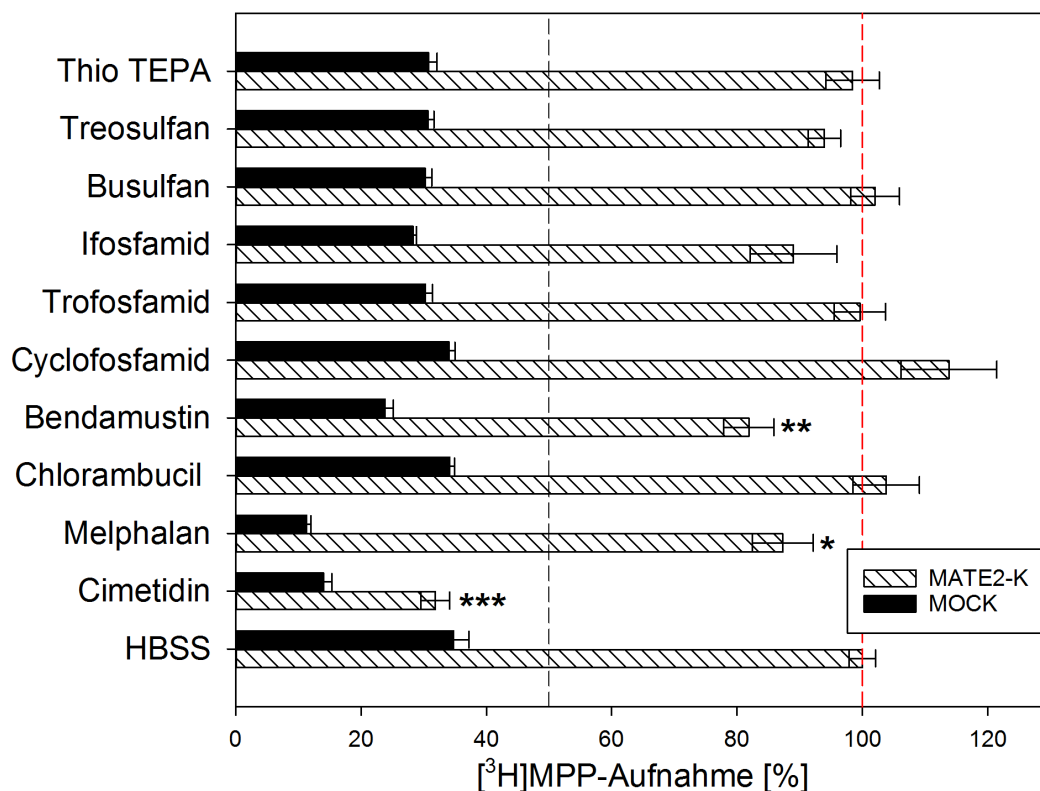


Abb. 14: Inhibitionsanalyse von **MATE2-K** durch **Alkylantien** in stabil transfizierten HEK293-Zellen (schraffierte Balken) im Vergleich mit Leervector-transfizierten Zellen (MOCK; schwarze Balken) unter Verwendung von 5,0 nM ^3H MPP⁺ als Modells substrat. Als Inhibitorkontrolle wurde Cimetidin in einer Konzentration von 100 μM verwendet. Alle Zytostatika wurden in einer Konzentration von 100 μM eingesetzt, die Transportdauer betrug 1 min bei 37°C , nach 30 min Vorinkubation mit 30 mM NH_4Cl in HBSS. Die ^3H MPP⁺-Aufnahme ohne Substanzzusatz von $91,3 \pm 6,7$ fmol/mg Protein wurde auf 100 % gesetzt (rote Hilfslinie). Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte \pm Standardfehler von drei Experimenten durchgeführt in Triplikaten an unterschiedlichen Zellkulturpassagen. Die schwarze Hilfslinie liegt bei 50 % Transportaktivität.

Signifikanz: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Aus der Gruppe der getesteten Alkylantien (Abb. 14) wurde nur in Anwesenheit von Bendamustin und Melphalan eine signifikante Verringerung der ^3H MPP⁺-Aufnahme gegenüber dem Transportansatz ohne Testsubstanzen festgestellt. Mit einer Reduktion um $18,1 \pm 4,0$ % erzielte Bendamustin die deutlichste Verringerung der ^3H MPP⁺-Aufnahme vor Melphalan mit einer Reduktion um $12,7 \pm 4,8$ %. Unter Zugabe von Cyclofosfamid konnte zwar eine Erhöhung der ^3H MPP⁺-Aufnahme um

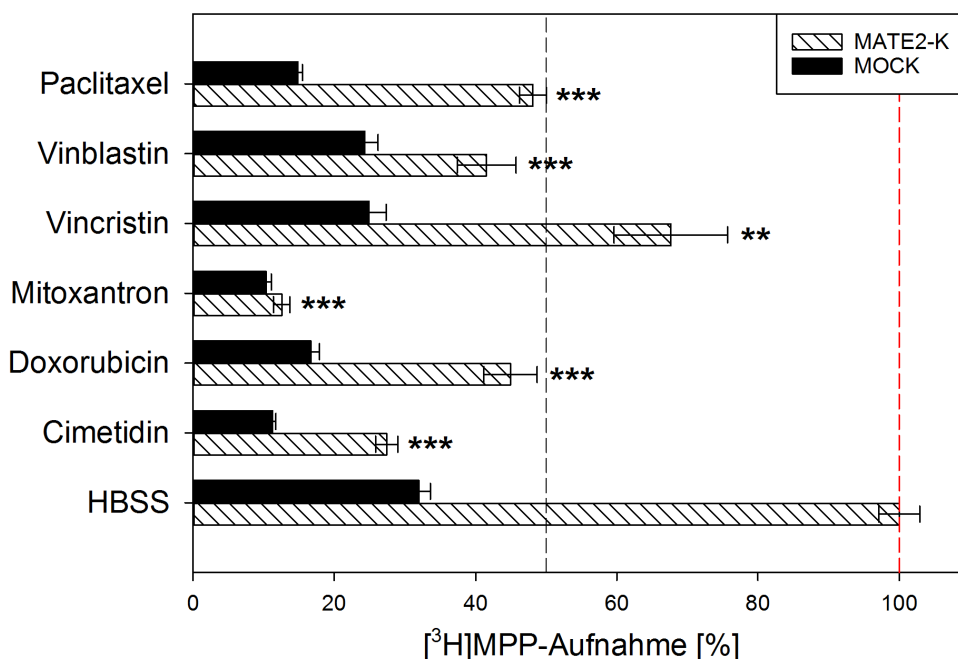


Abb. 15: Inhibitionsanalyse von **MATE2-K** durch **Interkalantien** und **Mitose-Inhibitoren** in stabil transfizierten HEK293-Zellen (schraffierte Balken) im Vergleich mit Leervector-transfizierten Zellen (MOCK; schwarze Balken) unter Verwendung von 5,0 nM $[^3\text{H}]\text{MPP}^+$ als Modells substrat. Als Inhibitor kontrolle wurde Cimetidin in einer Konzentration von 100 μM verwendet. Alle Zytostatika wurden in einer Konzentration von 100 μM eingesetzt, die Transportdauer betrug 1 min bei 37°C, nach 30 min Vorinkubation mit 30 mM NH_4Cl in HBSS. Die $[^3\text{H}]\text{MPP}^+$ -Aufnahme ohne Substanzzusatz von $91,3 \pm 6,7$ fmol/mg Protein wurde auf 100 % gesetzt (rote Hilfslinie). Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte \pm Standardfehler von drei Experimenten durchgeführt in Triplikaten an unterschiedlichen Zellkulturpassagen. Die schwarze Hilfslinie liegt bei 50 % Transportaktivität. Signifikanzen: ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

13,8 \pm 7,6 % festgestellt werden, diese erwies sich jedoch als nicht signifikant.

Alle getesteten Substanzen aus der Gruppe der Interkalantien und Mitose-Inhibitoren (Abb. 15) konnten die Aufnahme von $[^3\text{H}]\text{MPP}^+$ sehr bis hoch signifikant beeinflussen, wobei der stärkste Effekt in der Anwesenheit von Mitoxantron beobachtet werden konnte. Durch Zugabe dieses Interkalans wurde eine Verringerung der Modells substrat-Aufnahme um $87,5 \pm 1,2$ % bewirkt. Unter Zugabe der Substanzen Vinblastin, Doxorubicin und Paclitaxel konnte eine vergleichbare Reduktion um $58,5 \pm 4,2$ %, $55,1 \pm 3,8$ % bzw. $51,9 \pm 1,9$ % festgestellt werden. Der relativ schwächste Effekt wurde unter Zugabe von Vincristin beobachtet, was in einer Reduktion der $[^3\text{H}]\text{MPP}^+$ -Aufnahme um $32,3 \pm 8,0$ % resultierte.

Außer unter Zugabe von Fludarabin konnte für keines der getesteten Antimetabolite (Abb. 16) ein hoch signifikanter Effekt festgestellt werden. Die Reduktion der Referenzsubstrat-Aufnahme lag in Anwesenheit von Fludarabin bei $14,4 \pm 3,0$ %. Unter Zugabe der Antimetabolite 5-Fluorouracil, Gemcitabin und Cytosinarabinosid konn-

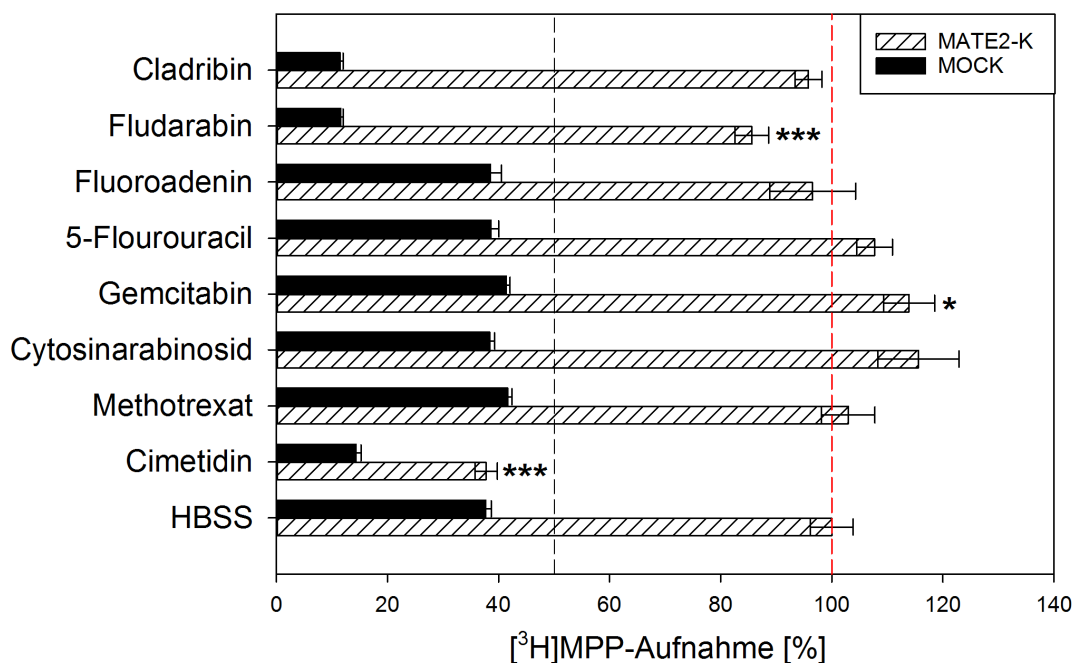


Abb. 16: Inhibitionsanalyse von **MATE2-K** durch **Antimetabolite** in stabil transfizierten HEK293-Zellen (schraffierte Balken) im Vergleich mit Leervector-transfizierten Zellen (MOCK; schwarze Balken) unter Verwendung von 5,0 nM $[^3\text{H}]\text{MPP}^+$ als Modellsubstrat. Als Inhibitorkontrolle wurde Cimetidin in einer Konzentration von 100 μM verwendet. Alle Zytostatika wurden in einer Konzentration von 100 μM eingesetzt, die Transportdauer betrug 1 min bei 37°C, nach 30 min Vorinkubation mit 30 mM NH_4Cl in HBSS. Die $[^3\text{H}]\text{MPP}^+$ -Aufnahme ohne Substanzzusatz von $91,3 \pm 6,7$ fmol/mg Protein wurde auf 100 % gesetzt (rote Hilfslinie). Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte \pm Standardfehler von drei Experimenten durchgeführt in Triplikaten an unterschiedlichen Zellkulturpassagen. Die schwarze Hilfslinie liegt bei 50 % Transportaktivität.

Signifikanzen: * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$

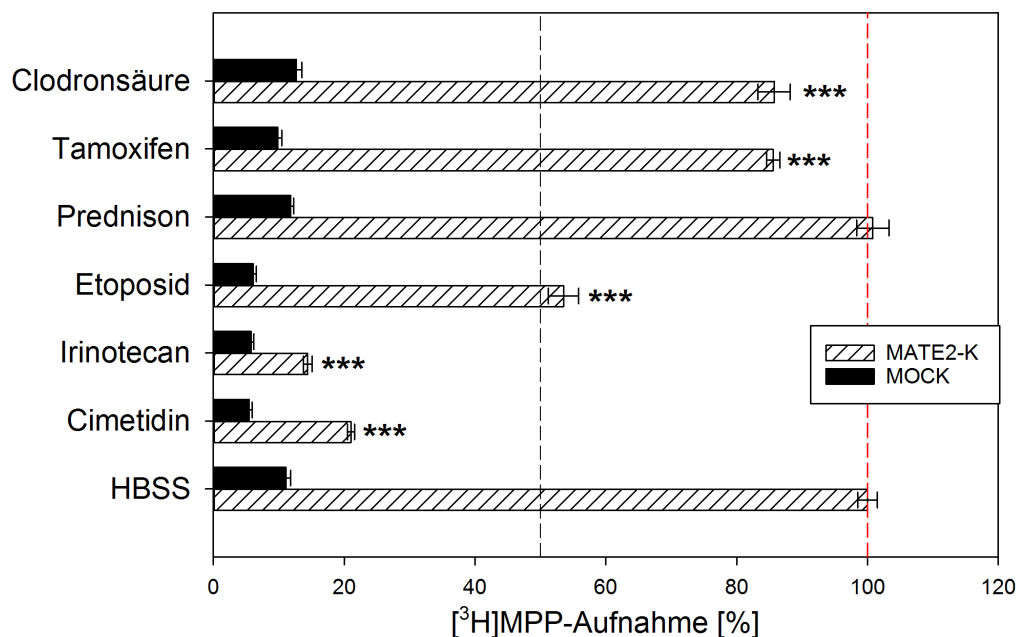


Abb. 17: Inhibitionsanalyse von **MATE2-K** durch **Topoisomerase-Inhibitoren und Adjuvantien** in stabil transfizierten HEK293-Zellen (schraffierte Balken) im Vergleich mit Leervector-transfizierten Zellen (MOCK; schwarze Balken) unter Verwendung von 5,0 nM $[^3\text{H}]\text{MPP}^+$ als Modellsubstrat. Als Inhibitorkontrolle wurde Cimetidin in einer Konzentration von 100 μM verwendet. Alle Zytostatika wurden in einer Konzentration von 100 μM eingesetzt, die Transportdauer betrug 1 min bei 37°C, nach 30 min Vorinkubation mit 30 mM NH_4Cl in HBSS. Die $[^3\text{H}]\text{MPP}^+$ -Aufnahme ohne Substanzzusatz von $91,3 \pm 6,7$ fmol/mg Protein wurde auf 100 % gesetzt (rote Hilfslinie). Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte \pm Standardfehler von drei Experimenten durchgeführt in Triplikaten an unterschiedlichen Zellkulturpassagen. Die schwarze Hilfslinie liegt bei 50 % Transportaktivität. Signifikanzen: *** $p < 0.001$

te eine erhöhte Akkumulation von $[^3\text{H}]\text{MPP}^+$ gemessen werden, wobei sich nur der durch Gemcitabin ausgelöste Effekt als signifikant erwies. Hier wurde eine verstärkte Aufnahme um $13,9 \pm 4,6$ % gemessen.

Innerhalb der Gruppe der Topoisomerase-Inhibitoren und Adjuvantien (Abb. 17) zeigte die Zugabe von Prednison als einzige Testsubstanz dieser Stoffgruppe keine Beeinflussung der Aufnahme des Referenzsubstrates. Die deutlichste hoch signifikante Reduktion der $[^3\text{H}]\text{MPP}^+$ -Akkumulation in MATE2-K wurde, mit $85,6 \pm 0,7$ %, unter Zugabe von Irinotecan beobachtet, der zweitstärkste Effekt, mit einer Reduktion der $[^3\text{H}]\text{MPP}^+$ -Aufnahme um $46,5 \pm 2,3$ %, in Anwesenheit von Etoposid. Unter Zugabe von Tamoxifen und Clodronsäure wurden vergleichbare reduktive Effekte um $14,4 \pm 1,0$ % bzw. $14,3 \pm 2,5$ % beobachtet.

3.2 Affinitätsbestimmung interagierender Zytostatika

Für die Modelltransporter OCTN2 und MATE2-K wurde für ausgewählte Substanzen eine Affinitätsbestimmung, wie unter Abschnitt 2.4 erläutert, durchgeführt. Die Bestimmung des K_i -Wertes erfolgte graphisch mit Hilfe des Dixon-Plots, bei dem die reziproke Transportgeschwindigkeit ($\frac{1}{v}$) gegen die Inhibitorkonzentration (i), gemessen in Anwesenheit von zwei verschiedenen Substratkonzentrationen (s), aufgetragen wird. Der Schnittpunkt der in den negativen Bereich extrapolierten Geraden gibt dabei die Inhibitorkonzentration bei $-i = -K_i$ wieder. Zusätzlich wurden die erhaltenen Daten nach der Methode von Cornish-Bowden aufgetragen, wobei der Quotient aus Substratkonzentration und Transportgeschwindigkeit gegen die Inhibitorkonzentration aufgetragen wird. Der Schnittpunkt der in den negativen Bereich extrapolierten Geraden gibt hier bei $-i = -K_i'$ wieder. Für die Affinitätsanalyse wurden diejenigen Substanzen ausgewählt, in deren Anwesenheit eine Reduktion der Referenzsubstrat-Aufnahme um mindestens 50 % bewirkt werden konnte. Alle Ergebnisse wurden als Mittelwerte dreier Experimente, durchgeführt in Triplikaten ($n = 3$), mit Standardfehler dargestellt.

3.2.1 OCTN2

Die Affinitätsanalyse wurde für OCTN2 wie unter Abschnitt 2.4 für vier verschiedene Substanzen durchgeführt. Für die Analysen wurden zwei verschiedene Gesamtkonzentrationen von L-Carnitin in den zwei Ansätzen verwendet, 2,7 μM und 27 μM . Beide Ansätze wurden mit je 5,0 nM [^3H]Carnitin versetzt.

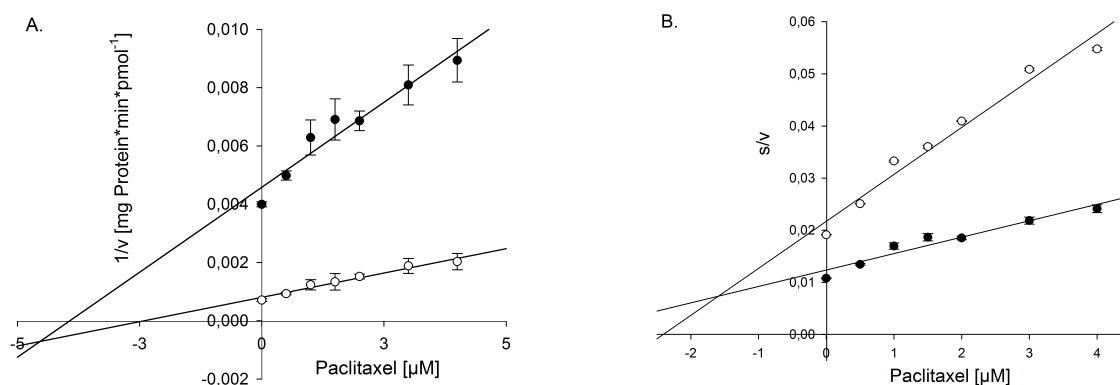


Abb. 18: Vergleich der nach Dixon (A) und Cornish-Bowden (B) aufgetragenen Daten zur Ermittlung der Hemmkinetik von **Paclitaxel**. Gemessen wurde die Aufnahme von 5,0 nM [^3H]Carnitin durch OCTN2 in HEK293-Zellen unter Zugabe steigender Konzentrationen von Paclitaxel (0 - 4,0 μM) in Anwesenheit unterschiedlicher Gesamtkonzentrationen von \bullet 2,7 μM Carnitin und \circ 27 μM Carnitin. Die Aufnahme erfolgte bei pH 7,4 und 37°C für 1 min. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte \pm Standardfehler von drei Experimenten durchgeführt in Triplikaten an unterschiedlichen Zellkulturpassagen.

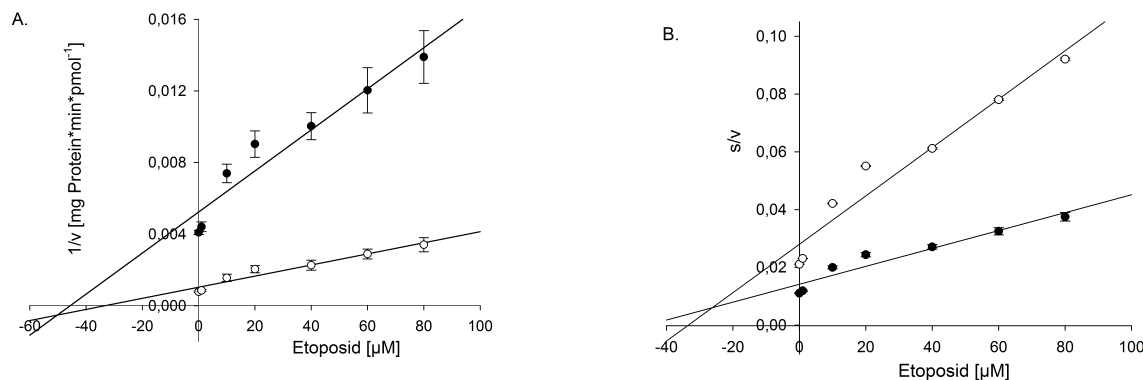


Abb. 19: Vergleich der nach Dixon (A) und Cornish-Bowden (B) aufgetragenen Daten zur Ermittlung der Hemmkinetik von **Etoposid**. Gemessen wurde die Aufnahme von 5,0 nM [³H]Carnitin durch OCTN2 in HEK293-Zellen unter Zugabe steigender Konzentrationen von Etoposid (0 - 80 μM) in Anwesenheit unterschiedlicher Gesamtkonzentrationen von ● 2,7 μM Carnitin und ○ 27 μM Carnitin. Die Aufnahme erfolgte bei pH 7,4 und 37°C für 1 min. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte ± Standardfehler von drei Experimenten durchgeführt in Triplikaten an unterschiedlichen Zellkulturpassagen.

Für die Analyse von OCTN2 mit Paclitaxel wurde die Testsubstanz in Konzentrationen zwischen 0 und 4,0 μM eingesetzt. Die Ergebnisse der Affinitätsanalyse (Abb. 18) resultierten im Dixon-Plot in einem Schnittpunkt, der unterhalb der X-Achse lag. Im Cornish-Bowden-Plot lag dieser oberhalb der X-Achse. Die sich daraus ergebenden Affinitätskonstanten zeigten einen K_i -Wert im Dixon-Plot von $4,6 \pm 0,3 \mu\text{M}$ und einen K_i' -Wert im Cornish-Bowden-Plot von $1,6 \pm 0,2 \mu\text{M}$.

Ein vergleichbares Bild zeigte sich auch für den Topoisomerase-Inhibitor Etoposid (Abb. 19). Dieser wurde in einem Konzentrationsbereich von 0 und 80 μM eingesetzt. Auch hier lag der Schnittpunkt im Dixon-Plot unterhalb, im Cornish-Bowden-Plot oberhalb der X-Achse. Der K_i -Wert lag hier bei $51,0 \pm 5,3 \mu\text{M}$, der K_i' -Wert bei $26,2 \pm 0,6 \mu\text{M}$.

Der Mitose-Inhibitor Vinblastin zeigte im Dixon-Plot einen Schnittpunkt oberhalb der X-Achse, welcher einen K_i -Wert von $52,3 \pm 5,2 \mu\text{M}$ ergab (Abb. 20). Im Cornish-Bowden-Plot resultierten die Messwerte in zwei parallelen Geraden, weshalb hier kein K_i' -Wert berechnet werden konnte. Die verwendeten Konzentrationen der Testsubstanz lagen im Bereich 0 und 150 μM.

Für das Vinka-Alkaloid Vincristin zeigte sich für den Konzentrationsbereich 0 - 150 μM ein vergleichbares Bild wie beim strukturverwandten Vinblastin (Abb. 21). Auch hier konnte nur ein K_i -Wert mit Hilfe des Dixon-Plots berechnet werden, der mit $52,5 \pm 5,9 \mu\text{M}$ auch nahezu identisch war. Im Cornish-Bowden-Plot zeigten sich zwei parallele Geraden.

In Tabelle 7 wurden die für OCTN2 berechneten Werte der Affinitätskonstanten zur besseren Übersicht noch einmal zusammengefasst aufgeführt. Zusätzlich dazu sind

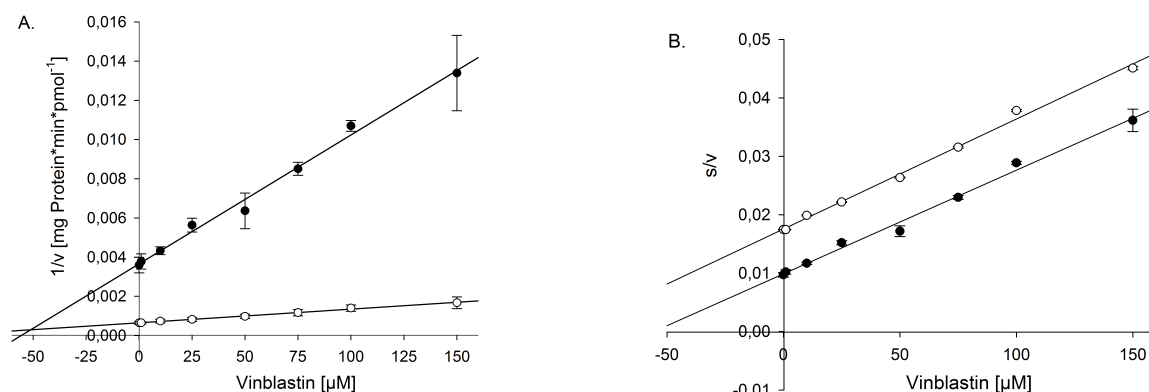


Abb. 20: Vergleich der nach Dixon (A) und Cornish-Bowden (B) aufgetragenen Daten zur Ermittlung der Hemmkinetik von **Vinblastin**. Gemessen wurde die Aufnahme von 5,0 nM [^3H]Carnitin durch OCTN2 in HEK293-Zellen unter Zugabe steigender Konzentrationen von Vinblastin (0 - 150 μM) in Anwesenheit unterschiedlicher Gesamtkonzentrationen von \bullet 2,7 μM Carnitin und \circ 27 μM Carnitin. Die Aufnahme erfolgte bei pH 7,4 und 37°C für 1 min. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte \pm Standardfehler von drei Experimenten durchgeführt in Triplikaten an unterschiedlichen Zellkulturpassagen.

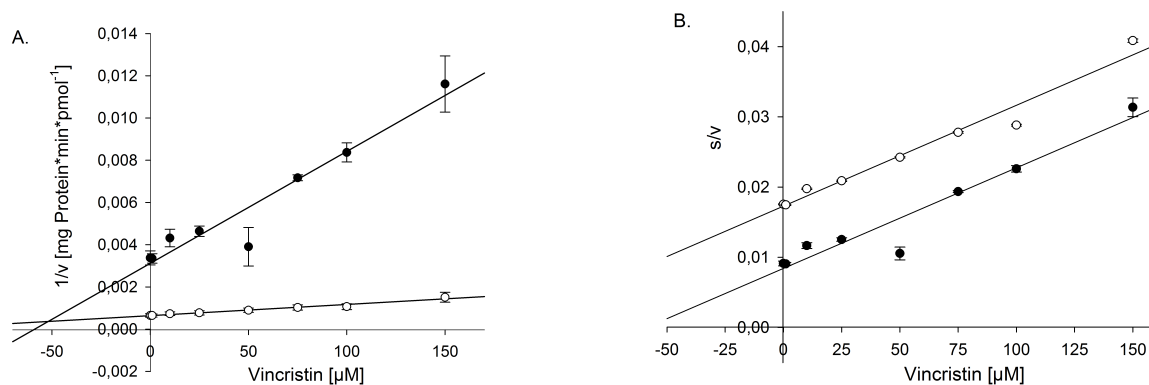


Abb. 21: Vergleich der nach Dixon (A) und Cornish-Bowden (B) aufgetragenen Daten zur Ermittlung der Hemmkinetik von **Vincristin**. Gemessen wurde die Aufnahme von 5,0 nM [^3H]Carnitin durch OCTN2 in HEK293-Zellen unter Zugabe steigender Konzentrationen von Vincristin (0 - 150 μM) in Anwesenheit unterschiedlicher Gesamtkonzentrationen von \bullet 2,7 μM Carnitin und \circ 27 μM Carnitin. Die Aufnahme erfolgte bei pH 7,4 und 37°C für 1 min. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte \pm Standardfehler von drei Experimenten durchgeführt in Triplikaten an unterschiedlichen Zellkulturpassagen.

Tabelle 7: Zusammenfassung der für OCTN2 bestimmten Affinitätskonstanten ausgewählter inhibitorischer Substanzen

Substanz	K_i -Wert	K_i' -Wert
Paclitaxel	$4,5 \pm 0,3 \mu\text{M}$	$1,6 \pm 0,2 \mu\text{M}$
Etoposid	$51,0 \pm 5,3 \mu\text{M}$	$26,2 \pm 0,6 \mu\text{M}$
Vinblastin	$52,3 \pm 5,2 \mu\text{M}$	–
Vincristin	$52,5 \pm 5,9 \mu\text{M}$	–

in Tabelle 8 die aus den gleichen Daten berechneten IC_{50} -Werte dargestellt.

Tabelle 8: IC_{50} -Werte von Interagierenden Substanzen mit OCTN2 berechnet nach Burlingham [11] aus den zur K_i -Wert-Bestimmung verwendeten Daten gemessen bei einer Substratkonzentration von $2,7 \mu\text{M}$ L-Carnitin. Die dargestellten Mittelwerte resultieren aus drei unabhängigen Experimenten, durchgeführt in Triplikaten.

Substanz	IC_{50} -Wert
Paclitaxel	$3,9 \pm 0,3 \mu\text{M}$
Vinblastin	$50,5 \pm 4,5 \mu\text{M}$
Etoposid	$57,3 \pm 1,1 \mu\text{M}$
Vincristin	$68,3 \pm 4,4 \mu\text{M}$

3.2.2 MATE2-K

Die Bestimmung der Affinitätskonstanten wurde für MATE2-K wie unter Abschnitt 2.4 für sechs verschiedene Substanzen durchgeführt. Für die Analysen wurden zwei verschiedene Gesamtkonzentrationen von MPP^+ in den zwei Ansätzen verwendet, $10 \mu\text{M}$ und $100 \mu\text{M}$. Beide Ansätze wurden mit je $5,0 \text{ nM}$ $[\text{}^3\text{H}]\text{MPP}^+$ versetzt.

Die Testsubstanz Mitoxantron wurde in einem Konzentrationsbereich von 0 bis $5,0 \mu\text{M}$ eingesetzt und zeigte im Dixon-Plot einen Schnittpunkt, der oberhalb der X-Achse lag (Abb. 22). Die Geraden, die sich im Cornish-Bowden-Plot für die gemessenen Daten ergaben, zeigten einen Schnittpunkt unterhalb der X-Achse. Die berechneten Affinitätskonstanten ergaben einen K_i -Wert von $1,3 \pm 0,4 \mu\text{M}$ und einen K_i' -Wert von $3,7 \pm 0,9 \mu\text{M}$.

Die Testsubstanz Irinotekan wurde in einem Konzentrationsbereich von 0 bis $10 \mu\text{M}$ eingesetzt. Die gemessenen Werte ergaben im Dixon-Plot einen Schnittpunkt oberhalb der X-Achse, woraus sich ein K_i -Wert von $7,4 \pm 1,3 \mu\text{M}$ berechnen ließ (Abb. 23). Der K_i' -Wert wurde aus dem Cornish-Bowden-Plot berechnet, dessen

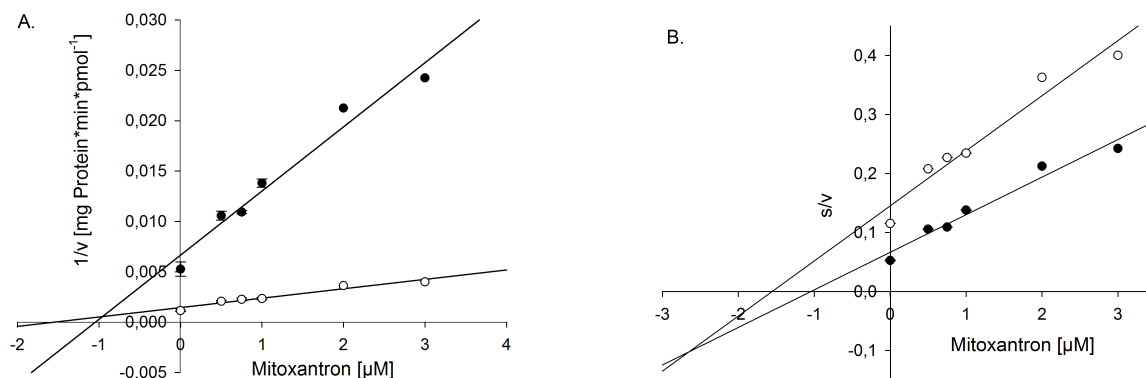


Abb. 22: Vergleich der nach Dixon (A) und Cornish-Bowden (B) aufgetragenen Daten zur Ermittlung der Hemmkinetik von **Mitoxantron**. Gemessen wurde die Aufnahme von 5,0 nM [³H]MPP⁺ durch MATE2-K in HEK293-Zellen unter Zugabe steigender Konzentrationen von Mitoxantron (0 - 5,0 µM) in Anwesenheit unterschiedlicher Gesamtkonzentrationen von ● 10 µM MPP⁺ und ○ 100 µM MPP⁺. Die Aufnahme erfolgte nach 30 min Vorinkubation mit 30 mM NH₄Cl, bei pH 7,4 und 37°C für 1 min. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte ± Standardfehler von drei Experimenten durchgeführt in Triplikaten an unterschiedlichen Zellkulturpassagen.

Schnittpunkt unterhalb der X-Achse lag. Hier ergab sich ein Wert von $21,2 \pm 4,8$ µM.

Für die Substanz Paclitaxel zeigten sich im Cornish-Bowden-Plot zwei nahezu parallel Geraden, weshalb hier kein K_i' -Wert berechnet werden konnte (Abb. 24). Der K_i -Wert lag bei $28,6 \pm 5,3$ µM mit einem Schnittpunkt im Dixon-Plot oberhalb der X-Achse. Paclitaxel wurde für die Analyse in einem Konzentrationsbereich von 0 bis 25 µM eingesetzt.

Die Testsubstanz Doxorubicin wurde in einem Konzentrationsbereich von 0 bis 120 µM eingesetzt (Abb. 25). Auch für Doxorubicin zeigten sich parallele Geraden im Cornish-Bowden-Plot, weshalb nur der K_i -Wert von $52,3 \pm 5,1$ µM berechnet werden konnte. Der Schnittpunkt der Geraden im Dixon-Plot lag oberhalb der X-Achse.

Für Vinblastin konnten sowohl im Dixon-Plot als auch im Cornish-Bowden-Plot Schnittpunkte der Geraden im Diagramm gezeigt werden (Abb. 26). Diese lagen im ersten Fall oberhalb, im zweiten unterhalb der X-Achse. Die berechneten Werte waren $91,0 \pm 8,1$ µM für den K_i -Wert im Dixon-Plot und $108,3 \pm 5,1$ µM für den K_i' -Wert im Cornish-Bowden-Plot. Die Testsubstanz wurde in einem Konzentrationsbereich von 0 bis 150 µM eingesetzt.

Der höchste K_i -Wert der Testsubstanzen von $107,1 \pm 4,4$ µM wurde für Etoposid bestimmt (Abb. 27). Für diese Substanz konnte nur im Dixon-Plot ein Schnittpunkt der ermittelten Geraden oberhalb der X-Achse festgestellt werden. Im Cornish-Bowden-Plot zeigten sich zwei nahezu parallele Geraden, weshalb hier kein K_i' -Wert berechnet werden konnte. Etoposid wurde in einem Konzentrationsbereich von 0 bis 120 µM für die Analyse eingesetzt.

In Tabelle 9 wurden die für MATE2-K berechneten Werte der Affinitätskonstan-

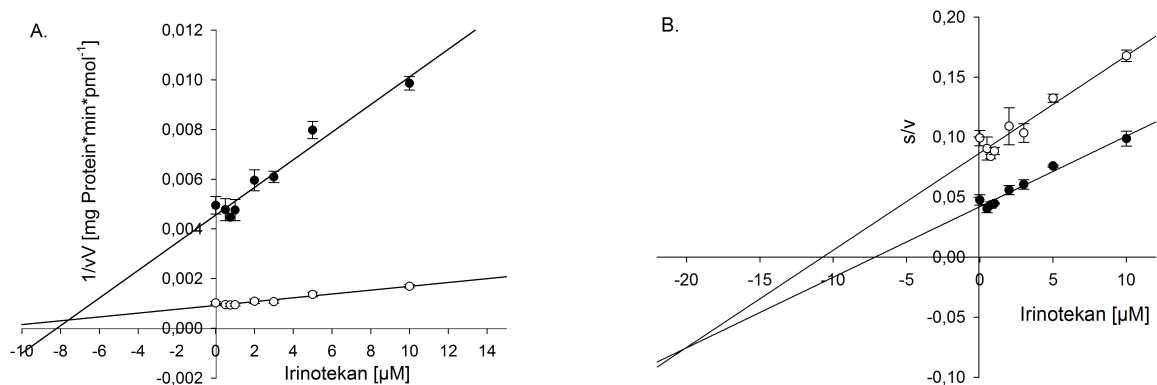


Abb. 23: Vergleich der nach Dixon (A) und Cornish-Bowden (B) aufgetragenen Daten zur Ermittlung der Hemmkinetik von **Irinotecan**. Gemessen wurde die Aufnahme von 5,0 nM [3 H]MPP $^{+}$ durch MATE2-K in HEK293-Zellen unter Zugabe steigender Konzentrationen von Irinotecan (0 - 10 μ M) in Anwesenheit unterschiedlicher Gesamtkonzentrationen von \bullet 10 μ M MPP $^{+}$ und \circ 100 μ M MPP $^{+}$. Die Aufnahme erfolgte nach 30 min Vorinkubation mit 30 mM NH $_4$ Cl, bei pH 7,4 und 37°C für 1 min. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte \pm Standardfehler von drei Experimenten durchgeführt in Triplikaten an unterschiedlichen Zellkulturpassagen.

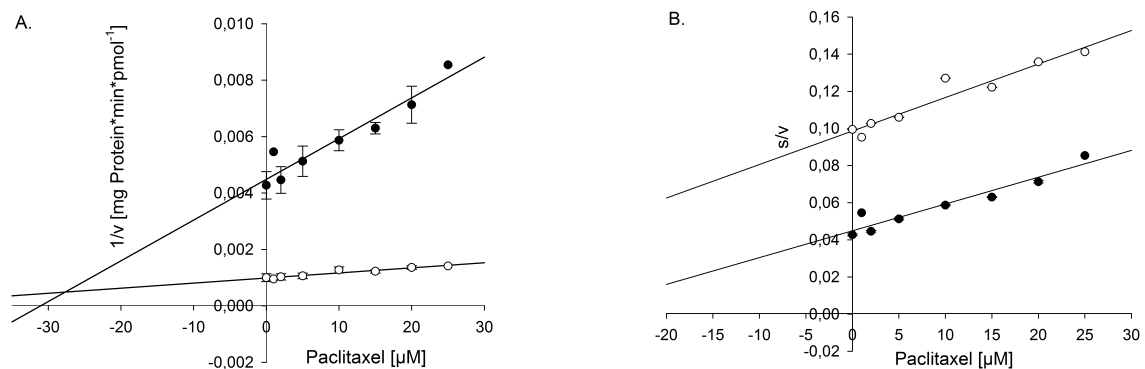


Abb. 24: Vergleich der nach Dixon (A) und Cornish-Bowden (B) aufgetragenen Daten zur Ermittlung der Hemmkinetik von **Paclitaxel**. Gemessen wurde die Aufnahme von 5,0 nM [3 H]MPP $^{+}$ durch MATE2-K in HEK293-Zellen unter Zugabe steigender Konzentrationen von Paclitaxel (0 - 25 μ M) in Anwesenheit unterschiedlicher Gesamtkonzentrationen von \bullet 10 μ M MPP $^{+}$ und \circ 100 μ M MPP $^{+}$. Die Aufnahme erfolgte nach 30 min Vorinkubation mit 30 mM NH $_4$ Cl, bei pH 7,4 und 37°C für 1 min. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte \pm Standardfehler von drei Experimenten durchgeführt in Triplikaten an unterschiedlichen Zellkulturpassagen.

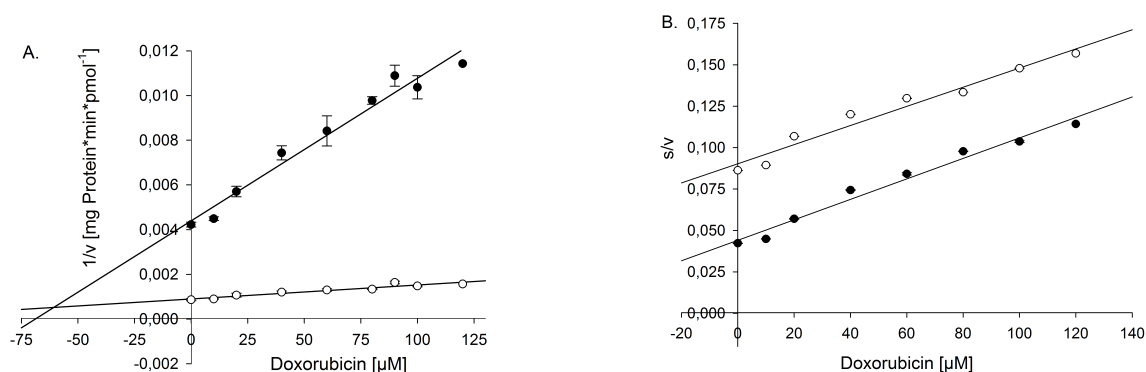


Abb. 25: Vergleich der nach Dixon (A) und Cornish-Bowden (B) aufgetragenen Daten zur Ermittlung der Hemmkinetik von **Doxorubicin**. Gemessen wurde die Aufnahme von 5,0 nM [3 H]MPP $^{+}$ durch MATE2-K in HEK293-Zellen unter Zugabe steigender Konzentrationen von Doxorubicin (0 - 120 μ M) in Anwesenheit unterschiedlicher Gesamtkonzentrationen von \bullet 10 μ M MPP $^{+}$ und \circ 100 μ M MPP $^{+}$. Die Aufnahme erfolgte nach 30 min Vorinkubation mit 30 mM NH $_4$ Cl, bei pH 7,4 und 37°C für 1 min. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte \pm Standardfehler von drei Experimenten durchgeführt in Triplikaten an unterschiedlichen Zellkulturpassagen.

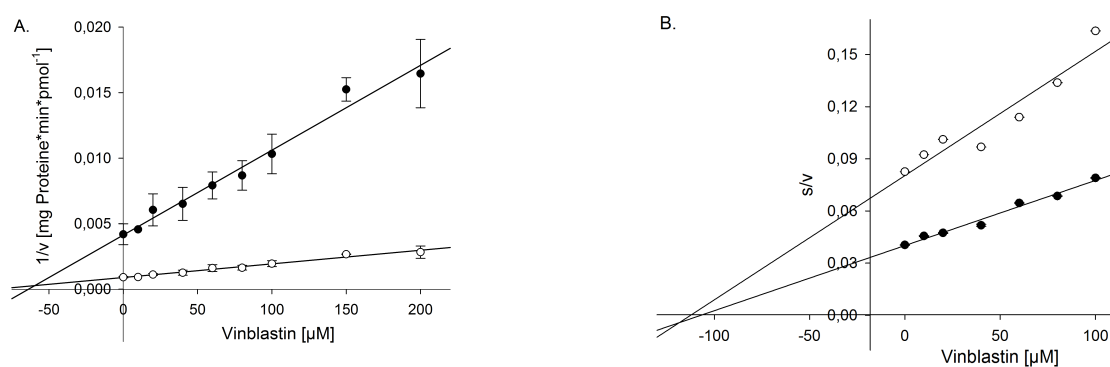


Abb. 26: Vergleich der nach Dixon (A) und Cornish-Bowden (B) aufgetragenen Daten zur Ermittlung der Hemmkinetik von **Vinblastin**. Gemessen wurde Aufnahme von 5,0 nM [3 H]MPP $^{+}$ durch MATE2-K in HEK293-Zellen unter Zugabe steigender Konzentrationen von Vinblastin (0 - 150 μ M) in Anwesenheit unterschiedlicher Gesamtkonzentrationen von \bullet 10 μ M MPP $^{+}$ und \circ 100 μ M MPP $^{+}$. Die Aufnahme erfolgte nach 30 min Vorinkubation mit 30 mM NH $_4$ Cl, bei pH 7,4 und 37°C für 1 min. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte \pm Standardfehler von drei Experimenten durchgeführt in Triplikaten an unterschiedlichen Zellkulturpassagen.

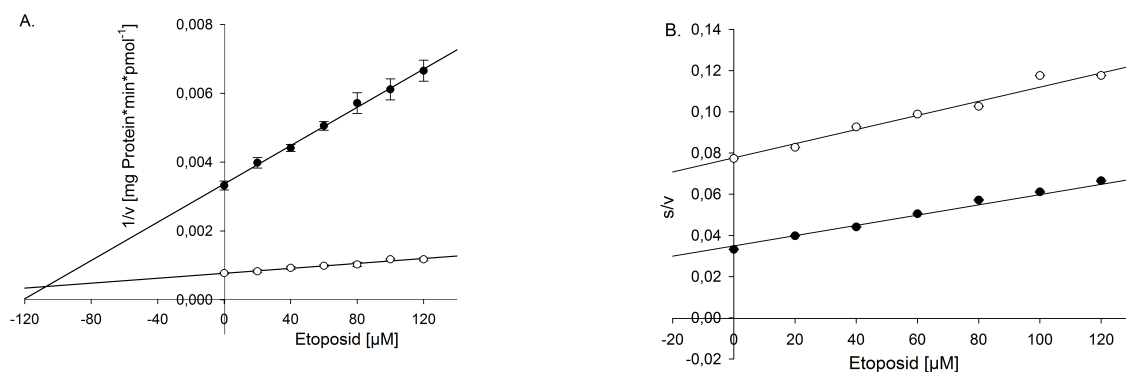


Abb. 27: Vergleich der nach Dixon (A) und Cornish-Bowden (B) aufgetragenen Daten zur Ermittlung der Hemmkinetik von **Etoposid**. Gemessen wurde Aufnahme von 5,0 nM [³H]MPP⁺ durch MATE2-K in HEK293-Zellen unter Zugabe steigender Konzentrationen von Etoposid (0 - 120 μM) in Anwesenheit unterschiedlicher Gesamtkonzentrationen von ● 10 μM MPP⁺ und ○ 100 μM MPP⁺. Die Aufnahme erfolgte nach 30 min Vorinkubation mit 30 mM NH₄Cl, bei pH 7,4 und 37°C für 1 min. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte ± Standardfehler von drei Experimenten durchgeführt in Triplikaten an unterschiedlichen Zellkulturpassagen.

Tabelle 9: Zusammenfassung der für MATE2-K bestimmten Affinitätskonstanten ausgewählter inhibitorischer Substanzen

Substanz	K _i -Wert	K _i '-Wert
Mitoxantron	1,3 ± 0,4 μM	3,7 ± 0,9 μM
Irinotekan	7,4 ± 1,3 μM	21,2 ± 4,8 μM
Paclitaxel	28,6 ± 5,3 μM	–
Doxorubicin	52,3 ± 5,1 μM	–
Vinblastin	91,0 ± 8,1 μM	108,3 ± 5,1 μM
Etoposid	107,1 ± 4,4 μM	–

ten noch einmal zur Übersicht zusammengefasst. Zusätzlich dazu sind in Tabelle 10 die aus den gleichen Daten berechneten IC_{50} -Werte dargestellt.

Tabelle 10: IC_{50} -Werte von Interagierenden Substanzen mit MATE2-K berechnet nach Burlingham [11] aus den zur K_i -Wert-Bestimmung verwendeten Daten gemessen bei einer Substratkonzentration von $10 \mu\text{M}$ MPP⁺. Die dargestellten Mittelwerte resultieren aus drei unabhängigen Experimenten, durchgeführt in Triplikaten.

Substanz	IC_{50} -Wert
Mitoxantron	$1,7 \pm 0,2 \mu\text{M}$
Irinotekan	$7,2 \pm 0,3 \mu\text{M}$
Paclitaxel	$29,7 \pm 10,2 \mu\text{M}$
Doxorubicin	$61,6 \pm 6,8 \mu\text{M}$
Vinblastin	$104,6 \pm 1,7 \mu\text{M}$
Etoposid	$131,7 \pm 21,7 \mu\text{M}$

3.3 Tumorzelllinien

3.3.1 Expressionsanalyse von SLC-Transportern in Tumorzelllinien

Um herauszufinden, welche SLC-Transporter in Mamma- und Prostatakarzinom-Zelllinien vorkommen, wurde eine Expressionsanalyse auf mRNA-Ebene, wie unter Abschnitt 2.6 beschrieben, durchgeführt. Die verwendeten Mammakarzinom-Zelllinien waren BT549, MCF-7, Hs578T, T47-D, MDA-MB231 (im Folgenden als MDA-MB bezeichnet) und SK-BR-3. Die verwendeten Prostatakarzinom-Zelllinien waren DU145, PC-3 und LNCaP. Hierbei wurde die enthaltene mRNA in cDNA überführt und in der PCR-Analyse in jedem Zyklus unter Verwendung spezifischer, markierter Primer verdoppelt. Dabei wurde nach jedem Amplifikationszyklus die Signalstärke der Fluoreszenz der Primer-Sonden und somit die Konzentration der amplifizierten cDNA gemessen. Entscheidend ist der Zyklus, nach dem das gemessene Signal einen bestimmten Grenzwert überschreitet. Je früher ein solches Signal im Laufe der Zyklen der PCR-Analyse auftritt, desto höher war die Ausgangskonzentration an cDNA in der Probe zu Beginn der Untersuchung. Die mittleren Expressionszyklen \pm Standardfehler sind der Tabelle 16 unter Abschnitt 6 zu entnehmen.

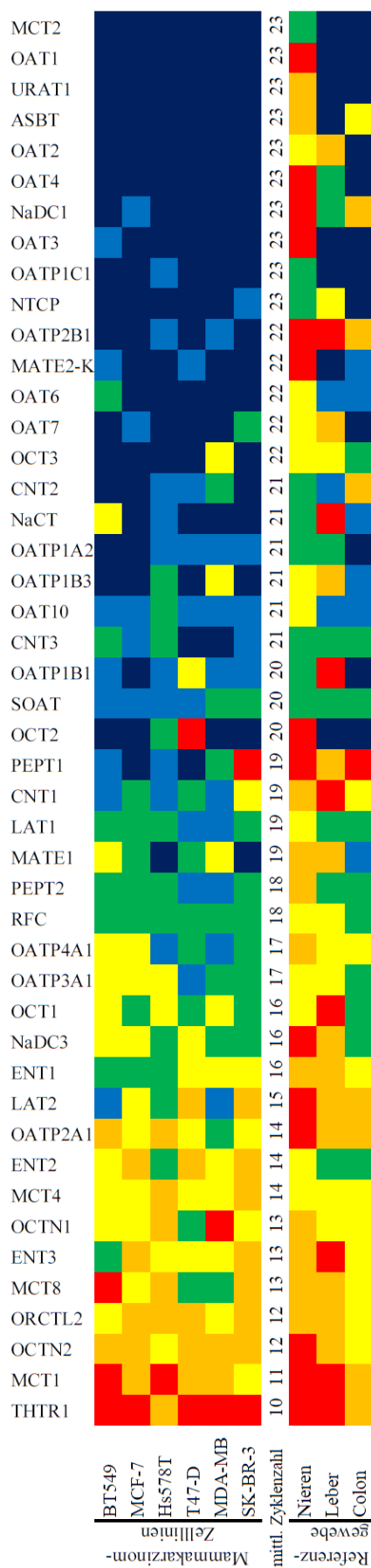


Abb. 28: Expression von 46 SLC-Transportern in Mamma- und Prostatakarzinom-Zelllinien auf mRNA-Ebene, ermittelt durch quantitative real time Chip-PCR (30 Zyklen) nach Präamplifikation (14 Zyklen) von $1,5 \mu\text{g}$ isolierter Gesamt-mRNA. Alle Werte wurden auf die Expression von GAPDH normalisiert. Für Präamplifikation und quantitative real time PCR wurden TaqMan-Primer verwendet. Die Ergebnisse resultieren aus zwei Experimenten durchgeführt in Doppelbestimmung zweier verschiedener Zellkulturpassagen. Die Sortierung erfolgte in absteigender mittlerer Expression innerhalb der Zellart. Die mRNA-Proben der Referenzgewebe (Nieren, Leber, Colon) wurden als Kontrolle mitgeführt und nicht in die Berechnung der mittleren Expression mit einbezogen.

In Abb. 28 ist die Expression der SLC-Transporter in den verwendeten Testzellen in Form einer Heat-Map zusammengefasst dargestellt. Hierfür wurde aus den ermittelten Signalen für jede Transporter-cDNA die mittlere Zyklenzahl über die verschiedenen Mamma- bzw. Prostatakarzinom-Zelllinien gebildet. Die Sortierung der Ergebnisse erfolgte aufsteigend nach der mittleren Zyklenzahl der SLC-Transporter, wodurch die SLC-Transporter, die nach wenigen PCR-Zyklen den Grenzwert erreichten, am Beginn der Grafik stehen und die Proben, ohne erkennbare Expression, am Ende. Die Referenzgewebe Leber, Niere und Colon sind nicht in die Berechnung des Mittelwertes mit einbezogen worden, da diese lediglich der Expressionskontrolle dienen. Pro Zelllinie wurden Proben aus zwei unterschiedlichen Zellpassagen für die Analyse verwendet, welche je in Doppelbestimmung auf den Chip aufgetragen wurden. Allen Proben deren Signale nach Zyklus 22 detektierbar waren, wurden der Wert 23 zugeordnet.

Von den 46 getesteten SLC-Transportern konnten in Mammakarzinom-Zelllinien für sieben cDNA-Proben innerhalb der ersten 13 Zyklen ein detektierbares Signal gemessen werden. Diese waren der Thiamin-Transporter THTR1, der Monocarboxylat-Transporter MCT1, der L-Carnitin-Transporter OCTN2, der noch wenig erforschte Transporter organischer Anionen ORCTL2, der Monocarboxylat-Transporter MCT8, der Nucleosid-Transporter ENT3 und der Ergothionein-Transporter OCTN1. Diese waren in abweichender Reihenfolge auch unter den insgesamt neun bis zum 13 Zyklus detektierbaren Signalen in Prostatakarzinom-Zellen vertreten, mit Ausnahme von OCTN1, dessen Signal hier im Mittel nach dem 15. Zyklus gemessen wurde. Zu den in Prostatakarzinom-Zelllinien früh detektierbaren cDNAs zählten der Monocarboxylat-Transporter MCT1, der Thiamin-Transporter THTR1, der L-Carnitin-Transporter OCTN2, der Nucleosid-Transporter ENT3, der noch wenig erforschte Transporter organischer Anionen ORCTL2, der Schilddrüsenhormon-Transporter OATP4A1, der Nucleosid-Transporter ENT2, der Aminosäure-Transporter LAT2 und der Monocarboxylat-Transporter MCT8.

Die sieben cDNAs, deren Signal bis zum 16. Zyklus detektiert wurde, waren innerhalb der Mammakarzinom-Zelllinien der Monocarboxylat-Transporter MCT4, der Nucleosid-Transporter ENT2, der Prostaglandin-Transporter OATP2A1, der Aminosäure-Transporter LAT2, der Zytostatika-Transporter ENT1, der Na⁺-abhängige Dicarboxylat-Transporter NaDC3 und der Transporter organischer Kationen OCT1. Für die getesteten Prostatakarzinom-Zelllinien fanden sich in diesem Bereich sechs SLC-Transporter. Diese waren der Transporter organischer Kationen OCT1, der Monocarboxylat-Transporter MCT4, der Ergothionein-Transporter OCTN1, der Prostaglandin-Transporter OATP2A1, der Transporter organischer Kationen OCT3 und der Transporter organischer Anionen OATP1B3. Der größte Anteil der Transporter-cDNA zeigt detektierbare Signale erstmals zwischen Zyklus 17-23. Hierunter befinden sich, sowohl innerhalb der Mammakarzinom-Zelllinien als auch der

Prostatakarzinom-Zelllinien, Transporter organischer Anionen (OATs), Peptidtransporter (PEPTs), konzentrierende Nukleosid-Transporter (CNTs), Toxin-Exporter (MA-TEs), Transporter für Gallensalze oder Schilddrüsenhormone (OATPs) und Sulfat-Transporter (SOAT).

Keinerlei Signale bis zum Zyklus 23 in Mammakarzinom-Zelllinien konnte für die cDNA der Transporter organischer Anionen OAT4 und OAT2, den Gallensäure-Transporter ASBT, den Urat-Transporter URAT1, den Transporter organischer Anionen OAT1 und den Monocarboxylat-Transporter MCT2 detektiert werden. Für vier dieser cDNAs konnte in Prostatazelllinien ebenfalls kein Signal bis zum Zyklus 22 detektiert werden. Innerhalb dieser Zellart fand sich kein Signal für den Transporter organischer Anionen OAT7, den Gallensalz-Transporter OATP1A2, den Schilddrüsenhormon-Transporter OATP1C1, den Na⁺-abhängige Dicarboxylat-Transporter NaDC1, den Gallensäure-Transporter ASBT, den Urat-Transporter URAT1, den Transporter organischer Anionen OAT1 und den Monocarboxylat-Transporter MCT2. Insgesamt sind die Signalmuster beider Zelllinien vergleichbar. So sind die früh detektierbaren Transporter-cDNAs der Mammakarzinom-Zelllinien auch innerhalb der Prostatakarzinom-Zelllinien mit früher Detektion zu finden und auch die cDNAs, für die kein Signal detektiert werden konnte, stimmen stark überein. Für die Karzinomzellen des Prostatagewebes konnte den Gruppen der früh wie auch der nicht-detektierbaren cDNAs jeweils eine größere Anzahl von Transporter-cDNA zugeordnet werden als dies bei den Mammakarzinom-Zelllinien der Fall war. Dabei ist besonders die Zelllinie LN-CaP auffällig, in der für mehr als die Hälfte der getesteten SLC-Transporter-cDNAs kein Signal detektiert werden konnte. Eine frühe Detektierbarkeit ist dabei sowohl für Mamma- als auch für Prostatakarzinom-Zelllinien nur für ca. ein Viertel der untersuchten Transporter gegeben. Der weit größere Anteil der SLC-Transporter zeigt Signale erst nach dem Zyklus 16. Darüber hinaus wird deutlich, dass sich die Expression innerhalb der Referenzgewebe z.T. stark vom der der Karzinom-Zelllinien unterscheidet. So ist beispielsweise OATP2B1 in beiden Karzinom-Zelllinien nur spät in einzelnen Zelllinien detektierbar, in den Proben der Referenzgewebe treten erste Signale jedoch schon vor dem Zyklus 10 auf. Ähnlich verhält es sich für die SLC-Transporter-cDNAs von PEPT1 oder NaDC1.

3.3.2 Funktionelle Expressionsanalyse ausgewählter SLC-Transporter in Karzinomzelllinien

Zur Untersuchung der innerhalb der verschiedenen Tumorzelllinien differentiell exprimierten SLC-Transporter wurden Aufnahmeuntersuchungen mit den jeweiligen Transporter-spezifischen Substraten und Inhibitoren durchgeführt. Hierzu wurde für die Gruppe der Mammakarzinom-Zelllinien und der Prostatakarzinom-Zelllinien pro untersuchtem Transporter je eine exprimierende Zelllinie und eine nicht-exprimierende

Zelllinie ausgewählt und für die Transportanalyse verwendet. Für SLC-Transporter wie z.B. OCTN2, deren Gene in allen Zelllinien ähnlich stark exprimiert waren, konnte keine funktionelle Analyse durchgeführt werden, da hier keine nicht-exprimierende Zelllinie als Negativ-Kontrolle zur Verfügung stand. Die Transportbedingungen wurden den jeweiligen Optimalbedingungen der ausgewählten SLC-Transporter angepasst. Alle Experimente wurden bei 37°C und einer Transportdauer von 1 bis 10 min durchgeführt. Im Falle von MATE1 wurde vor dem Transport eine Vorbeladung mit Ammoniumchlorid durchgeführt (siehe Abschnitt 1.3). Alle Ergebnisse wurden als Mittelwerte dreier Experimente, durchgeführt in Triplikaten ($n = 3$), mit Standardfehler dargestellt.

3.3.3 Prostatakarzinom-Zelllinien

Für die Analyse auf funktionelle Expression von SLC-Transportern in Prostatakarzinom-Zelllinien wurden fünf verschiedene, differentiell exprimierte Transportproteine ausgewählt. Die hierfür verwendeten Zelllinien und Substanzen sind der Tabelle 11 zu entnehmen. Die Konzentrationen der Transporter-spezifischen inhibitorischen Substanzen wurden durch die Firma PortaCellTec ermittelt und uns freundlicher Weise zur Verfügung gestellt. Im Folgenden sind in den Grafiken (Abb. 29 - 33) die Ergebnisse der Transportexperimente der getesteten SLC-Transporter auf der linken Seite und die isolierte Expressions-Übersicht des beprobten Transporters als Ausschnitt aus Abb. 28 auf der rechten Seite dargestellt.

Tabelle 11: Transportbedingungen der getesteten SLC-Transporter in Prostatakarzinom-Zelllinien

Transporter	Substrat	Substrat gesamt	Inhibitor	Zelll. +	Zelll. -
OAT4	[³ H]ES 20 nM	20 nM	BSP 100 μ M	LNCaP	PC-3
OATP1B3	[³ H]CCK-8 5,0 nM	1,0 μ M	Rifampicin 5,0 μ M	PC-3	LNCaP
OATP2B1	[³ H]ES 10 nM	10 nM	Glibenclamid 100 μ M	DU145	PC-3
NaCT	[¹⁴ C]Citrat 2,0 μ M	10 μ M	Na ⁺ -frei	DU145	PC-3
MATE1	[³ H]MPP ⁺ 10 nM	10 nM	Cimetidin 100 μ M	DU145	LNCaP

Für die funktionelle Expressionsanalyse des SLC-Transporters OATP1B3 wurde als positive Zelllinie PC-3 und als Negativzelllinie LNCaP verwendet. Die Aufnahme des Modellsubstrates [³H]Cholecystokinin Oktapeptid ([³H]CCK-8) in PC-3 änderte

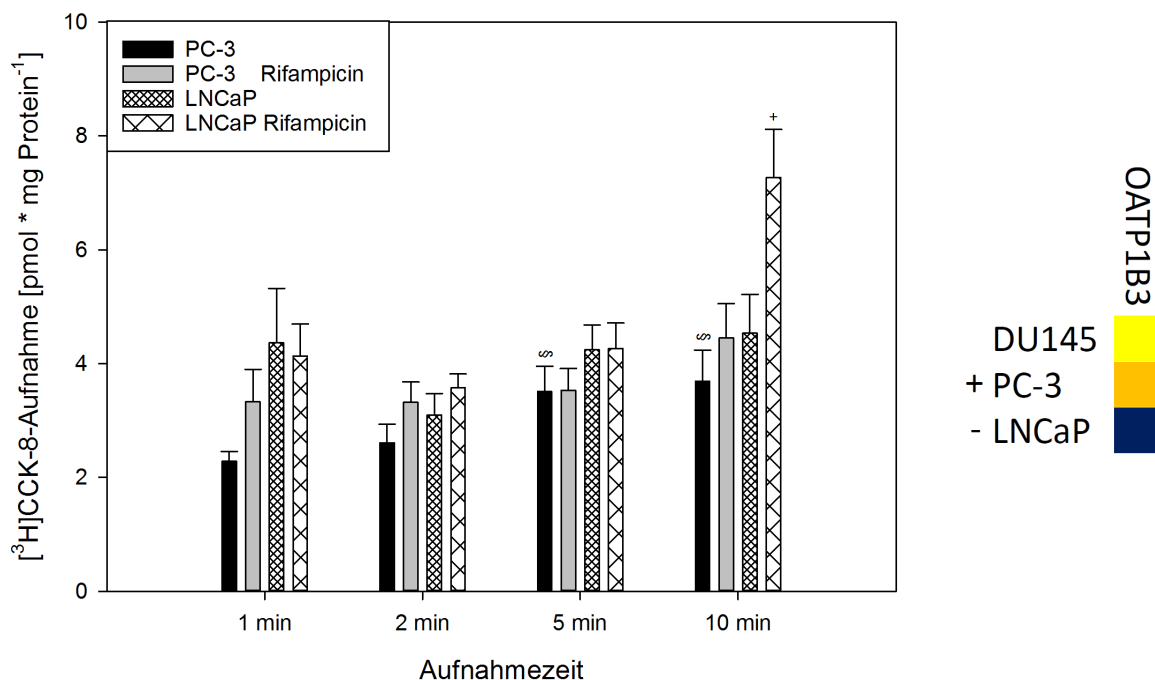


Abb. 29: Links: Aufnahme von 5,0 nM [^3H]CCK-8 in OATP1B3-exprimierenden (PC-3) und nicht-exprimierenden (LNCaP) Prostatakarzinom-Zelllinien, mit und ohne Zugabe von 5,0 μM Rifampicin, über einen Transportzeitraum von 1 bis 10 min, bei pH 7,4 und 37°C. Die Gesamtkonzentration von CCK-8 lag bei 1,0 μM . Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte \pm Standardfehler von drei Experimenten durchgeführt in Triplikaten an unterschiedlichen Zellkulturpassagen. Signifikanzniveau des nicht-inhibierten Transports der positiven Zelllinie gegenüber der Aufnahme nach 1 min § $p < 0,05$; Signifikanzniveau der inhibierten Aufnahme der negativen Zelllinie gegenüber der nicht-inhibierten Aufnahme zum jeweiligen Messzeitpunkt + $p < 0,05$

Rechts: Ausschnitt aus Abb. 28, Expression von OATP1B3 in Prostatakarzinom-Zelllinien auf mRNA-Ebene. Die für das Experiment verwendete positive Zelllinie wurde mit +, die negative Zelllinie durch - gekennzeichnet.

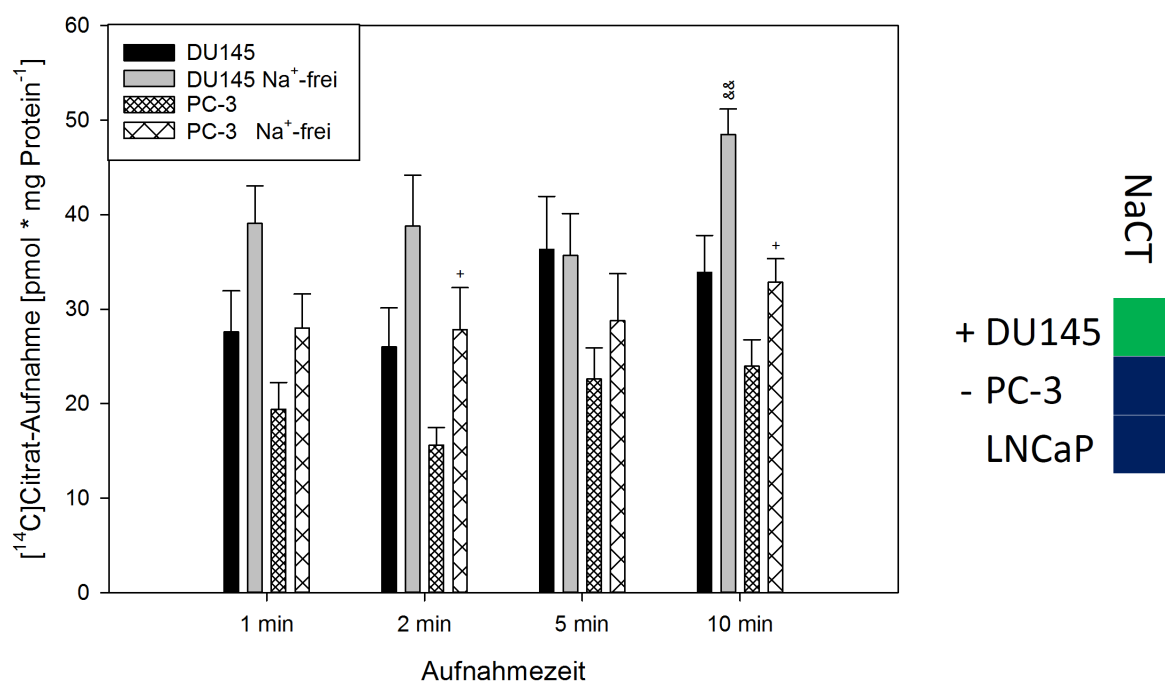


Abb. 30: Aufnahme von $2,0 \mu\text{M}$ $[^{14}\text{C}]$ Citrat in NaCT-exprimierenden (DU145) und nicht-exprimierenden (PC-3) Prostatakarzinom-Zelllinien, in An- und Abwesenheit von Na^+ -Ionen, über einen Transportzeitraum von 1 bis 10 min, bei pH 7,4 und 37°C . Die Gesamtkonzentration von Citrat lag bei $10 \mu\text{M}$. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte \pm Standardfehler von drei Experimenten durchgeführt in Triplikaten an unterschiedlichen Zellkulturpassagen. Signifikanzniveau der inhibierten Aufnahme der positiven Zelllinie gegenüber der nicht-inhibierten Aufnahme zum jeweiligen Messzeitpunkt $\&\& p < 0,01$; Signifikanzniveau der inhibierten Aufnahme der negativen Zelllinie gegenüber der nicht-inhibierten Aufnahme zum jeweiligen Messzeitpunkt $+ p < 0,05$

Rechts: Ausschnitt aus Abb. 28, Expression von NaCT in Prostatakarzinom-Zelllinien auf mRNA-Ebene. Die für das Experiment verwendete positive Zelllinie wurde mit +, die negative Zelllinie durch - gekennzeichnet.

sich über den Zeitraum von 10 min mit steigender Transportdauer kaum (Abb. 29). Die Aufnahme des markierten Referenzsubstrates war in Anwesenheit von Rifampicin zu jedem Messzeitpunkt höher als im Ansatz ohne zusätzliche Substanzen. Lediglich beim Messzeitpunkt von 5 min war die Aufnahme in beiden Ansätzen nahezu identisch. Die Zelllinie LNCaP zeigte bei jedem Messzeitpunkt eine erhöhte $[^3\text{H}]$ CCK-8-Aufnahme gegenüber PC-3, zeigte über den Messzeitraum jedoch, ungeachtet der Rifampicin-Zugabe, nur geringe Schwankungen in der Substrataufnahme. Lediglich beim Messzeitpunkt von 10 min konnte in Anwesenheit von Rifampicin eine deutliche erhöhte Substrataufnahme gegenüber den restlichen Messzeitpunkten festgestellt werden.

Für die funktionelle Expressionsanalyse des SLC-Transporters NaCT wurde als positive Zelllinie DU145 und als Negativzelllinie PC-3 verwendet. Die Aufnahme des Modellsubstrates $[^{14}\text{C}]$ Citrat war, außer zum Messzeitpunkt nach 5 min, unter Na^+ -freien Bedingungen deutlich höher als unter Normalbedingungen mit Na^+ -haltigem

Puffer. Dies konnte sowohl in DU145-Zellen als auch in PC-3-Zellen beobachtet werden. Die Aufnahme von Modellsubstrat war in PC-3-Zellen für jeden Messzeitpunkt geringer als in DU145-Zellen. Insgesamt konnte über die Transportdauer kein Anstieg in der Aufnahme bei steigender Inkubationszeit festgestellt werden. Die gemessenen Werte der [^{14}C]Citrat-Aufnahme durch DU145-Zellen in Anwesenheit von Na^+ zeigten keine Änderung vom Messzeitpunkt nach 1 min zu 2 min. Die gemessenen Aufnahmen nach 5 min und 10 min Inkubationszeit lagen wieder bei gleichen Konzentrationen, mit einer Erhöhung von ca. $10 \text{ pmol} \cdot \text{mg Protein}^{-1}$ gegenüber den vorherigen Messungen. Die Aufnahme in Na^+ -freiem Transportpuffer zeigte keine Änderung zwischen den Messzeitpunkten nach 1 min bis 5 min Inkubation. Nur nach einer Inkubationszeit von 10 min war gegenüber den restlichen Messzeitpunkten ein Anstieg der [^{14}C]Citrat-Aufnahme um ca. $10 \text{ pmol} \cdot \text{mg Protein}^{-1}$ feststellbar. Die Aufnahme in Gegenwart von Na^+ durch PC-3 schwankte um $4,0 \text{ pmol} \cdot \text{mg Protein}^{-1}$ um einen Wert von $20 \text{ pmol} \cdot \text{mg Protein}^{-1}$. Die Aufnahme von [^{14}C]Citrat unter Na^+ -freien Bedingungen resultierte in einer Aufnahme von $30 \text{ pmol} \cdot \text{mg Protein}^{-1}$ mit einer Schwankung von $2,0 \text{ pmol} \cdot \text{mg Protein}^{-1}$ über die verschiedenen Messzeitpunkte.

Für die funktionelle Expressionsanalyse der SLC-Transporter der MATE-Familie wurde als positive Zelllinie DU145 und als Negativzelllinie LNCaP verwendet. Da beide Mitglieder der MATE-Familie MPP^+ transportieren und sich durch Cimetidin hemmen lassen, wurde hier nicht näher zwischen MATE1 und MATE2-K unterschieden. Dies ist auch der Grund dafür, dass in Abbildung 31 die Expression beider SLC-Transporter dargestellt ist. Für die Aufnahme von [^3H]MPP⁺ ließ sich kein Unterschied zwischen den beiden getesteten Zelllinien zu den unterschiedlichen Messzeitpunkten feststellen. So war die Aufnahme in DU145-Zellen vergleichbar mit der [^3H]MPP⁺-Aufnahme in LNCaP-Zellen. Lediglich nach 10 min Inkubationszeit zeigte sich eine leicht erhöhte Akkumulation in LNCaP-Zellen. Dabei hatte die Zugabe von Cimetidin bei beiden Zelllinien keinen Einfluss auf die Modellsubstrat-Aufnahme. So waren für jeden Messzeitpunkt, abgesehen von der Messung nach 10 min Inkubation, unter beiden Bedingungen in den beiden Zelllinien nahezu identische Akkumulationen von [^3H]MPP⁺ messbar.

Für die funktionelle Expressionsanalyse des SLC-Transporters OAT4 wurde als positive Zelllinie LNCaP und als Negativzelllinie PC-3 verwendet. Die Aufnahme von [^3H]Estronsulfat ([^3H]ES) in LNCaP-Zellen erwies sich über den Messzeitraum als unregelmäßig (Abb. 32). So war sie nach 2 min zunächst geringer, stieg nach 5 min jedoch wieder an und blieb danach konstant. Dabei zeigte sich unter Zusatz von Bromsulphthalein (BSP) zu jedem Messzeitpunkt eine geringere Akkumulation als ohne die Zugabe der Substanz. Der geringste Unterschied wurde nach 2 min Inkubationszeit gemessen. Die Aufnahme des Modellsubstrates in PC-3-Zellen war zunächst geringer als in LNCaP-Zellen, stieg jedoch nach längerer Inkubationsdauer an und lag nach 10 min über dem in LNCaP-Zellen gemessenen Wert. Auch hier ließ sich eine geringere

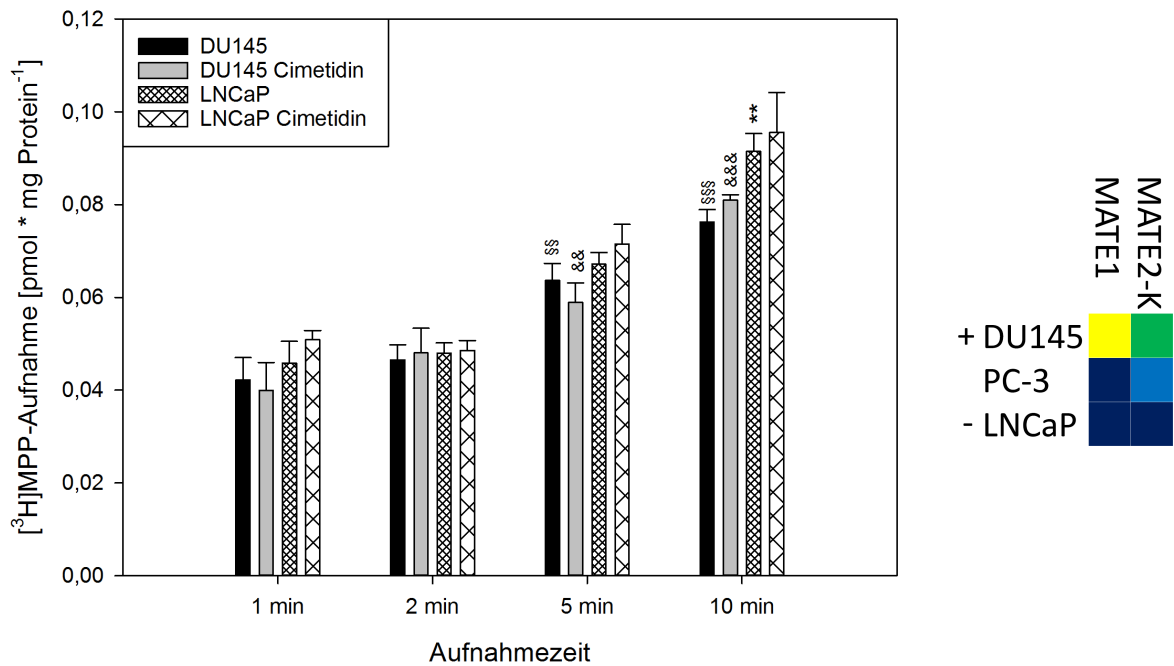


Abb. 31: Aufnahme von 10 nM $[^3\text{H}]\text{MPP}^+$ in MATE-exprimierenden (DU145) und nicht-exprimierenden (LNCaP) Prostatakarzinom-Zelllinien, mit und ohne Zugabe von 100 μM Cimetidin, über einen Transportzeitraum von 1 bis 10 min, bei pH 7,4 und 37°C, nach 30 min Vorinkubation mit 30 mM NH_4Cl . Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte \pm Standardfehler von drei Experimenten durchgeführt in Triplikaten an unterschiedlichen Zellkulturpassagen. Signifikanzniveau der positiven Zelllinie ohne Inhibitoren gegenüber der Aufnahme nach 1 min §§ $p < 0,01$, §§§§ $p < 0,001$; Signifikanzniveau der inhibierten Aufnahme der positiven Zelllinie gegenüber der nicht-inhibierten Aufnahme zum jeweiligen Messzeitpunkt && $p < 0,01$, &&& $p < 0,001$; Signifikanzniveau der negativen Zelllinie ohne Inhibitoren gegenüber der Aufnahme nach 1 min ** $p < 0,01$

Rechts: Ausschnitt aus Abb. 28, Expression von MATE1/2-K in Prostatakarzinom-Zelllinien auf mRNA-Ebene. Die für das Experiment verwendete positive Zelllinie wurde mit +, die negative Zelllinie durch - gekennzeichnet.

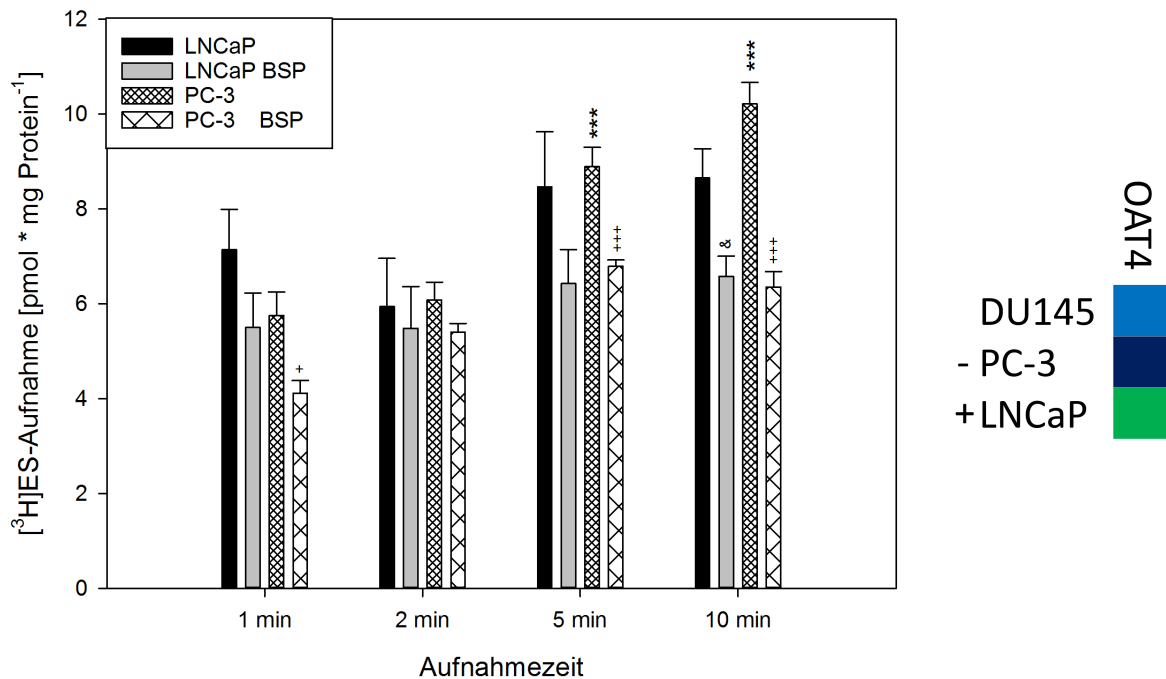


Abb. 32: Aufnahme von 20 nM $[^3\text{H}]\text{ES}$ in OAT4-exprimierenden (LNCaP) und nicht-exprimierenden (PC-3) Prostatakarzinom-Zelllinien, mit und ohne Zugabe von 100 μM BSP, über einen Transportzeitraum von 1 bis 10 min, bei pH 7,4 und 37°C. Die Gesamtkonzentration von ES lag bei 1,0 μM . Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte \pm Standardfehler von drei Experimenten durchgeführt in Triplikaten an unterschiedlichen Zellkulturpassagen. Signifikanzniveau der inhibierten Aufnahme der positiven Zelllinie gegenüber der nicht-inhibierten Aufnahme zum jeweiligen Messzeitpunkt & $p < 0,05$; Signifikanzniveau der negativen Zelllinie ohne Inhibitoren gegenüber der Aufnahme nach 1 min *** $p < 0,001$; Signifikanzniveau der inhibierten Aufnahme der negativen Zelllinie gegenüber der nicht-inhibierten Aufnahme zum jeweiligen Messzeitpunkt + $p < 0,05$; +++ $p < 0,001$

Rechts: Ausschnitt aus Abb. 28, Expression von OAT4 in Prostatakarzinom-Zelllinien auf mRNA-Ebene. Die für das Experiment verwendete positive Zelllinie wurde mit +, die negative Zelllinie durch - gekennzeichnet.

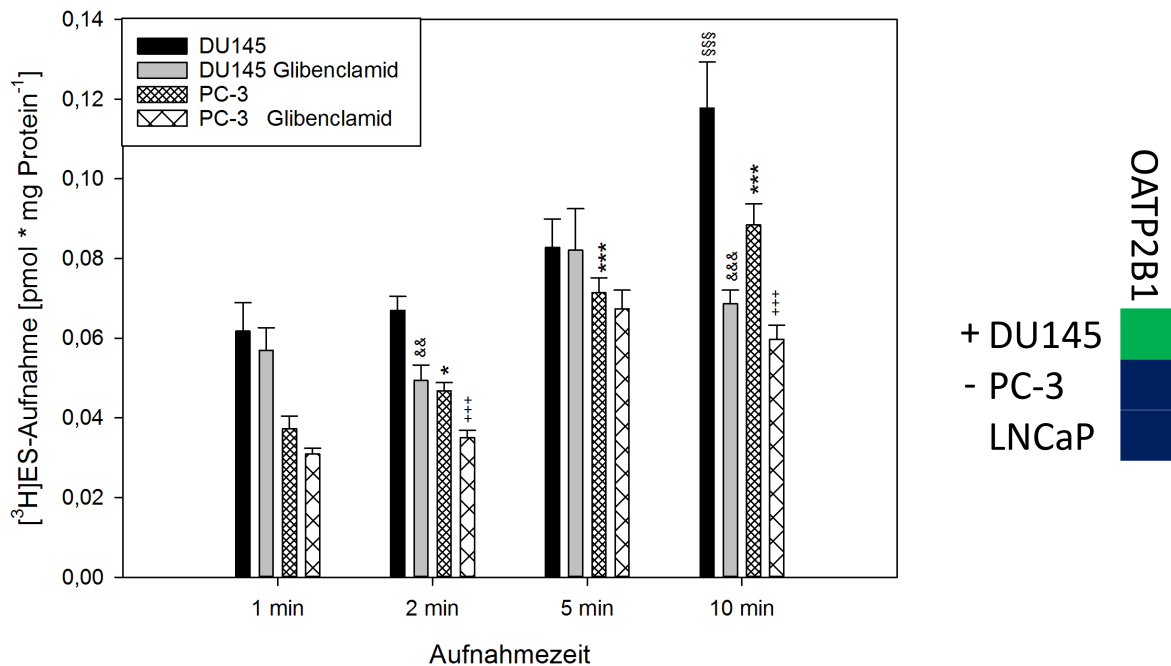


Abb. 33: Aufnahme von 10 nM [³H]ES in OATP2B1-exprimierenden (DU145) und nicht-exprimierenden (PC-3) Prostatakarzinom-Zelllinien, mit und ohne Zugabe von 100 μM Glibenclamid, über einen Transportzeitraum von 1 bis 10 min, bei pH 7,4 und 37°C. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte ± Standardfehler von drei Experimenten durchgeführt in Triplikaten an unterschiedlichen Zellkulturpassagen. Signifikanzniveau der positiven Zelllinie ohne Inhibitoren gegenüber gegenüber der Aufnahme nach 1 min §§§ p < 0,001; Signifikanzniveau der inhibierten Aufnahme der positiven Zelllinie gegenüber der nicht-inhibierten Aufnahme zum jeweiligen Messzeitpunkt && p < 0,01, &&& p < 0,001; Signifikanzniveau der negativen Zelllinie ohne Inhibitoren gegenüber der Aufnahme nach 1 min * p < 0,05; *** p < 0,001; Signifikanzniveau der inhibierten Aufnahme der negativen Zelllinie gegenüber der nicht-inhibierten Aufnahme zum jeweiligen Messzeitpunkt +++ p < 0,001

Rechts: Ausschnitt aus Abb. 28, Expression von OATP2B1 in Prostatakarzinom-Zelllinien auf mRNA-Ebene. Die für das Experiment verwendete positive Zelllinie wurde mit +, die negative Zelllinie durch - gekennzeichnet.

Akkumulation unter BSP-Zugabe feststellen.

Für die funktionelle Expressionsanalyse des SLC-Transporters OATP2B1 wurde als positive Zelllinie DU145 und als Negativzelllinie PC-3 verwendet. Die Aufnahme des Modellsubstrates [³H]ES war zu jedem Messzeitpunkt in DU145-Zellen höher als in PC-3-Zellen (Abb. 33). Die Substrataufnahme in DU145 stieg dabei mit zunehmender Transportdauer an. Zwar nahm auch die Aufnahme in Anwesenheit von Glibenclamid über die Zeit zu, jedoch stieg diese mit zunehmender Inkubation weniger stark an als unter Glibenclamid-freien Bedingungen. Lediglich beim Messzeitpunkt von 5 min zeigte sich kein Unterschied zwischen dem Transport in Anwesenheit von Glibenclamid und der Aufnahme von [³H]ES allein. Das Aufnahmemuster der PC-3-Zellen war vergleichbar, allerdings konnte zu jedem Zeitpunkt eine geringere Akkumulation des

Tabelle 12: Transportbedingungen der getesteten SLC-Transporter in Mammakarzinom-Zelllinien

Transporter	Substrat	Substrat gesamt	Inhibitor	Zelll. +	Zelll. -	pH- Wert
OCT2	[³ H]MPP ⁺ 10 nM	10 nM	Decynium 50 μ	T47-D	MCF-7	7,4
OATP1B3	[³ H]CCK-8 5,0 nM	1,0 μ M	Rifampicin 5,0 μ M	MDA-MB	MCF-7	7,4
NaCT	[¹⁴ C]Citrat 2,0 μ M	10 μ M	Na ⁺ -frei	BT549	MDA-MB	7,4
PEPT1	[³ H]Gly-Sar 0,25 μ M	0,25 μ M	Losartan 600 μ M	SK-BR-3	T47-D	6,0
MATE1	[³ H]MPP ⁺ 10 nM	10 nM	Cimetidin 100 μ M	MDA-MB	SK-BR-3	7,4

markierten Substrates als in LNCaP-Zellen festgestellt werden. Auch hier zeigte sich eine steigende Modells substrat-Aufnahme mit längerer Inkubationszeit und auch hier war die [³H]ES-Aufnahme in Anwesenheit von Glibenclamid zu jedem Messzeitpunkt geringer. Lediglich beim Messzeitpunkt von 5 min konnte eine nahezu identische Aufnahme festgestellt werden.

3.3.4 Mammakarzinom-Zelllinien

Wie auch bei der Analyse der Prostatakarzinom-Zelllinien wurden für die Untersuchung auf funktionelle Expression der Mammakarzinom-Zelllinien nur diejenigen SLC-Transporter ausgewählt, die eine differentielle Expression auf mRNA-Ebene aufwiesen. So wurden die fünf in Tabelle 12 aufgeführten SLC-Transporter mit den entsprechenden Modells substraten und spezifischen Inhibitorsubstanzen ausgewählt. Für die Analyse von MATE1 wurde dem Transportpuffer für jede Bedingung zusätzlich 50 μ M Decynium zugesetzt, um die Aufnahme über den ebenfalls exprimierten SLC-Transporter OCT2 zu unterbinden.

Für die funktionelle Expressionsanalyse des SLC-Transporters OATP1B3 wurde als positive Zelllinie MDA-MB und als Negativzelllinie MCF-7 verwendet (Abb. 34). Die Aufnahme von [³H]CCK-8 in MDA-MB-Zellen zeigte über die gesamte Inkubationszeit nur geringe Änderungen. Auch die Zugabe von Rifampicin zum Transportpuffer bewirkte keine Beeinträchtigung der Modells substrat-Aufnahme. Außer zum Messzeitpunkt nach 10 min, bei dem eine leicht erhöhte Aufnahme von [³H]CCK-8 in Anwesenheit von Rifampicin gemessen wurde, konnten keine Unterschiede in der Modells substrat-Aufnahme zwischen den beiden Testbedingungen festgestellt werden.

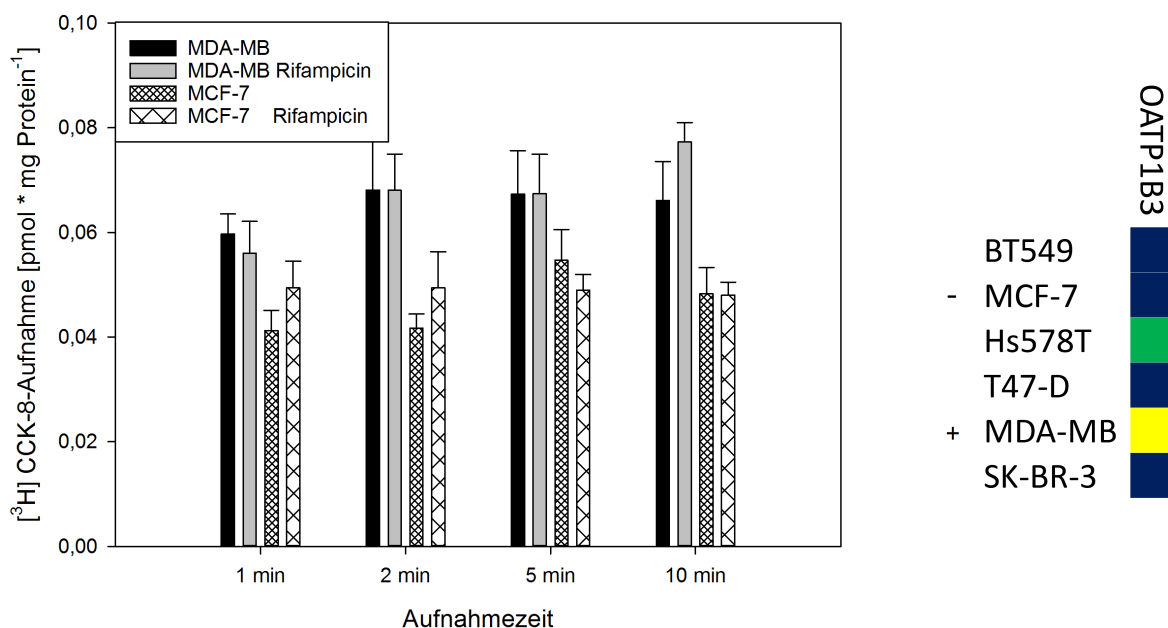


Abb. 34: Aufnahme von 5,0 nM [³H]CCK-8 in OATP1B3-exprimierenden (MDA-MB) und nicht-exprimierenden (MCF-7) Mammakarzinom-Zelllinien, mit und ohne Zugabe von 5,0 μ M Rifampicin, über einen Transportzeitraum von 1 bis 10 min, bei pH 7,4 und 37°C. Die Gesamtkonzentration von CCK-8 lag bei 1,0 μ M. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte \pm Standardfehler von drei Experimenten durchgeführt in Triplikaten an unterschiedlichen Zellkulturpassagen.

Rechts: Ausschnitt aus Abb. 28, Expression von OATP1B3 in Mammakarzinom-Zelllinien auf mRNA-Ebene. Die für das Experiment verwendete positive Zelllinie wurde mit +, die negative Zelllinie durch - gekennzeichnet.

Die [³H]CCK-8-Aufnahme in MCF-7-Zellen war zu jedem Messzeitpunkt geringer als in MDA-MB-Zellen und schwankte nur gering. Dabei war die Aufnahme in Anwesenheit von Rifampicin nach 1 min und nach 5 min zunächst leicht erhöht gegenüber dem Ansatz ohne Zusätze. Dies kehrte sich nach 5 min jedoch um. Nach 10 min konnte dann unter beiden Bedingungen die gleiche Akkumulation in MCF-7-Zellen gemessen werden.

Für die funktionelle Expressionsanalyse des SLC-Transporters NaCT wurde als positive Zelllinie BT549 und als Negativzelllinie MDA-MB verwendet (Abb. 35). Die Aufnahme von [¹⁴C]Citrat in BT549-Zellen stieg vom Messzeitpunkt 1 min bis 5 min an und fiel dann nach 10 min wieder etwas ab. Außer nach einer Inkubation von 5 min konnte dabei unter Na⁺-freien Bedingungen für jeden Messzeitpunkt eine höhere Akkumulation des Modellsubstrates als in Na⁺-haltigem Puffer festgestellt werden. Für die Aufnahme von [¹⁴C]Citrat in MDA-MB-Zellen zeigte sich das gleiche Muster, wobei die Akkumulation bei jedem Messzeitpunkt größer war als in BT549-Zellen.

Für die funktionelle Expressionsanalyse des SLC-Transporters MATE1 wurde als positive Zelllinie MDA-MB und als Negativzelllinie SK-BR-3 verwendet (Abb. 36). Für

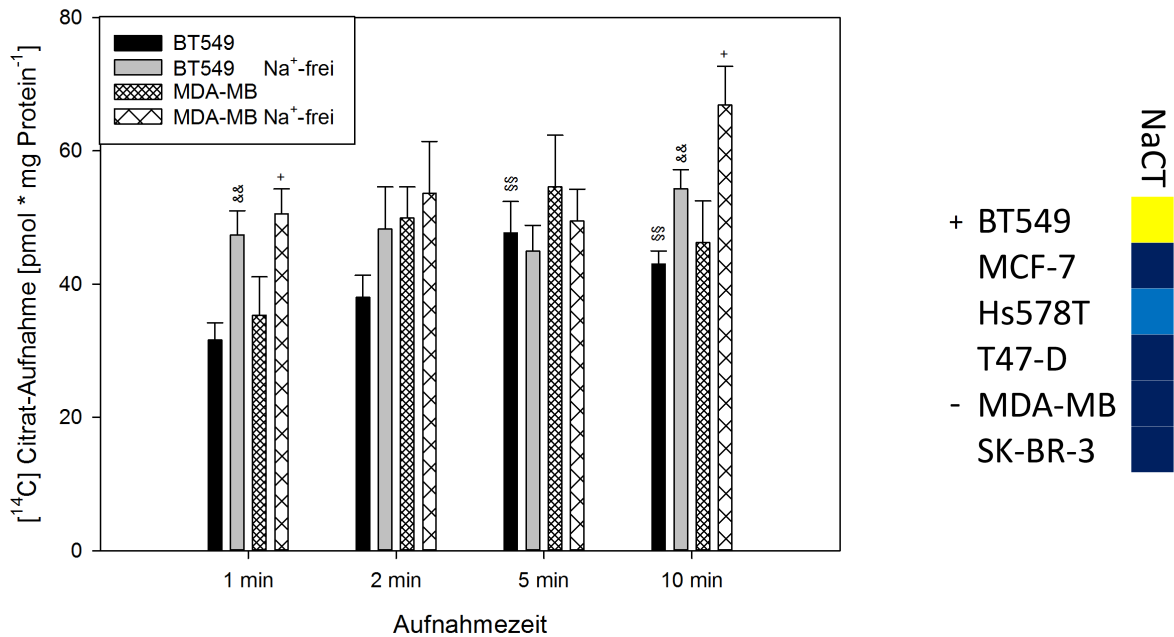


Abb. 35: Aufnahme von $2,0 \mu\text{M}$ $[^{14}\text{C}]$ Citrat in NaCT-exprimierenden (BT549) und nicht-exprimierenden (MDA-MB) Mammakarzinom-Zelllinien, in An- und Abwesenheit von Na^+ -Ionen, über einen Transportzeitraum von 1 bis 10 min, bei pH 7,4 und 37°C . Die Gesamtkonzentration von Citrat lag bei $10 \mu\text{M}$. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte \pm Standardfehler von drei Experimenten durchgeführt in Triplikaten an unterschiedlichen Zellkulturpassagen. Signifikanzniveau der positiven Zelllinie ohne Inhibitoren gegenüber der Aufnahme nach 1 min §§ $p < 0,01$; Signifikanzniveau der inhibierten Aufnahme der positiven Zelllinie gegenüber der nicht-inhibierten Aufnahme zum jeweiligen Messzeitpunkt && $p < 0,01$; Signifikanzniveau der inhibierten Aufnahme der negativen Zelllinie gegenüber der nicht-inhibierten Aufnahme zum jeweiligen Messzeitpunkt + $p < 0,05$

Rechts: Ausschnitt aus Abb. 28, Expression von NaCT in Mammakarzinom-Zelllinien auf mRNA-Ebene. Die für das Experiment verwendete positive Zelllinie wurde mit +, die negative Zelllinie durch - gekennzeichnet.

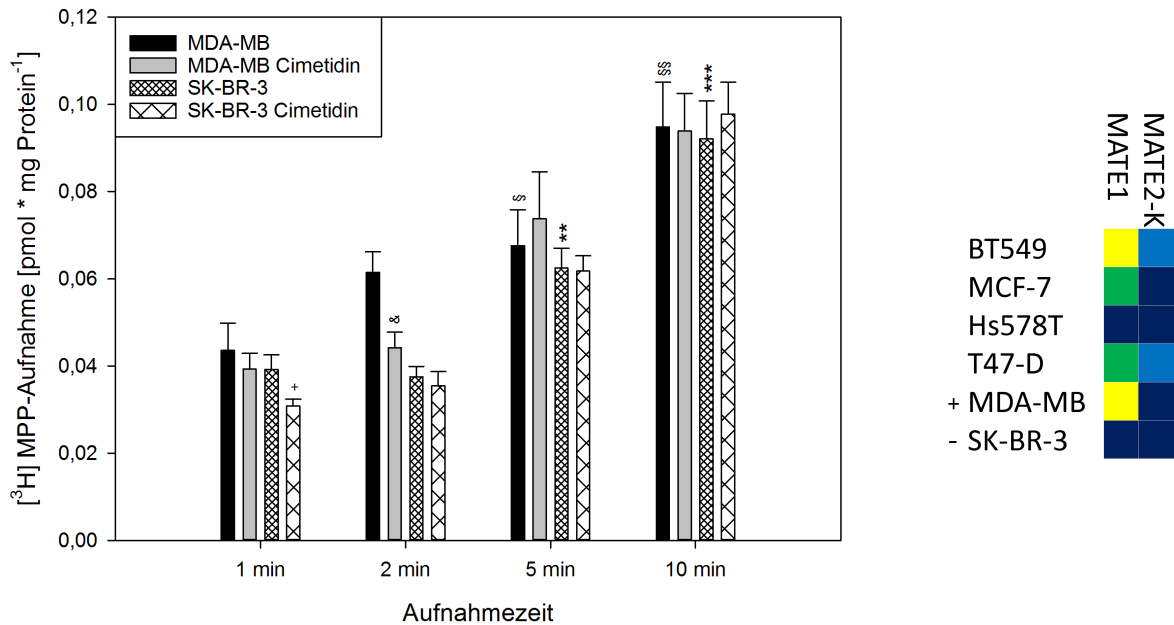


Abb. 36: Aufnahme von 10 nM $[^3\text{H}]\text{MPP}^+$ in MATE-exprimierenden (MDA-MB) und nicht-exprimierenden (SK-BR-3) Mammakarzinom-Zelllinien, mit und ohne Zugabe von 100 μM Cimeticidin, über einen Transportzeitraum von 1 bis 10 min, bei pH 7,4 und 37°C, nach 30 min Vorinkubation mit 30 mM NH_4Cl . Der Transportpuffer enthielt in allen Bedingungen 50 μM Decynium. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte \pm Standardfehler von drei Experimenten durchgeführt in Triplikaten an unterschiedlichen Zellkulturpassagen. Signifikanzniveau der positiven Zelllinie ohne Inhibitoren gegenüber der Aufnahme nach 1 min § $p < 0,05$; §§ $p < 0,01$; Signifikanzniveau der inhibierten Aufnahme der positiven Zelllinie gegenüber der nicht-inhibierten Aufnahme zum jeweiligen Messzeitpunkt & $p < 0,05$; Signifikanzniveau der negativen Zelllinie ohne Inhibitoren gegenüber der Aufnahme nach 1 min ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; Signifikanzniveau der inhibierten Aufnahme der negativen Zelllinie gegenüber der nicht-inhibierten Aufnahme zum jeweiligen Messzeitpunkt + $p < 0,05$

Rechts: Ausschnitt aus Abb. 28, Expression von MATE in Mammakarzinom-Zelllinien auf mRNA-Ebene. Die für das Experiment verwendete positive Zelllinie wurde mit +, die negative Zelllinie durch - gekennzeichnet.

beide getesteten Zelllinien konnte mit zunehmender Inkubationszeit eine zunehmende Akkumulation von [^3H]MPP $^+$ festgestellt werden. Diese war in MDA-MB-Zellen nach 1 min leicht, nach 2 min deutlich erhöht gegenüber der Akkumulation in SK-BR-3-Zellen. Dabei war die Aufnahme von Modells substrat in MDA-MB-Zellen unter Zugabe von Cimetidin zunächst verringert. Dieser Effekt konnte nach 5 min und nach 10 min jedoch nicht mehr festgestellt werden. Nach 5 min Inkubation war die [^3H]MPP $^+$ -Aufnahme in MDA-MB-Zellen unter Cimetidin-Zugabe zunächst leicht erhöht und zeigte nach 10 min schließlich keinen Unterschied mehr zur Aufnahme ohne Cimetidin. Nachdem die Akkumulation von Modells substrat in SK-BR-3-Zellen nach 1 min und nach 2 min zunächst geringer war als in MDA-MB-Zellen, glich sich diese nach längerer Inkubation immer mehr den Aufnahmen in MDA-MB-Zellen an, sodass nach 10 min schließlich kein Unterschied mehr zwischen den beiden Zelllinien unabhängig der Transportbedingungen festgestellt werden konnte. Lediglich nach 1 min konnte eine leicht verringerte [^3H]MPP $^+$ -Aufnahme in SK-BR-3-Zellen in Anwesenheit von Cimetidin gemessen werden. Für die übrigen Messungen ergab sich kein derartiger Unterschied zwischen den beiden Bedingungen.

Für die funktionelle Expressionsanalyse des SLC-Transporters OCT2 wurde als positive Zelllinie T47-D und als Negativzelllinie MCF-7 verwendet (Abb. 37). Die Aufnahme von [^3H]MPP $^+$ stieg in T47-D-Zellen mit steigender Inkubationsdauer an. Dieser Effekt war auch in Anwesenheit von Decynium festzustellen, jedoch war die Zunahme hier deutlich geringer, sodass die Akkumulation ohne Zusatz von Decynium über die Inkubationszeit deutlich stärker anstieg als unter Zugabe der Substanz. Dieses Aufnahmemuster ließ sich auch für MCF-7-Zellen beobachten, jedoch in deutlich geringerem Ausmaß. So war die Akkumulation sowohl mit als auch ohne Decynium-Zugabe nach 1 min vergleichbar und zeigte im Verlauf der Inkubation eine deutlicher werdende Verringerung der Akkumulation unter Zugabe des Inhibitors gegenüber dem Transport in HBSS allein. Dabei war die Aufnahme in Anwesenheit von Decynium in beiden Zelllinien zu jedem Messzeitpunkt auf vergleichbarem Niveau.

Für die funktionelle Expressionsanalyse des SLC-Transporters PEPT1 wurde als positive Zelllinie SK-BR-3 und als Negativzelllinie T47-D verwendet (Abb. 38). In dieser Analyse zeigte sich eine deutlich steigende Akkumulation von Modells substrat mit steigender Inkubationsdauer für die Zelllinie SK-BR-3. Die Aufnahme von [^3H]Gly-Sar zeigte in Anwesenheit von Losartan über den Messzeitraum kaum Veränderungen. Die Zelllinie T47-D erreichte mit und ohne Zugabe von Losartan eine vergleichbare Akkumulation von Modells substrat, die der Aufnahme in SK-BR-3-Zellen unter Losartan-Zugabe entsprach. Insgesamt zeigten sich nur für die Zelllinie SK-BR-3 ohne Zusatz von Losartan eine Änderung der [^3H]Gly-Sar-Aufnahme über die Inkubationszeit.

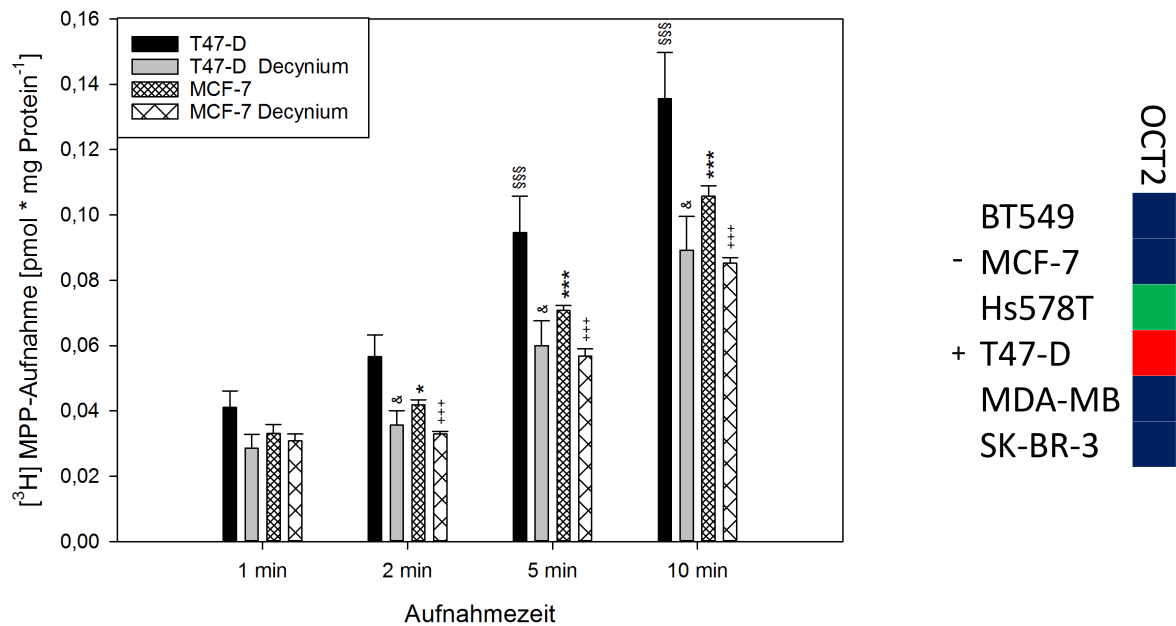


Abb. 37: Aufnahme von 10 nM $[^3\text{H}]\text{MPP}^+$ in OCT2-exprimierenden (T47-D) und nicht-exprimierenden (MCF-7) Mammakarzinom-Zelllinien, mit und ohne Zugabe von $50 \mu\text{M}$ Decynium, über einen Transportzeitraum von 1 bis 10 min, bei pH 7,4 und 37°C . Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte \pm Standardfehler von drei Experimenten durchgeführt in Triplikaten an unterschiedlichen Zellkulturpassagen. Signifikanzniveau der positiven Zelllinie ohne Inhibitoren gegenüber der Aufnahme nach 1 min §§§ $p < 0,001$; Signifikanzniveau der inhibierten Aufnahme der positiven Zelllinie gegenüber der nicht-inhibierten Aufnahme zum jeweiligen Messzeitpunkt & $p < 0,05$; Signifikanzniveau der negativen Zelllinie ohne Inhibitoren gegenüber der Aufnahme nach 1 min * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; Signifikanzniveau der inhibierten Aufnahme der negativen Zelllinie gegenüber der nicht-inhibierten Aufnahme zum jeweiligen Messzeitpunkt +++ $p < 0,001$

Rechts: Ausschnitt aus Abb. 28, Expression von OCT2 in Mammakarzinom-Zelllinien auf mRNA-Ebene. Die für das Experiment verwendete positive Zelllinie wurde mit +, die negative Zelllinie durch - gekennzeichnet.

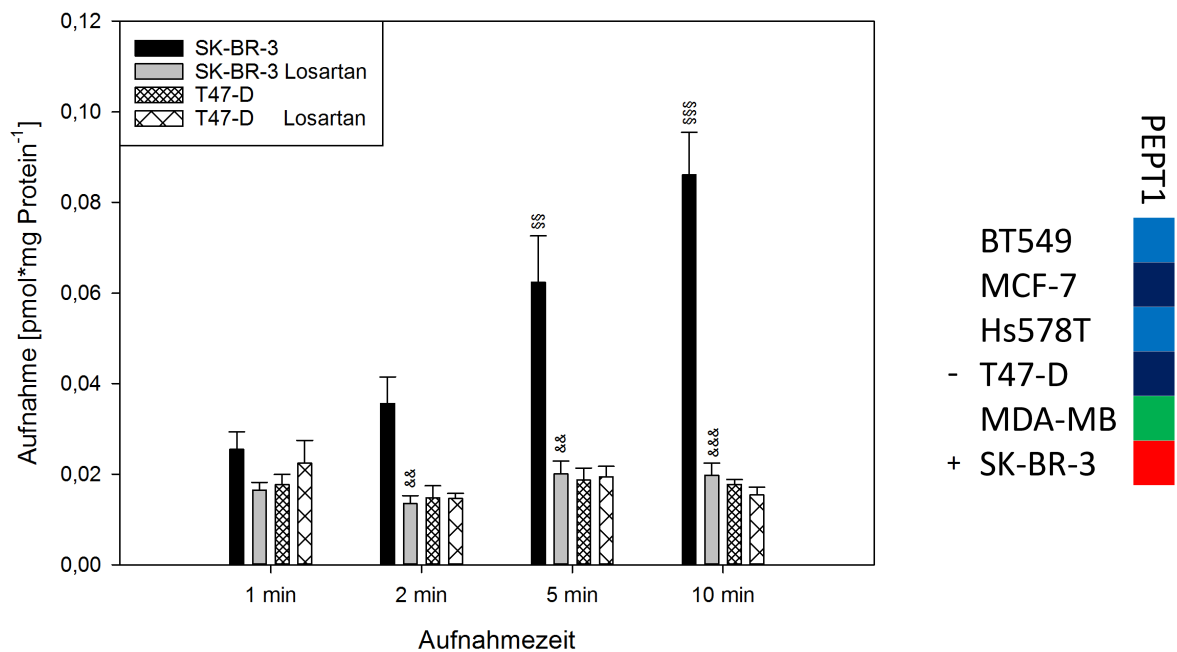


Abb. 38: Aufnahme von $0,25 \mu\text{M}$ $[^3\text{H}]\text{Gly-Sar}$ in PEPT-1-exprimierenden (SK-BR-3) und nicht-exprimierenden (T47-D) Mammakarzinom-Zelllinien, mit und ohne Zugabe von $600 \mu\text{M}$ Losartan, über einen Transportzeitraum von 1 bis 10 min, bei pH 6 und 37°C . Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte \pm Standardfehler von drei Experimenten durchgeführt in Triplikaten an unterschiedlichen Zellkulturpassagen. Signifikanzniveau der positiven Zelllinie ohne Inhibitoren gegenüber der Aufnahme nach 1 min §§ $p < 0,01$; §§§ $p < 0,001$; Signifikanzniveau der inhibierten Aufnahme der positiven Zelllinie gegenüber der nicht-inhibierten Aufnahme zum jeweiligen Messzeitpunkt && $p < 0,01$; &&& $p < 0,001$

Rechts: Ausschnitt aus Abb. 28, Expression von PEPT-1 in Mammakarzinom-Zelllinien auf mRNA-Ebene. Die für das Experiment verwendete positive Zelllinie wurde mit +, die negative Zelllinie durch - gekennzeichnet.

4 Diskussion

Genauso wie körpereigene Substanzen müssen auch körperfremde, für pharmakologische Zwecke eingesetzte Moleküle mit Hilfe von Transportproteinen Zellmembranen durchdringen, um ihre jeweilige Zielstruktur zu erreichen. Gelangen Zytostatika nicht in die Zellen von Tumorgewebe, können diese nicht auf die unkontrollierte Zellteilung einwirken und die Therapie bleibt ohne Erfolg. Eine Möglichkeit, die Wahrscheinlichkeit für den Erfolg einer Chemotherapie von Krebserkrankungen zu erhöhen, könnte die Behandlung mit einem Zytostatikum sein, für das ein Transporter im Zielgewebe vorhanden ist, der es aufnehmen kann. Um diesen Ansatz verfolgen zu können, muss zum einen bekannt sein, welche Transportproteine im Tumorgewebe exprimiert sind, und zum anderen, welche Zytostatika diese Transporter als Substrate akzeptieren.

Expressionsanalysen von Transportproteinen in Tumoren können an Biopsien von entartetem Gewebe in Form von Microarrays oder quantitativer PCR durchgeführt werden. Die Untersuchung von Zytostatika auf ihre Eigenschaften als Substrat verschiedener SLC-Transporter muss unter Verwendung von Modellzellen für jede Substanz mit dem jeweiligen Transportprotein einzeln analysiert werden. Dabei steht am Anfang dieser Analyse die Untersuchung der Interaktion von Testsubstanzen mit in Frage kommenden SLC-Transportern. Eine solche Interaktionsanalyse wurde in der vorliegenden Arbeit für vier SLC-Transporter aus drei unterschiedlichen Familien durchgeführt, deren Interaktionsvermögen mit Zytostatika bisher nur in geringem Umfang analysiert wurde. Ausgewählt wurden die Peptidtransporter PEPT1 (SLC15A1) und PEPT2 (SLC15A2), der L-Carnitin-Transporter OCTN2 (SLC22A5) und der nieren-spezifische Protonen/org. Kationen-Austauscher MATE2-K (SLC47A2). Die SLC-Transporter der Familie 15 sind durch ihre Lokalisation im Darm eine optimale Zielstruktur für oral verabreichte Medikamente. Aus diesem Grund wurden bereits von mehreren Arbeitsgruppen Modellstrukturen für PEPT-Substrate entwickelt, wodurch das Design von Medikamenten ermöglicht werden könnte, die gezielt über die SLC15-Transporter aufgenommen werden können [2][22]. Untersuchungen auf Interaktionen von PEPT-Transportern gegenüber Zytostatika wurden bisher nicht publiziert. Der L-Carnitin-Transporter OCTN2 wurde bereits von Tamai et al. als in Tumorgeweben hoch exprimiert beschrieben [101], konnte bisher jedoch nur mit der Aufnahme des Topoisomerase-Inhibitors Etoposid in Verbindung gebracht werden [39]. Da der Transporter durch die hohe Expression in entartetem Gewebe eine geeignete Zielstruktur für die Aufnahme von Pharmaka sein könnte, wurde der SLC22A5 für weiterführende Analysen zum Interaktionsverhalten gegenüber verschiedener Zytostatika ausgewählt. Der SLC-Transporter MATE2-K ist ein effektiver Protonen/org. Kationen-Austauscher, der durch die Abgabe von Xenobiotika in den Primärharn einen Einfluss auf die Wirkspiegel von Medikamenten hat, die als Substrat erkannt werden. Kenntnisse über Interaktio-

nen mit diesem Transportprotein sind jedoch auch bei der Abschätzung einer möglichen Nephrotoxizität von Substanzen wie beispielsweise Cisplatin von Bedeutung [76] und daher wurde hier MATE2-K näher auf seine Interaktion mit Zytostatika untersucht. Als Testsubstanzen wurden 26 therapierelevante Zytostatika und Adjuvantien sechs unterschiedlicher Wirkstoffklassen verwendet: Alkylantien, Antimetabolite, Interkalantien, Mitose-Inhibitoren, Topoisomerase-Inhibitoren und therapiebegleitend eingesetzte Medikamente.

In der Analyse wurde die Aufnahme von [^3H]-markierten Modellsubstraten durch die in HEK293-Zellen stabil exprimierten Transportproteine in An- und Abwesenheit von 100 μM der einzelnen Testsubstanzen untersucht. Zur Kontrolle wurden in allen Analysen Leervector-transfizierte HEK293-Zellen mitgeführt, die den entsprechenden Transporter nicht exprimierten und die generelle Inhibierbarkeit der Modellsubstrat-Aufnahme durch Transporter-spezifische Inhibitoren überprüft. Auf diese Weise sollte untersucht werden, ob durch die Anwesenheit der Testsubstanzen die Aufnahme des spezifischen Modellsubstrats beeinträchtigt wird. Substanzen, die eine starke Beeinträchtigung der [^3H]-Substrat-Aufnahme bewirkten, wurden weiterführend auf ihre Inhibitionskinetik untersucht und die Affinität des jeweiligen Transportproteins gegenüber dieser Substanz bestimmt. Als Auswahlkriterium wurde hierfür eine Inhibition der Modellsubstrat-Aufnahme von 50 % festgelegt. Um auch geringe Effekte der Pharmaka detektieren zu können, wurden die Substanzen in einer Konzentration von 100 μM eingesetzt, was verglichen mit therapeutischen Dosierungen eine sehr hohe Konzentration ist. Tritt hier keine deutliche Beeinträchtigung der Modellsubstrat-Aufnahme ein, kann davon ausgegangen werden, dass keine praxisrelevante Interaktion dieser Substanzen mit dem entsprechenden SLC-Transporter unter therapeutischen Bedingungen stattfindet.

4.1 Die PEPT-Transporter

Die PEPT-Transporter der SLC-Familie 15 sind bekannte Aufnahmesysteme für verschiedene β -Lactam-Antibiotika [9][25] oder Virostatika und deren Pro-Drugs [36]. Von der Aufnahme verschiedener ACE-Inhibitoren wurde ebenfalls berichtet [118], dies ist jedoch umstritten [49]. Der Transport von Pharmaka, die in der Tumorthherapie eingesetzt werden, wie 5-Aminolävulinsäure, wurde ebenfalls gezeigt [21] und über eine Aufnahme von Bestatin (Ubenimex) über PEPT2 aus Ratten und dessen Aufnahme über Peptidtransporter in Vesikeln des Darms von Kaninchen wurde berichtet [18][45][84]. Systematische Untersuchungen zum Interaktionsverhalten gegenüber unterschiedlichen Zytostatika sind jedoch bisher nicht durchgeführt worden.

In der hier durchgeführten Analyse wurde das Modellsubstrat [^3H]Gly-Sar für beide PEPT-Transporter verwendet und als inhibitorische Kontrollsubstanzen Losartan

(PEPT1) und das Dipeptid Tyr-Phe (PEPT2) eingesetzt, um sicherzustellen, dass die Transporter-vermittelte Aufnahme auch durch die stabil exprimierten SLC-Proteine vermittelt wurde und nicht durch andere, endogene Transportsysteme der zur Expression verwendeten HEK293-Zellen. Von den in dieser Arbeit getesteten Zytostatika und Adjuvantien wurde die [³H]Gly-Sar-Aufnahme durch PEPT1 nur durch das Alkylans Chlorambucil, den Mitose-Inhibitor Paclitaxel und das Interkalans Mitoxantron signifikant inhibiert. In Anbetracht der hohen Konzentration der Testsubstanzen in der Analyse sind die inhibitorischen Effekten von $18,3 \pm 3,0 \%$, $12,0 \pm 2,4 \%$ bzw. $17,9 \pm 4,5 \%$ jedoch als gering einzustufen. Es ist unwahrscheinlich, dass diese Substanzen in den niedrigen Dosierungen, in denen sie für die Chemotherapie eingesetzt werden, einen detektierbaren Effekt *in vivo* bewirken können.

Deutlich zahlreicher sind die signifikanten stimulierenden Effekte, die in Anwesenheit von sechs Substanzen detektiert werden konnten. Darunter sind die Antimetabolite Cladribin ($112,3 \pm 2,1 \%$), Fluoroadenin ($110,6 \pm 2,1 \%$), Fludarabin ($107,9 \pm 1,6 \%$) und Gemcitabin ($105,8 \pm 1,5 \%$), sowie die Topoisomerase-Inhibitoren Pednison ($109,2 \pm 2,3 \%$) und Etoposid ($106,4 \pm 1,6 \%$). Die Ursache für diese *cis*-Stimulation ist nicht bekannt. Da für kein Zytostatikum ein inhibitorischer Effekt von mindestens 50 % festgestellt werden konnte, war eine nähere Affinitätsanalyse des Peptidtransporters nicht angezeigt. PEPT2 zeigt hingegen deutlich zahlreichere, wenngleich nur wenige starke, signifikante Interaktionen, welche zur Inhibition der Modellsubstrat-Aufnahme durch den SLC-Transporter führen. Die größten Effekte konnten in Anwesenheit des Mitose-Inhibitors Paclitaxel und des Topoisomerase-Inhibitors Etoposid festgestellt werden, welche die Aufnahme von [³H]Gly-Sar um $63,8 \pm 1,6 \%$ bzw. um $45,0 \pm 3,1 \%$ reduzierten. Auch die Alkylantien Bendamustin und Chlorambucil konnten die Modellsubstrat-Aufnahme signifikant inhibieren, erreichten mit $28,0 \pm 0,9 \%$ bzw. $23,6 \pm 1,8 \%$ jedoch nicht den Grenzwert von 50 % und kamen nicht für weitere Analysen in Frage. Keine der übrigen Testsubstanzen zeigte einen inhibitorischen Effekt von mehr als $16,2 \pm 1,2 \%$.

Zum Interaktionsverhalten von PEPT-Transportern, gibt es mehrere Studien. Demnach sollten Substrate von Peptidtransportern eine freie Aminogruppe in einem Abstand von 500 – 635 nm zu einer Carboxylgruppe enthalten. Idealerweise liegt in diesem Abstand eine Carbonylverbindung und eine Seitenkette mit stark hydrophoben Eigenschaften. Schaut man von der Aminogruppe aus über das Carbonrückgrad des Moleküls, sollte die Carbonylgruppe senkrecht nach unten zeigen und in Relation dazu die Aminogruppe um 60° im Uhrzeigersinn und die Carboxylgruppe 60° gegen den Uhrzeigersinn versetzt sein [2][6].

Betrachtet man die Struktur der Substanzen, die eine Interaktion mit den getesteten Peptidtransportern zeigen (siehe Tabelle 17), so finden sich sowohl in Chlorambucil wie auch in Bendamustin freie Carboxylgruppen an viergliedrigen Kohlenwasserstoff-

ketten, die mit einer Ringstruktur verbunden sind. Freie Aminogruppen mit positiver Ladung oder Peptidbindungen befinden sich jedoch in keinem der beiden Moleküle. Das in der Struktur von Chlorambucil enthaltene Stickstoffatom ist von der Kohlenstoffkette aus, die die Carboxylgruppe trägt, in para-Position am zentralen Benzolring gebunden und trägt zwei Ethylchlorid-Seitenketten. Durch die Ringstruktur ist zwar der Abstand zwischen Stickstoffatom und Carboxylgruppe vergrößert, dieser kann jedoch durch die Beweglichkeit der Kohlenwasserkette überbrückt werden. Dies ändert jedoch nichts daran, dass der Stickstoff innerhalb des Moleküls tertiär gebunden ist und so durch die Substituenten sterisch schwer zugänglich ist. Da Bendamustin als zentrales Element einen Benzimidazolring besitzt, an den die gleiche Butansäure-Seitenkette gebunden ist wie in Chlorambucil, befinden sich hier gleich zwei Stickstoffatome in optimaler Entfernung zur Säurefunktion. Es finden sich jedoch keine weiteren funktionellen Gruppen, die die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke (H-Brücke) ermöglichen würden. Wie auch bei Chlorambucil fehlt in der Struktur von Bendamustin eine hydrophobe Seitenkette, die die Interaktion mit der Substratbindestelle der beiden Peptidtransporter deutlich verbessert. Das symmetrisch aufgebaute Mitoxantron besitzt zwei freie Hydroxygruppen, die über den zentralen Anthracenring in passendem Abstand zu sekundären Stickstoffatomen positioniert sind und durch die Carbonylgruppe am mittleren der drei Ringe eine Möglichkeit zur Ausbildung von H-Brücken besitzen. Das anelierte Ringsystem verhindert jedoch jegliche Rotation, wodurch eine Positionierung der Substituenten nach dem Modell von Bailey et al. unmöglich wird [2]. Betrachtet man das Molekül von den Seitenketten aus, die endständige Hydroxygruppen tragen, so sind auch hier die Stickstoffatome in passendem Abstand, es fehlt jedoch eine Carbonylgruppe und ein beweglicher hydrophober Rest, der eine Positionierung in der Transport-Pore der Peptidtransporter begünstigen würde. Dem Mitose-Inhibitor Paclitaxel fehlt zwar ebenfalls eine freie Aminogruppe es besitzt jedoch eine Peptidbindung in seiner Molekülstruktur und mehrere Hydroxygruppen. Durch eine große Zahl von Carbonyl- und Esterverbindungen im Molekül bieten sich viele Möglichkeiten für die Ausbildung von H-Brücken. All dies scheint eine starke Interaktion mit PEPT2 und eine schwächere Interaktion mit PEPT1 zu begünstigen. Ein Transport ist aufgrund der Gesamtgröße des Moleküls und der komplexen Ringstruktur in dessen Zentrum aus einem Cyclooctanon mit zwei anelierten Sechsringen jedoch eher unwahrscheinlich. Im Falle von Etoposid lassen sich keine eindeutigen Merkmale erkennen, die die Interaktion mit PEPT2 erklären könnten. Es gibt keine Peptidbindung, Stickstoffatome oder andere funktionelle Gruppen mit positiver Ladung. Außerdem ist Etoposid ein sehr großes Molekül mit einem vierzyklischen anelierten Ringsystem im Zentrum, wodurch es relativ starr ist. Für die Zytostatika, die eine Interaktion mit PEPT2 zeigten, wurden in dieser Arbeit keine weiterführenden Analysen durchgeführt. Da jedoch deutliche Interaktionen mit den Substanzen Paclitaxel und Etoposid festgestellt werden konnten,

sollte die weitere Charakterisierung dieser Interaktion mit Hinblick auf eine mögliche Aufnahme der Zytostatika durch PEPT2 weiter untersucht werden.

Durch die Expression der PEPT-Transporter im Tubulussystem der Nieren spielen diese eine wichtige Rolle bei der Rückresorption von Peptiden und Peptidomimetica, die mit dem Primärharn filtriert wurden. Die Aktivität der SLC15-Proteine ist somit verantwortlich für die Peptidhomeostase im Körper und beeinflusst folglich auch die Wirkspiegel von Pharmaka, die als Substrat dieser Transporter erkannt werden. So konnte eine stark erhöhte Ausscheidung von Cefadroxil im Urin von PEPT-2 knockout Mäusen gezeigt werden [92]. Derartige Verluste von Wirkstoffen über den Urin verringern die Halbwertszeit von Medikamenten im Organismus und führen so deutlich schneller zum Abfall der Wirkspiegel im Plasma. Aufgrund ihrer Expression im Verdauungstrakt sind PEPT-Transporter auch Zielproteine für die Aufnahme von Substanzen, die oral zugeführt werden [19]. Die Verabreichung in Form von Tabletten oder Kapseln haben den Vorteil, dass Patienten diese selbstständig, ohne die Notwendigkeit eines Krankenhausaufenthalts, einnehmen können, was eine Therapie vereinfacht. Bei der Resorption über den Darm ist jedoch der First-pass-Effekt zu beachten, da der Weg der aufgenommenen Substanzen zunächst über die Pfortader zur Leber führt. Die Modifikation von Pharmaka zu Pro-Drugs könnte hier, neben der Bewältigung des Leberstoffwechsels, auch eine Möglichkeit zur Verbesserung der Interaktionsfähigkeit der Substanzen mit SLC-Transportern der Familie 15 eröffnen, wie am Beispiel von Valganciclovir deutlich wird [99].

4.2 Der L-Carnitin-Transporter OCTN2

Das Transportprotein OCTN2 (SLC22A5) ist ein bekanntes Aufnahmesystem für L-Carnitin und spielt somit eine wichtige Rolle im Energiestoffwechsel [101]. Neben endogenen Substanzen ist auch die Aufnahme verschiedener Pharmaka durch dieses Transportprotein bekannt. Darunter fallen neben Verapamil, Spironolacton, und Meldonium auch einige β -Lactam-Antibiotika [26]. Dabei scheint es jedoch keine Überschneidungen mit den von PEPT-Transportern als Substrat akzeptierten β -Lactam-Antibiotika zu geben. So interagieren diejenigen Substanzen dieser Wirkstoffklasse mit OCTN2, deren Molekülstruktur keine freie Aminogruppe besitzen [101]. Im Gegensatz zu den Transportern der SLC15-Familie oder der SLC47-Familie, sind für OCTN2 keine vergleichbaren Strukturanalysen von Transporter-spezifischen Substraten durchgeführt worden, weshalb für den SLC22A5 bisher kein Modell eines Pharmakophors existiert.

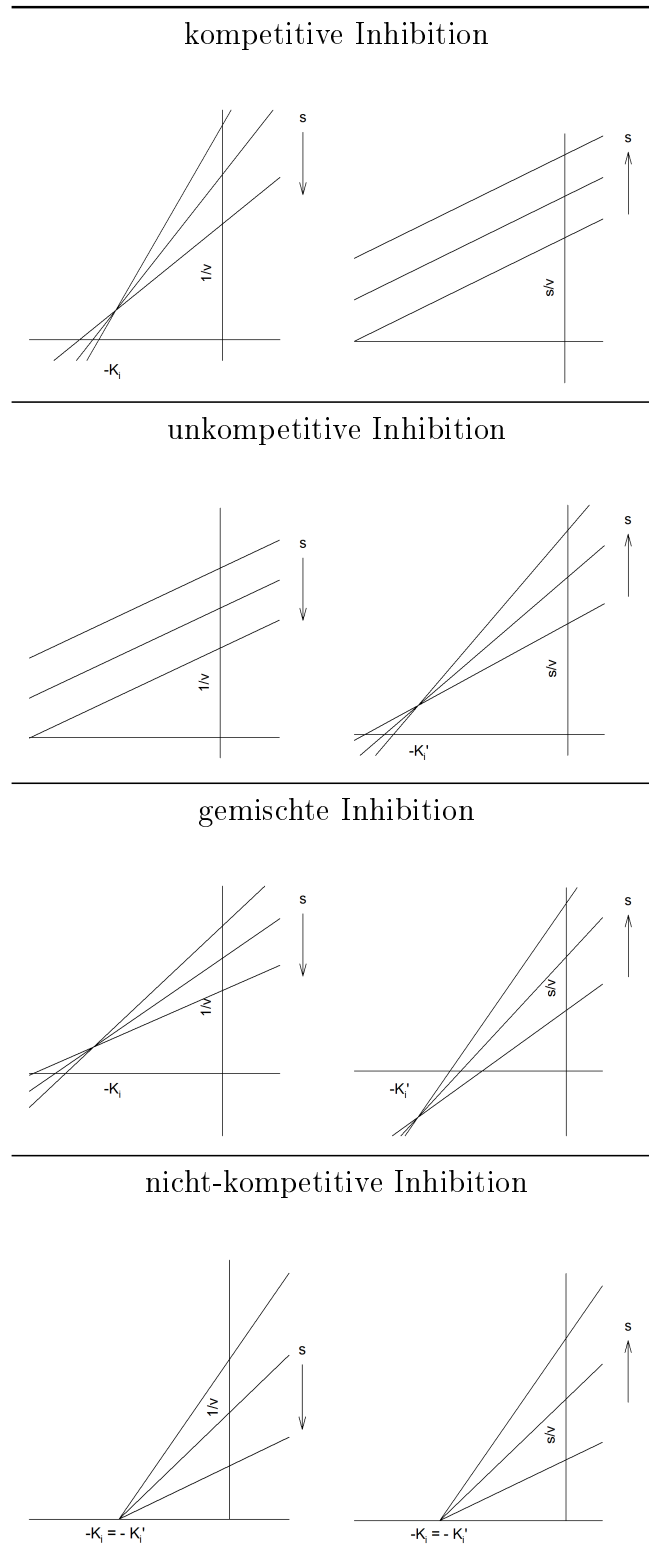
Bezüglich antineoplastischer Agentien aus dem Bereich der Tumorthherapie ist neben Interaktionen mit Vinblastin, Vincristin und Paclitaxel auch der Transport von Etoposid gezeigt worden [43]. In der Arbeit von Hu et al. wurden 27 Pharmaka auf ihr Interaktionsverhalten mit OCTN2 untersucht, von denen zehn Substanzen auch in der

vorliegenden Arbeit verwendet wurden. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Hu et al. wurden auch in dieser Arbeit die deutlichsten Inhibitionen der [^3H]Carnitin-Aufnahme von OCTN2 in Anwesenheit von je 100 μM Paclitaxel, Etoposid, Vincristin und Vinblastin beobachtet. Hierbei war die Aufnahme des markierten Modellsubstrates um $67,4 \pm 0,5 \%$, $61,9 \pm 0,7 \%$, $53,7 \pm 0,3 \%$ bzw. $48,0 \pm 2,1 \%$ verringert. Die restlichen übereinstimmend getesteten Pharmaka erreichten vergleichbare Inhibitionswerte, wie sie von Hu et al. veröffentlicht wurden. Die bisher noch nicht auf ihr Interaktionsverhalten mit OCTN2 untersuchten Substanzen Trofosfamid ($36,1 \pm 0,9 \%$), Bendamustin ($29,8 \pm 1,2 \%$), Melphalan ($22,8 \pm 1,1 \%$), Methotrexat ($21,2 \pm 2,2 \%$), Fluoroadenin ($31,2 \pm 3,8 \%$) und Irinotekan ($31,1 \pm 1,2 \%$) zeigten in der vorliegenden Arbeit eine signifikante Inhibition von über 20 %.

Für die Zytostatika Paclitaxel, Vinblastin, Vincristin und Etoposid wurde zur Untersuchung der Affinität des Transporters zur jeweiligen Substanz der K_i -Wert mit Hilfe des Dixon-Plots bestimmt. Hierbei wird die Aufnahme einer festen Konzentration von markiertem Referenzsubstrat unter steigenden Inhibitorkonzentrationen in Anwesenheit zweier verschiedener Gesamtkonzentrationen nicht-markierten Modellsubstrates gemessen. Die Werte werden in einem Diagramm dargestellt, in dem die reziproke Aufnahmegeschwindigkeit ($\frac{1}{v}$) gegen die Inhibitorkonzentration (i) aufgetragen wird. Der erhaltene Wert gibt diejenige Konzentration des Inhibitors an, bei der die maximale Transportgeschwindigkeit des Modellsubstrats durch den Transporter auf 50 % reduziert ist. Der Inhibitions-Typ kann durch den Dixon-Plot allein jedoch nicht eindeutig bestimmt werden. Wie in der Tabelle 13 dargestellt liegt der Schnittpunkt der in den negativen Bereich extrapolierten Geraden im Dixon-Plot sowohl im Falle einer kompetitiven als auch bei einer gemischten Inhibition oberhalb der X-Achse. Um dennoch zwischen diesen beiden Hemmformen unterscheiden zu können, wurde zusätzlich der Cornish-Bowden-Plot für die näher untersuchten Substanzen angefertigt, wobei hierfür ebenfalls die Daten verwendet wurden, die auch zur Erstellung des Dixon-Plots herangezogen wurden. In diesem Graphen wird der Quotient aus Substratkonzentration und Aufnahmegeschwindigkeit des Modellsubstrats ($\frac{s}{v}$) gegen die Inhibitorkonzentration (i) aufgetragen. So entsteht im Falle einer gemischten Inhibition ein Schnittpunkt unterhalb der X-Achse, während eine kompetitive Hemmung in parallelen Geraden resultiert.

So ergaben sich für beide getesteten Vincaalkaloide Vinblastin und Vincristin beinahe identische K_i -Werte von $52,3 \pm 5,2 \mu\text{M}$ bzw. $52,5 \pm 5,9 \mu\text{M}$ in Kombination mit einem Schnittpunkt im Dixon-Plot der oberhalb der X-Achse lag und parallelen Geraden im Cornish-Bowden-Plot (Abb. 20 und 21). Diese Ergebnisse deuten auf eine kompetitive Inhibition hin, bei der das Modellsubstrat mit den Testsubstanzen um die gleiche Bindestelle am Transportprotein konkurriert. Diese Inhibition scheint jedoch zumindest im Falle von Vinblastin nicht aus der Eigenschaft als konkurrierendem

Tabelle 13: Vergleich zwischen Dixon-Plot (links) und Cornish-Bowden-Plot (rechts) bei unterschiedlichen Inhibitionstypen [15]



Substrat zu resultieren, da Hu et al. keine Aufnahme von [^3H]Vinblastin durch den in HEK293-Zellen exprimierten OCTN2 feststellen konnten. Für Paclitaxel konnte eine hohe Affinität von OCTN2 mit einem K_i -Wert von $4,6 \pm 0,3 \mu\text{M}$ mit einem unbekanntem Hemmtyp ermittelt werden. Hier lag der Schnittpunkt der Geraden im Dixon-Plot unterhalb und der Schnittpunkt im Cornish-Bowden-Plot oberhalb der X-Achse (Abb. 18). Auch diese Substanz ist laut Hu et al. kein Substrat von OCTN2 [43].

Die Arbeitsgruppe postulierte allerdings eine kompetitive Inhibition durch Etoposid und zeigte dessen Aufnahme in Zellen, die das Transportprotein OCTN2 stabil exprimierten. Der Topoisomerase-Inhibitor führte in der vorliegenden Arbeit ebenfalls zu einer starken Inhibition mit einem K_i -Wert von $51,0 \pm 5,3 \mu\text{M}$ und auch der berechnete IC_{50} -Wert wich mit $57,3 \pm 1,1 \mu\text{M}$ nur geringfügig von dem von Hu et al. berechneten Wert von $55,0 \mu\text{M}$ ab. Ein eindeutiger Hemmtyp konnte jedoch nicht bestimmt werden, da wie bei Paclitaxel der Schnittpunkt im Dixon-Plot unterhalb und im Cornish-Bowden-Plot oberhalb der X-Achse lag (Abb. 19). Betrachtet man jedoch die Graphen der K_i -Wert-Bestimmung in Abb. 19 näher fällt auf, dass die Messpunkte in Anwesenheit der drei niedrigsten Etoposid-Konzentrationen allein eine deutlich stärkere Steigung ergeben als die Gerade der linearen Regression über die Gesamtwerte. Sowohl für die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen als auch in der Publikation von Hu et al. wurde Etoposid als Injektionslösung für die Untersuchung eingesetzt. Es kann somit nicht ausgeschlossen werden, dass auch andere Komponenten in der Lösung mit dem untersuchten Transporter interagieren und so die Analyse beeinflussen, wodurch kein klarer Hemmtyp bestimmt werden kann. Es könnte jedoch noch andere Ursachen für das nicht eindeutige Ergebnis aus Dixon- und Cornish-Bowden-Plot geben. Berechnungsmodelle der Bindung von L-Carnitin und Etoposid an OCTN2 zeigen einen sehr kleinen Überlappungsbereich der Bindungsstellen, was konform mit der vorhergesagten kompetitiven Inhibition durch Hu et al. ist [43]. L-Carnitin ist jedoch verglichen mit Etoposid ein deutlich kleineres Molekül. Eine mögliche Ursache dafür, dass in dieser Arbeit kein eindeutiger Inhibitionstyp festgestellt werden konnte, könnte sein, dass trotz der Anlagerung von L-Carnitin an der entsprechenden Bindungsstelle noch ausreichend Interaktionsfläche für die Bindung von Etoposid in der Pore des Transportproteins zugänglich bleibt, wodurch eine Bindung beider Substanzen möglich wäre, der Translokationsvorgang jedoch verhindert würde. So gäbe es sowohl eine kompetitive Komponente, wenn Etoposid als erste Substanz an das Transportprotein bindet, als auch eine Art unkompetitive Inhibition, wenn Etoposid an den L-Carnitin-OCTN2-Komplex bindet.

Die behördliche Lebensmittelüberwachungs- und Arzneimittelzulassungsbehörde der Vereinigten Staaten (Food and Drug Administration = FDA) hat einen Leitfaden zur Entwicklung von Medikamenten veröffentlicht, in dem ein Entscheidungsbaum zur Durchführung weiterführender Interaktionsstudien für SLC-Transporter erarbeitet

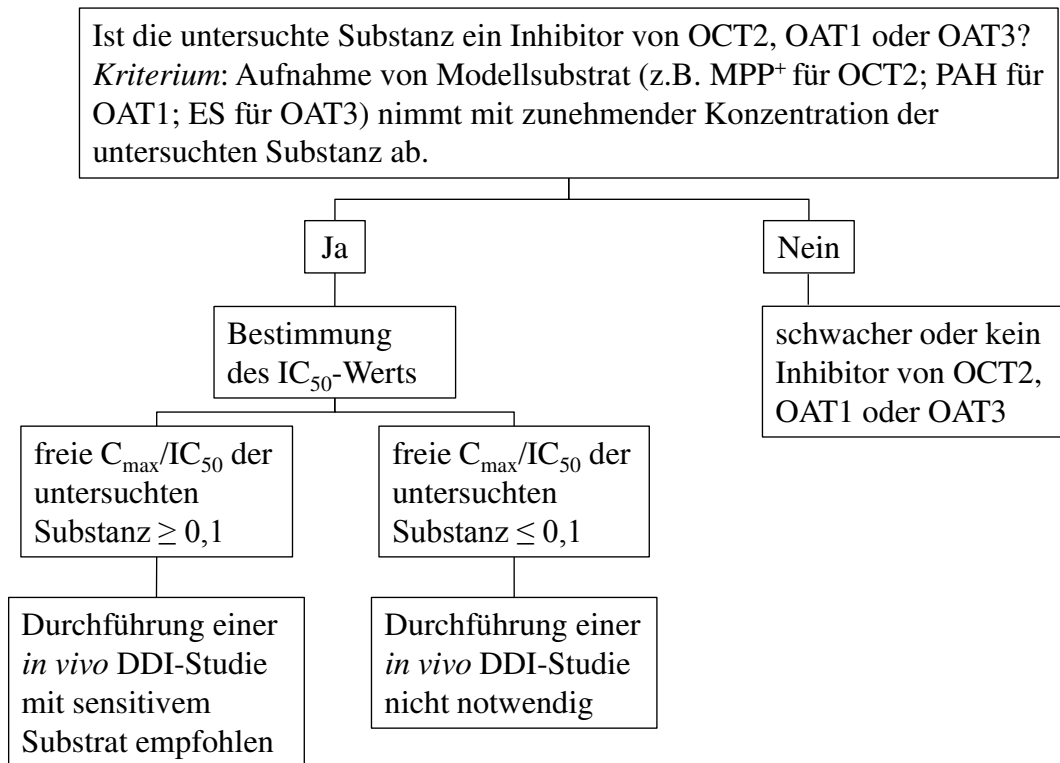


Abb. 39: Entscheidungsbaum zur Durchführung von *in vivo* Studien zum Auftreten von DDI [27]

wurde, die an der renalen Eliminierung pharmakologischer Substanzen beteiligt sind (Abb. 39). In diesem wird empfohlen, eine *in vivo* Studie auf mögliche Drug-Drug-Interaktionen (DDI) durchzuführen, wenn der Quotient aus der maximalen ungebundenen Konzentration des Medikaments im Patientenplasma und des IC_{50} -Wertes größer oder gleich 0,1 ist ($\frac{C_{max,unbound}}{IC_{50}} \geq 0,1$). Diese Empfehlung wurde bisher zwar nur für die Transportproteine OCT2, OAT1 und OAT3 gegeben, es wird jedoch diskutiert, diese Empfehlung auch auf die MATE-Transporter der Familie 47 auszuweiten [27]. Nimmt man diese Berechnung als Orientierungswert für den OCTN2, so ist eine Beeinträchtigung von Substanzen, die Substrate von OCTN2 sind, bei gleichzeitiger Verabreichung von Etoposid möglich (Tab.14). Im Fall des L-Carnitin-Transporters würde eine Inhibition bedeuten, dass die Aufnahme von L-Carnitin bei Verabreichung hoher Dosen von inhibitorischen Substanzen durch die Konkurrenzsituation am Transportprotein vermindert würde, was den Energiestoffwechsel der betroffenen Zellen negativ beeinflussen würde. Die verringerte Aufnahme in die Zellen führt zu einem kurzzeitigen Anstieg des L-Carnitin-Spiegels im Plasma und bewirkt eine verstärkte Filtration der Substanz in den Nieren. Wird die inhibitorische Substanz ebenfalls in den Primärharn filtriert, so wird auch im Tubulussystem am OCTN2 eine verminderte Rückresorption von L-Carnitin verursacht, wodurch im Therapieverlauf die Konzentration der Substanz im Patientenplasma weiter absinken würde. Dies wird durch die Beobachtung bestätigt,

Tabelle 14: Zusammenfassung der für OCTN2 bestimmten IC_{50} -Werte und der pharmakologischen Daten ausgewählter inhibitorischer Substanzen. Pharmakologische Daten entnommen aus Goodman & Gillman's [10]

Zytostatikum	IC_{50} -Wert [μ M]	Anteil freier Substanz	max. Plas- makon- zentration [μ M]	$\frac{C_{max,unbound}}{IC_{50}}$	Möglichkeit einer DDI
Paclitaxel	$3,9 \pm 0,3$	0,12	0,85	0,03	nein
Vinblastin	$50,5 \pm 4,5$	0,14	5,75	0,02	nein
Etoposid	$57,3 \pm 1,1$	0,12	45,8	0,1	ja
Vincristin	$68,3 \pm 4,4$	0,40	0,56	0,003	nein

dass Patienten unter Therapie mit Etoposid eine erhöhte Ausscheidung von L-Carnitin mit dem Urin aufweisen [43]. Eine auf diese Weise entstehende, sekundäre Carnitindefizienz bei längerer medikamentöser Therapie konnte bereits bei der Verabreichung anderer Pharmaka beobachtet werden, die eine Interaktion mit OCTN2 zeigten, wie z.B. bei der Behandlung von Epilepsie mit Valproinsäure [104].

4.3 Der nierenspezifische Transporter MATE2-K

Das Transportprotein MATE2-K der SLC-Familie 47 ist im Gegensatz zu den anderen in dieser Arbeit untersuchten Membrantransporter nur sehr selektiv im Körper exprimiert. Der H^+ /Kationen-Austauscher kommt ausschließlich in der apikalen Zellmembran des proximalen Tubulus der Nieren vor. Dennoch ist dieses Transportprotein von großer Bedeutung für die Pharmakologie, da es, seinem Namen entsprechend, für die Abgabe von Toxinen und somit auch von Pharmaka über die Nieren verantwortlich ist. Im Zusammenspiel mit basal exprimierten SLC-Transportern realisiert MATE2-K den vektorialen Transport von Substanzen die über OCT2 oder OCT3 in Tubuluszellen aufgenommen und gegen Protonen aus dem Primärharn ausgetauscht werden [76]. Pharmaka, die über diesen Weg ausgeschieden werden, sind bspw. Cimetidin oder Metformin [63]. Bezüglich antineoplastischer Agentien wurde eine Interaktion von MATE2-K mit Mitoxantron und Irinotekan gezeigt, wobei die Eigenschaft als transloziertes Substrat bisher nicht geklärt sind [109]. Bei der Interaktionsanalyse von MATE2-K traten in dieser Arbeit deutlich häufiger starke Interaktionseffekte mit Substanzen des Test-Sets auf als bei den übrigen getesteten SLC-Transportern. So zeigten sechs Zytostatika einen inhibitorischen Effekt von mindestens 50 % gegenüber der nicht-inhibierten [3H]MPP $^+$ -Aufnahme. Diese waren Mitoxantron, Irinotekan, Vinblastin, Doxorubicin, Paclitaxel und Etoposid mit einer Reduktion der Modellsubstrat-Aufnahme um $87,5 \pm 1,2$ %,

85,6 ± 0,7 %, 58,5 ± 4,2 %, 55,1 ± 3,8 %, 51,9 ± 1,9 % bzw. 46,5 ± 2,3 %. Etoposid erreicht zwar keine Inhibition von 50 %, die therapeutische Dosierung, in der diese Substanz eingesetzt wird, ist jedoch verglichen mit den übrigen Zytostatika relativ hoch, weshalb für den Topoisomerase-Inhibitor gemeinsam mit den anderen fünf Substanzen eine Affinitätsanalyse durchgeführt wurde. Dabei zeigte MATE2-K die stärkste Affinität zum Mitose-Inhibitor Mitoxantron, welche in einem K_i -Wert von $1,3 \pm 0,4 \mu\text{M}$ resultierte (Abb. 22). Da der Schnittpunkt der Geraden im Dixon-Plot jedoch oberhalb und im Cornish-Bowden-Plot unterhalb der X-Achse auftrat, ist es wahrscheinlich, dass diese Affinität nicht aus einer kompetitiven, sondern aus einer gemischten Inhibition des Transportproteins resultiert. Der aus den gleichen Werten berechnete IC_{50} -Wert von $1,7 \pm 0,2 \mu\text{M}$ liegt in etwa bei der doppelten Konzentration des Wertes von $0,83 \mu\text{M}$, der durch Wittwer et al. ermittelt wurde [109].

Abweichungen ließen sich auch gegenüber der Analyse für den Topoisomerase-Inhibitor Irinotekan der gleichen Arbeitsgruppe feststellen. Dieser zeigte in den hier durchgeführten Analysen mit einem K_i -Wert von $7,4 \pm 1,3 \mu\text{M}$ eine hohe Affinität von MATE2-K gegenüber diesem Zytostatikum, jedoch geht diese ausgehend von den graphischen Darstellungen auf eine gemischte Inhibition zurück (Abb. 23). Der ermittelte IC_{50} -Wert weicht hier mit $7,2 \pm 0,3 \mu\text{M}$ um mehr als das 10-fache von dem durch Wittwer et al. berechneten Wert von $78,6 \mu\text{M}$ ab. Dieser Unterschied resultiert wahrscheinlich aus der Verwendung von unterschiedlichen Modells substraten. Während in dieser Arbeit das tritiierte Kation MPP^+ verwendet wurde, nutzten Wittwer et al. den Fluoreszenzfarbstoff ASP^+ . Die Werte des Mitose-Inhibitors Paclitaxel führen zu einem Schnittpunkt im Dixon-Plot oberhalb der X-Achse und zu zwei parallelen Geraden in der Auftragung nach Cornish-Bowden (Abb. 24). Es ist somit davon auszugehen, dass die Affinität von MATE2-K gegenüber der Substanz mit einem K_i -Wert von $28,6 \pm 5,3 \mu\text{M}$ auf eine kompetitive Inhibition am Membrantransportprotein zurückgeht.

Dieses Muster einer kompetitiven Inhibition findet sich auch in den graphischen Auftragungen der Affinitätsanalyse von Doxorubicin (Abb. 25). Für diese Substanz wurde ein K_i -Wert von $52,3 \pm 5,1 \mu\text{M}$ berechnet. Die geringste Affinität von MATE2-K fand sich mit K_i -Werten von $91,0 \pm 8,1 \mu\text{M}$ bzw. $107,1 \pm 4,4 \mu\text{M}$ gegenüber den Substanzen Vinblastin und Etoposid. Während Vinblastin in der graphischen Auswertung der Affinitätsmessung jedoch Charakteristiken einer gemischten Inhibition ausweist (Abb. 26), zeigt sich Etoposid als kompetitiver Inhibitor, bei dem sich in der Auftragung der Werte nach Cornish-Bowden parallele Geraden ergeben (Abb. 27). Berechnet man für die hier näher untersuchten sechs Substanzen den Wert für den Quotienten $\frac{C_{max,unbound}}{IC_{50}}$, so zeigen sich nur für die Substanzen Mitoxantron und Irinotekan Werte, die auf eine mögliche DDI der Pharmaka mit Substraten des SLC47A2 hindeuten (Tab. 15).

Tabelle 15: Zusammenfassung der für MATE2-K bestimmten IC_{50} -Werte und der pharmakologischen Daten ausgewählter inhibitorischer Substanzen. Pharmakologische Daten entnommen aus Goodman & Gillman's [10]

Zytostatikum	IC_{50} -Wert [μ M]	Anteil freier Substanz	max. Plas- makon- zentration [μ M]	$\frac{C_{max,unbound}}{IC_{50}}$	Möglichkeit einer DDI
Mitoxantron	$1,7 \pm 0,2$	0,24	15,56	2,2	ja
Irinotekan	$7,2 \pm 0,3$	0,51	2,89	0,2	ja
Paclitaxel	$29,7 \pm 10,2$	0,12	0,85	0,003	nein
Doxorubicin	$61,6 \pm 6,8$	0,24	1,75	0,007	nein
Vinblastin	$104,6 \pm 1,7$	0,14	5,75	0,008	nein
Etoposid	$131,7 \pm 21,7$	0,12	45,8	0,04	nein

Das Bild vom MATE2-K als Exkretionsprotein, welches den Organismus durch die Abgabe von unterschiedlichsten Substanzen vor deren potentieller toxischer Wirkung schützt, zeichnet sich auch für die in dieser Arbeit durchgeführte Interaktionsanalyse ab. Verschiedene Studien zur Interaktionen von zumeist MATE1 zeigen ein breites Spektrum von interagierenden Substanzen mit den Proteinen der SCL47-Familie [1][103][109]. Deutlich wurde dabei in allen Untersuchungen, dass es keinen isolierten Parameter gibt, von dem allein auf das Interaktionsverhalten von MATE-Proteinen gegenüber einer Testsubstanz geschlossen werden kann. Die Affinität wird vielmehr von einer Kombination verschiedener Attribute der Substanz bestimmt. Dabei zeigte sich, dass die Modellierung eines Pharmakophors anhand eines einzelnen Modellsubstrates für die zu dessen Erstellung herangezogenen Inhibitionsanalysen weniger geeignet ist [1]. Wird statt dessen ein Pharmakophor aus Daten erstellt, welche durch Interaktionsanalysen unter Nutzung unterschiedlicher Modellsubstrate ermittelt wurden, lassen sich zutreffendere Vorhersagen über mit MATE-Proteinen interagierende Substrate machen [62]. Physikochemische Parameter, die das Interaktionsverhalten gegenüber SLC47-Proteinen beeinflussen, sind hydrophobe Bereiche im Molekül, Möglichkeiten zur Ausbildung von H-Brücken und positiv ionisierbare Gruppen. Darüber hinaus wirken sich Stickstoff-haltige Heterozyklen im Molekül positiv auf die Bindungseigenschaften zu MATE1 aus, während Hydroxyl- oder Carboxyl-Gruppen und chlorierte Substituenten eher von Nachteil waren. Betrachtet man die in dieser Arbeit stark interagierenden Substanzen, so besitzt die Molekülstruktur von Mitoxantron, das Zytostatikum, dem gegenüber MATE2-K die höchste Affinität aufweist, zwar positiv ionisierbare Gruppen und Möglichkeiten zur Ausbildung von H-Brücken, es liegen jedoch mehrere Hydroxyl-

Gruppen im Molekül vor, welches in seiner Struktur keinen Heterozyklus besitzt. Diese Parameter ergeben zusammen mit den Ergebnissen der K_i -Wert Bestimmung ein konsistentes Bild, nach dem Mitoxantron zwar einen potenter Inhibitor von MATE2-K darstellt, dessen Wirkung jedoch scheinbar nicht aus einer kompetitiven, sondern aus einer gemischten Inhibition resultiert, bei der die Substanzen nicht um die gleiche Bindungsstelle am Transportprotein konkurrieren.

Irinotekan besitzt mehrere Stickstoff-haltige Heterozyklen mit positiv ionisierbaren Gruppen und Möglichkeiten zur Ausbildung von H-Brücken. Hydrophobe Areale sind eher begrenzt vorhanden. Trotzdem zeigt dieses vermeintlich geeignete Molekül keine Charakteristik eines kompetitiven Inhibitors in der hier durchgeführten Analyse. Für Paclitaxel hingegen zeigt sich eine kompetitive Inhibition in der graphischen Darstellung der ermittelten Daten. Das Molekül erscheint jedoch ein eher weniger gut geeigneter Interaktionspartner zu sein, da mehrere Hydroxyl-Gruppen in einem Molekül ohne Heterozyklus und nur einer positiv ionisierbaren Gruppe vorliegt. Allerdings gibt es Möglichkeiten zur H-Brücken-Bildung und es sind durch die drei endständigen Benzolringe zugängliche, hydrophobe Bereiche vorhanden.

Hydrophobe Bereiche sind im Molekül von Doxorubicin kaum vorhanden, dafür gibt es mehrere Hydroxyl-Gruppen. Die Struktur enthält nur einen Heterozyklus, welcher allerdings von einem Oxan-Ring gebildet wird, bietet jedoch Optionen für H-Brücken und enthält eine freie Aminogruppe. Trotz dieser weniger optimalen Eigenschaften stellt sich Doxorubicin in dieser Arbeit als kompetitiver Inhibitor dar. MATE2-K zeigte jedoch keine besonders hohe Affinität zu diesem Interkalans.

Das sehr große Molekül des Vinkaalkaloids Vinblastin enthält mehrere Stickstoff-haltige Heterozyklen, Möglichkeiten zur Ausbildung von H-Brücken und positiv ionisierbare Gruppen, MATE2-K weist jedoch eine vergleichsweise schwache Affinität zu dem Mitose-Inhibitor auf, der sich als Inhibitor mit gemischter Inhibitionskinetik darstellt. Eine kompetitive Inhibition konnte für Etoposid beobachtet werden, obwohl die Molekülstruktur diese Substanz nicht als Interaktionspartner von MATE2-K prädestiniert. Das große Molekül enthält nur Sauerstoff-haltige Heterozyklen, kaum hydrophobe Bereiche und mehrere Hydroxyl-Gruppen. Positiv ionisierbare Gruppen sind nicht in der Struktur vorhanden. Die gemessene Affinität von MATE2-K zu Etoposid war jedoch auch die geringste innerhalb der sechs untersuchten Zytostatika. Wittwer et al. bringen noch weitere physiko-chemischen Parameter an, die ausschlaggebend für die Eigenschaft als Substrat von MATE2-K sind [109]. Hier wurden das Molekulargewicht, positive Ladung und die Lipophilie von Substanzen genannt. Betrachtet man das getestete Spektrum an Pharmaka anhand dieser Gesichtspunkte, sind die interagierenden Zytostatika auch die mit dem größten Molekulargewicht (>400), wobei Methotrexat die einzige Substanz mit einem Molekulargewicht von über 400 ist, welches keinerlei Interaktion zeigt und Vincristin den Grenzwert von 50 % nicht erreicht (Abb. 40).

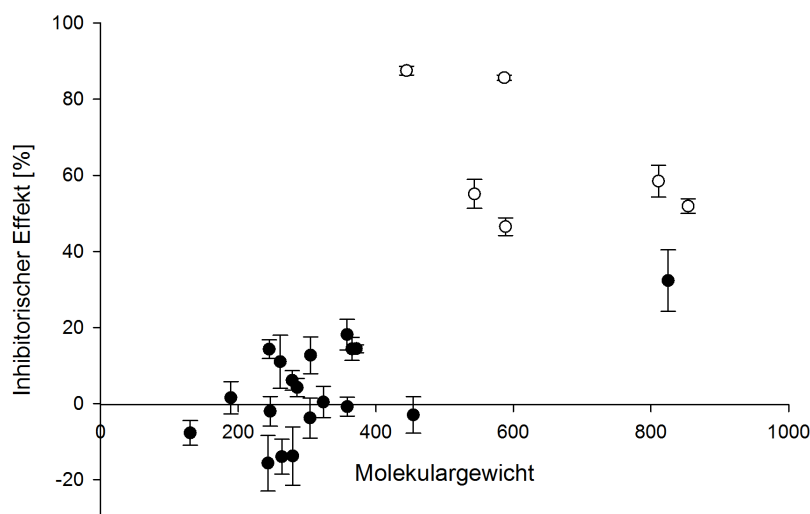


Abb. 40: Auftragung der inhibitorischen Effekte der getesteten Substanzen auf die MATE2-K-vermittelte $[^3\text{H}]\text{MPP}^+$ -Aufnahme gegen ihre Molekularmasse. \circ = interagierende Substanzen, \bullet = nicht-interagierende Substanzen

Bezüglich der Ladung der interagierenden Zytostatika werden, mit Ausnahme von Etoposid, welches bei einem physiologischen pH von 7,4 zweifach negativ geladen ist, und Paclitaxel, welches keine Ladung besitzt, positiv geladene Pharmaka bevorzugt (Abb. 41). Es ist jedoch bekannt, dass auch Anionen wie Estronsulfat oder Acyclovir von MATE2-K als Substrat akzeptiert werden [103]. Die Verteilung der Pharmaka anhand ihres LogP-Wertes, der ein Maß für die Lipophilie von Substanzen darstellt, zeigt kein eindeutiges Bild (Abb. 42). Hier lässt sich keine stärkere Inhibition mit höherem LogP-Wert feststellen. In dem Wertebereich von 0,5 – 4 liegen neben den auf ihr Interaktionsverhalten getesteten Substanzen noch sechs weitere Zytostatika, die keine Interaktion mit MATE2-K zeigen. Dies bestätigt noch einmal die Aussage, dass es keinen einzelnen Parameter gibt, anhand dessen man eine Interaktion von Substanzen mit MATE2-K abschätzen kann.

Inhibitoren von MATE2-K können die Ausscheidung von endogenen Substraten dieses Transportproteins aus dem Körper behindern und so die Eliminierung dieser Substanzen aus dem Blut beeinträchtigen. Werden verschiedene Medikamente verabreicht die Substrate oder interagierende Substanzen dieses Transporters sind, führt die gegenseitige Beeinflussung der Ausscheidung über MATE2-K zu veränderten Wirkspiegeln [52]. Erhöhte Konzentrationen von Metformin können dabei beispielsweise zur Entwicklung einer Lactatazidose führen [98][106]. Die Eigenschaft einer pharmakologischen Substanz als MATE2-K-Substrat ist jedoch nicht nur von Interesse wenn es um die Kontrolle des Wirkspiegels eines Medikaments im Blut geht. So verursacht ein antineoplastisches Agens, welches eben nicht über den MATE2-K in der Niere ausgeschieden werden kann, große Probleme bei der Therapie von Tumorerkrankungen.

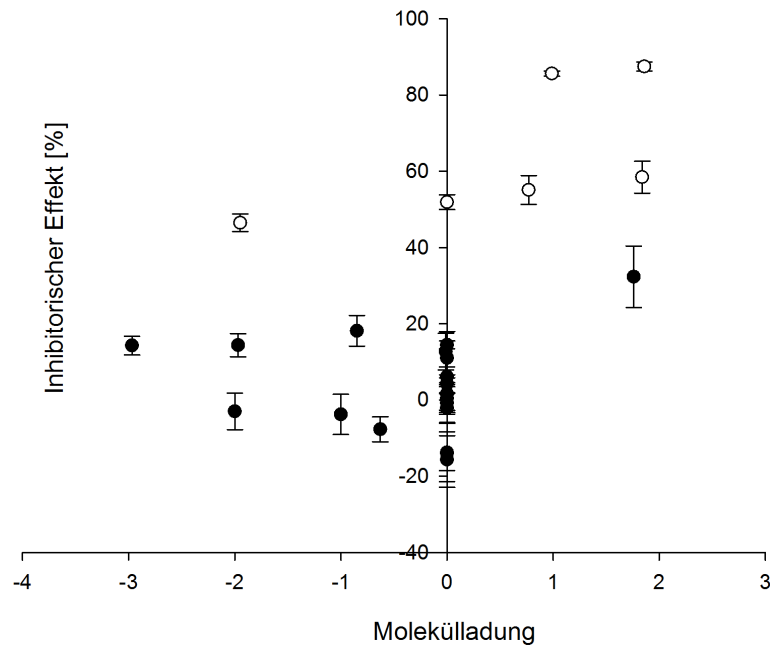


Abb. 41: Auftragung der inhibitorischen Effekte der getesteten Substanzen auf die MATE2-K-vermittelte $[^3\text{H}]\text{MPP}^+$ -Aufnahme gegen ihre Molekülladung bei pH 7,4. \circ = interagierende Substanzen, \bullet = nicht-interagierende Substanzen

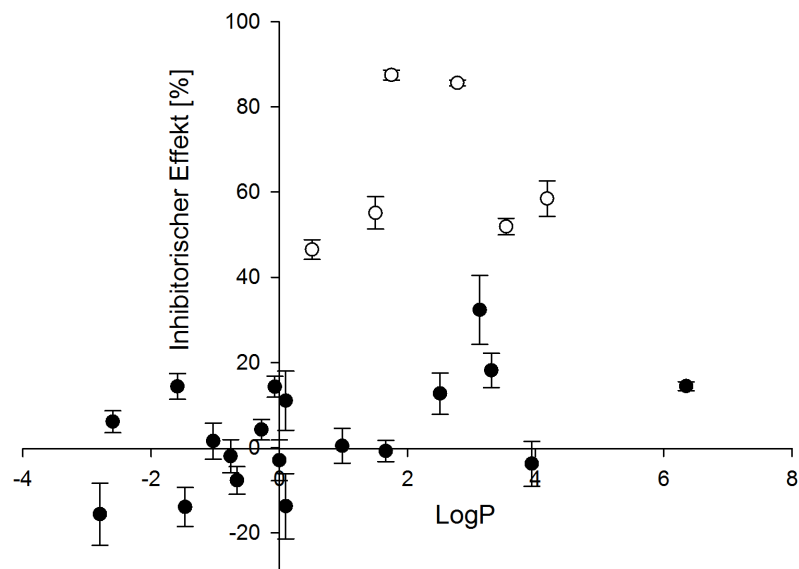


Abb. 42: Auftragung der inhibitorischen Effekte der getesteten Substanzen auf die MATE2-K-vermittelte $[^3\text{H}]\text{MPP}^+$ -Aufnahme gegen ihre LogP-Werte. \circ = interagierende Substanzen, \bullet = nicht-interagierende Substanzen

Cisplatin wird über den basal exprimierten OAT2 in die Tubuluszelle aufgenommen und reichert sich dort an, da es kein Substrat von MATE2-K ist und somit nicht effizient in den Primärharn abgegeben werden kann [115]. Da MATE2-K ein effektiver Protonen/org. Kationen-Austauscher ist, deren Transportrichtung sich mit Änderung des Konzentrationsgradienten für Protonen umkehren kann, stellt sich die Frage, ob dieser SLC-Transporter an der Aufnahme oder der Abgabe von Pharmaka in Tumorgewebe beteiligt sein könnte. Da Tumore, die nur unzureichend mit Sauerstoff versorgt werden können und einen niedrigeren intrazellulären pH-Wert aufweisen, könnte dies eine Aufnahme begünstigen. Existieren jedoch andere SLC-Transporter wie die MCTs, die Lactat und Protonen effizient aus den Tumorzellen entfernen, könnte die Umgebung dieser Zellen ebenfalls reich an Protonen sein, wodurch ein Efflux von MATE2-K-Substraten aus den Tumorzellen begünstigt würde. Studien zur Transportrichtung von MATE2-K in Tumorgewebe sind bisher nicht publiziert worden. Für eine Abschätzung über die Erfolgsaussichten einer medikamentösen Therapie ist es jedoch von großer Bedeutung zu wissen, ob dieser Transporter, wenn er funktionell exprimiert ist, zu einer guten Prognose oder einer Resistenz in der Behandlung mit MATE2-K-Substraten führen kann.

4.4 SLC-Expressionsanalyse von Mamma- und Prostatakarzinom-Zelllinien

Nach der Interaktionsanalyse verschiedener Transportproteine mit therapierelevanten Zytostatika, soll im Folgenden eine Expressionsanalyse auf mRNA-Ebene Aufschluss über in Tumorzellen exprimierte Transportproteine der SLC-Familie geben. Für die quantitative realtime PCR wurden sechs Mammakarzinom-Zelllinien und drei Prostatakarzinom-Zelllinien ausgewählt, die gut charakterisiert sind und häufig Verwendung als Tumorzellmodelle in wissenschaftlichen Studien finden. Die Signale, die in der durchgeführten Analyse nach wenigen Zyklen ein detektierbares Signal zeigten, besaßen eine hohe Ausgangskonzentration der entsprechenden cDNA-Fragmente und weisen auf eine hohe Expression der entsprechenden mRNA in den beprobten Zellen hin. Die mittleren Expressionszyklen \pm Standardfehler der untersuchten SLC-Transporter in den getesteten Karzinom-Zelllinien sind in Tabelle 16 unter Abschnitt 6 aufgeführt. Der HeatMap aus Abb. 28 kann die Expression der einzelnen SLC-Transporter in den beiden Zellarten, sortiert nach absteigender Intensität, und ihre Expression innerhalb der Referenzgewebe aus Nieren, Leber und Colon entnommen werden. Betrachtet man dabei zunächst die Expression einzelner Transporter in den Referenzgeweben, so sind auch nur in den Proben der cDNA des Nierengewebes deutliche Signale der Nierenspezifischen SLC-Transporter OCT2, OAT3, OAT4, URAT1, OAT1 und MATE2-K detektierbar. Für den Leber-spezifischen OATP1B1 ist nur in der cDNA dieser Or-

ganprobe eine starke Expression gemessen worden und die Transporter MATE1 und OAT2, die nur in Nieren und Leber, nicht aber im Darm vorkommen, zeigen Signale in den entsprechenden Referenzproben. Eine Kreuzkontamination der Proben während der Vorbereitung des Chip-Systems kann somit ausgeschlossen werden.

Die durchgeführte Expressionsanalyse von SLC-Transportern in Tumorzelllinien aus Mamma- und Prostatagewebe zeigte übereinstimmend in beiden Zellarten eine besonders starke Expression der Transportproteinen MCT1 und MCT8, THTR1, OCTN2, ENT3 und ORCTL2. In Mammakarzinom-Zellen war zusätzlich der OCTN1 und in Prostatakarzinom-Zellen eine deutliche Expression der Transporter OATP4A1, ENT2 und LAT2 nachweisbar. Dabei zeigten die Prostatakarzinom-Zelllinien insgesamt eine größere Anzahl an stark exprimierten SLC-Transportern, als das in den Zelllinien der Mammakarzinome der Fall war. Insgesamt konnte für beide Zelllinien gezeigt werden, dass nur etwa ein Drittel der getesteten Transportergene deutlich exprimiert sind, wobei die ausgewählten SLC-Transporter selbst nur einen Ausschnitt aus der großen Gruppe der Solute Carrier-Familie darstellen. Im Folgenden soll ein kurzer Überblick über die Rolle der hier stark exprimierten SLC-Transporter in Tumorgeweben gegeben werden.

Die Familie 16, der die MCT-Proteine angehören, transportieren als Symporter neben Ketonkörpern und Pyruvat auch Laktat, gemeinsam mit je einem Proton [34]. Da Tumorzellen durch ihre unkontrollierte Proliferation in der Regel sehr schnell wachsen, eine dem Bedarf entsprechende Vaskularisierung jedoch langsamer abläuft, herrscht in Tumorzellen oft ein anoxisches Milieu. Der hohe Energiebedarf der entarteten Zellen wird vorzugsweise durch Glykolyse gedeckt, welche unter anaeroben Bedingungen in der Produktion von Laktat endet [68]. Um unter diesen Bedingungen den Zellstoffwechsel aufrecht erhalten zu können und einen stabilen pH-Wert zu sichern, müssen anfallendes Laktat und Protonen effizient aus der Zelle geschleust werden [90]. Somit ist die Expression von MCT-Transportern für Tumorzellen von enormer Bedeutung, da sie genau diese Aufgabe effektiv erfüllen. Die Expression von MCT-Transportern hat darüber hinaus auch einen Vorteil für langsamer wachsende Tumore in denen eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff gewährleistet ist. Die Monocarboxylat-Transporter können die Transportrichtung dem Gradienten ihrer Substrate entsprechend ändern. So sind die betreffenden Tumorzellen in der Lage auch Laktat aufzunehmen und als zusätzliche Energiequelle zu nutzen [28]. Diese Funktion der MCT-Transporter haben sie bereits zu Zielstrukturen der Tumorthherapie prädestiniert [90]. Das Ziel von Substanzen wie Lonidamin ist jedoch nicht ihre Aufnahme, sondern die Inhibition der Transporter, um den Stoffwechsel der Tumorzellen zum Erliegen zu bringen, was den Zelltod zur Folge hat [23][66]. In gleicher Weise soll auch die von AstraZeneca entwickelte Substanz AZD3965 wirken, dessen Zieltransporter MCT1 ist [79].

Der ebenfalls zur Familie 16 gehörende und stark exprimierte MCT8 hat eine

andere Funktion. Seine Substrate sind im Gegensatz zu den MCT1-4 die Schilddrüsenhormone T3 und T4. Funktionsausfälle von MCT8 führen zu verzögerter geistiger Entwicklung mit hohen Serum T3-Konzentrationen [61]. Im Bezug auf Tumorerkrankungen wurde eine Korrelation zwischen einer Unterfunktion der Schilddrüse und dem Risiko für die Entstehung von Tumoren in Brust [86] und Lebergewebe [67][38] gezeigt. Darüber hinaus konnte eine verlangsamte Proliferation von Tumorzellen durch die medikamentöse Induktion einer Hypothyreose in unterschiedlichen Tumorgeweben nachgewiesen werden [40][105]. Die Rolle von Schilddrüsenhormon-Transportern ist dabei bisher nicht näher betrachtet worden. Eine detailliertere Untersuchung ihrer Funktion im Bezug auf ihren Einfluss auf die Proliferation von Tumorzellen bietet sich jedoch aufgrund der wachstumsfördernden Eigenschaften seiner Substrate und der hohen Expression stark an.

Thiamin ist ein für den Menschen essentielles, wasserlösliches Vitamin (Vitamin B1), welches über die Nahrung aufgenommen werden muss. Aufgrund seiner Ladung bei physiologischem pH-Wert ist die Notwendigkeit eines Transportproteins gegeben, um eine Verteilung im Körper zu realisieren. Thiamin ist der Co-Faktor des Enzyms Transketolase, welches eine Schlüsselposition im Glukosestoffwechsel einnimmt. Das Enzym ist sowohl essentiell für die Umsetzung von Glukose zu Fruktose-1,6-bisphosphat zum Abbau im Krebs-Zyklus als auch verantwortlich für die Synthese von Ribose aus aufgenommener Glukose, wodurch es ebenso von großer Bedeutung für die RNA-Synthese ist [7]. Da Tumorzellen stark proliferieren, ist eine ausreichende Versorgung dieser Zellen mit Thiamin notwendig, um die massive Produktion von RNA aufrecht zu erhalten. Zwar wurde die Rolle von Thiamin für die Proliferation von Tumorzellen von vielen Arbeitsgruppen untersucht, jedoch sind die Ergebnisse wenig eindeutig. So führte eine Substitution von Vitamin B1 in Versuchen mit Ehrlich's Aszites-Tumor-Zellen zu verstärkter Proliferation der entarteten Zellen, und eine gezielte Inhibition der Transketolase zu reduktiven Effekten auf das Tumorwachstum. Wurde Vitamin B1 jedoch in sehr hohen Dosen verabreicht, konnte ebenfalls eine Reduktion der Tumorgröße festgestellt werden [14]. Dabei scheint die Verabreichung von Thiamin vor der Tumorentstehung einen protektiven Effekt zu haben und eine Mangelversorgung mit Vitamin B1 in vielen Fällen mit einem erhöhten Risiko für Krebserkrankungen im Zusammenhang zu stehen [56]. Liu et al. konnten darüber hinaus zeigen, dass Tumorzellen die mit Thiamin-Transportern transfiziert wurden, eine erhöhte Chemosensitivität gegenüber Doxorubicin und eine erhöhte Apoptoseraten nach Radiotherapie aufwiesen [54]. Thiamin wird durch den THTR1 im Antiport gegen ein Proton in die Zelle aufgenommen, was besonders im Fall von Tumorzellen mit niedrigem intrazellulären pH-Wert von Vorteil ist. Da für THTR1 jedoch bisher kein anderes Substrat außer Thiamin bekannt ist, kommt dieser Transporter derzeit nicht als Aufnahmeprotein für Zytostatika in Frage. Die Arbeitsgruppe um Oyewumi verfolgt jedoch einen Ansatz, der ver-

sucht, das Potential von Thiamin-Transportern in der Aufnahme ihres physiologischen Substrates zu nutzen. Die Gruppe entwickelte Thiamin-beschichtete Nanopartikel, in die Gadolinium eingebracht werden kann und zeigte deren Interaktion mit Zellen, die Thiamin-Transporter exprimierten [77]. Die gezielte Assoziation solcher Nanopartikeln an das Tumorgewebe kann für eine Bor-Neutroneneinfangtherapie genutzt werden, eine Therapie, die sich derzeit noch in der Entwicklung befindet.

Der in den hier durchgeführten Analysen hoch exprimierte L-Carnitin-Transporter OCTN2 wurde bereits von der Arbeitsgruppe um Tamai als in Tumorzellen hoch exprimiert beschrieben [101]. Auch Wang et al. zeigten eine hohe Expression des L-Carnitin-Transporters in Mammakarzinom-Zelllinien, die durch Östrogen maßgeblich reguliert wurde [108]. In weiteren Experimenten stellte die Arbeitsgruppe eine verringerte Proliferation verschiedener Mammakarzinom-Zelllinien nach siRNA-Behandlung gegen OCTN2 fest, was die Bedeutung des Transporters für das Wachstum von Tumorzellen unterstreicht. Der in den hier getesteten Zelllinien ebenfalls hoch exprimierte OCTN1 vermittelt die Aufnahme von Mitoxantron und Doxorubicin, was zu einer Sensitivierung dieser Zellen gegenüber den beiden Substanzen führt [74]. Da OCTN1 jedoch kein so effizienter L-Carnitin-Transporter wie OCTN2 ist, ist seine Bedeutung für die Tumorthherapie vorwiegend in der Aufnahme von Zytostatika zu sehen, wohingegen OCTN2 auch als Target für Inhibitoren genutzt werden könnte. Dabei sollten jedoch die L-Carnitin-Spiegel des Patienten kontrolliert werden, um eine sekundäre Carnitin-Defizienz zu verhindern.

Die Expression des noch wenig untersuchten ORCTL2 (SLC22A18) ist in beiden sowohl in den in dieser Arbeit untersuchten Mamma- als auch in Prostatakarzinom-Zelllinien sehr hoch. Es gibt mehrere Studien, die diesen Transporter als Tumorsuppressor beschreiben und eine schwache Expression dieses SLC-Transporters mit einem erhöhten Malignitätsgrad von Tumoren und einer höheren Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Rezidiven in Verbindung bringen [114][12][13]. Dabei wird die verminderte Expression häufig durch die Methylierung des Promotors von SLC22A18 verursacht. In den in dieser Arbeit untersuchten Karzinom-Zelllinien scheint keine Methylierung vorzuliegen, da in allen Zelllinien eine hohe Expression festgestellt werden konnte. Im Fall der Zelllinie BT549 ist eine Punktmutation im Genabschnitt von SCL22A18 bekannt, die zum Auftreten eines Stop-Codons innerhalb des Leserahmens führt, wodurch kein funktionales Protein synthetisiert werden kann [88]. Um eine Aussage über den Nutzen einer starken Expression von ORCTL2 für die Therapie von Tumorerkrankungen zu machen, bedarf es jedoch noch weiterer Studien zum Substratspektrum und dem Transportmechanismus des Transportproteins.

Die Familie der SLC29 Transporter (ENTs) stellt neben der Familie 28 (CNTs) die Schlüsselstruktur für die Tumorthherapie mit Nucleosidanaloga dar. Die modifizierten DNA-Bausteine werden durch die Transportproteine in die Tumorzellen aufgenommen

und während der Replikation in neu synthetisierte Stränge eingebaut, wodurch die Proliferation der entarteten Zellen effizient beeinträchtigt wird [116]. Eine hohe Expression von ENT1 korreliert mit einer erhöhten Sensitivität gegenüber Nucleosidanaloga [44], und eine geringe Expression steht in Verbindung mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von frühen Rezidiven myeloischer Leukämien [24]. Dabaggh et al. konnten eine erhöhte Expression von ENT1 in Gewebe von Mammakarzinomen zeigen [16], was sich jedoch in den hier durchgeführten Analysen nicht bestätigen lässt. Die Zelllinien T47-D, MDA-MB231 und SK-BR-3 zeigen eine mittlere Expression und die Zelllinien BT549, MCF-7 und Hs578T eine geringe Expression der cDNA von ENT1. Deutlich stärker sind die cDNAs von ENT2 und ENT3 in beiden untersuchten Zellarten detektierbar. ENT2 transportiert ein ähnliches Spektrum an Nucleosidanaloga wie ENT1 [116]. Die Expression von ENT1 wird scheinbar gemeinsam mit dem Zellzyklus reguliert und ist während der G2- und der M-Phase stark erhöht, weshalb dieser Transporter im Vergleich das geeignetere Target für stark proliferierende Tumorzellen darstellt [81]. ENT3 wird hingegen mit dem Auftreten von Resistenzen in Zusammenhang gebracht wird [3].

Neben Energiequellen und Bausteinen für die DNA-Synthese benötigen schnell proliferierende Tumorzellen auch (essentielle) Aminosäuren zum Aufbau neuer Zellstrukturen. Die Transportproteine der SLC7-Familie, LAT1 und LAT2, sind Transporter neutraler Aminosäuren [80], wobei LAT1 eine höhere Affinität und LAT2 eine breitere Substratspezifität besitzt [89]. Beide Transporter bedürfen für ihre optimale Transportfunktion der Co-Expression mit dem Glykoprotein h4F2hc und bilden mit diesem eine Heterodimer-Struktur, was den Transport großer Aminosäuren ermöglicht [48]. Während für LAT1 eine hohe Expression in vielen Tumorzellen gezeigt werden konnte, scheint LAT2 keine derartige Bedeutung für Krebszellen zu besitzen [5]. Dabei steht eine hohe Expression von LAT1 im Zusammenhang mit einer schlechten Prognose für betroffene Patienten. Untersuchungen zeigten ein verringertes Tumorwachstum durch gezielte Inhibition von LAT1-exprimierenden Tumorzellen [72]. Da das Alkylans Melphalan ein Substrat dieses Transportproteins ist, kann ein funktional exprimierter LAT1 sowohl als Aufnahmeweg für Zytostatika als auch als Zielstruktur für selektive Inhibition genutzt werden [107]. Allerdings stimmen die in der Literatur beschriebenen Expressionsmuster für die SLC7-Familie nicht mit den in dieser Arbeit detektierten Signalen überein [94]. So wurde hier im Gegenteil eine stärkere Expression für LAT2 als für LAT1 in MCF-7 und MDA-MB 231 detektiert. Dies könnte zum einen auf abweichende Kulturbedingungen zurückzuführen sein, zum anderen könnte sich die Expression der unterschiedlichen Transporter in den stark proliferierenden Zellen auch mit zunehmender Kulturdauer ändern.

Während der Transporter OATP4A1 in den untersuchten Mammakarzinom-Zelllinien nur eine mittlere bis geringe Expression aufweist, ist er in Prostatakarzinom-

Zelllinien hoch exprimiert. Die Familie der OATP-Transporter wurde bezüglich ihrer Expression in mehreren Tumorgeweben untersucht, wobei eine von gesundem Gewebe abweichende Expression in vielen Fällen festgestellt wurde. Im Bezug auf Prostatakarzinome stand dabei vorwiegend der Transporter OATP1B3 im Fokus von Untersuchungen. Die Arbeitsgruppe um Hamada et al. konnte eine erhöhte Expression des Transporters in Prostatakarzinomen und eine unterschiedliche Aufnahme von Testosteron durch verschiedene Varianten des Transporters darstellen. Hierbei zeigte sich für Patienten mit beeinträchtigtem Testosterontransport eine höhere Überlebensrate über den Zeitraum von zehn Jahren, als für Patienten mit einer stark Testosterontransportierenden OATP1B3-Variante [35]. Es gibt jedoch auch gegenteilige Berichte, nach denen eine hohe Expression des Transporters für eine geringere Malignität und eine bessere langfristige Prognose spricht [55][73]. Auch die Arbeitsgruppe um Muto et al. hat eine gute Prognose für Patientinnen mit Östrogen-positiven Mammakarzinomen, die OATP1B3 exprimieren, gezeigt, wenn diese eine Tamoxifen-Therapie erhielten [70]. Für den OATP4A1 gibt es bisher keinen klaren Zusammenhang zwischen Tumorerkrankungen und einer stark veränderten Expression im Gewebe. Die Expression von OATP4A1 ist zwar im Zusammenhang mit Mammakarzinomen beschrieben worden, der Transporter wird jedoch auch von gesundem Brustgewebe exprimiert [110].

Die Transkription eines Gens der DNA in mRNA ist der erste Schritt auf dem Weg von der Erbinformation zum Protein. Die Synthese der mRNA allein garantiert aber noch kein funktionelles Produkt. Mutationen im Gen oder ein fehlerhafter Einbau von Basen während der Transkription können beispielsweise zu Veränderungen in der Aminosäuresequenz des Proteins führen, wodurch dies unter Umständen seine Funktionalität verliert oder die Synthese nicht beendet wird. Um die Existenz eines Proteins mit spezifischer Funktion zu bestimmen, reicht eine Expressionsanalyse auf mRNA-Ebene nicht aus. Im Fall von Transportproteinen ist der Nachweis des Proteins im Gewebe ebenfalls unzulänglich, da die Funktionalität der Carrier erst durch die korrekte Integration in die Zellmembran der jeweiligen Zielzelle erreicht werden kann. Um die Expression der getesteten SLC-Transporter auf mRNA-Ebene auch auf ihre funktionelle Expression hin zu untersuchen, wurden Aufnahmeversuche mit Transporter-spezifischen, radioaktiv markierten Substraten und den entsprechenden spezifischen Inhibitoren durchgeführt. Hierfür wurde für jedes untersuchte Transportprotein eine exprimierende und eine nicht-exprimierende Tumor-Zelllinie des gleichen Ursprungsgewebes ausgewählt und bezüglich ihres Aufnahmeverhaltens gegenüber des Modellsubstrates verglichen. Nur wenn die erhöhte Expression eines Transportproteins auf mRNA-Ebene gegenüber nicht-exprimierenden Zellen auch in einer deutlich erhöhten Aufnahme des spezifischen, markierten Substrats resultiert, kann auch von einer funktionellen Expression des jeweiligen Transportproteins ausgegangen werden. Um sicherzustellen, dass die Aufnahme des Modellsubstrats durch den getesteten Trans-

porter vermittelt wurde, wurde die Inhibierbarkeit durch eine Transporter-spezifische Inhibitorsubstanz getestet. Da die Untersuchungen vergleichend durchgeführt wurden, konnten nur diejenigen Transportproteine analysiert werden, die eine differentielle Expression innerhalb der jeweiligen Tumor-Zelllinien aufwiesen. Ohne den Vergleich mit einer nicht-exprimierenden Zelllinie kann eine detektierte Referenzsubstrat-Aufnahme nicht zweifelsfrei auf das zu testende Transportprotein zurückgeführt werden.

Die für die funktionelle Analyse ausgewählten Transporter und die verwendeten Zelllinien sind zusammen mit den Referenzsubstraten und den verwendeten Inhibitoren in den Tabellen 11 für Prostata- und in Tabelle 12 für Mammakarzinom-Zelllinien aufgeführt.

Für keine der in Prostatakarzinom-Zelllinien getesteten SLC-Transporter konnte in den durchgeführten Transportexperimenten eine eindeutige funktionelle Expression nachgewiesen werden. Die [³H]Estronsulfat-Aufnahme zur Untersuchung der OATP1B3-Aktivität zeigte keinen Unterschied zwischen der exprimierenden (PC-3) und der nicht-exprimierenden Zelle (siehe Abb. 29). Darüber hinaus konnte statt einer zu erwarteten Hemmung eine Stimulation der Substrataufnahme in Anwesenheit des Inhibitors Rifampicin festgestellt werden. Die mittels Chip-PCR detektierte Expression führte somit nicht zur Expression eines funktionalen Carriers. Ein ähnliches Bild zeigte sich für die Analyse von NaCT (siehe Abb. 30). Hier zeigte die exprimierende Zelllinie (DU145) zwar eine leicht erhöhte Aufnahme von [¹⁴C]Citrat gegenüber der nicht-exprimierenden Zelllinie (PC-3), diese war jedoch unter Na⁺-freien Bedingungen erhöht statt, wie erwartet, erniedrigt. Die Aufnahme des Modellsubstrats kann hier folglich nicht durch den Na⁺-abhängigen NaCT vermittelt worden sein. Die Aufnahme von markiertem MPP⁺ in die untersuchten Zellen DU145 (+) und LNCaP (-) stieg zwar mit zunehmender Inkubationszeit an, diese war jedoch in beiden Zelllinien vergleichbar stark und ließ sich nicht durch Cimetidin inhibieren (siehe Abb. 31). Die Aufnahme des Modellsubstrates muss daher durch einen anderen Transporter als den MATE1 vermittelt worden sein. Die Aufnahme in OAT4-exprimierenden Prostatazellen (LNCaP) zeigte sich zwar empfindlich gegenüber BSP, war jedoch vergleichbar mit der Aufnahme in nicht-exprimierenden Zellen (PC-3) (siehe Abb. 32). Es kann daher davon ausgegangen werden, dass der Transport von Estronsulfat durch einen anderen SLC-Transporter als den OAT4 erfolgt ist. Die Aufnahme von [³H]Estronsulfat durch die OATP2B1-exprimierende Zelllinie DU145 steigt zwar mit zunehmender Inkubationsdauer deutlicher an als in der nicht-exprimierenden Zelllinie PC-3, der Transport lässt sich jedoch in beiden Zellarten gleichermaßen inhibieren (siehe Abb. 33). Darüber hinaus war der Effekt des Inhibitors nicht bei jedem Messzeitpunkt zuverlässig detektierbar. Die mittlere Expressionsstärke der mRNA von OATP2B1 scheint hier zumindest zu einer geringfügig stärkeren Aufnahme des Modellsubstrates zu führen. Die unregelmäßigen Inhibitionseffekte lassen allerdings bezweifeln, ob dieser Effekt auch

durch die funktionelle Expression dieses Transportproteins vermittelt wurde.

Von den fünf in Mammakarzinom-Zelllinien untersuchten Transportproteinen mit differentieller Expression auf mRNA-Ebene zeigten sich mit OCT2 und PEPT1 zwei SLC-Transporter auch auf funktioneller Ebene als exprimiert. Der bereits in Prostatakarzinom-Zellen untersuchte OATP1B3 zeigte sich in der Mammakarzinom-Zelllinie MDA-MB als nicht funktionell exprimiert (siehe Abb. 34). Zwar konnte in dieser Zelllinie eine erhöhte Aufnahme von [^3H]CCK-8 gegenüber der nicht-exprimierenden Zelllinie MCF-7 detektiert werden, diese war jedoch in Gegenwart des Inhibitors Rifampicin unverändert gegenüber den Bedingungen ohne Inhibitor. Die Aufnahme muss daher von einem anderen Transporter als dem OATP1B3 vermittelt worden sein. Wie bereits bei den Prostata-Zellen beschrieben konnte auch in dem Mammakarzinom-Zelllinien eine erhöhte [^{14}C]Citrat-Aufnahme unter Na^+ -freien Bedingungen gemessen werden. Der NaCT ist in BT549-Zellen somit zwar auf mRNA-Ebene stark exprimiert, diese Expression führt jedoch nicht zur Bildung eines funktionellen Membrantransporters. Die Aufnahme von [^3H]MPP $^+$ stieg in MDA-MB-Zellen und SK-BR-3-Zellen in gleichem Maß mit längerer Inkubationsdauer an und zeigte keine Beeinflussbarkeit durch Cimetidin. Eine funktionelle Expression von MATE1 in den untersuchten Mammakarzinom-Zellen kann somit nicht bestätigt werden. Die Zelllinie T47-D, welche den Transporter OCT2 auf mRNA-Ebene stark exprimiert, zeigte im Verlauf der Messungen einen stärkeren Anstieg der [^3H]MPP $^+$ -Aufnahme als in der nicht-exprimierenden Zelllinie MCF-7. Zwar war auch in der negativen Zelllinie ein Anstieg der Modellsubstrat-Aufnahme mit längerer Inkubationsdauer messbar, dieser war jedoch weniger stark ausgeprägt als bei der positiven Zelllinie und weniger empfindlich gegenüber Decynium. Da eine schwache Expression von OCT1 auf mRNA-Ebene in beiden Zelllinien detektiert werden konnte, könnte eine schwache funktionelle Expression dieses Transportproteins ebenfalls zum Transport des Modellsubstrats beitragen. Da beide OCT-Transporter MPP $^+$ als Substrat akzeptieren und empfindlich gegenüber Decynium sind, könnte ein funktionell exprimierter OCT1 die inhibierbare Aufnahme von Modellsubstrat in MCF-7-Zellen erklären. Die Differenz der MPP $^+$ -Akkumulation zwischen den beiden Zelllinien bildet wahrscheinlich den OCT2-vermittelten MPP $^+$ -Transport ab. Eine funktionelle Expression des organischen Kationentransporters 2 ist somit sehr wahrscheinlich gegeben. Das deutlichste Ergebnis der Funktionsanalyse ließ sich bei der Untersuchung der funktionellen Expression von PEPT1 in SK-BR-3-Zellen darstellen. Die Aufnahme von [^3H]Gly-Sar stieg deutlich mit längerer Inkubation an, während die Aufnahme in Gegenwart von Losartan auf das Niveau der nicht-exprimierenden Zelllinie T47-D inhibiert wurde. Diese zeigen keinerlei Veränderung in der Aufnahme des Modellsubstrates zu den unterschiedlichen Messzeitpunkten. Die funktionelle Expression von PEPT1 in SK-BR-3-Zellen konnte so eindeutig nachgewiesen werden.

Diese Untersuchungen zeigen deutlich, dass eine hohe Konzentration von mRNA im Gewebe nicht pauschal mit einer erhöhten Expression des entsprechenden funktionalen Proteins gleichgesetzt werden kann. Eine Untersuchung der Transportaktivität von SLC-Transportern, deren Expression auf mRNA-Ebene nachweisbar ist, ist somit unverzichtbar um eine Aussage über deren Funktionalität treffen zu können. Der Nachweis der Transportaktivität von PEPT1 in Mammakarzinom-Zellen zeigt darüber hinaus auch, wie wichtig die weitere Charakterisierung von SLC-Transportern ist. So konnte unter den in dieser Arbeit getesteten Zytostatika keine Interaktion mit PEPT1 festgestellt werden, womit das Potential des funktionell in T47-D-Zellen exprimierten Transporters für die Aufnahme dieser Pharmaka nicht genutzt werden kann. Die weitere Analyse der Struktur von PEPT1-Substraten könnte zur Entwicklung wirksamer Zytostatika führen, die effizient über das Transportprotein in die entarteten Zellen aufgenommen werden könnten.

Der untersuchte OCTN2 ist in allen getesteten Tumorzellen auf mRNA-Ebene hoch exprimiert, Etoposid ist jedoch das einzige Zytostatikum, dessen Aufnahme durch den Transporter bisher nachgewiesen werden konnte. Die Arbeitsgruppe um Schneider et al. zeigte, dass die Selektion resistenter MCF-7-Zellen innerhalb der Zelllinie durch Etoposid ausgelöst werden kann und führte die Expression von multi drug resistance Proteinen (MDR) als mögliche Ursache an [87]. Ist der Einsatz von Etoposid durch das Auftreten einer derartigen Resistenz nutzlos geworden, ginge das Potential des OCTN2 als Aufnahme-Transporter verloren. Es wäre daher von großem Vorteil, wenn durch fortgeführte Untersuchungen des L-Carnitin-Transporters weitere Pharmaka entdeckt würden, die als Alternative zu Etoposid in Frage kämen.

Studien zur Untersuchung der Rolle von MATE2-K in Tumorzellen sind bisher nicht publiziert worden. Eine funktionale Expression in unzureichend mit Sauerstoff versorgtem Tumorgewebe könnte durch die Eigenschaft von MATE2-K als Protonen/org. Kationen-Austauscher zu einer effektiven Aufnahme von Substanzen führen, die von diesem SLC-Transporter als Substrate akzeptiert werden. Eine hohe intrazelluläre Protonenkonzentration würde den Import derartiger Pharmaka begünstigen. Werden die anfallenden Protonen über andere Transportproteine, wie z.B. MCT-Transporter, effizient aus den Tumorzellen entfernt, könnte jedoch auch ein umgekehrter Protonengradient auftreten. In diesem Fall könnte MATE2-K die Transportrichtung ändern und so zu einer Resistenz des Tumorgewebes gegen Zytostatika die vom SLC47A2 als Substrate erkannt werden führen. Aber auch in seiner physiologischen Expression im Tubulussystem der Nieren ist MATE2-K von Bedeutung für medikamentöse Therapien von Krebserkrankungen. So könnten nephrotoxische Effekte wie durch das Zytostatikum Cisplatin bei genauerer Charakterisierung des Transporters im Vergleich mit basalen Aufnahmetransportern im Vorfeld abgeschätzt und eine Schädigung des Nierengewebes vermieden werden. Ein weiterer Aspekt ist die schnelle Eliminierung

von MATE2-K-Substraten, die renal filtriert und effizient in den Primärharn abgegeben werden. So könnten Therapieerfolge durch schnell absinkende Wirkspiegel verhindert werden.

5 Ausblick

Da die Ursachen von Tumorerkrankungen oft vielfältig und nur selten genau zu identifizieren sind, ist es nicht möglich, eine bestimmte Krebsart standardmäßig mit einem bestimmten Medikament zu therapieren. Ein Ansatz für eine personalisierte Therapie, die auf die konkrete Tumorerkrankung eines Patienten zugeschnitten ist, könnte die Verabreichung von Zytostatika sein, für die im Tumorgewebe Aufnahme-Transporter der SLC-Familie funktionell exprimiert sind. So könnte die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Chemotherapie erhöht und eine Abschätzung über die möglichen Nebenwirkungen vorgenommen werden. Hierbei ist es notwendig für die Analyse der Expression von SLC-Transportern im Tumorgewebe nach Möglichkeit native Gewebeprobe zu verwenden, da sich die Kulturbedingungen *ex vivo* stark von den Bedingungen im Körper des Patienten unterscheiden und sich so die Expressionsmuster der SLC-Transporter verändern können. Darüber hinaus ist eine Sequenzierung der mRNA hoch exprimierter Aufnahme-Transporter zur Abschätzung ihrer Funktionalität von großer Bedeutung, wenn eine Funktionsanalyse durch Aufnahmeexperimente nicht möglich ist, da so Sequenzänderungen, die zum Verlust der Transportfunktion führen, detektiert werden können. Sind die potentiellen Aufnahmewege identifiziert, müssen die hierzu passenden Wirkstoffe ausgewählt werden. Um hierbei auch das Potential von funktionell exprimierten Transportern nutzen zu können, die bisher nicht mit dem Transport von Pharmaka in Verbindung gebracht wurden oder auf das Auftreten von Resistenzen reagieren zu können, ist die konsequente Weiterführung von Aufnahmeuntersuchungen notwendig.

Untersuchungen zur Interaktion von SLC-Transportern mit therapierelevanten Zytostatika wurden im Arbeitskreis der vegetativen Physiologie an der UMG bereits über mehrere Jahre an anderen stabil in HEK293-Zellen transfizierten SLC-Transportern durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Form einer Interaktions-Tabelle in Abb. 43 dargestellt. Dabei wurden hauptsächlich SLC-Transporter des Nieren- und Lebergewebes untersucht. Durch eine derartige Zusammenstellung der Ergebnisse können sowohl Zytostatika, die mit einer Vielzahl von Transportproteinen interagieren wie auch Transporter, die ein breites Interaktionsspektrum mit unterschiedlichen Zytostatika aufweisen, schnell identifiziert werden. So fällt in dieser Darstellung beispielsweise der Mitose-Inhibitor Paclitaxel als eine Substanz auf, die starke Interaktionen mit einer großen Zahl von SLC-Transportern aufweist. Die Substanzen Clodronsäure oder ThioTEPA zeigen hingegen keinerlei Interaktion mit den getesteten Transportprotei-

Zytostatikum		OCT1	OCT2	OCT3	OCTN2	OAT1	OAT2	OAT3	OAT4	OATP2B1	OATP1B1	OATP1B3	NTCP	SOAT	NaDC3	PEPT-1	PEPT-2	MATE1	MATE2-K	
Alkylantien	Melphalan																			
	Chlorambucil																			
	Bendamustin																			
	Cyclophosphamid																			
	Trofosphamid																			
	Ifosphamid																			
	Busulfan																			
	Treosulfan																			
	ThioTEPA																			
Interkalantien	Doxorubicin																			
	Mitoxantron																			
Mitose-Inhibitoren	Vincristin																			
	Vinblastin																			
	Paclitaxel																			
Antimetabolite	Methotrexat																			
	Cytosinarabinosid																			
	Gemcitabin																			
	5-Fluorouracil																			
	Fluoroadenin																			
	Fludarabin																			
	Cladribin																			
Topoisomerase-Inhibitoren	Irinotekan																			
	Etoposid																			
Adjuvantien	Prednison																			
	Tamoxifen																			
	Clodronsäure																			

Inhibition	e. e. b. h. a./f. c. a./f. a./f. a. c. c. c. g. e. h. h. d. h.
< 25%	
25% - 50%	
50% - 75%	
> 75%	
nicht getestet	

Abb. 43: Übersicht über die Interaktion von Zytostatika mit ausgewählten SLC-Transportern durchgeführt in stabil transfizierten HEK293-Zellen unter Verwendung von radioaktiv markiertem Referenzsubstrat am Institut für vegetative Physiologie der Universitätsmedizin Göttingen. Die Analysen wurden durchgeführt von a. Sören Petzke, b. Volodomyr Shnitsar [95], c. Vishnu Marada [59][60], d. Julia Grottker [31], e. Shivangi Gupta, f. Philip Hundertmark [33], g. Ronny Eckhardt, h. Judith Müller

nen. Liest man die Tabelle 43 senkrecht, so stellt sich der Transporter OATP1B3 als ein SLC-Transporter dar, der mit sieben Substanzen unterschiedlicher Wirkstoffklassen eine starke Interaktion von $>50\%$ aufweist. Demgegenüber zeigt z.B. der PEPT1 keinerlei Interaktionen mit den verwendeten Substanzen.

Detaillierte Charakterisierungen von SLC-Transportern im Hinblick auf ihr Aufnahmeverhalten gegenüber zugelassenen Zytostatika und die Entwicklung von neuen Medikamenten, die in ihrer Struktur auf die Eigenschaft als Substrat bestimmter Carrier zugeschnitten sind, bergen somit ein Potential für die individualisierte Tumorthherapie und könnten eine angepasste Behandlung mit gezielt ausgewählten Medikamenten und einer Minimierung von Nebenwirkungen ermöglichen.

Literatur

- [1] B. Astorga, S. Ekins, M. Morales, and S. H. Wright. Molecular determinants of ligand selectivity for the human multidrug and toxin extruder proteins MATE1 and MATE2-K. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 341(3):743–755, 2012.
- [2] P. D. Bailey, C. A. R. Boyd, J. R. Bronk, I. D. Collier, D. Meredith, K. M. Morgan, and C. S. Temple. How to Make Drugs Orally Active: A Substrate Template for Peptide Transporter PEPT1. *Angewandte Chemie*, 39(3):505–508, 2000.
- [3] S. A. Baldwin, S. Y. M. Yao, R. J. Hyde, A. M. L. Ng, S. Foppolo, K. Barnes, M. W. L. Ritzel, C. E. Cass, and J. D. Young. Functional characterization of novel human and mouse equilibrative nucleoside transporters (hENT3 and mENT3) located in intracellular membranes. *The Journal of biological chemistry*, 280(16):15880–15887, 2005.
- [4] U. V. Berger and M. A. Hediger. Distribution of peptide transporter PEPT2 mRNA in the rat nervous system. *Anatomy and Embryology*, 199(5):439–449, 1999.
- [5] H. Betsunoh, T. Fukuda, N. Anzai, D. Nishihara, T. Mizuno, H. Yuki, A. Masuda, Y. Yamaguchi, H. Abe, M. Yashi, Y. Fukabori, K.-I. Yoshida, and T. Kamai. Increased expression of system large amino acid transporter (LAT)-1 mRNA is associated with invasive potential and unfavorable prognosis of human clear cell renal cell carcinoma. *BMC cancer*, 13:509, 2013.
- [6] A. Biegel, I. Knutter, B. Hartrodt, S. Gebauer, S. Theis, P. Luckner, G. Kottra, M. Rastetter, K. Zebisch, I. Thondorf, H. Daniel, K. Neubert, and M. Brandsch. The renal type H⁺/peptide symporter PEPT2: structure-affinity relationships. *Amino acids*, 31(2):137–156, 2006.
- [7] L. G. Boros, J. Puigjaner, M. Cascante, W. N. Lee, J. L. Brandes, S. Bassilian, F. I. Yusuf, R. D. Williams, P. Muscarella, W. S. Melvin, and W. J. Schirmer. Oxythiamine and dehydroepiandrosterone inhibit the nonoxidative synthesis of ribose and tumor cell proliferation. *Cancer Research*, 57(19):4242–4248, 1997.
- [8] M. M. Bradford. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72:248–254, 1976.

-
- [9] B. Bretschneider, M. Brandsch, and R. Neubert. Intestinal transport of β -lactam antibiotics: analysis of the affinity at the H^+ /peptide symporter (PEPT1), the uptake into Caco-2 cell monolayers and the transepithelial flux. *Pharmaceutical research*, 16(1):55–61, 1999.
- [10] L. L. Brunton, L. S. Goodman, A. Gilman, and B. A. Chabner, editors. *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. McGraw-Hill Medical, New York, NY, 12. ed. edition, 2011.
- [11] B. T. Burlingham and T. S. Widlanski. An Intuitive Look at the Relationship of K_i and IC_{50} : A More General Use for the Dixon Plot. *Journal of Chemical Education*, 80(2):214, 2003.
- [12] S.-H. Chu, D.-F. Feng, Y.-B. Ma, H. Zhang, Z.-A. Zhu, Z.-Q. Li, and P.-C. Jiang. Promoter methylation and downregulation of SLC22A18 are associated with the development and progression of human glioma. *Journal of translational medicine*, 9:156, 2011.
- [13] S.-H. Chu, Y.-B. Ma, D.-F. Feng, H. Zhang, Z.-A. Zhu, Z.-Q. Li, and P.-C. Jiang. Correlation of low SLC22A18 expression with poor prognosis in patients with glioma. *Journal of clinical neuroscience*, 19(1):95–98, 2012.
- [14] B. Comin-Anduix, J. Boren, S. Martinez, C. Moro, J. J. Centelles, R. Trebukhina, N. Petushok, W. N. Lee, L. G. Boros, and M. Cascante. The effect of thiamine supplementation on tumour proliferation. A metabolic control analysis study. *European journal of biochemistry*, 268(15):4177–4182, 2001.
- [15] A. Cornish-Bowden. A simple graphical method for determining the inhibition constants of mixed, uncompetitive and non-competitive inhibitors. *The Biochemical journal*, 137(1):143–144, 1974.
- [16] L. Dabbagh, R. W. Coupland, C. E. Cass, and J. R. Mackey. Immunohistochemical variation of human equilibrative nucleoside transporter 1 protein in primary breast cancers. *Clinical cancer research*, 9(8):3213–3214, 2003.
- [17] Y. Dangprapai and S. H. Wright. Interaction of H^+ with the extracellular and intracellular aspects of hMATE1. *American journal of physiology. Renal physiology*, 301(3):F520–F528, 2011.
- [18] H. Daniel and S. A. Adibi. Functional separation of dipeptide transport and hydrolysis in kidney brush border membrane vesicles. *FASEB journal*, 8(10):753–759, 1994.

-
- [19] H. Daniel and G. Kottra. The proton oligopeptide cotransporter family SLC15 in physiology and pharmacology. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, 447(5):610–618, 2004.
- [20] H. Daniel and I. Rubio-Aliaga. An update on renal peptide transporters. *American journal of physiology. Renal physiology*, 284(5):F885–92, 2003.
- [21] F. Döring, J. Walter, J. Will, M. Focking, M. Boll, S. Amasheh, W. Clauss, and H. Daniel. δ -aminolevulinic acid transport by intestinal and renal peptide transporters and its physiological and clinical implications. *The Journal of clinical investigation*, 101(12):2761–2767, 1998.
- [22] F. Döring, J. Will, S. Amasheh, W. Clauss, H. Ahlbrecht, and H. Daniel. Minimal Molecular Determinants of Substrates for Recognition by the Intestinal Peptide Transporter. *Journal of Biological Chemistry*, 273(36):23211–23218, 1998.
- [23] J. Fang, Q. J. Quinones, T. L. Holman, M. J. Morowitz, Q. Wang, H. Zhao, F. Sivo, J. M. Maris, and M. L. Wahl. The H⁺-linked monocarboxylate transporter (MCT1/SLC16A1): A potential therapeutic target for high-risk neuroblastoma. *Molecular pharmacology*, 70(6):2108–2115, 2006.
- [24] C. M. Galmarini, X. Thomas, F. Calvo, P. Rousselot, M. Rabilloud, A. El Jaffari, E. Cros, and C. Dumontet. In vivo mechanisms of resistance to cytarabine in acute myeloid leukaemia. *British journal of haematology*, 117(4):860–868, 2002.
- [25] M. E. Ganapathy, M. Brandsch, P. D. Prasad, V. Ganapathy, and F. H. Leibach. Differential recognition of β -lactam antibiotics by intestinal and renal peptide transporters, PEPT 1 and PEPT 2. *The Journal of biological chemistry*, 270(43):25672–25677, 1995.
- [26] M. E. Ganapathy, W. Huang, D. P. Rajan, A. L. Carter, M. Sugawara, K. Iseki, F. H. Leibach, and V. Ganapathy. beta-lactam antibiotics as substrates for OCTN2, an organic cation/carnitine transporter. *The Journal of biological chemistry*, 275(3):1699–1707, 2000.
- [27] K. M. Giacomini, S. M. Huang, D. J. Tweedie, L. Z. Benet, K. L. Brouwer, X. Chu, A. Dahlin, R. Evers, V. Fischer, K. M. Hillgren, K. A. Hoffmaster, T. Ishikawa, D. Keppler, R. B. Kim, C. A. Lee, M. Niemi, J. W. Polli, Y. Sugiyama, P. W. Swaan, J. A. Ware, S. H. Wright, S. W. Yee, M. J. Zamek-Gliszczynski, and L. Zhang. Membrane transporters in drug development. *Nature Reviews Drug Discovery*, 9(3):215–236, 2010.
- [28] L. B. Gladden. Lactate metabolism: A new paradigm for the third millennium. *The Journal of physiology*, 558(Pt 1):5–30, 2004.

-
- [29] D. A. Groneberg, F. Doring, S. Theis, M. Nickolaus, A. Fischer, and H. Daniel. Peptide transport in the mammary gland: expression and distribution of PEPT2 mRNA and protein. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 282(5):E1172–9, 2002.
- [30] D. A. Groneberg, M. Nickolaus, J. Springer, F. Doring, H. Daniel, and A. Fischer. Localization of the peptide transporter PEPT2 in the lung: implications for pulmonary oligopeptide uptake. *The American journal of pathology*, 158(2):707–714, 2001.
- [31] J. Grottker, A. Rosenberger, G. Burckhardt, and Y. Hagos. Interaction of human multidrug and toxin extrusion 1 (MATE1) transporter with antineoplastic agents. *Drug metabolism and drug interactions*, 26(4):181–189, 2011.
- [32] D. Gründemann, S. Harlfinger, S. Golz, A. Geerts, A. Lazar, R. Berkels, N. Jung, A. Rubbert, and E. Schomig. Discovery of the ergothioneine transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(14):5256–5261, 2005.
- [33] Y. Hagos, P. Hundertmark, V. Shnitsar, V. V. Marada, G. Wulf, and G. Burckhardt. Renal human organic anion transporter 3 increases the susceptibility of lymphoma cells to bendamustine uptake. *American journal of physiology. Renal physiology*, 308(4):F330–F338, 2015.
- [34] A. P. Halestrap. The monocarboxylate transporter family—Structure and functional characterization. *IUBMB life*, 64(1):1–9, 2012.
- [35] A. Hamada, T. Sissung, D. K. Price, R. Danesi, C. H. Chau, N. Sharifi, D. Venzon, K. Maeda, K. Nagao, A. Sparreboom, H. Mitsuya, W. L. Dahut, and W. D. Figg. Effect of SLCO1B3 haplotype on testosterone transport and clinical outcome in caucasian patients with androgen-independent prostatic cancer. *Clinical cancer research*, 14(11):3312–3318, 2008.
- [36] H. Han, R. L. de Vruh, J. K. Rhie, K. M. Covitz, P. L. Smith, C. P. Lee, D. M. Oh, W. Sadee, and G. L. Amidon. 5'-Amino acid esters of antiviral nucleosides, acyclovir, and AZT are absorbed by the intestinal PEPT1 peptide transporter. *Pharmaceutical research*, 15(8):1154–1159, 1998.
- [37] H. A. Harvey. Therapeutic Use of Bisphosphonates in Breast Cancer. *American Journal of Cancer*, 2(Supplement 1):19–25, 2003.
- [38] M. M. Hassan, A. Kaseb, D. Li, Y. Z. Patt, J.-N. Vauthey, M. B. Thomas, S. A. Curley, M. R. Spitz, S. I. Sherman, E. K. Abdalla, M. Davila, R. D. Lozano,

- D. M. Hassan, W. Chan, T. D. Brown, and J. L. Abbruzzese. Association between hypothyroidism and hepatocellular carcinoma: A case-control study in the United States. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 49(5):1563–1570, 2009.
- [39] X. He, P. Szewczyk, A. Karyakin, M. Evin, W.-X. Hong, Q. Zhang, and G. Chang. Structure of a cation-bound multidrug and toxic compound extrusion transporter. *Nature*, 467(7318):991–994, 2010.
- [40] A. H. Hercbergs, O. Ashur-Fabian, and D. Garfield. Thyroid hormones and cancer: Clinical studies of hypothyroidism in oncology. *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity*, 17(5):432–436, 2010.
- [41] P. D. Holohan and C. R. Ross. Mechanisms of organic cation transport in kidney plasma membrane vesicles: 2. delta pH studies. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 216(2):294–298, 1981.
- [42] S. M. Houten and R. J. A. Wanders. A general introduction to the biochemistry of mitochondrial fatty acid beta-oxidation. *Journal of inherited metabolic disease*, 33(5):469–477, 2010.
- [43] C. Hu, Cy. S. Lancaster, Z. Zuo, S. Hu, Z. Chen, J. E. Rubnitz, S. D. Baker, and A. Sparreboom. Inhibition of OCTN2-mediated transport of carnitine by etoposide. *Molecular cancer therapeutics*, 11(4):921–929, 2012.
- [44] Y. Huang, P. Anderle, K. J. Bussey, C. Barbacioru, U. Shankavaram, Z. Dai, W. C. Reinhold, A. Papp, J. N. Weinstein, and W. Sadee. Membrane transporters and channels: Role of the transportome in cancer chemosensitivity and chemoresistance. *Cancer Research*, 64(12):4294–4301, 2004.
- [45] K. Inui, Y. Tomita, T. Katsura, T. Okano, M. Takano, and R. Hori. H⁺ coupled active transport of bestatin via the dipeptide transport system in rabbit intestinal brush-border membranes. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 260(2):482–486, 1992.
- [46] M. Irie, T. Terada, T. Katsura, S. Matsuoka, and K.-I. Inui. Computational modelling of H⁺-coupled peptide transport via human PEPT1. *The Journal of physiology*, 565(Pt 2):429–439, 2005.
- [47] C. Jeulin. Role of free L-carnitine and acetyl-L-carnitine in post-gonadal maturation of mammalian spermatozoa. *Human Reproduction Update*, 2(2):87–102, 1996.
- [48] N. Khunweeraphong, S. Nagamori, P. Wiriyasermkul, Y. Nishinaka, P. Wongthai, R. Ohgaki, H. Tanaka, H. Tominaga, H. Sakurai, and Y. Kanai. Establishment

- of Stable Cell Lines With High Expression of Heterodimers of Human 4F2hc and Human Amino Acid Transporter LAT1 or LAT2 and Delineation of Their Differential Interaction With α -Alkyl Moieties. *Journal of Pharmacological Sciences*, 119(4):368–380, 2012.
- [49] I. Knütter, G. Kottra, W. Fischer, H. Daniel, and M. Brandsch. High-affinity interaction of sartans with H^+ /peptide transporters. *Drug Metabolism and Disposition*, 37(1):143–149, 2009.
- [50] I. Knütter, I. Rubio-Aliaga, M. Boll, G. Hause, H. Daniel, K. Neubert, and M. Brandsch. H^+ -peptide cotransport in the human bile duct epithelium cell line SK-ChA-1. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 283(1):G222–9, 2002.
- [51] H. Koepsell. The SLC22 family with transporters of organic cations, anions and zwitterions. *Molecular aspects of medicine*, 34(2-3):413–435, 2013.
- [52] H. Kusahara, S. Ito, Y. Kumagai, M. Jiang, T. Shiroshita, Y. Moriyama, K. Inoue, H. Yuasa, and Y. Sugiyama. Effects of a MATE protein inhibitor, pyrimethamine, on the renal elimination of metformin at oral microdose and at therapeutic dose in healthy subjects. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 89(6):837–844, 2011.
- [53] K. D. Lazaruk and S. H. Wright. MPP^+ is transported by the TEA^+-H^+ exchanger of renal brush-border membrane vesicles. *The American journal of physiology*, 258(3 Pt 2):F597–605, 1990.
- [54] X. Liu, E. K. Y. Lam, X. Wang, J. Zhang, Y. Y. Cheng, Y. W. Lam, E. K. O. Ng, J. Yu, F. K. L. Chan, H. C. Jin, and J. J. Y. Sung. Promoter hypermethylation mediates downregulation of thiamine receptor SLC19A3 in gastric cancer. *Tumour biology*, 30(5-6):242–248, 2009.
- [55] A. C. Lockhart, E. Harris, B. J. Laffleur, N. B. Merchant, M. K. Washington, M. B. Resnick, T. J. Yeatman, and W. Lee. Organic anion transporting polypeptide 1B3 (OATP1B3) is overexpressed in colorectal tumors and is a predictor of clinical outcome. *Clinical and experimental gastroenterology*, 1:1–7, 2008.
- [56] K. V. Q. Lu’o’ng and L. T. H. Nguyen. The role of thiamine in cancer: Possible genetic and cellular signaling mechanisms. *Cancer genomics & proteomics*, 10(4):169–185, 2013.
- [57] B. Mackenzie, D. D. Loo, Y. Fei, W. J. Liu, V. Ganapathy, F. H. Leibach, and E. M. Wright. Mechanisms of the human intestinal H^+ -coupled oligopeptide

- transporter hPEPT1. *The Journal of biological chemistry*, 271(10):5430–5437, 1996.
- [58] H. Maegawa, M. Kato, K. Inui, and R. Hori. pH sensitivity of H⁺/organic cation antiport system in rat renal brush-border membranes. *The Journal of biological chemistry*, 263(23):11150–11154, 1988.
- [59] Marada, V. V. V. R., S. Flörl, A. Kühne, G. Burckhardt, and Y. Hagos. Interaction of human organic anion transporter polypeptides 1B1 and 1B3 with antineoplastic compounds. *European journal of medicinal chemistry*, 92:723–731, 2015.
- [60] Marada, V. V. V. R., S. Flörl, A. Kühne, J. Müller, G. Burckhardt, and Y. Hagos. Interaction of human organic anion transporter 2 (OAT2) and sodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) with antineoplastic drugs. *Pharmacological research*, 91:78–87, 2015.
- [61] C. M. C. Maranduba, E. C. H. Friesema, F. Kok, M. H. A. Kester, J. Jansen, A. L. Sertie, M. R. Passos-Bueno, and T. J. Visser. Decreased cellular uptake and metabolism in Allan-Herndon-Dudley syndrome (AHDS) due to a novel mutation in the MCT8 thyroid hormone transporter. *Journal of medical genetics*, 43(5):457–460, 2006.
- [62] L. J. Martinez-Guerrero, M. Morales, S. Ekins, and S. H. Wright. Lack of Influence of Substrate on Ligand Interaction with the Human Multidrug and Toxin Extruder, MATE1. *Molecular pharmacology*, 90(3):254–264, 2016.
- [63] S. Masuda, T. Terada, A. Yonezawa, Y. Tanihara, K. Kishimoto, T. Katsura, O. Ogawa, and K. Inui. Identification and functional characterization of a new human kidney-specific H⁺/organic cation antiporter, kidney-specific multidrug and toxin extrusion 2. *Journal of the American Society of Nephrology*, 17(8):2127–2135, 2006.
- [64] T. Matsumoto, T. Kanamoto, M. Otsuka, H. Omote, and Y. Moriyama. Role of glutamate residues in substrate recognition by human MATE1 polyspecific H⁺/organic cation exporter. *American journal of physiology. Cell physiology*, 294(4):C1074–8, 2008.
- [65] B. Melegh, J. Bene, G. Mogyorosy, V. Havasi, K. Komlosi, L. Pajor, E. Olah, G. Kispal, B. Sumegi, and K. Mehes. Phenotypic manifestations of the OCTN2 V295X mutation: sudden infant death and carnitine-responsive cardiomyopathy in Roma families. *American journal of medical genetics*, 131(2):121–126, 2004.

- [66] D. Meredith and H. C. Christian. The SLC16 monocarboxylate transporter family. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems*, 38(7-8):1072–1106, 2008.
- [67] S. Y. Mishkin, R. Pollack, M. A. Yalovsky, H. P. Morris, and S. Mishkin. Inhibition of local and metastatic hepatoma growth and prolongation of survival after induction of hypothyroidism. *Cancer Research*, 41(8):3040–3045, 1981.
- [68] R. Moreno-Sanchez, S. Rodriguez-Enriquez, A. Marin-Hernandez, and E. Saavedra. Energy metabolism in tumor cells. *The FEBS journal*, 274(6):1393–1418, 2007.
- [69] Y. Morita, A. Kataoka, S. Shiota, T. Mizushima, and T. Tsuchiya. NorM of vibrio parahaemolyticus is an Na⁺-driven multidrug efflux pump. *Journal of bacteriology*, 182(23):6694–6697, 2000.
- [70] M. Muto, T. Onogawa, T. Suzuki, T. Ishida, T. Rikiyama, Y. Katayose, N. Ohuchi, H. Sasano, T. Abe, and M. Unno. Human liver-specific organic anion transporter-2 is a potent prognostic factor for human breast carcinoma. *Cancer science*, 98(10):1570–1576, 2007.
- [71] J. Nezu, I. Tamai, A. Oku, R. Ohashi, H. Yabuuchi, N. Hashimoto, H. Nikaïdo, Y. Sai, A. Koizumi, Y. Shoji, G. Takada, T. Matsuishi, M. Yoshino, H. Kato, T. Ohura, G. Tsujimoto, J. Hayakawa, M. Shimane, and A. Tsuji. Primary systemic carnitine deficiency is caused by mutations in a gene encoding sodium ion-dependent carnitine transporter. *Nature genetics*, 21(1):91–94, 1999.
- [72] K. Oda, N. Hosoda, H. Endo, K. Saito, K. Tsujihara, M. Yamamura, T. Sakata, N. Anzai, M. F. Wempe, Y. Kanai, and H. Endou. L-type amino acid transporter 1 inhibitors inhibit tumor cell growth. *Cancer science*, 101(1):173–179, 2010.
- [73] N. Ogane, M. Yasuda, Y. Kameda, T. Yokose, H. Kato, A. Itoh, S. Nishino, Y. Hashimoto, and S. Kamoshida. Prognostic value of organic anion transporting polypeptide 1B3 and copper transporter 1 expression in endometrial cancer patients treated with paclitaxel and carboplatin. *Biomedical research (Tokyo, Japan)*, 34(3):143–151, 2013.
- [74] M. Okabe, G. Szakacs, M. A. Reimers, T. Suzuki, M. D. Hall, T. Abe, J. N. Weinstein, and M. M. Gottesman. Profiling SLCO and SLC22 genes in the NCI-60 cancer cell lines to identify drug uptake transporters. *Molecular cancer therapeutics*, 7(9):3081–3091, 2008.
- [75] G. Opala. The Effect of Valproic Acid on Plasma Carnitine Levels. *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine*, 145(9):999, 1991.

- [76] M. Otsuka, T. Matsumoto, R. Morimoto, S. Arioka, H. Omote, and Y. Moriyama. A human transporter protein that mediates the final excretion step for toxic organic cations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(50):17923–17928, 2005.
- [77] M. O. Oyewumi, S. Liu, J. A. Moscow, and R. J. Mumper. Specific association of thiamine-coated gadolinium nanoparticles with human breast cancer cells expressing thiamine transporters. *Bioconjugate chemistry*, 14(2):404–411, 2003.
- [78] V. D. Peltekova, R. F. Wintle, L. A. Rubin, C. I. Amos, Q. Huang, X. Gu, B. Newman, M. van Oene, D. Cescon, G. Greenberg, A. M. Griffiths, P. H. St George-Hyslop, and K. A. Siminovitch. Functional variants of OCTN cation transporter genes are associated with Crohn disease. *Nature genetics*, 36(5):471–475, 2004.
- [79] R. Polanski, C. L. Hodgkinson, A. Fusi, D. Nonaka, L. Priest, P. Kelly, F. Trapani, P. W. Bishop, A. White, S. E. Critchlow, P. D. Smith, F. Blackhall, C. Dive, and C. J. Morrow. Activity of the monocarboxylate transporter 1 inhibitor AZD3965 in small cell lung cancer. *Clinical cancer research*, 20(4):926–937, 2014.
- [80] P. D. Prasad, H. Wang, W. Huang, R. Kekuda, D. P. Rajan, F. H. Leibach, and V. Ganapathy. Human LAT1, a subunit of system L amino acid transporter: Molecular cloning and transport function. *Biochemical and biophysical research communications*, 255(2):283–288, 1999.
- [81] J. Pressacco, J. S. Wiley, G. P. Jamieson, C. Erlichman, and D. W. Hedley. Modulation of the equilibrative nucleoside transporter by inhibitors of DNA synthesis. *British journal of cancer*, 72(4):939–942, 1995.
- [82] C. J. Rebouche. Kinetics, pharmacokinetics, and regulation of L-carnitine and acetyl-L-carnitine metabolism. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1033:30–41, 2004.
- [83] A. Roos and W. F. Boron. Intracellular pH. *Physiological reviews*, 61(2):296–434, 1981.
- [84] H. Saito, T. Terada, M. Okuda, S. Sasaki, and K. Inui. Molecular cloning and tissue distribution of rat peptide transporter PEPT2. *Biochimica et biophysica acta*, 1280(2):173–177, 1996.
- [85] M. Sala-Rabanal, D. D. F. Loo, B. A. Hirayama, and E. M. Wright. Molecular mechanism of dipeptide and drug transport by the human renal H⁺/oligopeptide cotransporter hPEPT2. *American journal of physiology. Renal physiology*, 294(6):F1422–32, 2008.

-
- [86] P. P. Saraiva, N. B. Figueiredo, C. R. Padovani, M. M. Brentani, and C. R. Nogueira. Profile of thyroid hormones in breast cancer patients. *Brazilian journal of medical and biological research*, 38(5):761–765, 2005.
- [87] E. Schneider, J. K. Horton, C. H. Yang, M. Nakagawa, and K. H. Cowan. Multidrug resistance-associated protein gene overexpression and reduced drug sensitivity of topoisomerase II in a human breast carcinoma MCF7 cell line selected for etoposide resistance. *Cancer Research*, 54(1):152–158, 1994.
- [88] C. Schwienbacher, S. Sabbioni, M. Campi, A. Veronese, G. Bernardi, A. Menegatti, I. Hatada, T. Mukai, H. Ohashi, G. Barbanti-Brodano, C. M. Croce, and M. Negrini. Transcriptional map of 170-kb region at chromosome 11p15.5: Identification and mutational analysis of the BWR1A gene reveals the presence of mutations in tumor samples. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(7):3873–3878, 1998.
- [89] H. Segawa, Y. Fukasawa, K. Miyamoto, E. Takeda, H. Endou, and Y. Kanai. Identification and functional characterization of a Na⁺-independent neutral amino acid transporter with broad substrate selectivity. *The Journal of biological chemistry*, 274(28):19745–19751, 1999.
- [90] G. L. Semenza. Tumor metabolism: Cancer cells give and take lactate. *The Journal of clinical investigation*, 118(12):3835–3837, 2008.
- [91] N. Sheikh, Mt Goodarzi, H. Bab Al-Havaejee, Safari, I. Amiri, R. Najafi, and J. Hadeie. L-carnitine level in seminal plasma of fertile and infertile men. *Journal of research in health sciences*, 7(1):43–48, 2007.
- [92] H. Shen, S. M. Ocheltree, Y. Hu, R. F. Keep, and D. E. Smith. Impact of genetic knockout of PEPT2 on cefadroxil pharmacokinetics, renal tubular reabsorption, and brain penetration in mice. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, 35(7):1209–1216, 2007.
- [93] H. Shen, D. E. Smith, T. Yang, Y. G. Huang, J. B. Schnermann, and F. C. 3rd Brosius. Localization of PEPT1 and PEPT2 proton-coupled oligopeptide transporter mRNA and protein in rat kidney. *The American journal of physiology*, 276(5 Pt 2):F658–65, 1999.
- [94] D. B. Shennan, J. Thomson, I. F. Gow, M. T. Travers, and M. C. Barber. L-leucine transport in human breast cancer cells (MCF-7 and MDA-MB-231): Kinetics, regulation by estrogen and molecular identity of the transporter. *Biochimica et biophysica acta*, 1664(2):206–216, 2004.

- [95] V. Shnitsar, R. Eckardt, S. Gupta, J. Grottker, G. A. Muller, H. Koepsell, G. Burckhardt, and Y. Hagos. Expression of human organic cation transporter 3 in kidney carcinoma cell lines increases chemosensitivity to melphalan, irinotecan, and vincristine. *Cancer Research*, 69(4):1494–1501, 2009.
- [96] C. Shu, H.ong Shen, N. S. Teuscher, P. J. Lorenzi, R. F. Keep, and D. E. Smith. Role of PEPT2 in peptide/mimetic trafficking at the blood-cerebrospinal fluid barrier: studies in rat choroid plexus epithelial cells in primary culture. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 301(3):820–829, 2002.
- [97] D. E. Smith, A. Pavlova, U. V. Berger, M. A. Hediger, T. Yang, Y. G. Huang, and J. B. Schnermann. Tubular localization and tissue distribution of peptide transporters in rat kidney. *Pharmaceutical research*, 15(8):1244–1249, 1998.
- [98] A. Somogyi, C. Stockley, J. Keal, P. Rolan, and F. Bochner. Reduction of metformin renal tubular secretion by cimetidine in man. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 23(5):545–551, 1987.
- [99] M. Sugawara, W. Huang, Y.-J. Fei, F. H. Leibach, V. Ganapathy, and M. E. Ganapathy. Transport of Valganciclovir, a Ganciclovir Prodrug, via Peptide Transporters PEPT1 and PEPT2. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 89(6):781–789, 2000.
- [100] I. Tamai, K. China, Y. Sai, D. Kobayashi, J. Nezu, E. Kawahara, and A. Tsuji. Na⁺-coupled transport of L-carnitine via high-affinity carnitine transporter OCTN2 and its subcellular localization in kidney. *BBA-Biochimica Biophysica Acta*, 1512(2):273–284, 2001.
- [101] I. Tamai, R. Ohashi, J. Nezu, H. Yabuuchi, A. Oku, M. Shimane, Y. Sai, and A. Tsuji. Molecular and functional identification of sodium ion-dependent, high affinity human carnitine transporter OCTN2. *The Journal of biological chemistry*, 273(32):20378–20382, 1998.
- [102] I. Tamai, H. Yabuuchi, J. Nezu, Y. Sai, A. Oku, M. Shimane, and A. Tsuji. Cloning and characterization of a novel human pH-dependent organic cation transporter, OCTN1. *FEBS letters*, 419(1):107–111, 1997.
- [103] Y. Tanihara, S. Masuda, T. Sato, T. Katsura, O. Ogawa, and K. Inui. Substrate specificity of MATE1 and MATE2-K, human multidrug and toxin extrusions/H⁺-organic cation antiporters. *Biochemical pharmacology*, 74(2):359–371, 2007.
- [104] I. Tein and Z. W. Xie. Reversal of valproic acid-associated impairment of carnitine uptake in cultured human skin fibroblasts. *Biochemical and biophysical research communications*, 204(2):753–758, 1994.

-
- [105] C. Theodossiou, N. Skrepnik, E. G. Robert, C. Prasad, T. W. Axelrad, D. V. Schapira, and J. D. Hunt. Propylthiouracil-induced hypothyroidism reduces xenograft tumor growth in athymic nude mice. *Cancer*, 86(8):1596–1601, 1999.
- [106] K. Toyama, A. Yonezawa, S. Masuda, R. Osawa, M. Hosokawa, S. Fujimoto, N. Inagaki, K. Inui, and T. Katsura. Loss of multidrug and toxin extrusion 1 (MATE1) is associated with metformin-induced lactic acidosis. *British journal of pharmacology*, 166(3):1183–1191, 2012.
- [107] H. Uchino, Y. Kanai, D. K. Kim, M. F. Wempe, A. Chairoungdua, E. Morimoto, M. W. Anders, and H. Endou. Transport of amino acid-related compounds mediated by L-type amino acid transporter 1 (LAT1): Insights into the mechanisms of substrate recognition. *Molecular pharmacology*, 61(4):729–737, 2002.
- [108] C. Wang, I. P. Uray, A. Mazumdar, J. A. Mayer, and P. H. Brown. SLC22A5/OCTN2 expression in breast cancer is induced by estrogen via a novel intronic estrogen-response element (ERE). *Breast cancer research and treatment*, 134(1):101–115, 2012.
- [109] M. B. Wittwer, A. A. Zur, N. Khuri, Y. Kido, A. Kosaka, X. Zhang, K. M. Morrissey, A. Sali, Y. Huang, and K. M. Giacomini. Discovery of potent, selective multidrug and toxin extrusion transporter 1 (MATE1, SLC47A1) inhibitors through prescription drug profiling and computational modeling. *Journal of Medicinal Chemistry*, 56(3):781–795, 2013.
- [110] K. Wlcek, M. Svoboda, F. Sellner, G. Krupitza, W. Jaeger, and T. Thalhammer. Altered expression of organic anion transporter polypeptide (OATP) genes in human breast carcinoma. *Cancer biology & therapy*, 7(9):1450–1455, 2014.
- [111] X. Wu, P. D. Prasad, F. H. Leibach, and V. Ganapathy. cDNA sequence, transport function, and genomic organization of human OCTN2, a new member of the organic cation transporter family. *Biochemical and biophysical research communications*, 246(3):589–595, 1998.
- [112] C. Xuan, B.-B. Zhang, T. Yang, K.-F. Deng, M. Li, and R.-J. Tian. Association between OCTN1/2 gene polymorphisms (1672C-T, 207G-C) and susceptibility of Crohn’s disease: a meta-analysis. *International journal of colorectal disease*, 27(1):11–19, 2012.
- [113] H. Yabuuchi, I. Tamai, J. Nezu, K. Sakamoto, A. Oku, M. Shimane, Y. Sai, and A. Tsuji. Novel membrane transporter OCTN1 mediates multispecific, bidirectional, and pH-dependent transport of organic cations. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 289(2):768–773, 1999.

-
- [114] H. Y. Yamada and G. J. Gorbisky. Tumor suppressor candidate TSSC5 is regulated by UbcH6 and a novel ubiquitin ligase RING105. *Oncogene*, 25(9):1330–1339, 2006.
- [115] A. Yonezawa and K.-I. Inui. Organic cation transporter OCT/SLC22A and H⁺/organic cation antiporter MATE/SLC47A are key molecules for nephrotoxicity of platinum agents. *Biochemical pharmacology*, 81(5):563–568, 2011.
- [116] J. Zhang, F. Visser, K. M. King, S. A. Baldwin, J. D. Young, and C. E. Cass. The role of nucleoside transporters in cancer chemotherapy with nucleoside drugs. *Cancer metastasis reviews*, 26(1):85–110, 2007.
- [117] X. Zhang, X. He, J. Baker, F. Tama, G. Chang, and S. H. Wright. Twelve transmembrane helices form the functional core of mammalian MATE1 (multidrug and toxin extruder 1) protein. *Journal of Biological Chemistry*, 287(33):27971–27982, 2012.
- [118] T. Zhu, X. Z. Chen, A. Steel, M. A. Hediger, and D. E. Smith. Differential recognition of ACE inhibitors in *Xenopus laevis* oocytes expressing rat PEPT1 and PEPT2. *Pharmaceutical research*, 17(5):526–532, 2000.
- [119] T. R. Ziegler, C. Fernandez-Estivariz, L. H. Gu, N. Bazargan, K. Umeakunne, T. M. Wallace, E. E. Diaz, Kathia E. Rosado, R. R. Pascal, J. R. Galloway, J. N. Wilcox, and L. M. Leader. Distribution of the H⁺/peptide transporter PepT1 in human intestine: up-regulated expression in the colonic mucosa of patients with short-bowel syndrome. *The American journal of clinical nutrition*, 75(5):922–930, 2002.

6 Anhang

Expressionswerte von SLC-Transportern in Mamma- und Prostatakarzinom-Zelllinien

In Tabelle 16 sind die Expressionswerte der in Abb. 28 dargestellten 46 SLC-Transporter in Mamma- und Prostatakarzinom-Zelllinien zusammengefasst. Die Werte sind der Übersichtlichkeit halber anhand der SLC-Familie eingeteilt. Angegeben ist jeweils der mittlere Expressionszyklus \pm Standardfehler resultierend aus zwei Einzelexperimenten durchgeführt in Doppelbestimmung.

Tabelle 16: Expressionswerte der qPCR der in Abb. 28 dargestellten 46 SLC-Transporter in Mamma- und Prostatakarzinom-Zelllinien, eingeteilt anhand der SLC-Familie. Angegeben ist jeweils der mittlere Expressionszyklus \pm Standardfehler resultierend aus zwei Experimenten in Doppelbestimmung.

Zelllinie	SLC7-Familie		SLC10-Familie		SLC13-Familie			SLC15-Familie			SLC16-Familie			
	LAT1	LAT2	NTC	ASBT	SOAT	NaDC1	NaDC3	NaCT	PEPT1	PEPT2	MCT1	MCT2	MCT4	MCT8
BT-549	17,2 $\pm 0,6$	19,7 $\pm 0,2$	0	0	20,4 $\pm 0,8$	0	15,3 $\pm 0,3$	15,1 $\pm 0,3$	20,1 $\pm 0,2$	16,7 $\pm 0,3$	8,0 $\pm 0,3$	0	15,9 $\pm 0,5$	9,5 $\pm 0,6$
MCF-7	18,8 $\pm 0,1$	13,2 $\pm 0,1$	0	0	21,9 $\pm 0,7$	21,6 $\pm 0,4$	14,4 $\pm 0,2$	0	23,4 $\pm 0,1$	18,2 $\pm 0,2$	11,9 $\pm 0,1$	0	15,6 $\pm 0,4$	14,5 $\pm 0,6$
Hs578T	16,4 $\pm 0,5$	16,0 $\pm 0,4$	0	0	20,7 $\pm 1,5$	0	17,8 $\pm 0,7$	20,6 $\pm 0,6$	21,8 $\pm 0,6$	18,4 $\pm 0,4$	8,0 $\pm 0,3$	0	12,8 $\pm 0,1$	10,1 $\pm 0,2$
T47-D	19,6 $\pm 1,0$	10,8 $\pm 0,2$	0	0	20,6 $\pm 0,6$	22,6 $\pm 0,3$	14,5 $\pm 0,6$	0	23,9 $\pm 0,7$	19,8 $\pm 0,8$	12,5 $\pm 0,8$	0	13,2 $\pm 0,5$	17,7 $\pm 0,8$
MDA-MB	21,0 $\pm 0,9$	19,5 $\pm 2,9$	0	0	18,6 $\pm 0,5$	23,2 $\pm 0,1$	17,8 $\pm 0,4$	0	16,3 $\pm 0,8$	19,7 $\pm 0,6$	11,4 $\pm 1,6$	0	14,0 $\pm 1,7$	16,3 $\pm 2,2$
SK-BR-3	18,9 $\pm 0,6$	11,3 $\pm 0,2$	20,3 $\pm 0,3$	0	18,2 $\pm 0,4$	23,7 $\pm 0,3$	17,5 $\pm 0,8$	0	9,5 $\pm 0,3$	17,9 $\pm 0,6$	15,4 $\pm 0,3$	0	10,2 $\pm 0,3$	10,6 $\pm 0,1$
PC-3	17,2 $\pm 1,1$	8,7 $\pm 0,1$	0	0	17,6 $\pm 1,0$	0	17,2 $\pm 0,8$	0	19,1 $\pm 0,3$	15,9 $\pm 0,9$	7,4 $\pm 0,5$	12,1 $\pm 0,1$	10,0 $\pm 0,6$	0
LNCaP	0	11,3 $\pm 0,3$	0	0	20,2 $\pm 0,3$	0	15,0 $\pm 0,3$	0	22,1 $\pm 0,1$	17,7 $\pm 0,8$	9,6 $\pm 0,5$	14,4 $\pm 0,5$	20,4 $\pm 0,2$	0
DU145	19,6 $\pm 0,3$	18,4 $\pm 0,2$	0	0	21,2 $\pm 0,6$	0	19,2 $\pm 0,2$	19,0 $\pm 0,4$	20,5 $\pm 1,1$	17,1 $\pm 0,2$	9,1 $\pm 0,1$	13,5 $\pm 0,2$	11,3 $\pm 0,1$	0
Nieren	15,3 $\pm 1,3$	8,2 $\pm 0,1$	19,0 $\pm 3,2$	12,0 $\pm 0,9$	16,1 $\pm 1,1$	0	10,0 $\pm 0,4$	18,7 $\pm 1,8$	9,0 $\pm 0,3$	11,7 $\pm 0,5$	9,7 $\pm 0,4$	17,8 $\pm 4,8$	13,5 $\pm 1,1$	11,3 $\pm 0,6$
Leber	16,9 $\pm 0,9$	11,9 $\pm 0,6$	14,4 $\pm 0,6$	0	17,5 $\pm 0,9$	17,8 $\pm 1,0$	12,3 $\pm 0,8$	5,2 $\pm 0,3$	12,8 $\pm 0,7$	16,8 $\pm 0,9$	9,1 $\pm 0,5$	0	15,0 $\pm 0,9$	11,4 $\pm 0,7$
Colon	18,9 $\pm 0,6$	11,9 $\pm 0,2$	22,8 $\pm 0,4$	15,7 $\pm 0,5$	16,5 $\pm 0,5$	12,2 $\pm 0,3$	18,9 $\pm 0,4$	20,3 $\pm 0,3$	8,9 $\pm 0,2$	16,4 $\pm 0,4$	11,1 $\pm 0,3$	0	15,9 $\pm 0,5$	15,7 $\pm 0,44$

Mammakarz.

Prostatakarz.

Referenzgew.

Zelllinie	SLC22-Familie													
	OCT1	OCT2	OCT3	OCTN1	OCTN2	OAT1	OAT2	OAT3	OAT4	OAT6	OAT7	OAT10	URAT1	ORCTL2
BT-549	13,9	0	26,3	13,5	12,7	0	23,2	21,3	0	18,3	0	19,8	0	13,5
	$\pm 0,2$		$\pm 0,7$	$\pm 0,3$	$\pm 0,5$		$\pm 0,4$	$\pm 0,4$		$\pm 0,6$		$\pm 0,5$		$\pm 0,2$
MCF-7	18,1	0	0	14,0	11,8	0	24,8	23,7	23,7	23,2	20,5	21,7	0	11,9
	$\pm 0,4$			$\pm 0,1$	$\pm 0,1$		$\pm 1,0$	$\pm 0,3$	$\pm 0,8$	$\pm 0,6$	$\pm 0,3$	$\pm 0,6$		$\pm 0,4$
Hs578T	14,7	17,7	23,3	11,4	13,3	0	23,3	23,2	0	22,4	23,7	18,5	0	12,6
	$\pm 0,4$	$\pm 0,6$	$\pm 0,5$	$\pm 0,1$	$\pm 0,3$		$\pm 0,6$	$\pm 0,4$		$\pm 1,2$	$\pm 0,2$	$\pm 0,5$		$\pm 0,9$
T47-D	17,3	7,8	29,7	17,0	12,0	0	25,7	24,4	23,5	0	0	21,9	24,3	12,6
	$\pm 0,6$	$\pm 0,7$	$\pm 0,6$	$\pm 0,4$	$\pm 0,3$		$\pm 1,4$	$\pm 0,3$	$\pm 0,3$			$\pm 1,1$	$\pm 0,1$	$\pm 0,6$
MDA-MB	15,8	0	16,0	8,7	12,8	0	26,7	25,7	23,9	22,9	0	21,7	0	13,7
	$\pm 1,0$		$\pm 0,4$	$\pm 2,2$	$\pm 0,3$		$\pm 0,6$	$\pm 1,0$	$\pm 0,7$	$\pm 0,6$		$\pm 1,3$		$\pm 0,5$
SK-BR-3	18,2	0	0	15,9	11,4	0	24,8	0	23,9	24,0	18,6	19,9	0	10,3
	$\pm 0,2$			$\pm 0,1$	$\pm 0,1$		$\pm 0,4$		$\pm 1,14$	$\pm 0,1$	$\pm 0,4$	$\pm 0,1$		$\pm 0,3$
PC-3	11,7	21,7	14,8	12,0	11,3	0	20,4	19,9	24,7	16,7	22,4	18,9	0	11,3
	$\pm 0,5$	$\pm 0,6$	$\pm 0,2$	$\pm 0,1$	$\pm 0,4$		$\pm 0,1$	$\pm 0,4$	$\pm 0,5$	$\pm 0,6$	$\pm 0,9$	$\pm 0,5$		$\pm 0,6$
LNCaP	14,6	22,8	14,1	20,4	13,0	0	25,5	23,7	16,4	19,1	22,5	23,1	0	13,2
	$\pm 0,6$	$\pm 0,4$	$\pm 0,2$	$\pm 0,4$	$\pm 0,3$		$\pm 1,0$	$\pm 0,1$	$\pm 0,3$	$\pm 0,4$	$\pm 0,6$	$\pm 1,1$		$\pm 0,4$
DU145	14,7	0	17,9	12,2	11,4	0	25,0	0	21,4	25,2	0	20,0	0	12,3
	$\pm 0,2$		$\pm 0,4$	$\pm 0,1$	$\pm 0,2$		$\pm 0,40$		$\pm 0,3$	$\pm 0,1$		$\pm 0,4$		$\pm 0,2$
Nieren	14,5	8,7	14,6	11,7	8,9	8,1	13,3	7,7	9,5	14,8	15,6	13,7	10,0	11,9
	$\pm 1,1$	$\pm 0,3$	$\pm 0,9$	$\pm 0,6$	$\pm 0,2$	$\pm 0,5$	$\pm 0,9$	$\pm 0,2$	$\pm 0,3$	$\pm 1,3$	$\pm 1,1$	$\pm 0,8$	$\pm 0,4$	$\pm 0,6$
Leber	6,1	0	14,6	13,9	12,4	0	12,9	23,2	18,6	19,8	10,6	20,3	0	12,9
	$\pm 0,6$		$\pm 0,5$	$\pm 0,9$	$\pm 0,6$		$\pm 0,8$	$\pm 0,7$	$\pm 0,8$	$\pm 1,4$	$\pm 0,6$	$\pm 1,0$		$\pm 0,8$
Colon	18,1	22,4	17,9	15,6	13,3	0	25,4	23,9	23,0	21,2	0	20,5	0	14,7
	0,7	$\pm 1,0$	$\pm 0,1$	$\pm 0,5$	$\pm 0,3$		$\pm 1,5$	$\pm 1,4$	$\pm 0,8$	$\pm 0,6$		$\pm 0,5$		$\pm 0,4$

Mammakarz.

Prostatakarz.

Referenzgew.

Zelllinie	SLC19-Familie		SLC28-Familie			SLC29-Familie			SLC47-Familie	
	RFC	THTR1	CNT1	CTN2	CTN3	ENT1	ENT2	ENT3	MATE1	MATE2-K
BT549	17,2 ± 0,5	9,8 ± 0,1	19,1 ± 0,3	0	18,6 ± 0,7	16,2 ± 0,4	13,8 ± 0,1	17,6 ± 0,4	14,7 ± 0,3	19,8 ± 0,3
MCF-7	18,7 ± 0,2	9,2 ± 0,1	17,9 ± 0,2	23,5 ± 1,0	20,0 ± 0,2	16,2 ± 0,2	12,7 ± 0,4	10,8 ± 0,2	18,9 ± 0,8	23,5 ± 0,3
Hs578T	16,4 ± 0,2	10,2 ± 0,4	21,2 ± 1,8	19,8 ± 0,4	17,2 ± 0,5	17,5 ± 0,8	17,6 ± 1,1	13,6 ± 0,5	0	23,6 ± 0,9
T47-D	17,9 ± 0,6	10,0 ± 0,5	17,9 ± 0,9	20,6 ± 0,6	24,4 ± 0,7	14,2 ± 0,4	11,9 ± 0,6	13,7 ± 0,5	16,3 ± 0,7	21,5 ± 0,2
MDA-MB	17,9 ± 0,2	8,6 ± 0,2	21,4 ± 0,3	18,9 ± 0,9	24,4 ± 0,5	14,7 ± 0,7	13,8 ± 0,1	13,1 ± 0,2	15,6 ± 1,3	22,5 ± 1,3
SK-BR-3	17,2 ± 0,2	9,6 ± 0,1	16,0 ± 0,1	0	21,4 ± 0,5	15,8 ± 0,4	12,2 ± 0,2	11,0 ± 0,2	22,6 ± 0,2	22,2 ± 1,3
PC-3	15,9 ± 0,8	8,9 ± 0,5	20,2 ± 1,6	20,2 ± 0,4	18,6 ± 0,3	15,9 ± 0,6	12,5 ± 0,6	11,9 ± 0,6	22,8 ± 0,7	19,8 ± 1,5
LNCaP	17,0 ± 0,3	9,4 ± 0,5	22,8 ± 0,6	24,5 ± 0,1	0	0	13,2 ± 0,5	12,5 ± 0,3	0	0
DU145	17,7 ± 0,4	9,7 ± 0,1	21,2 ± 0,9	21,8 ± 0,5	24,5 ± 0,8	13,9 ± 0,3	12,4 ± 0,2	11,3 ± 0,3	14,5 ± 0,2	18,2 ± 0,6
Nieren	15,1 ± 1,0	9,3 ± 0,5	10,9 ± 0,7	17,9 ± 1,5	17,9 ± 1,4	11,5 ± 0,7	14,1 ± 0,9	11,0 ± 0,5	10,7 ± 0,7	9,2 ± 0,3
Leber	14,0 ± 0,7	9,8 ± 0,7	9,5 ± 0,7	20,3 ± 1,0	17,3 ± 1,0	11,5 ± 0,6	17,3 ± 0,8	9,8 ± 0,6	12,4 ± 0,9	23,9 ± 0,8
Colon	16,3 ± 0,3	11,0 ± 0,3	14,0 ± 0,5	10,8 ± 0,2	18,9 ± 0,5	13,5 ± 0,3	16,7 ± 0,4	13,7 ± 0,3	19,1 ± 0,7	21,4 ± 0,8

Mammakarz.

Prostatakarz.

Referenzgew.

Zelllinie	SLCO-Familie									
	OATP1A2	SLCO2A1	SLCO3A1	SLCO4A1	SLCO1B1	SLCO1B3	SLCO2B1	SLCO1C1		
BT549	0	11,6 ± 0,6	14,8 ± 0,2	13,3 ± 0,1	21,9 ± 0,4	22,6 ± 0,3	23,8 ± 0,2	0		
MCF-7	26,2 ± 1,9	14,8 ± 0,2	15,1 ± 0,3	16,0 ± 0,7	26,2 ± 0,4	0	22,9 ± 0,6	0		
Hs578T	20,1 ± 0,4	11,9 ± 0,1	15,2 ± 0,1	19,0 ± 0,2	21,2 ± 0,6	16,6 ± 0,3	20,7 ± 1,0	20,7 ± 0,4		
T47-D	19,2 ± 0,4	14,5 ± 0,2	21,0 ± 0,4	18,3 ± 0,5	14,9 ± 0,7	26,1 ± 1,2	0	0		
MDA-MB	21,4 ± 0,2	16,1 ± 2,3	16,8 ± 0,1	19,2 ± 2,1	20,8 ± 1,6	15,1 ± 1,6	21,4 ± 1,6	0		
SK-BR-3	20,1 ± 0,3	13,7 ± 0,1	17,9 ± 0,1	16,2 ± 0,1	19,1 ± 0,4	24,8 ± 0,6	22,9 ± 0,2	0		
PC-3	23,3 ± 0,4	18,2 ± 0,5	16,4 ± 0,1	10,1 ± 0,2	16,9 ± 0,6	10,8 ± 0,3	0	23,5 ± 0,9		
LNCaP	25,3 ± 1,4	15,3 ± 0,5	26,6 ± 0,6	15,2 ± 0,4	21,1 ± 0,5	23,2 ± 1,0	0	0		
DU145	0	11,9 ± 0,5	0	12,4 ± 0,1	19,8 ± 1,6	13,7 ± 0,9	17,6 ± 0,5	0		
Nieren	16,4 ± 1,2	8,3 ± 0,2	14,7 ± 0,8	11,7 ± 0,5	18,9 ± 1,8	14,8 ± 0,8	9,9 ± 0,4	18,0 ± 1,4		
Leber	17,6 ± 0,8	12,1 ± 0,6	15,9 ± 0,7	13,1 ± 0,7	9,0 ± 0,5	13,0 ± 0,6	8,5 ± 0,5	22,2 ± 0,7		
Colon	22,1 ± 0,4	11,2 ± 0,2	17,9 ± 0,4	15,4 ± 0,4	26,7 ± 1,5	20,9 ± 0,7	12,3 ± 0,4	22,7 ± 0,7		

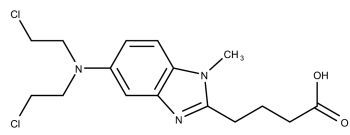
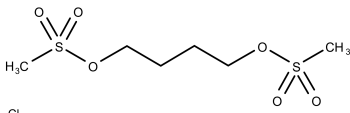
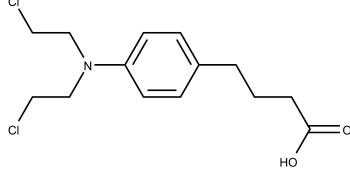
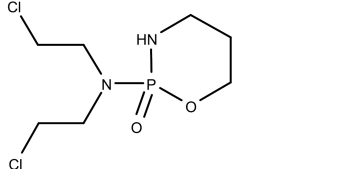
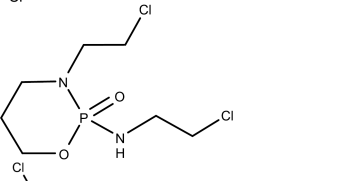
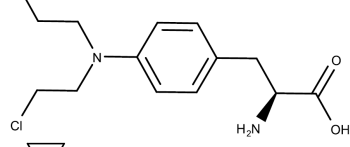

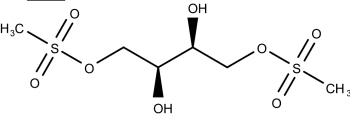
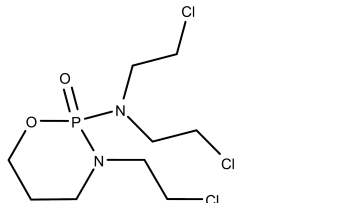
Mammakarz.

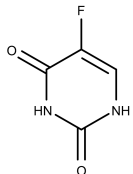
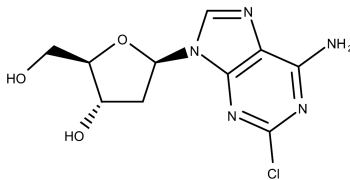
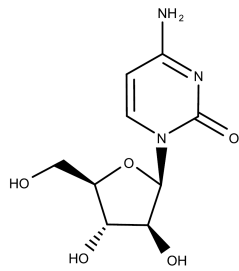
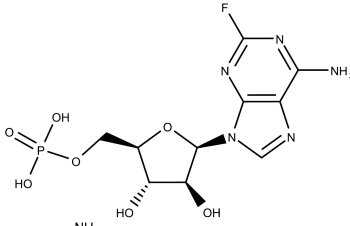
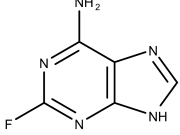
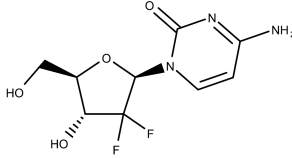
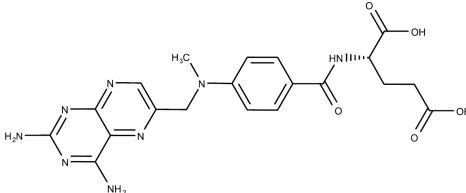
Prostatakarz.

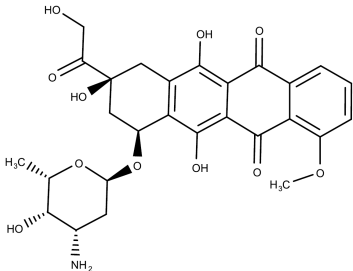
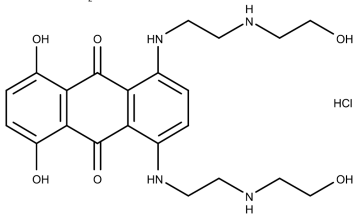
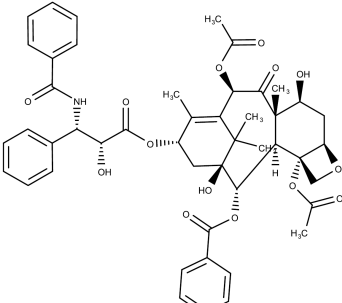
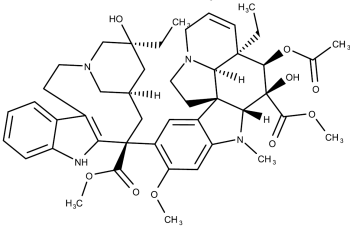
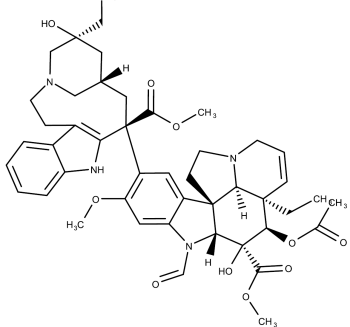
Referenzgew.

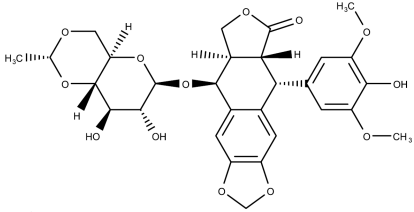
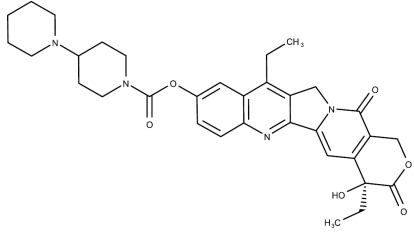
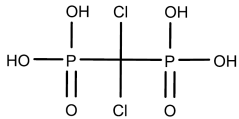
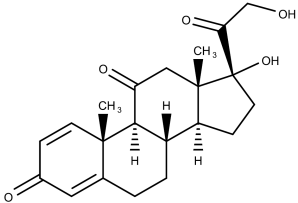
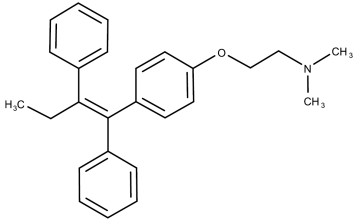
Strukturen der verwendeten Zytostatika

Tabelle 17: Physikochemische Parameter der in dieser Arbeit verwendeten Substanzen.

Substanz	Struktur	Molekulargewicht	LogP	Ladung bei pH 7,4
Alkylantien				
Bendamustin		358,3	2,51	0 (99,2 %)
Busulfan		246,3	-0,76	0
Chlorambucil		304,2	3,94	-1 (99,8 %)
Cyclophosphamid		279,1	0,10	0 (100 %)
Ifosfamid		261,1	0,10	0 (100 %)
Melphalan		305,2	2,51	0 (100 %)
ThioTEPA		189,2	-1,03	0 (100 %)
Treosulfan		278,3	-2,60	0 (100 %)
Trofosfamid		323,6	0,98	0 (100 %)

Substanz	Struktur	Molekulargewicht	LogP	Ladung bei pH 7,4
Antimetabolite				
5-Fluorouracil		130,1	-0,66	0 (69,7 %)
Cladribin		285,7	-0,28	0 (100 %)
Cytosinarabinosid		243,2	-2,80	0 (100 %)
Fludarabin		365,2	-1,47	0 (100 %)
Fluoroadenin		153,1	0,05	0 (99,8 %)
Gemcitabin		263,2	-1,47	0 (99,9 %)
Methotrexat		454,4	0X	-2 (99,9 %)

Substanz	Struktur	Molekulargewicht	LogP	Ladung bei pH 7,4
Interkalantien				
Doxorubicin		543,5	1,50	+1 (79,5 %)
Mitoxantron		444,5	1,75	+2 (85,9 %)
Mitose-Inhibitoren				
Paclitaxel		853,9	3,54	0 (99,5 %)
Vinblastin		811,0	4,18	+2 (87,4 %)
Vincristin		825,0	3,13	+2 (79,9 %)

Substanz	Struktur	Molekulargewicht	LogP	Ladung bei pH 7,4
Topoisomerase-Inhibitoren				
Etoposid		588,6	1,16	0 (98,8 %)
Irinotekan		586,7	2,78	+1 (99,1 %)
Adjuvantien				
Clodronsäure		244,9		X
Prednison		358,4	1,30	0 (100 %)
Tamoxifen		371,5	6,35	+1 (95,8 %)

Liste der verwendeten Reagenzien

Tabelle 18: In der vorliegenden Arbeit verwendete Substanzen mit Angabe der Bezugsfirma

Zellkultur	
PBS	AppliChem
RPMI 1640	AppliChem
DMEM	PAN
bovines Insulin	Sigma-Aldrich
Pen/Strep	Biochrom
Trypsin/EDTA	Biochrom
FKS	Biochrom
Proteinbestimmung	
Serva Blue G	Serva Electrophoresis GmbH
Ehtanol (96 %)	Carl Roth
Phosphorsäure (85 %)	Carl Roth
Transportversuche	
Ammoniumchlorid	Sigma-Aldrich
BSP	Sigma-Aldrich
CCK-8	Sigma-Aldrich
Cimetidin	Sigma-Aldrich
Citrat	Sigma-Aldrich
Gly-Sar	Sigma-Aldrich
HBSS	Biochrom
HEPES	Biochrom
L-Carnitin	Sigma-Aldrich
Losartan	Sigma-Aldrich
MPP ⁺	Sigma-Aldrich
Natriumhydroxid	Carl Roth
radioaktiv markierte Substanzen	PerkinElmer
Rifampicin	Sigma-Aldrich
Ringer-Lsg.	AppliChem
Rotizint eco plus	Carl Roth
Tyr-Phe	Sigma-Aldrich
Verapamil	Sigma-Aldrich

Zytostatika

5-Fluorouracil	Sigma-Aldrich
Bendamustin	Sigma-Aldrich
Busulfan	Sigma-Aldrich
Chlorambucil	Sigma-Aldrich
Cladribin	Sigma-Aldrich
Clodronsäure	Infusions-Lsg. der Apotheke der UMG
Cyclophosphamid	Infusions-Lsg. der Apotheke der UMG
Cytosinarabinosid	Infusions-Lsg. der Apotheke der UMG
Doxorubicin	Sigma-Aldrich
Etoposid	Infusions-Lsg. der Apotheke der UMG
Fludarabin	Infusions-Lsg. der Apotheke der UMG
Fluoroadenin	Sigma-Aldrich
Gemcitabin	Sigma-Aldrich
Ifosfamid	Sigma-Aldrich
Irinotekan	TCI
Melphalan	Sigma-Aldrich
Methotrexat	TCI
Mitoxantron	Sigma-Aldrich
Paclitaxel	Infusions-Lsg. der Apotheke der UMG
Prednison	Sigma-Aldrich
Tamoxifen	Sigma-Aldrich
ThioTEPA	Infusions-Lsg. der Apotheke der UMG
Treosulfan	Sigma-Aldrich
Trofosfamid	Infusions-Lsg. der Apotheke der UMG
Vinblastin	Sigma-Aldrich
Vincristin	Sigma-Aldrich

Expressionsanalyse

2x AssayLoading Reagent	Fluidigm
20x GE Sample Loading Reagent	Fluidigm
dNTPs	AppliChem
Oligo-dT-Primer	Eurofins
RNeasy Mini Kit	Qiagen
SuperScript II	InVitrogen
TaqMan Fast Universal PCR Master Mix	Life Technologies
TaqMan-Primer	InVitrogen

Liste der verwendeten Geräte

Tabelle 19: Liste der in der Arbeit verwendeten Geräte mit Angabe der Herstellerfirma

Gerät	Firma	Modell
Photometer	Pharmacia Biotech	GeneQuant II
Photometer	Berthold Technologies	Mithras LB 940
Mikroskop	Zeiss	Telaval 31
Zentrifuge	Heraeus	Megafuge 40R
Zentrifuge	Heraeus	Biofuge fresco
Werkbank	Thermo Fisher	Safe 2020
Inkubator	Heraeus	Typ BB 16
Wasserbad	GFL	Typ 1083
Thermocycler	BioRad	C1000
Szintillations Counter	Perkin Elmer	TriCarb2810TR
pH-Meter	WTW	intoLab Level 2
Feinwaage	Sartorius	2002 MPI
qPCR Thermocycler	Agilent	Stratagene Mx3000P
Chip-PCR	Fluidigm	BioMarkHD
Chip-Präparator	Fluidigm	IFC Controller MX