Aus dem Institut für Klinische Pharmakologie
(Prof. Dr. med. J. Brockmöller)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Membrantransport von Substanzen mit ZNS-Wirkungen oder Nebenwirkungen über organische Kationentransporter

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
für Zahnmedizin
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Nicolai Kirsch

aus

Vlissingen

Göttingen 2024

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

Betreuungsausschuss

Betreuer*in: Prof. Dr. med. J. Brockmöller

Ko-Betreuer*in: Prof. Dr. med. J. Staiger

Prüfungskommission

Referent*in: Prof. Dr. med. J. Brockmöller

Ko-Referent*in: ..……..

Drittreferent*in: …..……..

Datum der mündlichen Prüfung: ……

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel „Membrantransport von Substanzen mit ZNS-Wirkungen oder Nebenwirkungen über organische Kationentransporter“ eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den …… ……

(Unterschrift)

Die Daten, auf denen die vorliegende Arbeit basiert, wurden teilweise publiziert:

Ali Khan C, **Kirsch N**, Brockmöller J, Redeker K (2024): An extended substrate spectrum of the proton organic cation antiporter and relation to other cation transporters. Basic Clin Pharmacol Toxicol (im Druck)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis ..... **III**

Tabellenverzeichnis ..... **IV**

Abkürzungsverzeichnis ..... **V**

1 Einleitung **1**

1.1 Entdeckung der Blut-Hirn-Schranke und anatomischer Aufbau 1

1.2 Transportmechanismen in den Zellen der Blut-Hirn-Schranke 3

1.3 Substanzen und Medikamente, die die Blut-Hirn-Schranke passieren 5

1.4 Chemische Charakteristika von Substanzen mit Bedeutung für die Überwindung der Blut-Hirn-Schranke 6

1.5 Bekannte Transportproteine für organische Kationen 7

1.5.1 OCT3 (SLC22A3) 9

1.5.2 OCTN1 (SLC22A4) 10

1.5.3 OCTN2 (SLC22A5) 11

1.5.4 MATE1 (SLC47A1) 11

1.5.5 MATE2-K (SLC47A2) 12

1.5.6 SLC35G3 13

1.6 Noch unbekannt: Der Protonen-Organische-Kationen-Antiporter 13

1.7 Untersuchte Substanzen 14

1.8 Zielsetzung 16

2 Material und Methoden **17**

2.1 Verwendete Materialien 17

2.2 Zellkultur 24

2.2.1 Generelle Zellkulturbedingungen 24

2.2.2 Einfrieren der Zellen 24

2.2.3 Auftauen der Zellen 25

2.2.4 Stabile Transfektion der HEK293 T-Rex Zellen 25

2.3 Transportexperimente 28

2.3.1 Transportexperimente für eine Standardkonzentration an OCT3, OCTN1, OCTN2 und SLC35G3 28

2.3.2 Transportexperimente für eine Standardkonzentration an MATE1 und MATE2-K 29

2.3.3 Konzentrationsabhängige Transportexperimente an OCT3, OCTN1, OCTN2 und SLC35G3 30

2.3.4 Konzentrationsabhängige Transportexperimente an MATE1 und MATE2-K 30

2.3.5 Vorbereiten der Proben für die Massenspektrometrie 31

2.3.6 HPLC-MS/MS 31

2.4 Proteinquantifizierung 36

2.5 Datenanalyse 37

2.6 Statistische Darstellung und statistische Vergleiche 38

3 Ergebnisse **40**

3.1 OCT3 40

3.2 OCTN1 ... 44
3.3 OCTN2 ... 46
3.4 MATE1 ... 48
3.5 MATE2-K ... 52
3.6 SLC35G3 ... 57
3.7 Vergleich der Transportproteine ... 61
4 Diskussion ... 63
4.1 Vergleich der Substrate mit zuvor publizierten Daten ... 63
4.1.1 OCT3 ... 63
4.1.2 OCTN1 ... 65
4.1.3 OCTN2 ... 67
4.1.4 MATE1 ... 70
4.1.5 MATE2-K ... 72
4.1.6 SLC35G3 ... 73
4.2 Vergleich der chemischen Struktur und anderer chemischer Eigenschaften ... 74
4.3 Vergleich mit der Transportaktivität an hCMEC Zellen ... 79
4.4 Limitationen und Ausblick ... 82
5 Zusammenfassung ... 85
6 Literaturverzeichnis ... 87

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Blut-Hirn-Schranke. 2
Abbildung 2: Schematische Darstellung der verschiedenen Transportmechanismen. 4
Abbildung 3: Schema der stabilen Transfektion. 26
Abbildung 4: Transportablauf für OCTN1, OCTN2, OCT3 und 35G3. 29
Abbildung 5: Transportablauf für MATE1 und MATE2-K. 30
Abbildung 6: HPLC-MS/MS-Analyse. 31
Abbildung 7: Proteinquantifizierung. 37
Abbildung 8: Transportraten der 102 Substanzen durch OCT3. 41
Abbildung 9: Konzentrationsabhängige Transportexperimente an OCT3. 43
Abbildung 10: Transportraten der 102 Substanzen durch OCTN1. 45
Abbildung 11: Transportraten der 102 Substanzen durch OCTN2. 47
Abbildung 12: Transportraten der 102 Substanzen durch MATE1. 49
Abbildung 13: Konzentrationsabhängige Transportexperimente an MATE1. 51
Abbildung 14: Transportraten der 102 Substanzen durch MATE2-K. 53
Abbildung 15: Konzentrationsabhängige Transportexperimente an MATE2-K. 55
Abbildung 16: Transportraten der 102 Substanzen durch SLC35G3. 58
Abbildung 17: Konzentrationsabhängige Transportexperimente an SLC35G3. 60
Abbildung 18: Gegenüberstellung der Ergebnisse der jeweiligen Transportproteine. 62
Abbildung 19: Chemische Eigenschaften der Substrate. 78
Abbildung 20: Vergleich der Transportaktivitäten mit denen der hCMEC Zelllinie. 81

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Substanzen, die die Blut-Hirn-Schranke überwinden 6
Tabelle 2: Übersicht der Transportproteine 9
Tabelle 3: Untersuchte Substanzen sortiert nach Medikamentengruppen 14
Tabelle 4: Verwendete Zelllinien 17
Tabelle 5: Verwendete Chemikalien 18
Tabelle 6: Verwendete Substanzen 18
Tabelle 7: Verwendete Verbrauchsmaterialien 21
Tabelle 8: Verwendetes Instrumentarium 22
Tabelle 9: Verwendete Puffer, Medien und Lösungen 23
Tabelle 10: Verwendete Softwares 24
Tabelle 11: MS Parameter für alle Substanzen 32
Tabelle 12: Gute und schlechte Substrate von OCT3 mit Ratio und P-Wert. 42
Tabelle 13: Kinetische Parameter für ausgewählte Substrate des Transportprotein OCT3. 44
Tabelle 14: Gute und schlechte Substrate von OCTN1 mit Ratio und P-Wert. 46
Tabelle 15: Gute und schlechte Substrate von OCTN2 mit Ratio und P-Wert. 48
Tabelle 16: Gute und schlechte Substrate von MATE1 mit Ratio und P-Wert 50
Tabelle 17: Kinetische Parameter für ausgewählte Substrate des Transportproteins MATE1 . 52
Tabelle 18: Gute und schlechte Substrate von MATE2-K mit Ratio und P-Wert. 54
Tabelle 19: Kinetische Parameter für ausgewählte Substrate von MATE2-K 56
Tabelle 20: Gute und schlechte Substrate von SLC35G3 mit Ratio und P-Wert. 59
Tabelle 21: Kinetische Parameter für ausgewählte Substrate von SLC35G3. 61
Tabelle 22: Überschneidungen der Substrate zwischen den Transportproteinen. 62
Tabelle 23: Bekannte Substrate von OCT3. 65
Tabelle 24: Bekannte Substrate von OCTN1 66
Tabelle 25: Substrate von OCTN2. 67
Tabelle 26: Diskrepanzen in der Literatur für die Substrate von OCTN1 und OCTN2 69
Tabelle 27: Substrate von MATE1. 70
Tabelle 28: Substrate von MATE2-K. 72
Tabelle 29: Diskrepanzen in der Literatur für die Substrate von MATE1 und MATE2-K 73
Tabelle 30: Substrate von SLC35G3 74
Tabelle 31: Strukturformeln der drei besten Substrate je Transportprotein. 76
Tabelle 32: Vergleich der Substrate, zu denen des untersuchten Antiporters 82

Abkürzungsverzeichnis

ABC-Transporter	ATP-bindende-Kassetten-Transporter
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	*bicinchoninic acid solution*
DMEM	*Dulbecco's Modified Eagle Medium*
FKS	Fetales Kälberserum
HBSS	*Hank's Balanced Salt Solution*
hCMEC	*human cortical microvessels endothelial cells*
HEK	*human embryonic kidney*
HPLC-MS/MS	*high performance liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry*
MATE	*multidrug and toxin compound extrusion-Transporter*
OCT 1-3	Organische Kationentransporter 1-3
OCT6	Organischer Kationentransporter
OCTN1	Neue organische Kationentransporter 1
OCTN2	Neue organische Kationentransporter 2
RIPA	*radio-immunoprecipitation assay*
SLC22	Solute-Carrier-22-Familie
SLC35	Solute-Carrier-35-Familie
SLC47	Solute-Carrier-47-Familie
SLC-Transporter	Solute-Carrier-Transporter
ZNS	Zentralnervensystem

1 Einleitung

Medikamente und andere endogene und exogene Substanzen gelangen vom Blut nicht ohne weiteres ins Gehirn. Sofern Medikamente oder andere Substanzen in das Gehirn gelangen, müssen sie die Blut-Hirn-Schranke überwinden (Pardridge 2012). Bei dieser handelt es sich um eine Barriere zwischen dem Blut und dem Gehirn, welche sich durch Fehlen der interzellulären Poren und vermehrte Expression von Zell-Zell-Kontakten darstellt (Abbott et al. 2010). Durch die anatomischen Gegebenheiten der Blut-Hirn-Schranke müssen Moleküle, um effizient ins Gehirn zu gelangen, durch die Zellmembranen der Endothelzellen der hirnversorgenden Blutgefäße gelangen. Hier existieren unterschiedliche Möglichkeiten. Zu diesen zählen neben der Diffusion auch der carrier- oder rezeptorvermittelte Transport (Pardridge 2012). Die freie Diffusion spielt vor allem für ungeladene, lipophile Moleküle eine Rolle, welche ein geringere Molekülmasse aufweisen (Veber et al. 2002). Über einen Großteil der organischen Kationen ist bisher lediglich bekannt, dass sie nicht nur mittels einfacher Diffusion über die Blut-Hirn-Schranke gelangen. So wurde der Transport über die *human Cortical Microvessels Endothelial Cells* (hCMEC) Zelllinie für mehr als 200 Substanzen erforscht, die vermittelnden Transportproteine bisher jedoch nicht identifiziert.

1.1 Entdeckung der Blut-Hirn-Schranke und anatomischer Aufbau

Als Blut-Hirn-Schranke wird die Barriere zwischen dem Blut und dem Zentralnervensystem (ZNS) beschrieben. Diese Schranke regelt den Transfer von Substanzen zwischen dem Blut und dem ZNS und dient somit sowohl dem Schutz vor Toxinen, als auch dem Erhalt der regulären neuronalen Funktionen (Daneman und Prat 2015). Zur Gewährleistung einer adäquaten Versorgung des Gehirns werden in dieser Barriere spezifische Transportsysteme exprimiert (Abbott et al. 2010). Die ersten experimentellen Belege der Blut-Hirn-Schranke sind auf Paul Ehrlich zurückzuführen (1885). Für die Studie des Sauerstoffbedarfes des Organismus injizierte er in Tierexperimenten verschiedene wasserlösliche Farbstoffe in die Peripherie lebender Tiere. Durch die Verteilung des Farbstoffes mit Hilfe des Blutkreislaufs zeigte sich eine Anfärbung aller Organe mit Ausnahme des Gehirns und des Rückenmarks. Ehrlich selbst schloss jedoch auf Grundlage dieser Ergebnisse noch nicht explizit auf das Bestehen einer Barriere zwischen Blutkreislauf und Gehirn bzw. Rückenmark. Erst 1913 wurden weitere Forschungsergebnisse seines Schülers Edwin Goldmann veröffentlicht. Dieser injizierte den Farbstoff direkt in die Zerebrospinalflüssigkeit. Es zeigte sich hierbei ein umgekehrtes Bild im Gegensatz zu Ehrlichs Versuchen zuvor (Hawkins und Davis 2005). So färbte der Farbstoff die Zellen des Gehirns und nicht die Zellen der Peripherie an. Zusammengenommen ließ die Betrachtung der beiden Forschungsergebnisse auf das Bestehen einer Barriere zwischen peripherem Kreislauf und dem ZNS schließen (Hawkins und Davis 2005). Im Jahr 1967 wurde noch weiter die Existenz der Bluthirnschranke

untermauert. Den hierfür nötigen Beweis lieferten Reese und Karnovsky, indem sie Meerrettichperoxidase in die Schwanzvenen adulter Mäuse injizierten (1967) . Im Anschluss ermöglichte ihnen ihre Methodik die Visualisierung der Peroxidase im Elektronenmikroskop. Hierbei konnten sie keine extravaskuläre Anreicherung der Peroxidase im Gehirn detektieren. Diese Erkenntnis sahen sie als Beweis für die Existenz einer Blut-Hirn-Schranke. Des Weiteren wurde hiermit die Bedeutung der Endothelzellen für die Blut-Hirn-Schranke bewiesen (Reese und Karnovsky 1967). Diese bilden die Tight Junctions, (Sofroniew und Vinters 2010), welche die Ursache für die Einschränkung des parazellulären Diffusionswegs sind. Auf diese Weise wird nicht nur das Eindringen von Ionen und anderen polaren gelösten Stoffen reduziert, sondern auch das Eindringen von Makromolekülen (Abbott et al. 2006). Weitere wichtige Bestandteile der Blut-Hirn-Schranke sind die Basallamina, welche die Endothelzellen umgibt, sowie die zu den zellulären Bestandteilen zählenden perivaskulären Perizyten, die Fortsätze der Astrozyten und die Mikroglia (Lochhead et al. 2020). Zur besseren Veranschaulichung des anatomischen Aufbaus der Blut-Hirn-Schranke verweise ich an dieser Stelle auf die folgende Abbildung 1.

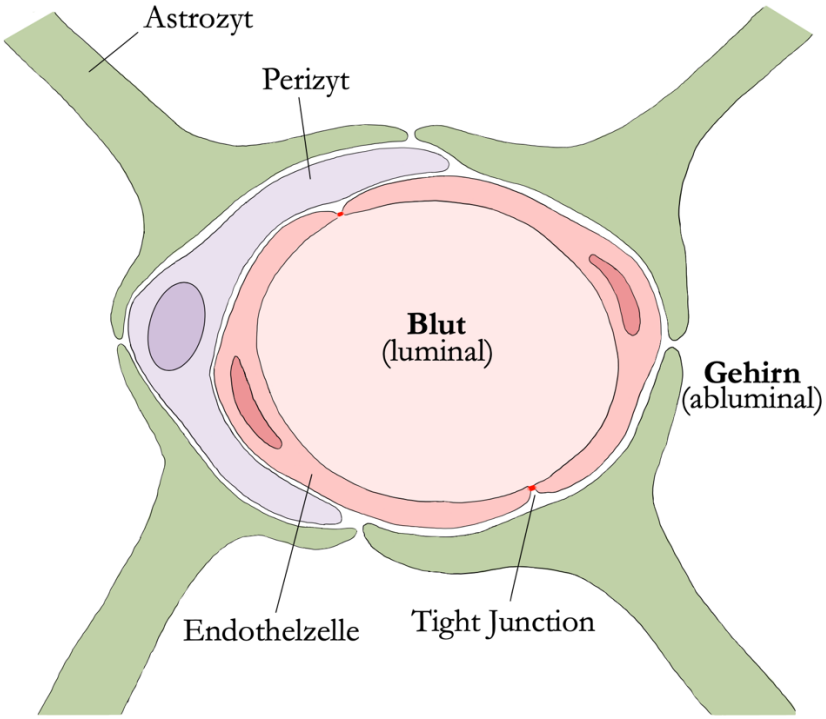

Abbildung 1: Blut-Hirn-Schranke. Die Blut-Hirn-Schranke setzt sich aus den Endothelzellen zusammen (Reese und Karnovsky 1967), welche die Tight Junctions ausbilden (Sofroniew und Vinters 2010). Weitere Bausteine sind Astrozyten und Perizyten (Lochhead et al. 2020). Gemeinsam bilden sie eine Barriere zwischen Blut und ZNS (Daneman und Prat 2015). Die Abbildung basiert auf Neumaier (2021).

Die Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke unterscheiden sich von anderen im Körper vorkommenden Endothelzellen. So zeichnen sie sich durch ihre besonders flache Form und die starke Expression inter-zellulärer Tight Junctions aus (Kadry et al. 2020). Die Zellmembran besteht aus einer Lipiddoppelschicht, welche neben den Lipiden auch Proteine wie Transportproteine enthält (Simons und Sampaio 2011).

Ein anderer Zelltyp im Gehirn, die Astrozyten, machen den größten Anteil der im ZNS vorkommenden Zellen aus (Kadry et al. 2020). Ihre Rolle bezogen auf die Funktion der Blut-Hirn-Schranke ist umstritten (Sofroniew und Vinters 2010). In-vitro-Beweise legen jedoch nahe, dass sie in der Lage sind, Barriereeigenschaften zerebraler Endothelzellen zu induzieren. Diese Ergebnisse sprechen für Teilnahme der Astrozyten an der Induktion der Blut-Hirn-Schranke (Sofroniew und Vinters 2010).

Als ein weiterer zellulärer Bestandteil spielen die Perizyten eine entscheidende Rolle für die Aufrechterhaltung der Integrität der Blut-Hirn-Schranke (Armulik et al. 2011). Durch ihre kontraktilen Eigenschaften (Kadry et al. 2020) sind sie außerdem in der Regulation des Kapillardurchmessers und des zerebralen Blutflusses involviert (Hall et al. 2014).

1.2 Transportmechanismen in den Zellen der Blut-Hirn-Schranke

Die Blut-Hirn-Schranke stellt ein komplexes System dar, welches sich durch seine selektive Permeabilität auszeichnet (Patel und Patel 2017). Einem Großteil der Medikamente und Substanzen wird durch die Blut-Hirn-Schranke der Zugang zum Gehirn verwehrt (Pardridge 2012). Resultierend aus den anatomischen Gegebenheiten, bietet die Blut-Hirn-Schranke nur eingeschränkte Passagemöglichkeiten für Moleküle. Zu diesen gehört unter anderem die freie Diffusion und der carrier- oder rezeptorvermittelte Transport (Pardridge 2012).

Grundsätzlich lassen sich verschiedene Transportmechanismen differenzieren Abbildung 2. Die einfache Diffusion lässt sich von der erleichterten Diffusion unterscheiden, welche durch Membrankanäle oder Membrantransportproteine vermittelt wird. Eine Unterform des über Membrantransportproteine vermittelten Transportes ist der nur in eine Richtung gehende Uniport. Andere Formen sind der gemeinsame Transport (Symport) von mehreren Substanzen und der Austauschtransport (Antiport). Eine große weitere Gruppe von Membrantransportern vermittelt den ATP-abhängigen primär aktiven Transport. Diese Gruppe stellen die ATP-bindenden-Kassetten-Transporter (ABC-Transporter) dar (Cocucci et al. 2017).

Die Transzytose besteht aus den Vorgängen der Endozytose und Exozytose (Wu et al. 2014). Als diese werden Mechanismen bezeichnet, bei welchen unter Ausbildung kleiner Membranvesikel, verschiedene Frachtmoleküle transferiert werden (Kaksonen und Roux 2018). Über diesen Transportweg können auch Makromoleküle wie Proteine oder sogar Viren über Membranen transportiert werden (Knyazev et al. 2021).

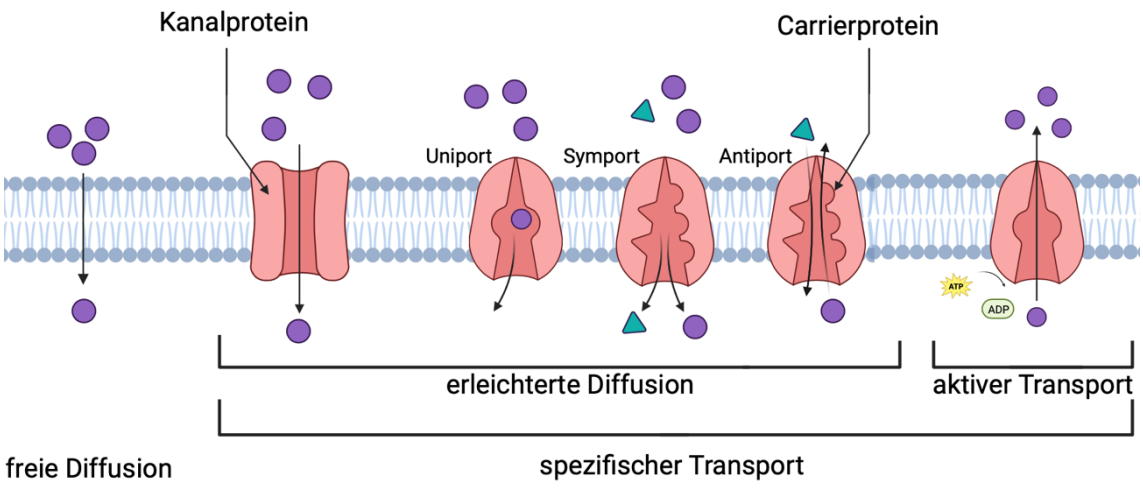

Abbildung 2: Schematische Darstellung der verschiedenen Transportmechanismen. Neben der freien Diffusion existiert der spezifische Transport, welcher sowohl die erleichterte Diffusion, als auch den aktiven Transport umfasst. In Blick auf die erleichterte Diffusion wird zwischen der kanalvermittelten Diffusion und der carriervermittelte Diffusion differenziert (Cocucci et al. 2017). Des Weiteren unterscheidet man Uniport, Symport und Antiport Cocucci et al. 2017). Die Abbildung wurde mit BioRender.com erstellt.

Die passive Diffusion galt lange Zeit als Hauptmechanismus des intrazellulären Medikamententransports (Al-Awqati 1999). Einfluss auf die einfache Diffusion haben neben der Molekülmasse auch die Lipophilie, die molekulare Flexibilität und die Anzahl der Wasserstoffbrückenbindungsdonatoren. Mit Hilfe dieses Mechanismus gelangen überwiegend kleine, lipophile und ungeladene Moleküle (Veber et al. 2002), welche weniger als acht Wasserstoffbrücken aufweisen, über die Zellmembran (Pardridge 2012). Durch diese Einschränkungen spielt die einfache Diffusion nur für eine begrenzte Anzahl an Substanzen eine Rolle (Pardridge 2012). Substanzen, die teilweise positiv oder negativ geladen sind, können in Form des ungeladenen Anteils über Membranen diffundieren, dies wird als nichtionische Diffusion bezeichnet. Als Beispiele für Substanzen, welche mittels einfacher Diffusion über die Blut-Hirn-Schranke gelangen, sind Sauerstoff sowie Kohlenstoffdioxid anzuführen (Pandit et al. 2020), sowie weitere Substanzen mit einer Molekülmasse von vorwiegend unter 400 Dalton (Pardridge 2012).

In den vergangenen Jahren wird dem carriervermitteltem Transport eine größere Rolle zugesprochen (Cocucci et al. 2017). Der durch Carrier vermittelte Transport ermöglicht die gesteuerte Selektivität der Zellmembranen (Giacomini et al. 2010). Die Membranproteine stellen einen wichtigen Baustein für den spezifischen Transport verschiedenster endogener und exogener Moleküle dar (Cocucci et al. 2017). Die Solute-Carrier-Transporter (SLC-Transporter), für welche mehr als 400 Membrantransporter-Gene codieren, stellen die größte Gruppe von Transportproteinen (Nigam 2015). SLC-Transporter arbeiten unabhängig von Adenosintriphosphat (ATP)- Hydrolyse und können sowohl als Uniporter und Symporter, als auch als Antiporter auftreten (Cocucci et al. 2017). Hauptsächlich, jedoch nicht ausschließlich, fungieren sie als Aufnahmetransporter für kleinere Moleküle (Nigam 2015). Die Konzepte, wie Membrantransport über die SLC-Proteine funktioniert, basierten lange Zeit auf Analogieschlüssen zu anderen Transportproteinen oder rein hypothetischen Ideen.

Experimentelle Verfahren, um die Struktur und Funktion von Membrantransportern zu untersuchen, sind die Kristallographie und die Kryoelektronenmikroskopie (Khanppnavar et al. 2022). Letztere hat in den letzten Jahren zu einem deutlichen Fortschritt in der Aufklärung von Struktur und Funktion einiger Kationentransporter beigetragen (Meyer-Tönnies und Tzvetkov 2023).

Eine weitere Gruppe bilden die ABC-Transporter, welche eine der größten Gruppen der Membranproteine bilden (Theodoulou und Kerr 2015). Sie fungieren überwiegend als Exporter (Locher 2009) und zählen zu den primär aktiven Transportern (Zolnerciks et al. 2011). Ihr Mechanismus basiert auf der Nutzung einer ATP-Hydrolyse (Nigam 2015). Sie weisen ein breites Funktionsspektrum auf (Beis 2015).

Neben dem primär aktiven Transport existiert im menschlichen Organismus auch ein sekundär aktiver Transport. In diesem Fall wird als Energiequelle zunächst ein elektrochemisches Gefälle, durch separate Mechanismen, mittels ATP verbrauch erzeugt (Forrest et al. 2011). Die von den Carriern zu unterscheidenden Transportkanäle sind teilweise sogar in der Lage als Enzyme eine hochaffine Aufnahme zu vermitteln. Sie dienen dem Transport von Ionen entlang einem elektrochemischen Gradienten. Sie öffnen sich großenteils als Reaktion auf spezifische Öffnungssignale (Conde et al. 2010).

1.3 Substanzen und Medikamente, die die Blut-Hirn-Schranke passieren

Neben den vielen neurotoxischen Substanzen, welche durch die Blut-Hirn-Schranke am Eindringen in das ZNS gehindert werden (Abbott et al. 2010), gibt es eine Vielzahl an Substanzen welche diese überwinden müssen (Campos-Bedolla et al. 2014). Zu diesen Substanzen gehören neben Nährstoffen (Abbott et al. 2010), wie Glukose, Aminosäuren, Vitaminen und Spurenelementen, auch Hormone (Campos-Bedolla et al. 2014). Ebenso ist für die Wirksamkeit vieler zentraler Medikamente die Fähigkeit diese zu überwinden essentiell (Vitorino et al. 2019). Es gibt jedoch auch Substanzen, zum Beispiel das Lokalanästhetikum Bupivacain, welche die Blut-Hirn-Schranke überwinden und Nebenwirkungen verursachen (Mather 2010). In Tabelle 1 sind beispielhaft einige Substanzen gelistet, welche die Blut-Hirn-Schranke passieren.

Tabelle 1: Substanzen, die die Blut-Hirn-Schranke überwinden

Substanzgruppen	Beispiele
Hormone	Stresshormone, Sexualhormone, Schilddrüsenhormone, Insulin (Banks 2012)
Zucker	Glukose, Mannose, Galaktose (Pardridge und Oldendorf 1975b)
Ionen	Magnesium, Kalzium, Zink (Campos-Bedolla et al. 2014)
Vitamine	Vitamin B1, Vitamin B5, Vitamin B7, Vitamin B9, Vitamin C (Campos-Bedolla et al. 2014)
Aminosäuren	Phanylalanin, Leucin, Tyrosin, Tryptophan (Pardridge und Oldendorf 1975a)
Stoffwechselprodukte	Laktat, Pyrovat (Cremer et al. 1979)
Opioide	Oxycodon, Hydrocodone, Hydromorphon, Morphin, Sufentanil (Trescot et al. 2008)
Allgemeinanästhetika	Ketamin (Zanos et al. 2018)
Antidepressiva	Paroxetin, Duloxetin, Desipramin, Imipramin, Amitriptylin (Sallee und Pollock 1990),
Lokalanästhetika	Lidocain, Mepivacain, Bupivacain, Ropivacain, Tetracain (Ferrari et al. 2010)

1.4 Chemische Charakteristika von Substanzen mit Bedeutung für die Überwindung der Blut-Hirn-Schranke

Die verschiedenen chemischen Charakteristika einer Substanz beeinflussen die Penetration der Blut-Hirn-Schranke. Die Molekülmasse stellt in diesem Hinblick ein wichtiges Kriterium dar (Banks 2009), sie wird gebildet aus den Atommassen aller Atome eines Moleküls. Die Maßeinheit der Molekülmasse ist das Dalton. Ein Dalton entspricht 1/12 der Masse des Kohlenstoff-Isotops ^{12}C. Eine niedrige Molekülmasse begünstigt die Überwindung der Blut-Hirn-Schranke mittels einfacher Diffusion (Banks 2009). Des Weiteren spielt die Lipophilie und Hydrophilie der Substanzen eine große Rolle, für ihre Fähigkeit die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden (Veber et al. 2002). Auch die Verteilung (Banks 2009) und Toxizität werden durch sie beeinflusst (Hughes et al. 2008). Die Lipophilie zeichnet sich durch die Affinität der Substanz zu apolaren Lösungsmitteln aus. Im Gegensatz dazu zeigen hydrophile Substanzen eine höhere Affinität zu polaren Lösungsmitteln wie zum Beispiel Wasser. Der Grad der Lipophilie, oder auch Hydrophilie einer Substanz, kann mittels dem logP dieser beziffert werden. Dieser Wert kann sowohl positiv, als auch negativ sein. Je größer ein positiver Wert ist, je höher ist die Lipophilie. Ein logP-Wert von -1 bedeutet ein Oktanol-Wasser-Verteilungsverhältnis einer Substanz von 1:10 (in Oktanol zu Wasser), ein logP Wert von 0 bedeutet ein Verhältnis von 1:1 und ein logP-Wert von 1 bedeutet ein Verhältnis von 10:1 (in Oktanol zu Wasser), also ist die Substanz zehnmal mehr im Oktanol gelöst. Je größer

ein positiver Wert ist, je höher ist die Lipophilie. Im Gegensatz dazu steht ein stark negativer Wert für eine höhere Hydrophilie der Substanz. Anders als der logP, welcher sich auf die neutrale Spezies einer Substanz bezieht, berücksichtigt der logD alle Formen der Substanz. Durch die pH-Wert abhängige Verschiebung der einzelnen Spezies ändert sich der logD in Abhängigkeit zum pH-Wert, wohingegen der logP pH-Wert unabhängig ist. Eine besondere Bedeutung kommt dem logD7,4 zu, da dieser die Lipophilie unter physiologischen Bedingungen des Blutplasmas widerspiegelt (Wang et al. 2023).

Neben dem pH-Wert ist für den Grad der Ionisierung einer Substanz der pK_S-Wert von Bedeutung (Wood 1952). Es handelt sich hierbei um eine dimensionslose Zahl, welche die Stärke einer Säure beschreibt. Für Basen wird der äquivalente pK_B-Wert verwendet. Auf Grund des Vorkommens von verschiedenen Flüssigkeiten und Geweben im menschlichen Körper, welche unterschiedliche pH-Werte aufweisen, lässt sich lediglich mittels dieser Werte die Ionisierung der Substanzen ermitteln (Gaohua et al. 2021). Substanzen lassen sich abhängig von ihrer Ladung als Kation oder Anion klassifizieren. Von einem Kation spricht man bei einer positiv geladenen Substanz, wohingegen man bei einer negativ geladenen Substanz von einem Anion spricht. Dabei orientiert man sich in der Regel an einem pH-Wert von 7,4, welcher dem physiologischen pH-Wert des menschlichen Blutes entspricht (Dueck et al. 2004). Zwitterionen besitzen sowohl positiv, als auch negativ geladene funktionelle Gruppen. Die Ladung der Substanzen hat Einfluss auf die Penetration der Blut-Hirn-Schranke. Ungeladene Substanzen gelangen besser mittels freier Diffusion durch die Zellmembran (Veber et al. 2002).

1.5 Bekannte Transportproteine für organische Kationen

Für den Transport gelöster Stoffe und Arzneimittel in Säugetierzellen spielen unter anderem die SLC-Transporter eine bedeutende Rolle (Wagner et al. 2016). Die Gruppe der SLC-Transporter umfasst mehr als 400 Membrantransporter-Gene (Nigam 2015) und stellt somit die größte Gruppe von Membrantransportern dar (Samodelov et al. 2020). Die SLC-Transporter sind maßgeblich beteiligt an bedeutenden physiologischen Vorgängen, wie der Aufnahme von Nährstoffen und dem Transport von Ionen (César-Razquin et al. 2015). Die Mitglieder der SLC-Superfamilie weisen eine große Variabilität in Hinblick auf ihre Struktur und Faltungen auf (Colas et al. 2016). 65 SLC Familien untergliedern die SLC-Superfamilie und sind kategorisiert von SLC1 bis hin zu SLC65 (Samodelov et al. 2020). Die einzelnen Transporter Familien umfassen verschiedene Subtypen, welche sich sowohl in ihren funktionellen Eigenschaften, ihrer Lokalisation und ihrer Regulation differenzieren (Koepsell 2011).

Die organischen Kationentransporter sind insbesondere Mitglieder der Solute-Carrier-22-Familie (SLC22) (Samodelov et al. 2020), welche sowohl organische Anionen Transporter, als auch organische Kationen Transporter umfasst (Hosoya und Tachikawa 2011). In dieser Familie wurden in Hinblick auf die jeweiligen Substrate sechs organische Kationen-

transporter kategorisiert (Samodelov et al. 2020). Die Gene SLC22A1, SLC22A2 und SLC22A3 kodieren die organischen Kationentransporter 1-3 (OCT 1-3). Die enge Lagebeziehung dieser Gene, welche auf dem sechsten menschlichen Chromosom zu finden sind, lässt die Vermutung zu, dass sie sich aus einem gemeinsamen Vorläufergen entwickelt haben könnten (Roth et al. 2012). Die neuen organischen Kationen Transporter 1 und 2 (OCTN1 und OCTN2) werden durch die Gene SLC22A4 und SLC22A5 kodiert. Ein weiteres Mitglied dieser Familie stellt der organische Kationentransporter 6 (OCT6) dar, welcher durch SLC22A16 kodiert wird (Koepsell 2013). Die OCTs transportieren eine große Bandbreite von Molekülen, welche positiv geladen sind und zählen daher zu den polyspezifischen Transportern (Samodelov et al. 2020). Im Gegensatz dazu werden die meisten Plasmamembranproteine als oligospezifisch charakterisiert, da sie ein schmaleres Molekülspektrum bedienen (Koepsell et al. 2007). Hauptsächlich vermittelt die OCT-Familie die zelluläre Aufnahme von Substraten (Koepsell 2011). Die meistens Na+ unabhängigen Transporter werden, in Hinblick auf ihre Aktivität, durch das Membranpotenzial der Plasmamembran gesteuert. Daraus resultiert die Möglichkeit, abhängig vom elektrochemischen Gradienten der Substrate, sowohl als Zufluss, als auch Abflusssystem zu fungieren (Samodelov et al. 2020). Die Transportproteine OCT3, OCTN1 und OCTN2 werden in dieser Arbeit genauer beleuchtet.

Eine weitere bekannte Gruppe der Transportproteine für organische Kationen stellen die *multidrug and toxin compound extrusion*-Transporter (MATE) dar (Krah et al. 2020), welche vorrangig am Ausfluss organischer Kationen aus den Zellen beteiligt sind (Staud et al. 2013). Sie gehören ebenfalls zur SLC-Superfamilie und bilden die Solut-Carrier-47-Familie (SLC47)(Pelis und Wright 2014). Mitglieder dieser Familie sind die Transporter MATE1, MATE2 (Masuda et al. 2006), MATE2-K sowie MATE2-B (Staud et al. 2013).

Es gibt viele weitere SLC-Familien mit Transportern, für welche die Substratspezifität und physiologische Funktion unbekannt ist (Hadley et al. 2019). Zu diesen gehört zum Beispiel das Transportprotein SLC35G3 (Sosicka et al. 2017).

Eine Übersicht über die Transportproteine, welche ich in dieser Arbeit behandle, liefert die Tabelle 2.

Tabelle 2: Übersicht der Transportproteine

SLC	Andere Namen	Lokalisation	Typische endogene Substrate	Literatur
SLC22A3	OCT3, extraneuraler Monoamintransporter	Nahezu gesamter Körper z.B. Niere, Plazenta, BHS	Epinephrin Histamin Acetylcholin, Ketamin, Amisulprid	(Roth et al. 2012), (Samodelov et al. 2020), (Koepsell 2020), (Geier et al. 2013), (Koepsell et al. 2007)
SLC22A4	OCTN1, Ergothionein Transporter	Nahezu gesamter Körper z.B. BHS, Niere, Darm	Ergothionein, Amisulprid	(Koepsell 2020), (Gründemann et al. 2005), (Kurosawa et al. 2018), (Samodelov et al. 2020)
SLC22A5	OCTN2, Carnitin Transporter	Nahezu gesamter Körper, z.B. Niere, Herz, BHS	Carnitin, Amisulprid	(Longo et al. 2016), (Samodelov et al. 2020), (Pereira et al. 2014), (Kurosawa et al. 2018), (Wu et al. 1999)
SLC47A1	MATE1	Niere, Leber, Skelettmuskel, BHS	Thiamin, Metformin, Acyclovir, Oxaliplatin	(Tanihara et al. 2007), (Otsuka et al. 2005), (Geier et al. 2013)
SLC47A2	MATE2-K	Niere, Gehirn, Hoden	Thiamin, Metformin, Acyclovir, Oxaliplatin	(Komatsu et al. 2011), (Tanihara et al. 2007)
SLC35G3	keine	unbekannt	unbekannt	(Sosicka et al. 2017)

1.5.1 OCT3 (SLC22A3)

Die ersten Beschreibungen und Charakterisierungen des OCT3 wurden vor über 25 Jahren publiziert (Gründemann et al. 1998). Bekannt ist er auch als extraneuraler Monoamintransporter (Roth et al. 2012) oder SLC22A3 (Pelis und Wright 2014). Strukturell stellt sich dieser Transporter sehr ähnlich wie die meisten Transporter der SLC22 Familie dar. Sie weisen zwölf α-helikale Transmembrandomänen, sowie einen intrazellulären N-Terminus und C-Terminus auf. Des Weiteren sind sie gekennzeichnet durch eine extrazelluläre Schlaufe zwischen den Transmembrandomänen eins und zwei, sowie einer intrazellulären Schlaufe zwischen den Transmembrandomänen sechs und sieben (Koepsell et al. 2007). Erst genannte beinhaltet die Konsensussequenz für die Glykosylierung und darüber hinaus sechs Disulfidbrücken ausbildende Sulfhydrylgruppen, welche die tertiäre Struktur der Schlaufe konsolidieren (Koepsell 2015). Die große Homologie der OCTs zeigt sich auch in der Übereinstimmung der Aminosäuresequenz, welche zwischen 50-70% liegt

(Koepsell 2015). OCT3 wird im menschlichen Körper breit gefächert exprimiert (Koepsell et al. 2007). So wurde OCT3 bereits in der Niere (Roth et al. 2012), der Leber, der Skelettmuskulatur, dem Herzen, einigen Krebszelllinien und dem Gehirn nachgewiesen (Koepsell et al. 2007). Geier konnte mit seiner Arbeitsgruppe den Beweis liefern, dass OCT3 ebenfalls an der Blut-Hirn-Schranke exprimiert wird und somit für den Transport über diese von Bedeutung ist (2013). Funktionell ist OCT3 hauptsächlich an dem Transport einer großen Bandbreite von organischen Kationen beteiligt, welche eine große Variabilität in ihrer Molekülstruktur aufweisen (Koepsell et al. 2007). Daher zählt er zu den polyspezifischen Transportern (Roth et al. 2012). Die Funktionsweise stimmt weitgehend mit denen von OCT1 und OCT2 überein (Koepsell et al. 2007). Gekennzeichnet sind sie durch ihre hohe Kapazität, aber niedrige Affinität (Gasser et al. 2017). Beeinflusst wird die Affinität zu bestimmten Substraten durch deren Ionisierungsgrad (Liu 2019). Im Allgemeinen funktioniert der OCT3 Na+ unabhängig und es wurde ein Transport in beide Richtungen bewiesen (Samodelov et al. 2020). Somit ist er sowohl an dem Einstrom in die Zelle, als auch am Ausstrom der Kationen beteiligt (Koepsell et al. 2007). Bezogen auf den Funktionsmechanismus wird vermutet, dass verschiedene Bindungsstellen den Transport der großen Bandbreite an Substraten ermöglichen (Koepsell 2015). Die meisten transportierten Substanzen zeichnen sich durch eine relative Molekülmasse von unter 500 aus (Liu 2019). Bekannte Substrate des Transporters sind unter anderem Clonidin, Imipramin (Roth et al. 2012), Epinephrin, Ketamin (Koepsell 2020), Histamin und Thiamin (Gebauer et al. 2022b). Im Gegensatz dazu sind unter anderem Alexidin und Chlorhexidin als Inhibitoren des OCT3 anzuführen (Gebauer et al. 2022b). Die Inhibition wird vermittelt, indem die Inhibitoren den Translokationspfad sterisch blockieren. Inwieweit es dadurch zu einer vollständigen Blockade des Transportes kommt ist zum heutigen Zeitpunkt noch nicht geklärt (Khanppnavar et al. 2022).

1.5.2 OCTN1 (SLC22A4)

OCTN1 ist ein Mitglied, einer drei Transporter umfassenden Unterfamilie von Membrantransportern (Pochini et al. 2019). Anders als OCTN1 und OCTN2, welche auch im Menschen exprimiert werden, wird OCTN3 in der Maus exprimiert (Tamai et al. 2000). Auf Grund der hohen Substrataffinität zu Ergothionein schlug Gründemann die Bezeichnung Ergothionein Transporter vor, worunter er früher ebenfalls bekannt war (2005). Die Strukturanalyse von Membrantransportern stellt eine große Herausforderung dar, welche unter anderem durch ihre Flexibilität und Hydrophobie bedingt ist (Indiveri et al. 2013). Aus diesem Grund sind für die OCTN-Transporter noch keine dreidimensionale Strukturen verfügbar (Pochini et al. 2019). Die strukturellen Eigenschaften der OCTN-Unterfamilie überschneiden sich weitestgehend (Pochini et al. 2013). OCTN1 und OCTN2 zeigen eine Übereinstimmung von ca. 77% der Aminosäuren (Liu 2019). Beide Transportproteine setzen sich aus zwölf Transmembrandomänen zusammen, welche eine α-helikale Sekundärstruktur aufweisen. Des Weiteren weisen sie zwei besonders extendierte

hydrophile Aminosäureschlaufen auf, von denen eine extrazellulär und eine intrazellulär liegt (Zhu et al. 2015). In Bezug auf die intrazelluläre Schleife und den C Terminus weisen die beiden Transporter größere Unterschiede auf (Pochini et al. 2013). OCTN1 wird nahezu im gesamten Körper exprimiert (Samodelov et al. 2020), zum Beispiel in der Niere, der Skelettmuskulatur (Koepsell et al. 2007) und den Augenepithelzellen (Garrett et al. 2008). Durch Kurosawa ist die Expression innerhalb der Blut-Hirn-Schranke belegt (2018). Die funktionelle Rolle von OCTN1 ist noch immer nicht umfänglich geklärt (Pochini et al. 2019). Er ist sowohl am Influx (Pelis und Wright 2014), als auch am Efflux beteiligt (Gründemann et al. 2005). So ist die Rückresorption von Zwitterionen und Sekretion organischer Kationen in den proximalen Nierentubuli eine der Aufgaben des Transporters (Koepsell 2015). Er fungiert Natrium abhängig für Zwitterionen, Natrium unabhängig für Zwitterionen, und als Kationen Austauscher (Koepsell 2013). Zu seinen Substraten zählt neben Ergothionein (Gründemann et al. 2005) auch Amisulprid (Pereira et al. 2014), wohingegen Clonidin, Nikotin und Pyrilamin eine hemmende Wirkung aufweisen (Yabuuchi et al. 1999). Es besteht die Vermutung, dass verschiedene Antitumormedikamente durch OCTN1 in die Zellen gelangen (Okabe et al. 2008).

1.5.3 OCTN2 (SLC22A5)

Der Transporter OCTN2 wird durch das Gen SLC22A5 codiert (Nigam 2018). Seine strukturellen Eigenschaften ähneln denen des OCTN1 und wurden bereits im Kapitel 1.5.2 detailliert beleuchtet (Zhu et al. 2015). Er ist ubiquitär im Körper verbreitet (Samodelov et al. 2020). Neben seinem Auftreten in Niere, Herz und Plazenta (Wu et al. 1999) bewies Kurosawa das Vorkommen von OCTN2 an der Blut-Hirn-Schranke (2018). Aus funktioneller Sicht handelt es sich bei OCTN2 um einen Carnitin-Transporter der Plasmamembran (Pochini et al. 2013). Er weist einen bifunktionellen Transportmechanismus auf (Samodelov et al. 2020) und funktioniert neben dem Na+-abhängigen Carnitin Transport (Tamai et al. 1998) auch auf Na+ unabhängige Weise für weitere organische Kationen (Kou et al. 2018). Des Weiteren ist dieser Transporter an der Sekretion und Rückresorption organischer Kationen in den proximalen Nierentubuli beteiligt (Koepsell 2013). Als Substrate sind insbesondere Carnitin (Tamai et al. 1998) und Amisulprid (Pereira et al. 2014) bekannt.

1.5.4 MATE1 (SLC47A1)

Das menschliche Genom enthält die Sequenzen für zwei MATE-Gene, welche unter den Namen SLC47A1 und SLC47A2 bekennt sind (Otsuka et al. 2005). Neben dem MATE1 Transporter existieren auch die Transporter MATE 2, MATE2-K und MATE2-B, welche im folgenden Kapitel genauer charakterisiert werden (Masuda et al. 2006). Die dreidimensionale Kristallstruktur der menschlichen MATE-Proteine konnte lange Zeit nicht entschlüsselt werden, daher dienten lediglich einige Berechnungsmethoden zur Vorhersage der Membrantopologie (Nies et al. 2016). In den vergangenen Jahren konnten erste

Kristallstrukturen entschlüsselt werden, welche jedoch lediglich den nach außen gerichteten Zustand darstellen (Zakrzewska et al. 2019). Menschliche MATE-Proteine weisen 13 Transmembranhelices auf (Zhang et al. 2007), wohingegen pflanzliche zwölf Transmembranhelices besitzen (Tanaka et al. 2017). Die Funktion der zusätzlichen Transmembranhelix, welche in Richtung der C-terminalen Seite liegt, ist nicht gänzlich geklärt (Kusakizako et al. 2020). Laut Zhang könnte sie für den Proteinumsatz von Bedeutung sein (2012), während Kusakizaku einen Zusammenhang zur Stabilität des Transporters in der Lipiddoppelschicht vermutet (2020). MATE1 wird im menschlichen Körper in den verschiedensten Organen exprimiert, so lieferte Otsuka den Beweis für die Existenz in Niere, Leber und Skeletmuskulatur (2005). Ebenso konnte der Transporter in den vergangenen Jahren an der Blut-Hirn-Schranke lokalisiert werden (Geier et al. 2013). Funktionell spielt der Transporter im Zuge verschiedener biologischen Funktionen eine Rolle (Staud et al. 2013). So hat die Familie der MATE-Transporter unter anderem eine herausragende Stellung als Exporteur organischer Kationen (Otsuka et al. 2005). Zur Vermittlung der transzellulären Bewegung ihrer Substrate, arbeiten sie teilweise kombiniert mit organischen Kationentransportern (Sato et al. 2008). Als treibende Kraft dient ein gegenläufiger Protonengradient (Otsuka et al. 2005), welcher durch H+ oder Na+ Ionen erzeugt wird (He et al. 2010). Auf Grund dieser Funktionsweise lassen sich die MATE-Transporter als sekundär aktive Transporter charakterisieren (Staud et al. 2013). Durch diese Funktionsweisen fallen sie in die Gruppe der Protonen-organische-Kationen-Antiporter (Masuda et al. 2006). MATE1 transportiert eine große Bandbreite von Substraten, welche tendenziell die positiv Ladung, Hydrophilie und eine geringe Molekülmasse charakterisiert (Nies et al. 2016). Dazu zählen unter anderem Metformin, Kreatinin, Thiamin und zwitterionische Verbindungen wie Cephalexin (Tanihara et al. 2007).

1.5.5 MATE2-K (SLC47A2)

Das 566 Aminosäuren große MATE2-K Protein konnte zuerst 2006 isoliert werden (Masuda et al. 2006). Es weist eine Sequenzhomologie zu MATE1 von 52% auf (Masuda et al. 2006), dies spiegelt sich auch in der weitestgehend übereinstimmenden Struktur wieder (Zhang et al. 2007). Im Gegensatz zu dem Transporter MATE2-B, welcher nahezu ubiquitär nachweisbar ist, wird MATE2K überwiegend in der Niere exprimiert (Masuda et al. 2006). Des Weiteren konnte ein niedrigeres Expressionsniveau unter anderen in der Lunge, den Hoden und dem Gehirn nachgewiesen werden (Komatsu et al. 2011). Die Funktionsweise des Transporters gleicht dem in Kapitel 1.5.4 beschriebenen Transporter MATE1. Das Substratspektrum dieser Transporter weicht jedoch teilweise voneinander ab. So wird im Gegensatz zu Cephalexatin, welches von MATE1 besser transportiert wird, Oxaliplatin durch MATE2-K besser transportiert (Tanihara et al. 2007).

1.5.6 SLC35G3

Die Solut-Carrier-35-Familie (SLC35) gilt als Gruppe der Nukleotid-Zucker-Transporter (Hadley et al. 2019). Sie wird in sieben Unterfamilien unterteilt, welche von SLC35A bis SLC35G durchnummeriert sind. Abhängig von den transportierten Substraten wird innerhalb dieser weiter differenziert (Hadley et al. 2019). Die Charakterisierung in die SLC35 Familie basiert hauptsächlich auf der Homologie der Aminosäuresequenzen (Ishida et al. 2005). Es wurden bisher 31 Mitglieder dieser Familie entdeckt (Song 2013), wobei einige als Orphan Transporter bezeichnet werden (Sosicka et al. 2017). Für diese Transporter ist die Substratspezifität und physiologische Bedeutung noch ungeklärt (Hadley et al. 2019), basierend auf Ihrer Sequenzhomologie konnten sie jedoch der SLC35 Familie zugeordnet werden (Sosicka et al. 2017). Auch bei dem Transportprotein SLC35G3 handelt es sich um einen Orphan Transporter (Sosicka et al. 2017). Funktionell handelt es sich bei dem überwiegenden Anteil der bekannten Transportproteine dieser Gruppe um Nukleotid-Zucker- Transporter. Diese bewerkstelligen den Transport von aktivierten Zuckern in das Endoplasmatische Retikulum oder das Golgi-Lumen (Hadley et al. 2019). Für die Orphan Transporter wurde im Gegensatz dazu herausgefunden, dass sie möglicherweise keine direkte Rolle in der Glykosylierung spielen (Hadley et al. 2019). So wurde zum Beispiel für den Transporter SLC35F2 YM155 als Substrat identifiziert, welches in der Krebstherapie verwendet wird (Winter et al. 2014). Das Vorkommen für viele der Transportproteine aus der SLC35 Familie wurde von Nishimura genauer untersucht. Er kommt zu dem Schluss, dass ein Großteil dieser Transportproteine ubiquitär im menschlichen Körper exprimiert wird. So wird das Transportprotein SLC35F1 am ausgeprägtesten im Gehirn exprimiert (Nishimura et al. 2009). Einige der hoch konservierten Typ-III-Transmembranproteine wurden bezüglich ihrer Struktur detaillierter untersucht (Hadley et al. 2019). Diese Transportproteine, für welche die Kristallstruktur veröffentlicht wurde, weisen eine Struktur auf, die aus zehn Transmembranhelices besteht (Parker und Newstead 2019). Diese Helices sind in einer fünf plus fünf Konfiguration um die zentrale Ligandenbindungsstelle angeordnet (Parker et al. 2019).

1.6 Noch unbekannt: Der Protonen-Organische-Kationen-Antiporter

Für eine Vielzahl an organischen Kationen werden, zur effizienten Aufnahme und Extrusion aus den Zellen, Transportproteine benötigt. Diese Transporter beeinflussen maßgeblich die Exposition des Organismus zu organischen Kationen (Sachkova et al. 2022). In der Vergangenheit konnten mehr als 15 dieser Transporter charakterisiert werden. Viele Transporter blieben jedoch unentdeckt. So konnte auch das Gen des Protonen-Organische-Kationen-Antiporters nicht identifiziert werden. Aus diesem Grund muss zur Lokalisierung des Transporters auf funktionelle Charakterisierung von Geweben zurückgegriffen werden. Auf dessen Grundlage wurde das Vorkommen des Transporters unter anderem in der Niere und der Lunge ermittelt (Sachkova et al. 2022). Durch Fischer konnte auch das Vorkommen

im Gehirn belegt werden (2007). Bezogen auf diesen Transporter ist es unklar, ob es sich um nur ein Transportprotein, oder mehrere handelt (Sachkova et al. 2022). Es wurden bereits einige Antiporter charakterisiert, zu diesen zählen unter anderem die Transportproteine MATE1 und MATE2-K (Masuda et al. 2006). Diese bekannten Antiporter weisen jedoch, bezogen auf die bisher bekannten Substrate, ein differentes Substratspektrum auf (Sachkova et al. 2021). Zur Charakterisierung des Protonen-Organische-Kationen-Antiporters können verschiedene Kriterien herangezogen werden. Diese Kriterien wurden in einer Übersichtsarbeit von Sachkova zusammengefasst und erläutert (2022). Das Kriterium des sättigungsfähigen Transports dient als Differenzierung zur einfachen Diffusion, nicht aber zur Differenzierung zu anderen Transportproteinen (Sachkova et al. 2022). Ebenso lässt die Temperaturabhängigkeit keine klare Differenzierung zwischen den Transportern zu. Neben der Identifikation spezifischer Inhibitoren gilt die Trans Stimulation als ein weiteres Kriterium. Die pH-Abhängigkeit, Ionophoren und das Membranpotenzial wurden ebenso als Kriterien verwendet, die beiden letzteren sind jedoch verhältnismäßig unspezifisch und kompliziert zu interpretieren (Sachkova et al. 2022). Des Weiteren stellt die Natriumunabhängigkeit ein Kriterium des Protonen-Organische-Kationen-Antiporters dar. Basierend auf diesen Kriterien konnten mehr als 70 Substrate des Transporters identifiziert werden, zu diesen gehören unter anderem Diphenhydramin, Oxycodon und Pyrilamin. Bisher gänzlich ungeklärt ist die endogene biologische Funktion des Transporters (Sachkova et al. 2022).

1.7 Untersuchte Substanzen

Die im Zuge dieser Arbeit getesteten Substanzen sind verschiedensten Medikamentengruppen zuzuordnen (Tabelle 3). Großteils wurde die Auswahl basierend auf einer Liste von transportervermittelt in die hCMEC-Zelllinie aufgenommener Substrate getroffen. Diese Auswahl wurde ergänzt durch einige Substanzen, welche von besonderer Bedeutung für das ZNS sind und in der Literatur beschriebenen Substrate der untersuchten Transportproteine.

Tabelle 3: Untersuchte Substanzen sortiert nach Medikamentengruppen

Substanz	Medikamentengruppe	Substanz	Medikamentengruppe
Tamsulosin	Alpha$_1$ Blocker	Galantamin	Cholinesterasehemmer
Terazosin	Alpha$_1$ Blocker	Rivastigmin	Cholinesterasehemmer
Urapidil	Alpha$_1$ Blocker	Cabergolin	Dopamin Agonist
Clonidin	Alpha$_2$ Agonist	Ropinirol	Dopamin Agonist
Ketamin	Anästhetikum	Articain	Lokalanästhetikum
Amiodaron	Antiarrhythmikum	Bupivacain	Lokalanästhetikum
Cycloserin (-D)	Antibiotikum	Kokain	Lokalanästhetikum
Cycloserin (-L)	Antibiotikum	Lidocain	Lokalanästhetikum
Ethambutol	Antibiotikum	Mepivacain	Lokalanästhetikum

Substanz	Medikamentengruppe	Substanz	Medikamentengruppe
Levofloxacin	Antibiotikum	Ropivacain	Lokalanästhetikum
Meropenem	Antibiotikum	Tetracain	Lokalanästhetikum
Moxifloxacin	Antibiotikum	Rasagilin	MAO-Inhibitor
Trimethoprim	Antibiotikum	Clozapin	Neuroepileptikum
Doxycyclin	Antibiotikum	Pipamperon	Neuroepileptikum
Atropin	Anticholinergikum	Memantin	NMDA-Rezeptor-Antagonist
Biperiden	Anticholinergikum	Methylnaltrexon	Opioid Antagonist
Scopolamin	Anticholinergikum	Nalmefen	Opioid Antagonist
Solifenacin	Anticholinergikum	Naloxon	Opioid Antagonist
Amitriptylin	Antidepressivum	N-Desmethyltramadol	Opioide
Atomoxetin	Antidepressivum	Hydrocodon	Opioide
Bupropion	Antidepressivum	Hydromorphon	Opioide
Desipramin	Antidepressivum	Morphin	Opioide
Duloxetin	Antidepressivum	Nortilidin	Opioide
Fluoxetin	Antidepressivum	Oxycodon	Opioide
Imipramin	Antidepressivum	Sufentanil	Opioide
Milnacipran	Antidepressivum	Ipratropium	Parasympatholytikum
N-Desmethylvenlafaxin	Antidepressivum	Betain	Sonstige
Paroxetin	Antidepressivum	Carnitin-d9	Sonstige
Tranylcypromin	Antidepressivum	Ergothionein	Sonstige
Trimipramin	Antidepressivum	MDAI	Sonstige
Venlafaxin	Antidepressivum	MDMA	Sonstige
Metoclopramid	Antiemetikum	Mescalin	Sonstige
Gabapentin	Antiepileptikum	Methylphenidat	Sonstige
Cetirizin	Antihistaminikum	Tyramin	Sonstige
Clemastin	Antihistaminikum	Vareniclin	Sonstige
Dimenhydrinat	Antihistaminikum	YM155	Sonstige
Diphenhydramin	Antihistaminikum	Amphetamin	Sympathomimetikum
Doxylamin	Antihistaminikum	Cathin	Sympathomimetikum
Pyrilamin	Antihistaminikum	Dobutamin	Sympathomimetikum
Terfenadin	Antihistaminikum	Ephedrin	Sympathomimetikum
Amisulprid	Antipsychotikum	Fenoterol	Sympathomimetikum
Aripiprazol	Antipsychotikum	Formoterol	Sympathomimetikum
Haloperidol	Antipsychotikum	Midodrin	Sympathomimetikum
Levomepromazin	Antipsychotikum	Phenylephrin	Sympathomimetikum
Quetiapin	Antipsychotikum	Aspartam	synthetischer Süßstoff
Risperidon	Antipsychotikum	Aciclovir	Virostatikum
Atenolol	Betablocker	Thiamin	Vitamine
Bisoprolol	Betablocker	Buspiron	5HT Agonist
Metoprolol	Betablocker	Frovatriptan (R-)	5HT Agonist

Substanz	Medikamentengruppe	Substanz	Medikamentengruppe
Propranolol	Betablocker	Zolmitriptan	5HT Agonist
Nimodipin	Calcium Antagonist	Palonosetron	5HT Antagonist

1.8 Zielsetzung

Über einen Großteil der organischen Kationen ist bisher lediglich bekannt, dass sie nicht ausschließlich vermittels einfacher Diffusion über die Blut-Hirn-Schranke gelangen (Pardridge 2012). Sie werden konzentrationsabhängig und hemmbar transportiert. Im gesunden Gehirn wird es sich dabei um trans-epithelialen Transport handeln, da parazellulärer Transport und andere Transportmechanismen hier nur eine untergeordnete Rolle spielen (Pardridge 2012). Viele Substanzen, die die Blut-Hirn-Schranke passieren können, werden nach experimentellen Studien auch über einen so genannten Protonen-Organische Kationen-Antiporter transportiert (Doetsch et al. 2022). Der Transport über diesen Antiporter wurde anhand der menschlichen hCMEC Zelllinie bereits für mehr als 200 Substanzen erforscht (Doetsch et al. 2022). Im Zuge dieser Experimente wurde das jeweils vermittelnde Transportprotein nicht identifiziert. Zur Identifikation des Transportproteins gibt es mehrere Möglichkeiten, insbesondere Transportmessungen an Zellen, die spezifische Transportproteine überexprimieren oder Transportmessungen an Zellen, in denen spezifisch einzelne Transportproteine ausgeschaltet oder zumindest herunterreguliert werden (Jala et al. 2021).

Die Hypothese ist, dass ein Teil der hCMEC-Substrate über bereits bekannte Transportproteine transportiert wird, zum Beispiel über die Transportproteine OCT3, OCTN1, OCTN2, MAT1, MATE2-K oder SLC35G3. Daher soll der Transport spezifisch über diese Transportproteine gemessen werden. Eine bereits existierende Liste der hCMEC-Substrate diente als Grundlage für die Substanzauswahl.

Einerseits dienen die Fragen der Verbesserung des Verständnisses der Blut-Hirn-Schranke, andererseits sind sie wichtig für die Erarbeitung von Substanzen, die leicht in das Gehirn gelangen können und für das Verständnis von Wechselwirkungen. Durch die Spezifizierung der einzelnen Transporter besteht die Chance, die Beeinflussung der Pharmakokinetik spezifischer Medikamente an der Blut-Hirn-Schranke, durch angeborene Variationen in den Transportern, verstehen und prognostizieren zu können.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Materialien

Die Zellkulturexperimente wurden an *Human Embryonic Kidney* (HEK)-293 Zellen durchgeführt, welche in Tabelle 4 aufgeführt sind. In Tabelle 5 sind die verwendeten Chemikalien aufgelistet und in Tabelle 6 die verwendeten Substanzen. Die verwendeten Verbrauchsmaterialien sind der Tabelle 7 zu entnehmen. In Tabelle 8 ist das verwendete Instrumentarium aufgelistet. Die verwendeten Medien, Lösungen und Puffer sind, mit ihren jeweiligen Zusammensetzungen, der Tabelle 9 zu entnehmen. Die zur Hilfe genommenen Softwares sind in Tabelle 10 aufgelistet.

Tabelle 4: Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Herkunft
Flp-In™ T-Rex™293	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
HEK293 pcDNA5	Ali Reeza Saadatamand, Institut für klinische Pharmakologie, UMG
HEK293 SLC22A3 (OCT3)	Lukas Gebauer und Kyra-Elisa Redeker, Institut für klinische Pharmakologie, UMG
HEK293 SLC22A4 (OCTN1)	Joao N Dos Santos Pereira, Institut für klinische Pharmakologie, UMG
HEK293 SLC22A5 (OCTN2)	Joao N Dos Santos Pereira, Institut für klinische Pharmakologie, UMG
HEK293 SLC47A1 (MATE1)	Jiayin Chen, Institut für klinische Pharmakologie, UMG
HEK293 SLC47A2 (MATE2-K)	Jiayin Chen, Institut für klinische Pharmakologie, UMG
HEK293 SLC35G3	Kyra-Elisa Redeker, Institut für klinische Pharmakologie, UMG

Tabelle 5: Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Acetonitril	LGC Promochem, Wesel, Deutschland
Ameisensäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Bicinchoninsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Dulbecco`s Modified Eagle Medium	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
Fetales Kälberserum	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
FuGene6™	Promega, Fitchburg, USA
Hank´s Balanced Salt Solution	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
HEPES	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Penicillin-Streptomycin	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
Poly-D-Lysin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Rinderalbumin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Trypan Blau (0,4%)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Tabelle 6: Verwendete Substanzen

Substanz	Hersteller
3,4-Methylen-dioxy-N-methylamphetamin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
5,6-Methylenedioxy-2- aminoindane	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Aciclovir	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Amiodaron	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Amisulprid	Toronto Research Chemicals, Toronto, Canada
Amitriptylin	Toronto Research Chemicals, Toronto, Canada
Amphetamin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Aripiprazol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Articain	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA
Aspartam	Merck Millipore, Billerica, USA
Atenolol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Atomoxetin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Atropin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Betain	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Biperiden	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Bisoprolol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Bupivacain	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Bupropion	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Buspiron	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Cabergolin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Carnitin-d9	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Cathin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Cetirizin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Substanz	Hersteller
Clemastin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Clonidin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Clozapin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
D-Cycloserin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
L-Cycloserin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Desipramin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Dimenhydrinat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Diphenhydramin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Dobutamin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Doxycyclin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Doxylamin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Duloxetin	Toronto Research Chemicals, Toronto, Canada
Ephedrin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Ergothionein	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Ethambutol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Fenoterol	Toronto Research Chemicals, Toronto, Canada
Fluoxetin	Eli Lilly, Indianapolis, USA
Formoterol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Frovatriptan (R-)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Gabapentin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Galantamin	Santa Cruz Biotechnologie, Dallas, USA
Haloperidol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Hydrocodon	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Hydromorphon	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Imipramin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Ipratropium	Santa Cruz Biotechnologie, Dallas, USA
Ketamin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Kokain	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Levofloxacin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Levomepromazin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Lidocain	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Memantin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Mepivacain	AstraZeneca, Cambridge, UK
Meropenem	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Mescaline	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Methylnaltrexon	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Methylphenidat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Metoclopramid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Metoprolol	AstraZeneca, Cambridge, UK
Midodrin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Substanz	Hersteller
Milnacipran	Santa Cruz Biotechnologie, Dallas, USA
Morphin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Moxifloxacin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
N-Desmethylvenlafaxin	Wyeth, Madison, USA
N-Desmethyltramadol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Nalmefen	Tocris Bioscience, Bristol, UK
Naloxone	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Nicotin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Nimodipin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Nortilidin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Oxycodon	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Palonosetron	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Paroxetin	GSK, Brentford, UK
Phenylephrin	Toronto Research Chemicals, Toronto, Canada
Pipamperon	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Propranolol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Pyrilamin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Quetiapin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Rasagilin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Risperidon	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Rivastigmin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Ropinirol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Ropivacain	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Scopolamin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Solifenacin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Sufentanil	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Tamsulosin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Terazosin	Santa Cruz Biotechnologie, Dallas, USA
Terfenadin	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA
Tetracain	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Thiamin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Tranylcypromin	Merck Millipore, Billerica, USA
Trimethoprim	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Trimipramin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Tyramin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Urapidil	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Vareniclin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Venlafaxin	Toronto Research Chemicals, Toronto, Canada
YM155 (Sepantronium)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Zolmitriptan	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Tabelle 7: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
12-Well-Zellkulturplatten	Greiner, Kremsmünster, Österreich
24-Well-Zellkulturplatten	Greiner, Kremsmünster, Österreich
96-Well-Mikrotiterplatte, flach	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
96-Well-Platten, tief (2 ml)	Waters, Milford, USA
Combitips (5 ml)	Eppendorf, Hamburg, Germany
Dialyse Membranfilter, 0,025 µm	Merck Millipore, Billerica, USA
Nunc™Kryoröhrchen	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
Pasteurpipetten aus Glas (230 mm)	Brand, Wertheim, Deutschland
Petrischale (100 mm)	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Pipettenspitze mit Filter, steril (100 µl, 1000 µl)	Kisker, Steinfurt, Deutschland
Pipettenspitze mit Filter, steril (10 µl)	Starlab, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitze ohne Filter (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäß (5 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturflaschen mit Belüftungskappe (25 cm^2, 75 cm^2)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zentrifugenröhrchen (15 ml)	Greiner, Kremsmünster, Österreich
Zentrifugenröhrchen (50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Tabelle 8: Verwendetes Instrumentarium

Instrument	Hersteller
96-Well-Probenkonzentrator	Techne, Stone, UK
Analysenwaage BP210S	Sartorius, Göttingen, Deutschland
API 4000 LC-MS/MS System	AB Sciex, Darmstadt, Deutschland
Biologische Sicherheitswerkbank: CleaAir NSF 49	Cleanair, Woerden, Niederlande
Brownlee SPP RP-Amide Säule	PerkinElmer, Waltham, USA
C18 Vorsäule	Phenomenex, Torrance, USA
CO_2 Inkubator BBD 6220	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
Elektrische Pipettierhilfe	Brand, Wertheim, Deutschland
Fresco™ 17 Mikrozentrifuge	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
FTA-1 Aspirator	BioSan, Riga, Lettland
Gefrierschrank -20°C	Liebherr, Bulle, Schweiz
Köttermann Wasserbad 3044	Köttermann GmbH, Uetze, Deutschland
Kühlschrank +4°C	Liebherr, Bulle, Schweiz
Mikroskop Axiovert 40 CFL	Carl Zeiss, Mikroskop GmbH, Oberkochen, Deutschland
Minischüttler MS2	IKA, Staufen, Deutschland
Multipette Plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Nexera 2 UHPLC System	Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg, Deutschland
Objektträger-Strecktisch OTS 40	Medite, Burgdorf, Deutschland
Pipetten (2,5/10/100/1000/2500 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Polymax Plattformschüttler 1040	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Sartorius PB-11 pH-Meter	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Tecan Ultra Mikroplatten-Reader	Tecan Group AG, Männedorf, Schweiz
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Ultratiefkühlschrank MDF-U71V -80°C	Sanyo, Moriguchi, Japan
Zählkammer Neubauer	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Zentrifuge 58010R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Tabelle 9: Verwendete Puffer, Medien und Lösungen

Puffer, Medien und Lösungen	Zusammensetzung
Ameisensäure	99% (v/v) ddH_2O 1% (v/v) Ameisensäure, 10%
Autosampler Waschlösung	49,95% (v/v) ddH_2O 49,95% (v/v) Methanol 0,1% (v/v) Essigsäure
BCA/ Kupfersulfatlösung	98% (v/v) Bicinchoninsäure 2% (v/v) Kupfer(II)-sulfat, 4%
Brownlee Waschlösung 1	95% (v/v) ddH_2O 5% (v/v) Methanol
Brownlee Waschlösung 2	95% (v/v) Acetonitril 5% (v/v) ddH_2O
DMEM-Zellkulturmedium	89% (v/v) DMEM 10% (v/v) FBS 100% U/ml Penicillin 100µg/ml Streptomycin
HBSS+ (PH 7,4)	HBSS 10mM HEPES
Kryomedium	90% (v/v) FBS 10% (v/v) DMSO
LC-MS/MS Mobilephase 3% Organische Zusatzstoffe	96% (v/v) ddH_2O 1% (v/v) Ameisensäure, 10% 2,6% (v/v) Acetonitril 0,4% (v/v) Methanol
LC-MS/MS Mobilephase 8% Organische Zusatzstoffe	91% (v/v) ddH_2O 1% (v/v) Ameisensäure, 10% 6,9% (v/v) Acetonitril 1,1% (v/v) Methanol
LC-MS/MS Mobilephase 20% Organische Zusatzstoffe	79% (v/v) ddH_2O 1% (v/v) Ameisensäure, 10% 17,2% (v/v) Acetonitril 2,8% (v/v) Methanol
LC-MS/MS Mobilephase 35% Organische Zusatzstoffe	64% (v/v) ddH_2O 1% (v/v) Ameisensäure, 10% 30,2% (v/v) Acetonitril 4,8% (v/v) Methanol
LC-MS/MS Mobilephase 50% Organische Zusatzstoffe	49% (v/v) ddH_2O 1% (v/v) Ameisensäure, 10% 43,1% (v/v) Acetonitril 6,9% (v/v) Methanol
Lysepuffer	80% (v/v) Acetonitril 20% (v/v) ddH_2O 10 ng/ml Interner Standard der Wahl
RIPA-Puffer	50mM Tris 150mM NaCl 1 mM EDTA 1% NP-40 0,25 Natriumdeoxycholat

Tabelle 10: Verwendete Softwares

Software (Version)	Anbieter
Affinity Designer (1.8.6.3.4.1)	Serif, Nottingham, UK
Analyst (1.6.2)	AB SCIEX, Darmstadt, Deutschland
GraphPad Prism (5.01)	GraphPad Software, San Diego, USA
MarvinSketch (20.4.0)	ChemAxon Ltd., Budapest, Ungarn
Microsoft Office (2010)	Microsoft, Redmond, USA
XFluor4 (4.40)	Tecan Group AG, Männedorf, Schweiz

2.2 Zellkultur

2.2.1 Generelle Zellkulturbedingungen

Die für die Experimente verwendeten Säugetierzelllinien sind in Tabelle 4 aufgelistet. Inkubiert wurden die Zellen in einem CO_2 Inkubator. Zur Sicherstellung optimaler Wachstumsbedingungen wurde eine Umgebungstemperatur von 37°C bei einer befeuchteten Atmosphäre gewählt (5% CO_2, 95% relative Luftfeuchtigkeit). Jegliche Arbeitsschritte wurden, unter einer Klasse II Sicherheitswerkbank, bei sterilen Bedingungen durchgeführt und die Arbeitsplätze regelmäßig mit 70% Isopropanol gereinigt. Die Säugetierzellen wurden in *Dulbecco´s Modified Eagle Medium* (DMEM) mit 4,5 g/L D-Glucose, L-Glutamin und Pyruvat kultiviert. Dieses wurde ergänzt mit 10% Fetalem Kälberserum (FKS) und 1% Penicillin/Streptomycin (Penicillin 100 U/ml, Streptomycin 100 µg/ml). Zur Kultivierung wurden belüftete T75 Zellkulturflaschen verwendet, welche mit einer adäquaten Menge DMEM befüllt wurden. Bei Erreichen einer Zellkonfluenz zwischen 90 bis 95% wurden die Zellen passagiert, dies entspricht einem Intervall von 3-4 Tagen. Das verbrauchte Medium wurde abgesaugt und die Zellen vom Flaschenboden abgelöst. Dazu wurde eine Menge von 12 ml frischem DMEM verwendet. Danach wurde ein Teil der Zellen in eine neue Zellkulturflasche überführt. Die Zellen wurden bis zur 30. Passage kultiviert und verwendet.

2.2.2 Einfrieren der Zellen

Die Zelllinien wurden zur Langzeitlagerung in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die in T75 Zellkulturflaschen wachsenden Zellen wurden nach dem Erreichen einer Zellkonfluenz von 90-95%, durch das wiederholte Pipettieren von 10 ml DMEM, von dem Flaschenboden gelöst. Nachfolgend erfolgte der Transfer der Zellsuspension in 50 ml Falcon-Röhrchen, welche bei Raumtemperatur für 5 min bei 300 x g zentrifugiert wurden. Das Zellpellet wurde in 4,5 ml Kryomedium resuspendiert, welches auf 4°C heruntergekühlt worden war. Je 1,5 ml der Zellsuspension wurden auf drei Kryoröchen aufgeteilt und in einen vorgekühlten Mr. FrostyTM Gefrierbehälter überführt. Nach einer 1–3-tägigen Lagerung des Gefrierbehältnis bei -80°C wurden die Kryoröhrchen zur Langzeitlagerung mit flüssigem Stickstoff überführt.

2.2.3 Auftauen der Zellen

Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Kryoröhrchen wurden innerhalb kurzer Zeit in einem 37°C warmen Wasserbad aufgetaut. Nach der Desinfektion der Kryoröhrchen mit 70% Isopropanol wurde dieses, unter der Klasse II Sicherheitswerkbank, geöffnet und der gesamte Inhalt in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt. Zuvor wurden 10 ml DMEM in das Falcon-Röhrchen vorgelegt. Nach dreiminütigem Zentrifugieren bei 300 x g wurde der Überstand abgenommen und das entstandene Zellpellet in 6 ml vorgewärmten DMEM resuspendiert. Die gesamte Zellsuspension wurde im Anschluss in eine T25 Zellkulturflasche transferiert, welche unter den in den in Kapitel 2.2.1 beschriebenen Bedingungen kultiviert wurde. Nach dem Erreichen einer Zellkonfluenz von 90-95% wurde die weitere Kultivierung in T75 Zellkulturflaschen durchgeführt.

2.2.4 Stabile Transfektion der HEK293 T-Rex Zellen

Mittels dem Flp-In™ System, welches die Firma Thermo Fisher Scientific (Darmstadt, Deutschland) vertreibt, gelingt die stabile Transfektion der HEK293 Zellen. Dieses ermöglicht die ortsspezifische Integration eines Expressionsvektors, welcher im Vorhinein konstruiert wurde, in das Genom der Wirtszelllinie. Dazu werden spezifische Flp-Rekombinationszielstellen genutzt. Dieses Prozedere zielt auf die Überexpression einzelner Transporter ab, welche durch das gewünschte Gen codiert werden. Das Enzym Flp rekombinase aus s. cerevisiae wird durch Verwendung des Helferplasmids pOG44 co-transfiziert und ermöglicht die chromosomale Integration der Expressionsplasmide in das Genom der Zelle. Zur Selektion der erfolgreich transfizierten Plasmide wird die Antibiotikaresistenz gegen Hygromycin B verwendet, welche durch den transfizierten pcDNA5 Plasmidvektor codiert wird. Die Abbildung 3 veranschaulicht diesen Vorgang schematisch.

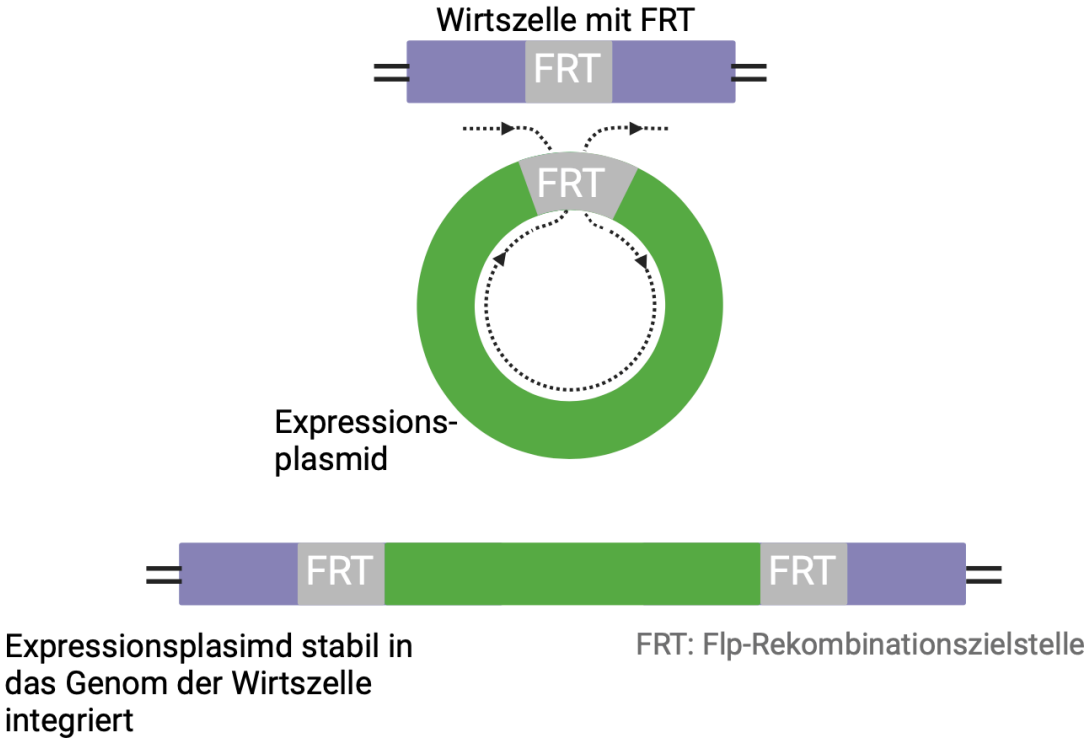

Abbildung 3: Schema der stabilen Transfektion. Gezeigt ist die ortsspezifische Integration eines Expressionsvektors in das Genom der Wirtszelle. Das Expressionsplasmid beinhaltet die genetischen Daten für den jeweiligen Transporter, welcher überexprimiert werden soll. Des Weiteren codiert es für eine Antibiotikaresistenz zur Selektion der erfolgreich transfizierten Expressionsplasmide. Die Abbildung wurde mit BioRender.com erstellt.

Zu Beginn des Vorhabens wurden je Well 1000000 Zellen auf eine 6-Well Platte ausplattiert, welche nicht mit Poly-D-Lysin vorbehandelt wurde, und für 24 Stunden inkubiert. Am folgenden Tag wurden je Well zwei 1,5 ml Reaktionsgefäße vorbereitet, indem sie mit 150 µl purem DMEM befüllt wurden. In eines der Reaktionsgefäße wurden zusätzlich 4 µg DNA zugesetzt, welche sich zu 3,6 µg aus pOG44 Helferplasmid und 0,4 µg Expressionsvektor zusammensetzte. Möglichst zeitnah wurden dem zweiten Reaktionsgefäß 12 µl FuGene6 Transfektionsreagenz hinzugesetzt. Nach einer fünfminütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden die Inhalte beider Reaktionsgefäße vermischt. In der sich anschließenden Inkubationszeit von 15 Minuten, wurden die Zellen mit 2 ml DMEM gewaschen, welchem 10% FKS hinzugesetzt wurde. Das DNA-FuGene Gemisch wurde zur optimalen Verteilung tröpfchenweise auf die jeweiligen Wells verteilt, nachdem 1,8 ml DMEM/10%FKS in jedes Well vorgelegt wurde. Anschließend wurde die 6-Well Platte für 24 Stunden bei 37°C inkubiert, bevor das Medium am folgenden Tag gewechselt wurde. Von diesem Schritt an wurde ein Medium verwendet, dem neben den 10%FKS auch 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin zugesetzt wurde. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen in eine 100 mm Petrischale transferiert. Zunächst wurden 18 ml Medium in die Petrischale vorgelegt, bevor die Zellen in 2 ml Medium resuspendiert und in die Petrischale transferiert wurden. Über Nacht wurden die Zellen inkubiert und am folgenden Tag Hygromycin B, in einer Endkonzentration von 300 µg/ml, tröpfchenweise hinzugesetzt.

Durch den Zusatz von Hygromycin B kam es zu einer Selektion der Zellen, welche das Plasmid erfolgreich integrierten und exprimierten. Ausschlaggebend für diese Selektion war die durch das Plasmid vermittelte Resistenz gegen Hygromycin B. Nach 4-5 Tagen wurde das Medium erneuert. Hierfür wurde frisches Medium verwendet, welchem FKS, Penicillin/Streptomycin und Hygromycin B, in einer Konzentration von 300 µg/ml, hinzugesetzt wurden. Den Zellen wurden weitere fünf Tage zur Bildung einzelner Zellkolonien, gegeben. Die einzelnen Kolonien wurden in 3 µl Medium resuspendiert und in je ein Well einer 24-Well Platte transferiert. Dem Medium wurde hierbei ein verringerter Anteil von Hygromycon B (50 µl/ml) hinzugefügt. Nach Erreichen einer Zellkonfluenz von ca. 75% wurden die Zellen auf eine 6-Well Platte transferiert, auch hierbei wurde ein reduzierter Hygromycin B Anteil verwendet. Nach abermaligem Erreichen einer Zellkonfluenz von 75% wurde der vorherig beschriebene Vorgang wiederholt und die Zellen in eine T25 Zellkulturflasche überführt. Zur Validierung der generierten Zelllinie wurde während dem ersten Passagieren, ein Teil der Zellsuspension für die DNA-Extraktion vorbereitet. Anschließend wurde, wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben, die korrekt transfizierte Zelllinie eingefroren und gelagert. Aussäen der Zellen

Zwei Tage vor dem zellulären Transportexperiment wurden die Zellen auf 24-Well-Platten ausplattiert. Für eine verbesserte Haftung der Zellen am Boden wurden die Platten zunächst mit Poly-D-Lysin (2 mg/ml) vorbehandelt. Durch die Wechselwirkung zwischen der positiv geladenen Beschichtung der Oberfläche und der negativen Ladung der Zellmembran kommt es zu der verbesserten Haftung, durch welche weniger Zellen im Zuge der Waschvorgänge abgelöst werden. Mit 300 µl Poly-D-Lysin je Well wurde die gesamte Oberfläche bedeckt. Im Anschluss wurden die 24-Well-Platten für 30 Minuten bei 37°C inkubiert, bevor unter der Klasse II Sicherheitswerkbank das Poly-D-Lysin abgenommen wurde und die Platten dort trockneten. Die Zellen wurden zunächst trypsiniert. Dazu wurden 3,5 ml Trypsin in die T75 Zellkulturflasche hinzugegeben und diese für 3 Minuten in den Inkubator gestellt. Im Anschluss wurde die Reaktion durch Zugabe von 7 ml vorgewärmten DMEM abgestoppt. Die Zellen wurden dabei abgelöst und anschließend in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt. Das Zentrifugieren der Zellsuspension bei 300 xg für drei Minuten ermöglichte es, den Überstand abzunehmen und das Zellpallet in einer definierten Menge von 12 ml DMEM zu resuspendieren. Ein Teil der Zellsuspension wurde in einer neuen T75 Zellkulturflasche unter den in Kapitel 2.2.1 beschriebenen Bedingungen weiter kultiviert. Die Zellen wurden anschließend in einer Neubauer Zählkammer ausgezählt. Dazu wurden 20 µl Zellsuspension in 40 µl DMEM und 20 µl Trypanblau verdünnt. Die Zellzahl wurde dann in der Neubauer Zählkammer bestimmt. Zur Errechnung der Konzentration wurde folgende Gleichung verwendet:

$$c\left[\frac{Zellen}{ml}\right] = \frac{\sum gezählte\ Zellen\ x\ Verdünnungsfaktor\ x\ Kammerfaktor}{Anzahl\ der\ ausgezählzen\ Quadranten}$$

$$c\left[\frac{Zellen}{ml}\right] = \frac{\sum gezählte\ Zellen\ x\ 4\ x\ 10^4\ \frac{Zellen}{ml}}{4}$$

$$c\left[\frac{Zellen}{ml}\right] = \sum gezählte\ Zellen\ x\ 1\ x\ 10^4\ \frac{Zellen}{ml}$$

Zum Ausplattieren wurde eine Zellsuspension mit einem definierten Volumen hergestellt. Je Well wurden 300000 Zellen in einem Volumen von 0,5 ml benötigt. Im Anschluss wurden die Platten für zwei Tage, bis zur Durchführung des Transportexperiments bei 37°C und 5% CO2, inkubiert. Dieses Vorgehen wurde für die Verwendung von 12-Well-Platten angepasst, welche für die Transportexperimente der Transportproteine MATE1 und MATE2-K verwendet wurden. In diesem Fall wurden 500 µl Poly-D-Lysin je Well verwendet. Außerdem wurden 600000 Zellen je Well ausplattiert. In einem Volumen von je 1 ml wurden diese auf die jeweiligen Wells aufgeteilt. Der sonstige Vorgang der Verwendung der 12-Well-Platten glich dem der Verwendung der 24-Well-Platten.

2.3 Transportexperimente

Die verschiedenen Transportexperimente basierten auf dem Vergleich zwischen der entsprechenden Kontrollzelllinie und der Zelllinie, welche den entsprechenden Transporter überexprimiert. Die detaillierten Abläufe der einzelnen Experimente sind in den folgenden Kapiteln detailliert beschrieben.

2.3.1 Transportexperimente für eine Standardkonzentration an OCT3, OCTN1, OCTN2 und SLC35G3

Die Transportexperimente wurden unter Verwendung einer Substratkonzentration von 2,5 µM durchgeführt. Durch die Zugabe von HEPES zu *Hanks' Balanced Salt Solution* (HBSS) wurde HBSS+ hergestellt und im Folgenden ein pH-Wert von 7,4 eingestellt. Die verwendeten 24-Well Platten wurden nach einer Kontrolle der Zellkonfluenz, unter dem Mikroskop, auf die vorgewärmte Heizplatte platziert. Nachdem das Medium abgenommen wurde, wurden die Zellen mit jeweils 1ml vorgewärmten HBSS+ gewaschen. Im Anschluss wurde 250 µl der jeweiligen Substratlösung, welche auf 37°C vorgewärmt wurde, auf das entsprechende Well gegeben. Nach exakt 2 Minuten wurde der Vorgang, durch die Zugabe von 1ml eiskaltem HBSS+, abgestoppt und die Kulturplatten von der Heizplatte genommen.

Nach zweimaligem Waschen der Zellen, mit jeweils 1 ml HBSS+, wurden die Zellen lysiert. Dazu wurde je Well 250 µl Lysepuffer verwendet, welcher den jeweiligen Internen Standard beinhaltete. Nach Ablauf von mindestens zehn Minuten wurden die Proben in 1,5 ml Reaktionsgefäße transferiert und für die LC-MS/MS Analyse vorbereitet. Der genaue Vorgang ist in Kapitel 2.3.5 detailliert beschrieben. Alternativ wurden die Proben zur kurzfristigen Lagerung bei -20°C eingefroren. Die Abbildung 4 stellt ein detailliertes Schema von dem Ablauf des Versuchs dar.

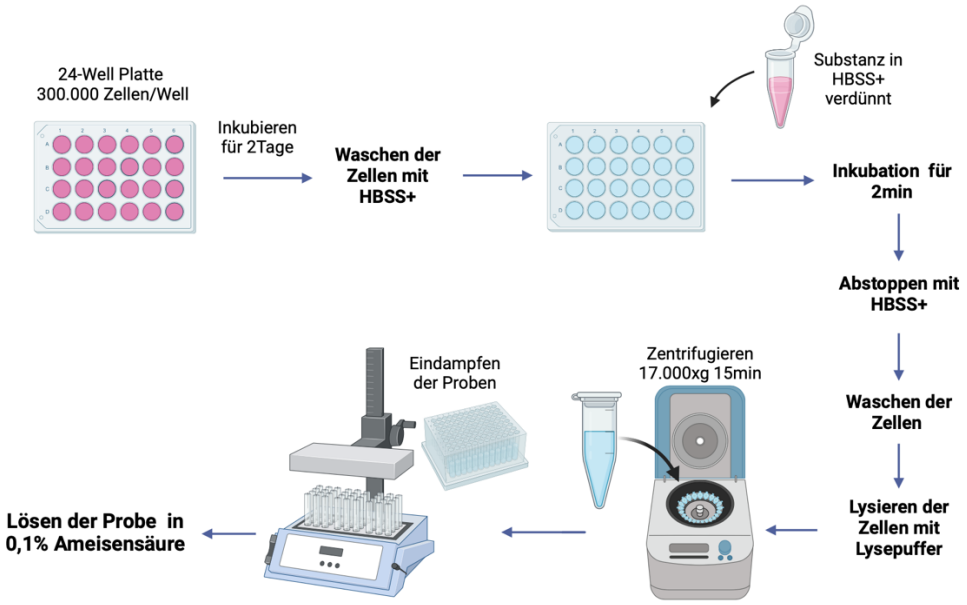

Abbildung 4: Transportablauf für OCTN1, OCTN2, OCT3 und 35G3. Die Abbildung wurde mit BioRender.com erstellt.

2.3.2 Transportexperimente für eine Standardkonzentration an MATE1 und MATE2-K

Die Transportexperimente wurden unter der Verwendung einer Substratkonzentration von 2,5 µM durchgeführt. Dazu wurde zunächst HBSS+ hergestellt und der pH-Wert auf 7,4 eingestellt. Die zwei Tage zuvor vorbereiteten 12-Well Platten wurden auf eine 37°C warme Heizplatte platziert, nachdem die Zellkonfluenz unter dem Mikroskop kontrolliert wurde. Das Zellkulturmedium wurde abgenommen und die Zellen mit je 1 ml vorgewärmten HBSS+ gewaschen. Anschließend wurde jedes Well mit jeweils 1 ml HBSS+ vorbehandelt und für 30 Minuten in den Inkubator gestellt. Dem in diesem Schritt verwendeten HBSS+ wurde im vorhinein Ammoniumchlorid hinzugefügt, um eine Ammoniumchlorid Konzentration von 30 mM zu erreichen. Im Anschluss wurde das HBSS+ wieder abgenommen und 400 µl der jeweiligen Substratlösung, welche auf 37°C vorgewärmt wurde, auf das entsprechende Well gegeben. Nach exakt einer Minute wurde der Vorgang mittels Zugabe von 2 ml eiskaltem HBSS+ abgestoppt und die Kulturplatte zeitgleich von der Heizplatte heruntergenommen. Im Anschluss wurden die Zellen zweimal mit je 1 ml eiskaltem HBSS+ gewaschen, ehe sie für mindestens 10 min lysiert wurden. Dazu wurde je Well 500 µl Lysepuffer verwendet, welcher den jeweiligen Internen Standard beinhaltete.

Nach Ablauf der Zeit wurden die Proben direkt für die *High performance liquid chromatographie-mass spectrometry/mass spectrometry* (HPLC-MS/MS)-Analyse vorbereitet, oder alternativ kurzfristig bei -20°C eingefroren. Dieser Ablauf ist zur Verdeutlichung in der Abbildung 5 schematisch dargestellt.

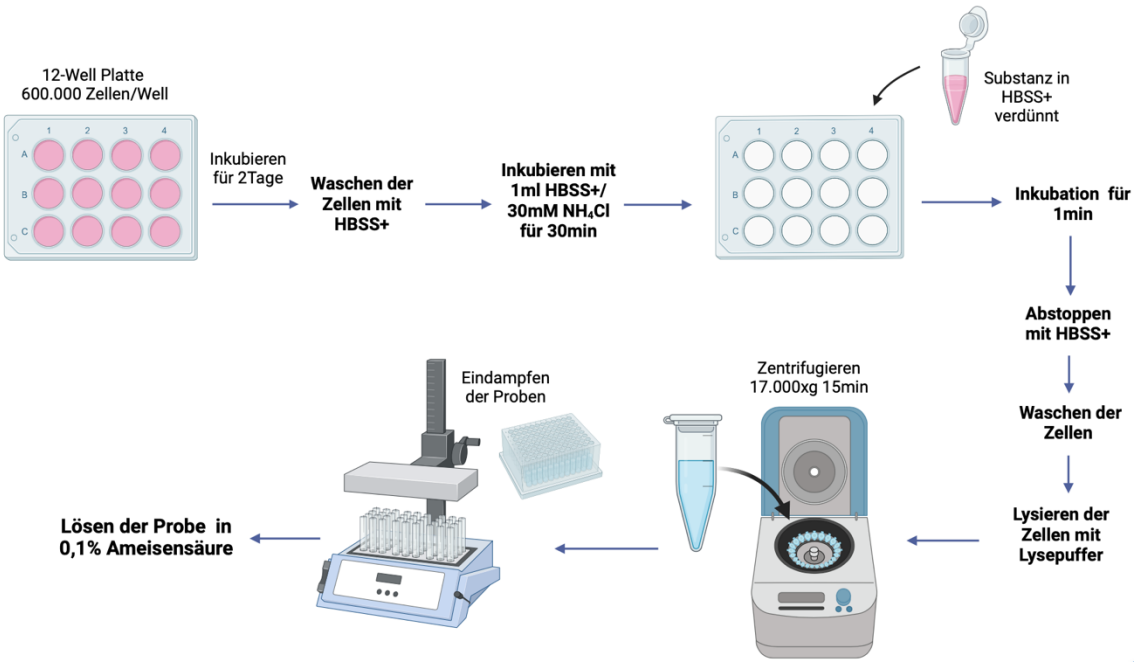

Abbildung 5: Transportablauf für MATE1 und MATE2-K. Die Abbildung wurde mit BioRender.com erstellt.

2.3.3 Konzentrationsabhängige Transportexperimente an OCT3, OCTN1, OCTN2 und SLC35G3

Der Aufbau und Vorgang der konzentrationsabhängigen Transportexperimente glichen den in Kapitel 2.3.1 beschriebenen Transportexperimenten. Hierbei wurden die Substrate in verschiedenen Konzentrationen verwendet. Die verwendeten Konzentrationen wurden substratspezifisch angepasst. Zusätzlich wurde eine Eichgrade der jeweiligen Substanz pipettiert und mittels der HPLC-MS/MS-Analyse gemessen. Dieser zusätzliche Schritt ermöglichte die Ermittlung der Nettoaufnehme für die jeweilige Substanz.

2.3.4 Konzentrationsabhängige Transportexperimente an MATE1 und MATE2-K

Die Transportexperimente glichen, bezogen auf den Aufbau und Ablauf, den zuvor beschriebenen Experimenten für die Transporter MATE1 und MATE2-K. Im Gegensatz dazu wurden die ausgewählten Substanzen in verschiedenen Konzentrationen untersucht. Es wurden sechs bis acht substanzspezifische Konzentrationen verwendet. Zusätzlich wurde eine Eichgrade, der untersuchten Substanz, pipettiert. Dazu wurde die jeweilige Substanz, in drei bis vier definierten Konzentration, in den jeweiligen Lysepuffer pipettiert und anschließend mittels der HPLC-MS/MS-Analyse gemessen. Dieser zusätzliche Schritt ermöglichte die Ermittlung der Nettoaufnehme für die jeweilige Substanz.

2.3.5 Vorbereiten der Proben für die Massenspektrometrie

Zunächst wurden die einzelnen Proben in ihren 1,5 ml Reaktionsgefäßen bei 17.000 x g für 15 Minuten zentrifugiert. Im Anschluss wurde ein definiertes Volumen in eine 96-Well Mikrotiterplatte überführt, welche in Fassungsvolumen von 2 ml aufwies. Die Flüssigkeit wurde mit Hilfe von Stickstoff, bei einer Temperatur von 40°C, restlos eingedampft. Folgend wurde die Probe in einem definierten Volumen 0,1% Ameisensäure gelöst, um die gewünschte Probenverdünnung zu erlangen.

2.3.6 HPLC-MS/MS

Zur Quantifizierung der intrazellulären Konzentrationen der ausgewählten Substanzen wurde die HPLC-MS/MS-Analyse genutzt. Dazu wurden die vorbereiteten 96-Well Mikrotiterplatten, welche die Proben beinhalten, in den gekühlten Autosampler des Shimadzu Nexera 2UHPLC Systems platziert. Neben dem Modul CBM-20A umfasst dieses System auch den Flüssigkeitschromatographen LC-30AD und den Säulenofen CTO-20AC. Standardmäßig wurde je Messung ein Volumen von 10 µl zur Quantifizierung aufgenommen. Als Vorsäule wurde eine Phenomonex C18-Vorsäule verwendet und dazu die Brownlee SPP RP-Amid Säule (4,6x100mm Innendurchmesser mit 2,7 µm Partikelgröße) als passende Hauptsäule. Der Ofen wurde auf 40°C vorgeheizt.

Die Abbildung 6 zeigt schematisch den Vorgang der HPLC-MS/MS-Analyse. Zunächst wird die Probe injiziert. Durch das Einwirken der Ionenquelle, dem ersten Quadrupol, der Kollisionszelle und dem dritten Quadrupol kann nach einem definierten Masse zu Ladungsverhältnis selektiert werden. Die detektierten Daten werden mittels der Analyst Software ausgewertet.

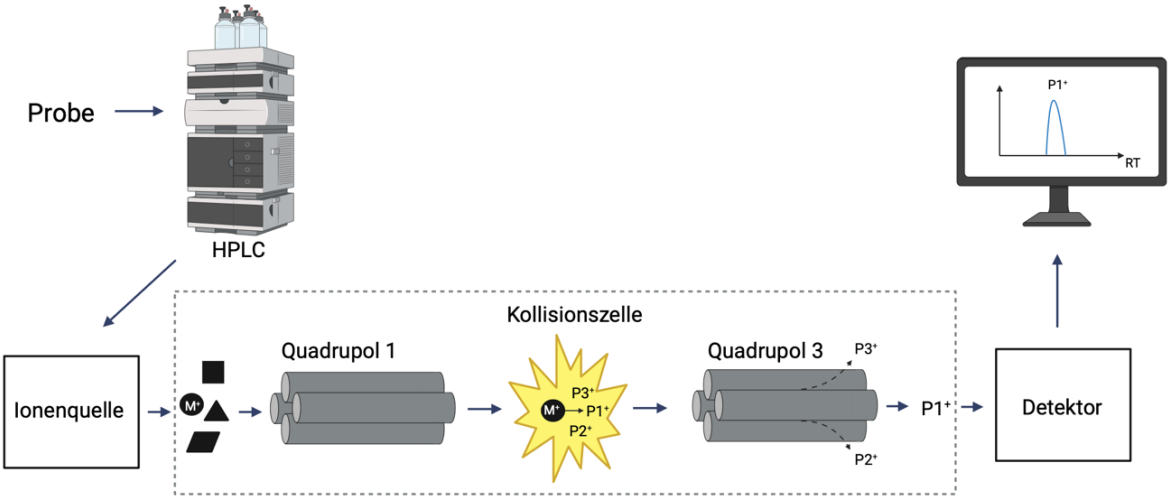

Abbildung 6: HPLC-MS/MS-Analyse. Die Abbildung zeigt schematisch den Vorgang der HPLC-MS/MS-Analyse. Zunächst wird die Probe injiziert. Durch das Einwirken der Ionenquelle, dem ersten Quadrupol, der Kollisionszelle und dem dritten Quadrupol kann nach einem definierten Masse zu Ladungsverhältnis selektiert werden. Die detektierten Daten werden mittels der Analyst Software ausgewertet. Die Abbildung wurde mit BioRender.com erstellt.

Für jede Substanz wurde im Vorhinein eine Optimierung der Flüssigphase, in Hinblick auf Zusammensetzung des Fließmittels mit organischen Zusatzstoffen und die Flussrate, durchgeführt. Maßgebliche Gesichtspunkte waren hierbei die Retentionszeit und die Trennqualität. Die mit dem API 4000 Tandem Massenspektrometer gekoppelte Flüssigkeitschromatographie ermöglichte den Nachweis der verschiedenen Substrate, über spezifische LC-Retentionszeiten und Massenübergänge. Mittels der Analyst Software gelang die automatisierte Quantifizierung, durch die Integration der Fläche unter dem detektierten Peak. Die integrierten Flächen wurden kontrolliert und bei geringen Abweichungen manuell nachintegriert. Zur Errechnung des Nettotransports wurde die Aufnahme der Kontrollzelllinie von der Aufnahme der Transporter-überexprimierenden Zelllinie subtrahiert. Die verwendeten Fließmittel, internen Standards, Retentionszeiten und Massenübergänge sind der Tabelle 11 zu entnehmen.

Tabelle 11: MS Parameter für alle Substanzen

Substanz	RT [min]	Masse Q1 [Da]	Masse Q3 [Da]	DP [V]	CE [V]	CXP [V]	Interner Standard
3% Organische Zusatzstoffe (96,9% H_2O, 0,1% Ameisensäure, 2,6% Acetonitril, 0,4% Methanol)							
Ethambutol	2,5	205,2	116,1 (55,1)	66	21 (45)	6 (10)	Buformin
Betain	3,25	118,0	58,0 (59,9)	31	39 (23)	10 (10)	Buformin
D-Cycloserin	2,55	103,064	75,0 (58,0)	51	11 (15)	14 (10)	Buformin
L-Cycloserin	2,55	103,064	75,0 (58,0)	51	11 (15)	14 (10)	Buformin
Ergothionein	3,4	230,159	127,0 (186,2)	50	25 (17)	8 (12)	Buformin
Nicotin	3,6	163,01	130,0 (117,0)	56	27 (35)	8 (15)	Buformin
Phenylephrin	3,99	168,21	91 (77)	41	30 (56)	11 (4)	Buformin
Thiamin	2,8	425,1	122,1 (143,8)	50	25 (19)	10 (10)	Buformin
Tyramin	4,06	138,1	121,1	43	14	12	Buformin
8% Organische Zusatzstoffe (91,9% H_2O, 0,1% Ameisensäure, 6,9% Acetonitril, 1,1% Methanol)							
Aciclovir	3,8	225,98	151,9 (134,93)	46	17 (40)	10 (8)	Ranitidin-d6
Carnitine-d9	2,85	171,3	85,0 (129,0)	81	29 (9)	6 (10)	Ranitidin-d6
Ephedrin	4,18	166,02	148,1 (133,0)	41	17 (27)	9 (8)	Ranitidin-d6
Frovatriptan (R-)	5,11	244,3	213,0 (170,1)	56	19 (34)	14 (10)	Ranitidin-d6
Hydrocodon	6,8	300,472	283,1 (133,1)	56	15 (21)	26 (28)	Ranitidin-d6

Substanz	RT [min]	Masse Q1 [Da]	Masse Q3 [Da]	DP [V]	CE [V]	CXP [V]	Interner Standard
Hydromorphon	4,0	286,2	185,2 (157,1)	110	43 (55)	5 (10)	Ranitidin-d6
Morphin	3,78	166,02	148,1 (133,0)	41	17 (27)	9 (8)	Ranitidin-d6
Trimethoprim	9,9	291,0	230,19 (123,01)	94	33	15 (8)	Ranitidin-d6
20% Organische Zusatzstoffe (79,9% H_2O, 0,1% Ameisensäure, 17,2% Acetonitril, 2,8% Methanol)							
Amisulprid	3,8	370,2	242,1 (195,8)	90	38 (52)	15 (15)	Fenoterol-d6
Amphetamin	3,56	136,0	91,0 (119,0)	41	21 (13)	16 (14)	Fenoterol-d6
Articain	4,15	285,203	86,2 (253,1)	63	21 (17)	16 (24)	Fenoterol-d6
Atenolol	2,9	267,2	145,2	130	38	10	Fenoterol-d6
Atropin	2,9	290,2	142,2 (124,2)	100	45 (33)	12 (12)	Fenoterol-d6
Bupropion	3,7	240,08	183,9 (139,0)	55	17 (35)	12 (12)	Fenoterol-d6
Cabergolin	3,5	452,3	381,4 (336,5)	95	25 (33)	12 (10)	Fenoterol-d6
Cathin	3,47	152,09	91,0 (117,0)	39	39 (23)	16 (22)	Fenoterol-d6
Clonidin	3,6	230,0	44,0 (213,0)	85	46 (34)	15 (15)	Fenoterol-d6
Clozapin	7,5	327,154	270,1 (192,2)	101	31 (57)	18 (12)	Fenoterol-d6
N-Desmethyl-tramadol	3,67	177,97	161,0 (131,0)	43	17 (27)	10 (16)	Fenoterol-d6
Dobutamin	3,17	302,202	137,0 (106,9)	66	30 (37)	10 (6)	Fenoterol-d6
Doxylamin	3,5	271,2	182,1 (167,2)	51	21 (44)	12 (16)	Fenoterol-d6
Fenoterol	3,56	304,1	107,1 (135,2)	70	44 (24)	12 (12)	Fenoterol-d6
Formoterol	3,82	345,2	149,1 (121,1)	70	28 (42)	15 (15)	Fenoterol-d6
Gabapentin	3,5	172,157	137,0 (153,9)	36	15 (19)	8 (10)	Fenoterol-d6
Galantamin	2,3	288,221	213,1 (231,2)	86	31 (23)	14 (16)	Fenoterol-d6
Ipratropium	4,5	332,3	166,2 (124,0)	100	36 (45)	12 (12)	Fenoterol-d6
Levofloxacin	4,11	362,2	318,0 (261,0)	71	27 (37)	22 (18)	Fenoterol-d6
Memantin	7,4	180,19	163,1 (107,0)	46	21 (35)	10 (6)	Fenoterol-d6

Substanz	RT [min]	Masse Q1 [Da]	Masse Q3 [Da]	DP [V]	CE [V]	CXP [V]	Interner Standard
Meropenem	3,1	384,209	67,9 (141,1)	61	70 (23)	12 (8)	Fenoterol-d6
Mescaline	3,54	211,910	165,0 (195,0)	46	31 (15)	10 (12)	Fenoterol-d6
3,4-Methylen-dioxy-N-methyl-amphetamin	3,65	193,9	163,0 (104,9)	41	17 (33)	10 (6)	Fenoterol-d6
5,6-Methylenedioxy-2-aminoindane	3,54	177,97	161,0 (131,0)	43	17 (27)	10 (16)	Fenoterol-d6
Methylnaltrexon	2,66	356,093	55,2 (284,1)	98	61 (33)	10 (18)	Fenoterol-d6
Methylphenidat	4,4	234,174	84,1 (91,1)	71	27 (73)	6 (89)	Fenoterol-d6
Metoclopramid	4,6	300,2	227,0 (183,9)	65	25 (42)	14 (12)	Fenoterol-d6
Metoprolol	4,54	268,2	116,1 (74,0)	86	27 (35)	8 (14)	Fenoterol-d6
Midodrin	3,54	255,1	236,9 (180,0)	36	10 (23)	16 (12)	Fenoterol-d6
Milnacipran	5,6	247,174	230,2 (100,1)	51	17 (27)	14 (8)	Fenoterol-d6
Nalmefen	4,2	340,252	322,2 (55,1)	61	29 (63)	10 (10)	Fenoterol-d6
Naloxone	3,5	328,2	310,3 (253,2)	86	27 (35)	20 (16)	Fenoterol-d6
Nimodipin	3,8	419,2	402,3 (45,2)	75	17 (84)	12 (8)	Fenoterol-d6
Nortilidin	4,2	260,3	155,1 (115,1)	61	25 (67)	12 (10)	Fenoterol-d6
Oxycodon	3,54	316,3	298,2 (256,2)	91	27 (35)	10 (8)	Fenoterol-d6
Rasagilin	3,5	172,109	117,0 (56,1)	40	11 (41)	10 (8)	Fenoterol-d6
Ropinirol	3,7	261,2	114,2 (86,2)	75	28 (40)	8 (16)	Fenoterol-d6
Scopolamin	2,9	304,3	138,1	80	30	15	Fenoterol-d6
Tranylcypromin	3,56	134,048	117,0 (115,0)	41	13 (27)	8 (8)	Fenoterol-d6
Urapidil	4,1	388,268	233,1 (190,0)	91	33 (47)	16 (12)	Fenoterol-d6
Vareniclin	3,3	212,2	169,1 (183,1)	95	29 (31)	12 (12)	Fenoterol-d6
YM155 (Sepantronium)	4,5	363,13	305,3 (93,2)	100	33 (49)	20 (18)	Fenoterol-d6
Zolmitriptan	2,66	310,3	109,1 (141,0)	70	40 (26)	12 (12)	Fenoterol-d6
35% Organische Zusatzstoffe (64,9% H_2O, 0,1% Ameisensäure, 30% Acetonitril, 5% Methanol)							

Substanz	RT [min]	Masse Q1 [Da]	Masse Q3 [Da]	DP [V]	CE [V]	CXP [V]	Interner Standard
Amitriptylin	4,0	278,2	117,1 (91,0)	36	30 (36)	8 (16)	Bupivacain
Aspartam	3,08	295,1	120,0 (235,2)	76	36 (18)	8 (16)	Bupivacain
Atomoxetin	4,2	256,156	44,2 (148,1)	46	35 (11)	8 (10)	Bupivacain
Biperiden	4,3	312,237	98,2 (70,0)	80	36 (72)	18 (12)	Bupivacain
Bisoprolol	3,34	326,285	116,1 (74,1)	85	25 (41)	8 (6)	Bupivacain
Bupivacain	3,5	289,248	140,1 (84,2)	75	30 (58)	8 (16)	Amitriptylin-d6
Buspiron	3,4	286,212	122,2 (95,1)	100	42 (71)	10 (8)	Bupivacain
Cetirizin	5,9	289,248	140,1 (84,2)	75	30 (58)	8 (16)	Bupivacain
Clemastin	7,6	344,4	215,0 (130,2)	55	22 (16)	14 (7)	Bupivacain
Desipramin	3,0	267,147	72,1 (44,2)	76	29 (61)	12 (8)	Bupivacain
N-Desmethyl-venlafaxin	3,35	264,1	246,1 (215,1)	66	15 (21)	16 (14)	Bupivacain
Dimenhydrinat	3,81	470,311	171,2 (57,1)	66	29 (77)	12 (10)	Bupivacain
Diphenhydramin	4,7	256,2	167,0 (152,0)	46	17 (49)	10 (10)	Bupivacain
Doxycyclin	2,89	445,170	428,2	55	25	14	Bupivacain
Duloxetin	4,8	298,146	154,0 (44,1)	46	9 (33)	10 (8)	Bupivacain
Fluoxetin	2,9	310,159	44,1 (148,1)	56	39 (13)	8 (10)	Bupivacain
Imipramin	4,2	281,154	86,1 (58,1)	91	23 (59)	16 (10)	Bupivacain
Ketamin	2,61	239,026	126,1 (125,1)	50	37 (34)	8 (8)	Bupivacain
Kokain	3,35	304,338	182,0 (77,0)	41	27 (77)	12 (14)	Bupivacain
Levomepromazin	5,0	329,3	100,1 (58,2)	76	27 (58)	18 (10)	Bupivacain
Lidocain	3,3	235,1	86,2 (158,9)	71	26 (11)	16 (12)	Bupivacain
Mepivacain	3,3	247,2	98,0	77	28	5	Bupivacain
Moxifloxacin	3,35	402,2	384,2 (110,2)	90	30 (37)	12 (6)	Bupivacain
Palonosetron	2,5	297,2	110,0 (81,9)	115	37 (52)	6 (16)	Bupivacain

Substanz	RT [min]	Masse Q1 [Da]	Masse Q3 [Da]	DP [V]	CE [V]	CXP [V]	Interner Standard
Paroxetin	3,6	330,2	70,0 (192,1)	61	51 (29)	12 (12)	Bupivacain
Pipamperon	2,6	376,3	165,2 (98,0)	56	39 (43)	10 (8)	Bupivacain
Propranolol	3,5	260,2	116,2	85	30	10	Bupivacain
Pyrilamin	2,51	286,236	121,2 (241,2)	56	33 (19)	22 (22)	Bupivacain
Quetiapin	3,61	384,1	253,1 (221,2)	71	31 (50)	16 (14)	Bupivacain
Risperidon	3,36	411,3	191,2 (69,2)	96	39 (83)	18 (12)	Bupivacain
Rivastigmin	3,3	251,1	206,1 (86,1)	51	19 (33)	14 (16)	Bupivacain
Ropivacain	3,35	275,267	126,2 (84,1)	81	29 (59)	8 (16)	Bupivacain
Solifenacin	3,8	363,3	110,1 (193,1)	106	37 (41)	6 (12)	Bupivacain
Sufentanil	3,38	387,152	238,1 (110,9)	81	27 (53)	8 (8)	Bupivacain
Tamsulosin	3,4	409,227	228,1 (271,1)	91	33 (27)	14 (18)	Bupivacain
Terazosin	2,5	388,2	290,2 (247,1)	94	37 (43)	8 (16)	Bupivacain
Tetracain	2,93	265,1	176,1 (72,3)	61	20 (37)	10 (14)	Bupivacain
Venlafaxin	3,35	278,2	58,1 (121,0)	65	47 (39)	10 (15)	Bupivacain
50% Organische Zusatzstoffe (49,9% H_2O, 0,1% Ameisensäure, 42,9% Acetonitril, 7,1% Methanol)							
Amiodaron	8,0	646,025	58,1 (86,2)	110	95 (62)	12 (16)	Propanolol
Aripiprazol	2,2	448,1	285,2 (176,2)	111	37 (45)	18 (10)	Propanolol
Haloperidol	2,94	376,103	165,2 (123,2)	86	33 (56)	10 (8)	Propanolol
Terfenadin	3,87	472,295	436,5 (57,2)	114	36 (71)	12 (10)	Propanolol
Trimipramin	3,1	295,25	100,1 (58,2)	65	24 (59)	18 (10)	Propanolol

2.4 Proteinquantifizierung

Zur Normierung der Ergebnisse hinsichtlich der Zelldichte wurde eine Protein-quantifizierung durchgeführt. So konnten Unterschiede beim Ausplattieren, oder dem Zellwachstum, ausgeglichen werden. Zur Quantifizierung wurde mindestens ein Well je

Zelllinie verwendet. Die entsprechenden Wells wurden identisch zu den anderen Wells behandelt, es wurde lediglich reines HBSS+, ohne den Zusatz eines Substrates, verwendet. Lysiert wurden die Zellen in *Radio-Immunoprecipitation Assay* (RIPA) Lyse Puffer. Dazu wurden, bei Verwendung einer 24-Well Platte, 250 µl je Well verwendet. Bei der Verwendung einer 12-Well Platte wurden 500 µl je Well verwendet. Nach 10 min wurde das Lysat in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Im Anschluss wurden sechs Wells einer flachen 96-Well Platte mit jeweils 5 µl der Proteinprobe befüllt. Des Weiteren wurde eine Standardkurve, bestehend aus Rinderserumalbumin, in doppelter Ausführung, angesetzt. Zusätzlich wurden 200 µl einer Lösung, bestehend aus *Bicinchoninic Acid solution* (BCA) und einem Anteil von 2% Kupfersulfat, hinzugegeben. Weiterführend wurde die 96-Well Platte für 30 Minuten, bei einer Temperatur von 37°C, in den Inkubator gestellt. Nach Ablauf der Zeit wurde die Absorption, bei einer Wellenlänge von 570 nm, mit Hilfe eines Tecan Ultra Mikroplattenleser gemessen. Für diesen Vorgang wurden 2x2 Messpunkte je Well ausgewertet, die weitere Analyse wurde, unter Zuhilfenahme von Microsoft Excel, durchgeführt. Die folgende Abbildung 7 zeigt das Vorgehen der Proteinquantifizierung.

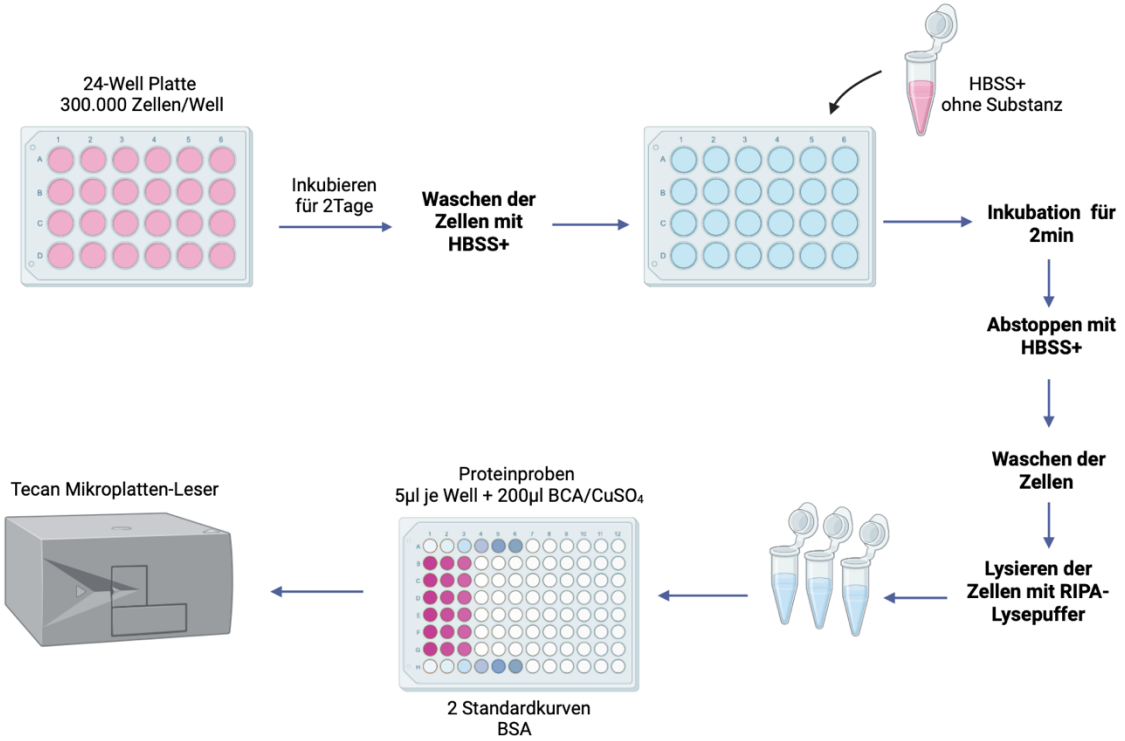

Abbildung 7: Proteinquantifizierung. Die Schematische Darstellung der Proteinquantifizierung ist in dieser Abbildung auf Grundlage, der in Kapitel 2.3.1 beschriebenen, Transportexperimente dargestellt. Diese Abbildung wurde mit BioRender.com erstellt.

2.5 Datenanalyse

Die Analyse der Daten, welche durch die HPLC-MS/MS Analyse generiert wurden, wurde mittels der Analyst Software durchgeführt. Hierzu wurden die Bereiche unter den ermittelten

Peaks integriert. Das Ziel war es, das Verhältnis der Aufnahme, zwischen der jeweiligen zu untersuchenden Transporter und der Kontrollzelllinie, zu ermitteln. Hierfür wurde die Substrataufnahme der Kontrollzelllinie ermittelt, welche großenteils auf einfache Diffusion zurückgeführt werden kann. Zur Errechnung des Verhältnisses wurde die Substrataufnehme, in die Transporter-überexprimierenden Zelllinie, durch die der Kontrollzelllinie dividiert. Das errechnete Verhältnis wurde als Ratio bezeichnet. Im Zuge der konzentrations-abhängigen Transportversuche wurde die Nettoaufnahme ermittelt. Dazu wurden im vorhinein Standardproben, mit einer definierten Substratkonzentration, hergestellt. Durch Subtraktion der Aufnahme in die Kontrollzelllinie, von der Aufnahme in die Transporter-überexprimierenden Zelllinie, wurde die Nettoaufnahme ermittelt. Die graphische Darstellung der zellulären Aufnahme, in Relation zu der Substratkonzentration, wurde unter Zuhilfenahme der Michaelis- Menten-Gleichung erstellt:

$$v = \frac{V_{max} * [S]}{(K_m + [S])}$$

V_{max} bezeichnet die maximale Reaktionsgeschwindigkeit, [S] die Substratkonzentration und K_m die Michaeliskonstante. Die intrinsische Clearance (Cl_{int}) wurde anschließend unter Betrachtung der kinetischen Parameter V_{max} und K_m, berechnet.

$$Cl_{int} = \frac{V_{max}}{K_m}$$

2.6 Statistische Darstellung und statistische Vergleiche

Alle Messungen wurden mindestens dreimal an unterschiedlichen Tagen durchgeführt. Für den jeweiligen Tag wurden die Transportverhältnisse ermittelt. Dieser Quotient wurde durch Division der Substanzaufnahme in die Transporter-überexprimierende Zelllinie durch die Aufnahme in die Kontrollzelllinie errechnet. Nach allen Messungen wurden für alle Substanzen schließlich die Mittelwerte (Summe der Quotienten dividiert durch die Anzahl der Versuchsdurchgänge) und deren Standardfehler berechnet.

Die Analyse des konzentrationsabhänigigen Transportes erfolgte mittels nichtlinearer Regressionsanalyse. Dafür wurde das Programm GraphPad Prism(5.01) verwendet. Unter Zuhilfenahme dieses Programmes konnten die Parameter der Michaelis-Menten-Gleichung bestimmt werden.

Für die Vergleiche bezüglich der chemischen Eigenschaften wurden Boxplots mittels dem Programm GraphPad Prism(5.01) erstellt. Diese wurden so erstellt, dass die jeweiligen Boxen 50% der mittleren Werte abbilden. Unter dem ersten Quartil (untere Ende der Box) liegen 25% der Werte, über dem dritten Quartil (obere Ende der Box) liegen ebenfalls 25% der Werte. Der Median wurde ebenfalls angegeben. Minimum und Maximum wurden durch die Whisker dargestellt.

Zur Analyse, ob signifikanter Transport vorlag, wurde eine statistische Testung durchgeführt. Dazu wurde ein t-Test für eine einzige Stichprobe verwendet. Mit diesem sollte ermittelt werden, ob der Mittelwert, welcher aus den Stichproben einer einzelnen Gruppe ermittelt wurde, von einem festgelegten Wert abweicht. Als festgelegter Wert wurde der Wert 1 ausgewählt. Eine Ratio von 1 lässt darauf schließen, dass die Substratkonzentration in der Transporter-überexprimierenden Zelllinie identisch hoch ist, wie die der Kontrollzelllinie und somit kein Transport über das untersuchte Transportprotein stattfindet. Es wurde ein zweiseitiger t-Test verwendet, der mit dem Programm GraphPad Prism(5.01) durchgeführt wurde. Die ermittelten Signifikanzen wurden jeweils in den Tabellen der Substrate und den Abbildungen angegeben.

3 Ergebnisse

Zur Charakterisierung der Transportproteine OCT3 (SLC22A3), OCTN1 (SLC22A4), OCTN2 (SLC22A5), MATE1 (SLC47A1), MATE2-K (SLC47A2) und SLC35G3 wurde der über diese Proteine vermittelte Transport von 102 Substanzen untersucht. Die Auswahl der Substanzen basierte auf einer Liste von Substraten, die von hCMEC-Zellen Transporter-vermittelt aufgenommen werden. Die hCMEC Zelllinie ist ein gut bekanntes Modell der Blut-Hirn-Schranke. Diese Liste wurde um einige wenige Substanzen erweitert, welche eine besondere Bedeutung für das ZNS aufweisen. Zunächst wurde der Transport für jede Substanz bei einer Standartkonzentration von 2,5 µM ermittelt. Anschließend wurden für eine Auswahl von Substanzen, welche zuvor als Substrate ermittelt wurden, konzentrations-abhängige Transportexperimente durchgeführt. Auf Grundlage der konzentrations-abhängigen Transportexperimente wurden die kinetischen Parameter V_{max}, K_m und Cl_{int} bestimmt. Als gutes Substrat werden Substrate bezeichnet, welche eine Ratio von ≥ 2 aufwiesen. Bei Ratio zwischen 1,5 - 2 wurden sie zu den schlechten Substraten eingeordnet.

3.1 OCT3

Um den Transport jeder Substanz über das Transportprotein OCT3 zu ermitteln, wurden die Transportexperimente mit einer Standardkonzentration von 2,5 µM durchgeführt. Die HEK293-Zellen wurden stabil mit OCT3 transfiziert. Zur Ermittlung der Ratio wurde das Verhältnis der Aufnahme der Substanzen in die Transportprotein-überexprimierende Zelllinie dividiert durch die Aufnahme der Kontrollzelllinie pcDNA5 verwendet (Kapitel 2.3.1). Die beiden Zelllinien wurden identisch behandelt und jeweils zwei Minuten mit der Substanz inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen nach Entfernung des Zellkultur-mediums lysiert und die Proben für die Massenspektrometrie aufbereitet (Kapitel 2.3.5). Die aufbereiteten Proben wurden im Anschluss mittels der HPLC-MS/MS-Analyse gemessen (Kapitel 2.3.6). Abbildung 8 stellt die Ergebnisse graphisch dar.

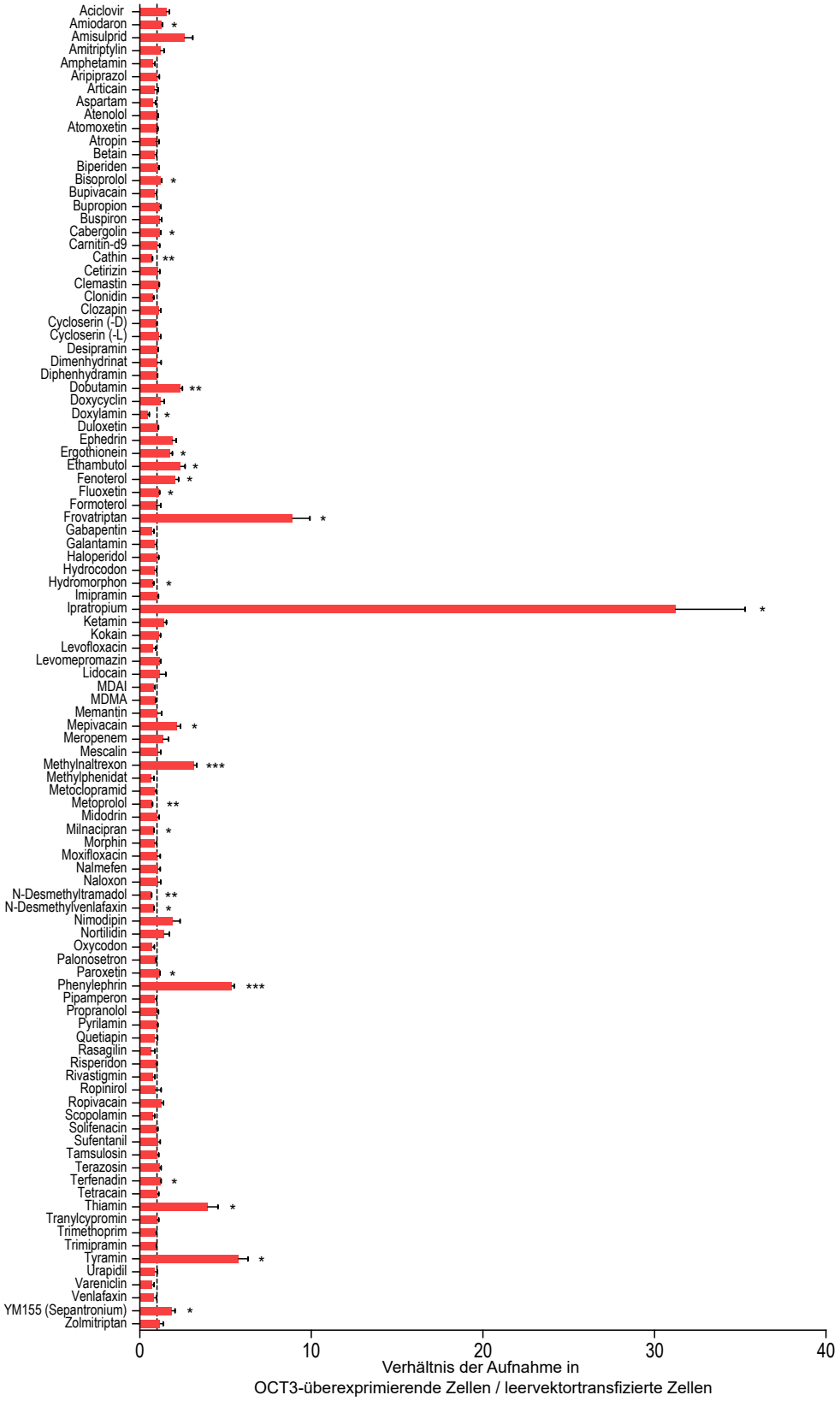

Abbildung 8: Transportraten der 102 Substanzen durch OCT3. Die Transportexperimente wurden für jede Substanz mit einer Standartkonzentration von 2,5 µM durchgeführt. Die Inkubationszeit betrug 2 Minuten. Die Ratios wurden ermittelt, indem die zelluläre Konzentration in der Zelllinie, welche das untersuchte Transportprotein überexprimiert, durch die Konzentration der Kontrollzelllinie pcDNA5,

dividiert wurde. Wies eine Substanz eine Ratio von mehr als 2 auf gilt diese als gutes Substrat. Bei einer Ratio von 1,5 - 2 handelt es sich um ein schlechtes Substrat. Die Balken zeigen die Mittelwerte und Standardfehler. Es wurden drei voneinander unabhängige Durchgänge durchgeführt. Die Signifikanz (P) wurde mit dem zweiseitigen Einstichproben-t-Test ermittelt, wobei geprüft wurde, ob sich die Ratio signifikant von 1 unterschied ($P \leq 0{,}05$, *; $P \leq 0{,}01$, **; $P \leq 0{,}001$, ***). Die Abkürzung MDAI steht für 5,6-Methylendioxy-2-aminoindane. Die Abkürzung MDMA steht für 3,4-Methylendioxy-N-methylamphetamin.

Von 102 Substanzen konnten elf als gutes Substrat charakterisiert werden. Weitere fünf fielen in die Kategorie eines schlechten Substrates. Die höchste Ratio wies Ipratropium auf, diese lag bei 31,2 (Tabelle 12). Für einige der getesteten Substanzen wurde eine Ratio von unter eins ermittelt. Dies bedeutet, dass weniger der getesteten Substanz in die OCT3-überexprimierende Zelllinie aufgenommen wird als in die Vergleichszelllinie. Ein möglicher Efflux-Transport wurde im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht genauer untersucht.

Tabelle 12: Gute und schlechte Substrate von OCT3 mit Ratio und P-Wert.

Substrat	Ratio	P-Wert	Substrat	Ratio	P-Wert
Aciclovir	1,55	0,08	Ipratropium	31,2	0,02
Amisulprid	2,62	0,08	Mepivacain	2,18	0,03
Dobutamin	2,37	0,008	Methylnaltrexon	3,16	0,0009
Ephedrin	1,90	0,06	Nimodipin	1,94	0,15
Ergothionein	1,78	0,03	Phenylephrin	5,38	0,0008
Ethambutol	2,39	0,03	Thiamin	3,96	0,04
Fenoterol	2,09	0,02	Tyramin	5,75	0,01
Frovatriptan	8,91	0,02	YM155 (Sepantronium)	1,87	0,04

Für fünf Substanzen, die zuvor als gute Substrate identifiziert wurden, wurden im Anschluss konzentrationsabhängige Transportexperimente durchgeführt, wie sie in Kapitel 2.3.3 beschrieben sind. Dies diente der Charakterisierung der Affinität der Substrate zum Transporter und der maximalen Transportrate (Abbildung 9).

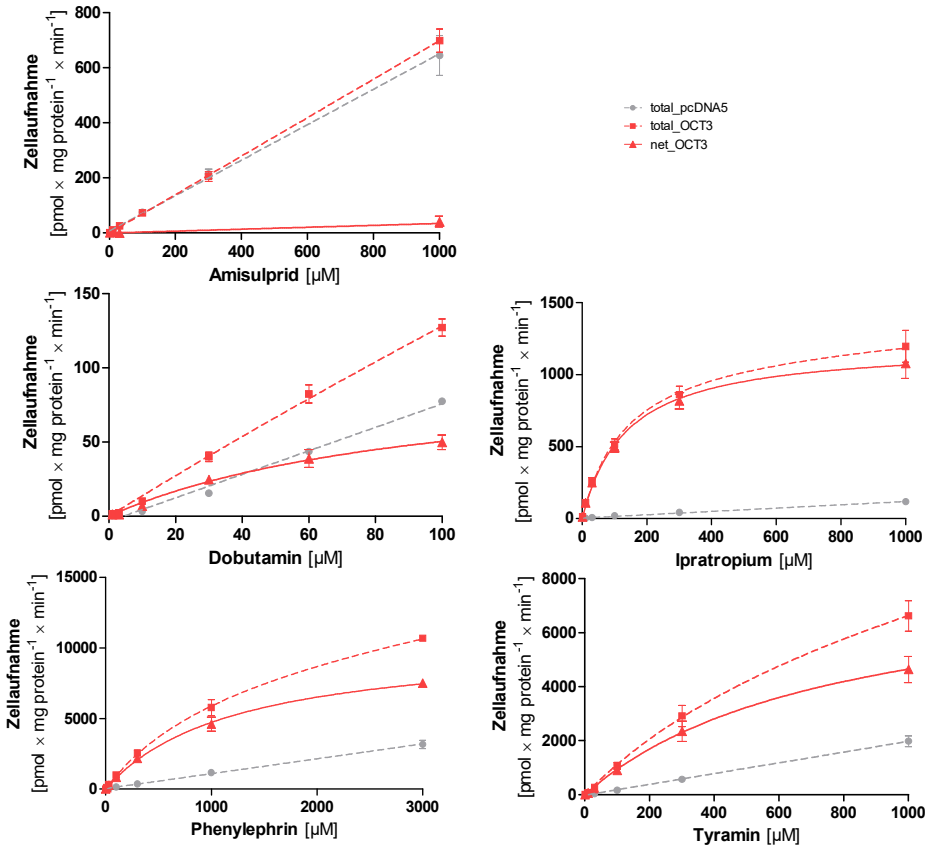

Abbildung 9: Konzentrationsabhängige Transportexperimente an OCT3. Die Transportexperimente wurden für jede Substanz mit unterschiedlichen Konzentrationen durchgeführt. Dazu wurden HEK 293 Zellen verwendet, welche stabil mit OCT3 transfiziert wurden. Die Inkubationszeit betrug 2 Minuten. Es wurden jeweils drei unabhängige Messungen durchgeführt. Die Nettoaufnahme wurde durch Subtraktion der Gesamtaufnahme der pcDNA5 transfizierten Zellen von der Gesamtaufnahme der Transporter-überexprimierenden Zelllinie berechnet. Eine transportkinetische Michaelis-Menten-Analyse wurde für die Daten der Nettoaufnahme durchgeführt. Die Messwerte sind als Mittelwerte ± SEM dargestellt. Die grau dargestellten Kurven stellen die totale Aufnahme in die Zelllinie pcDNA5 dar. Die gestrichelten roten Linien stehen für die totale Aufnahme in die OCT3-überexprimierende Zelllinie. Die Nettoaufnahme dieser Zelllinie ist durch die durchgängige rote Linie dargestellt.

Die konzentrationsabhängigen Transportexperimente für die Substanz Amisulprid zeigten keinen sättigbaren Transport, was dazu passt, dass auch die Ratio zwar deutlich über 1 lag, aber statistisch nicht signifikant unterschiedlich von 1 war. Für das Substrat Dobutamin konnte ein sättigbarer Transport ermittelt werden. Der hohe K_m-Wert deutete auf eine geringe Affinität des Transportproteins für Dobutamin hin. Auch für die beiden Substrate Phenylephrin und Tyramin wurde, basierend auf dem hohen K_m-Wert, eine geringe Substrataffinität festgestellt. Für diese beiden Substrate wiesen die Transporter-überexprimierenden Zelllinien eine hohe Substratkapazität auf. So lag der Wert für V_{max} des Substrates Phenylephrin bei 10497 pmol x mg Protein^{-1} x min^{-1} (Tabelle 13). Auch die Substanz Ipratropium wurde von der analysierten Zelllinie aufgenommen. Der im Verhältnis zum V_{max}-Wert von 1210 pmol x mg Protein^{-1} x min^{-1} niedrige K_m-Wert zeigte eine hohe Affinität des Transportproteins für dieses Substrat.

Tabelle 13: Kinetische Parameter für ausgewählte Substrate des Transportprotein OCT3. Basierend auf den konzentrationsabhängigen Transportexperimenten konnten die Werte für K_m, V_{max}, und Cl_{int} ermittelt werden. Die Abkürzung SEM (standard error of the mean) steht für den Standardfehler des Mittelwertes. Für die Substanz Amisulprid konnte kein sättigbarer Transport ermittelt werden, daraus resultierend sind keine Werte angegeben.

Substanz	**K_m [µM] ± SEM**	**V_{max} [pmol x mg Protein^{-1} x min^{-1}] ± SEM**	**Cl_{int} [mL x g Protein^{-1} x min^{-1}] ± SEM**
Amisulprid	-	-	-
Dobutamin	98,5 ± 39,2	100,1 ± 23,2	1,02 ± 0,64
Ipratropium	135 ± 24,7	1210 ± 68,93	8,95 ± 2,15
Phenylephrin	1223 ± 187	10497 ± 714,5	8,58 ± 1,9
Tyramin	779 ± 257	8271 ± 1431	10,6 ± 5,34

3.2 OCTN1

Um den Transport jeder Substanz über das Transportprotein OCTN1 zu ermitteln, wurden die Transportexperimente mit einer Standartkonzentration von 2,5 µM durchgeführt. Der Versuchsaufbau für dieses Experiment ist in dem Kapitel 2.3.1 detailliert beschrieben. Die Ergebnisse der Transportmessungen sind in Abbildung 10 dargestellt.

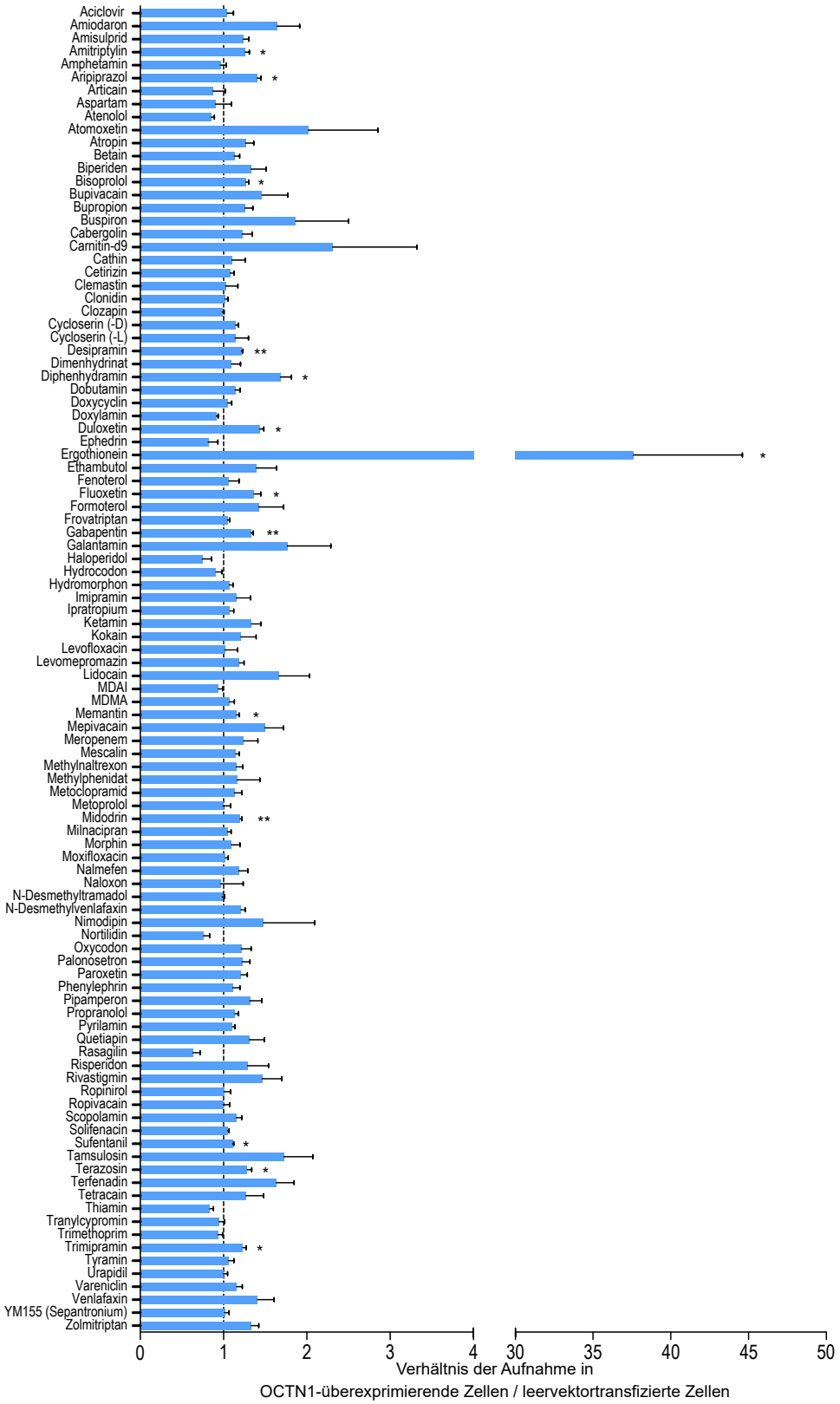

Abbildung 10: Transportraten der 102 Substanzen durch OCTN1. Die Daten zur zellulären Aufnahme in die überexprimierenden Zellen sind als Mittelwert ± SEM angegeben. Es wurden drei voneinander unabhängige Durchgänge durchgeführt. Die Signifikanz (P) wurde mit dem zweiseitigen Einstichproben-t-Test ermittelt, wobei geprüft wurde, ob sich die Ratio signifikant von 1 unterschied ($P \leq 0{,}05$, *; $P \leq 0{,}01$, **; $P \leq 0{,}001$ = ***).

Von 102 Substanzen konnten nur drei als gute Substrate charakterisiert werden. Weitere sieben zählen zu den schlechten Substraten. Ergothionein wies mit 36,1 die höchste Ratio auf. Für alle restlichen Substanzen konnte kein merklicher Transport festgestellt werden. Die Substrate sind in (Tabelle 14) genannt.

Tabelle 14: Gute und schlechte Substrate von OCTN1 mit Ratio und P-Wert.

Substrat	Ratio	P-Wert	Substrat	Ratio	P-Wert
Amiodaron	1,64	0,08	Ergothionein	36,1	0,01
Atomoxetin	2,02	0,35	Galantamin	1,77	0,28
Buspiron	1,87	0,31	Lidocain	1,67	0,21
Carnitin-d9	2,31	0,32	Tamsulosin	1,72	0,17
Diphenhydramin	1,68	0,04	Terfenadin	1,63	0,1

3.3 OCTN2

Es wurden auch hier zunächst Transportexperimente bei einer Standartkonzentration von 2,5 µM durchgeführt, um den Transport jeder Substanz über das Transportprotein OCTN2 zu ermitteln (Abbildung 11).

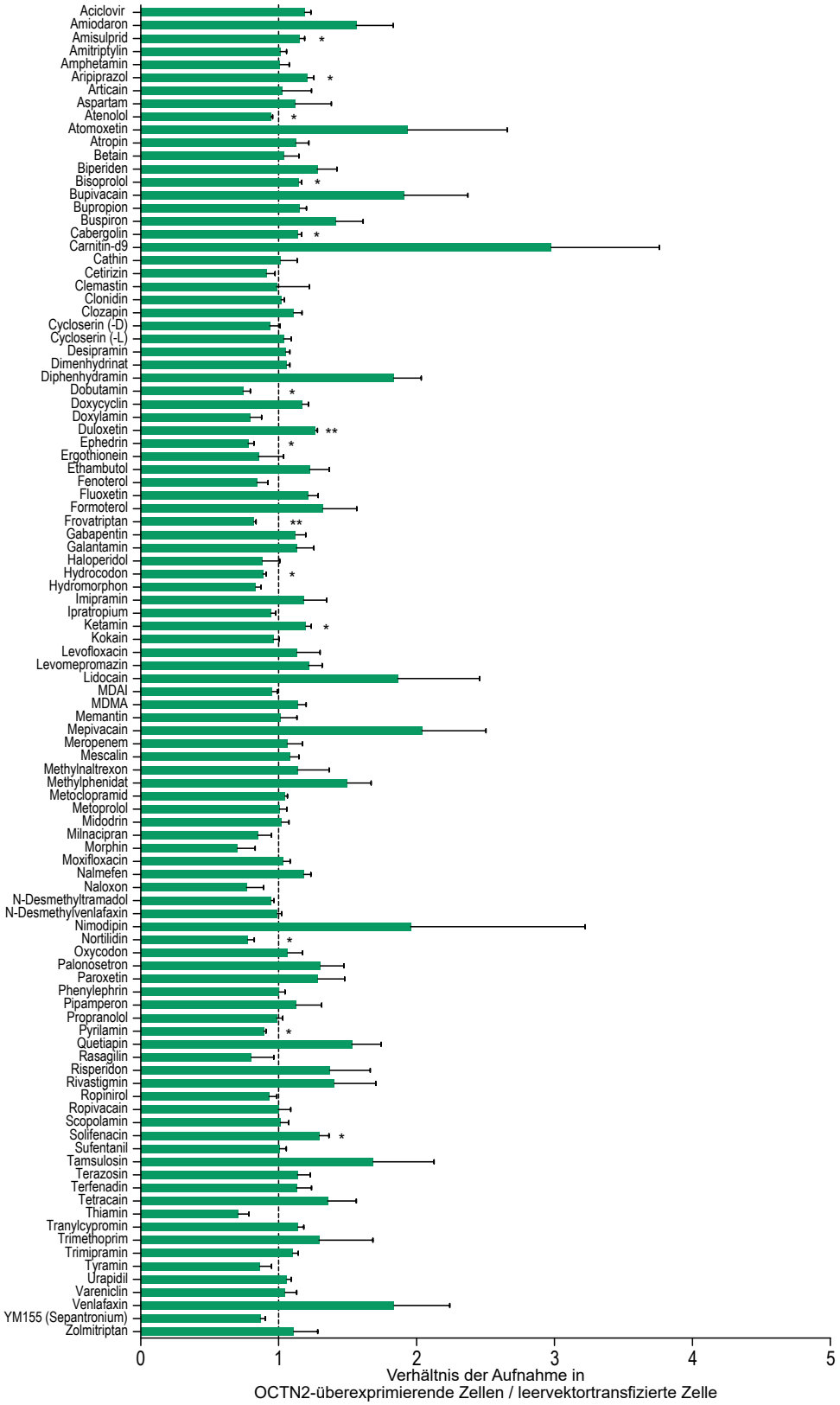

Abbildung 11: Transportraten der 102 Substanzen durch OCTN2. Die Daten der Aufnahme-Verhältnisse bei OCTN2 sind als Mittelwert ± SEM angegeben. Die Signifikanz (P) wurde mit dem zweiseitigen Einstichproben-t-Test ermittelt, wobei geprüft wurde, ob sich die Ratio signifikant von 1 unterschied ($P \leq 0{,}05$, *; $P \leq 0{,}01$, **; $P \leq 0{,}001$, ***). Es wurden drei voneinander unabhängige Durchgänge durchgeführt.

Basierend auf den Transportraten bei 2,5 µM konnten Carnitin und Mepivacain als gute Substrate charakterisiert werden. Die Ratio von Carnitin lag bei 2,98 und die von Mepivacain mit 2,04 lediglich knapp über dem Wert von 2. Weitere neun Substanzen fielen in die Rubrik der schlechten Substrate (Tabelle 15). Die restlichen Substanzen konnten nicht als Substrat des Transportproteins OCTN2 identifiziert werden.

Tabelle 15: Gute und schlechte Substrate von OCTN2 mit Ratio und P-Wert.

Substrat	Ratio	P-Wert	Substrat	Ratio	P-Wert
Amiodaron	1,56	0,17	Mepivacain	2,04	0,15
Atomoxetin	1,94	0,32	Nimodipin	1,96	0,53
Bupivacain	1,91	0,19	Quetiapin	1,53	0,13
Carnitin-d9	2,98	0,13	Tamsulosin	1,69	0,26
Diphenhydramin	1,83	0,053	Venlafaxin	1,84	0,17
Lidocain	1,86	0,28			

3.4 MATE1

Im Gegensatz zu den Transportexperimenten bei den anderen Transportproteinen wurde bei den beiden MATE-Transportern vor der eigentlichen Transportmessung der Protonengradient an der Zellmembran umgekehrt, indem zuvor 30 Minuten mit zusätzlichem 30 mM Ammoniumchlorid inkubiert wurde (2.3.2). Sodann wurden die Zelllinien für jeweils eine Minute mit dem Substrat inkubiert (siehe 2.3.2.). Anschließend wurden die Proben für die HPLC-MS/MS-Analyse vorbereitet (siehe 2.3.5) und mittels dieser analysiert (siehe 2.3.6.). Die Abbildung 12 stellt die Ratios der einzelnen Substanzen für das Transportprotein MATE1 dar.

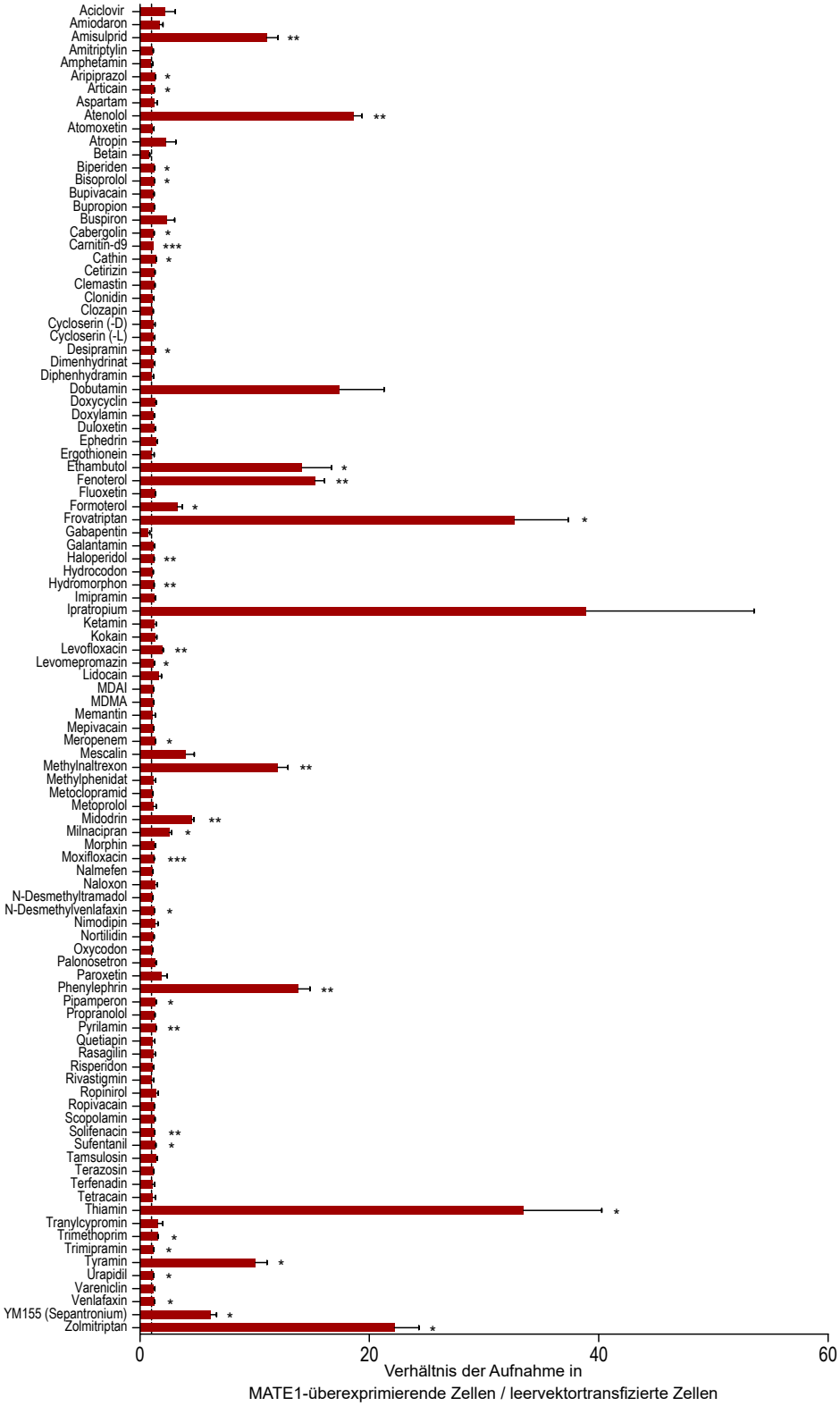

Abbildung 12: Transportraten der 102 Substanzen durch MATE1. Die Transportexperimente wurden für jede Substanz mit einer Standartkonzentration von 2,5 µM durchgeführt. Die Inkubationszeit betrug eine Minute. Die Daten sind als Mittelwert ± SEM angegeben. Die Signifikanz (P) wurde mit dem zweiseitigen Einstichproben-t-Test ermittelt, wobei geprüft wurde, ob sich die Ratio signifikant von 1 unterschied ($P \leq 0{,}05$, *; $P \leq 0{,}01$, **; $P \leq 0{,}001$ = ***). Es wurden drei voneinander unabhängige Durchgänge durchgeführt.

Von 102 Substanzen konnten 26 als Substrat identifiziert werden. Von diesen sind 20 als gute Substrate und 6 als schlechte Substrate zu charakterisieren. Die höchste Ratio wies Ipratropium mit 38,9 auf (Tabelle 16). Auch Thiamin und Frovatriptan wiesen jeweils Raten von über 30 auf.

Tabelle 16: Gute und schlechte Substrate von MATE1 mit Ratio und P-Wert

Substrat	Ratio	P-Wert	Substrat	Ratio	P-Wert
Aciclovir	2,22	0,29	Lidocain	1,64	0,10
Amiodaron	1,72	0,12	Mescalin	4,00	0,056
Amisulprid	11,0	0,0098	Methylnaltrexon	12,0	0,007
Atenolol	18,7	0,0016	Midodrin	4,53	0,003
Atropin	2,27	0,28	Milnacipran	2,54	0,02
Buspiron	2,36	0,17	Paroxetin	1,92	0,19
Dobutamin	17,4	0,051	Phenylephrin	13,8	0,007
Ethambutol	14,1	0,036	Thiamin	33,4	0,042
Fenoterol	15,2	0,004	Tranylcypromin	1,57	0,31
Formoterol	3,25	0,04	Trimethoprim	1,52	0,013
Frovatriptan	32,6	0,04	Tyramin	10,1	0,012
Ipratropium	38,9	0,12	YM155 (Sepantropium)	6,15	0,01
Levofloxacin	1,93	0,009	Zolmitriptan	22,2	0,01

Auf diesen Daten basierend wurden für interessante Substrate konzentrationsabhängige Transportexperimente durchgeführt (Abbildung 13).

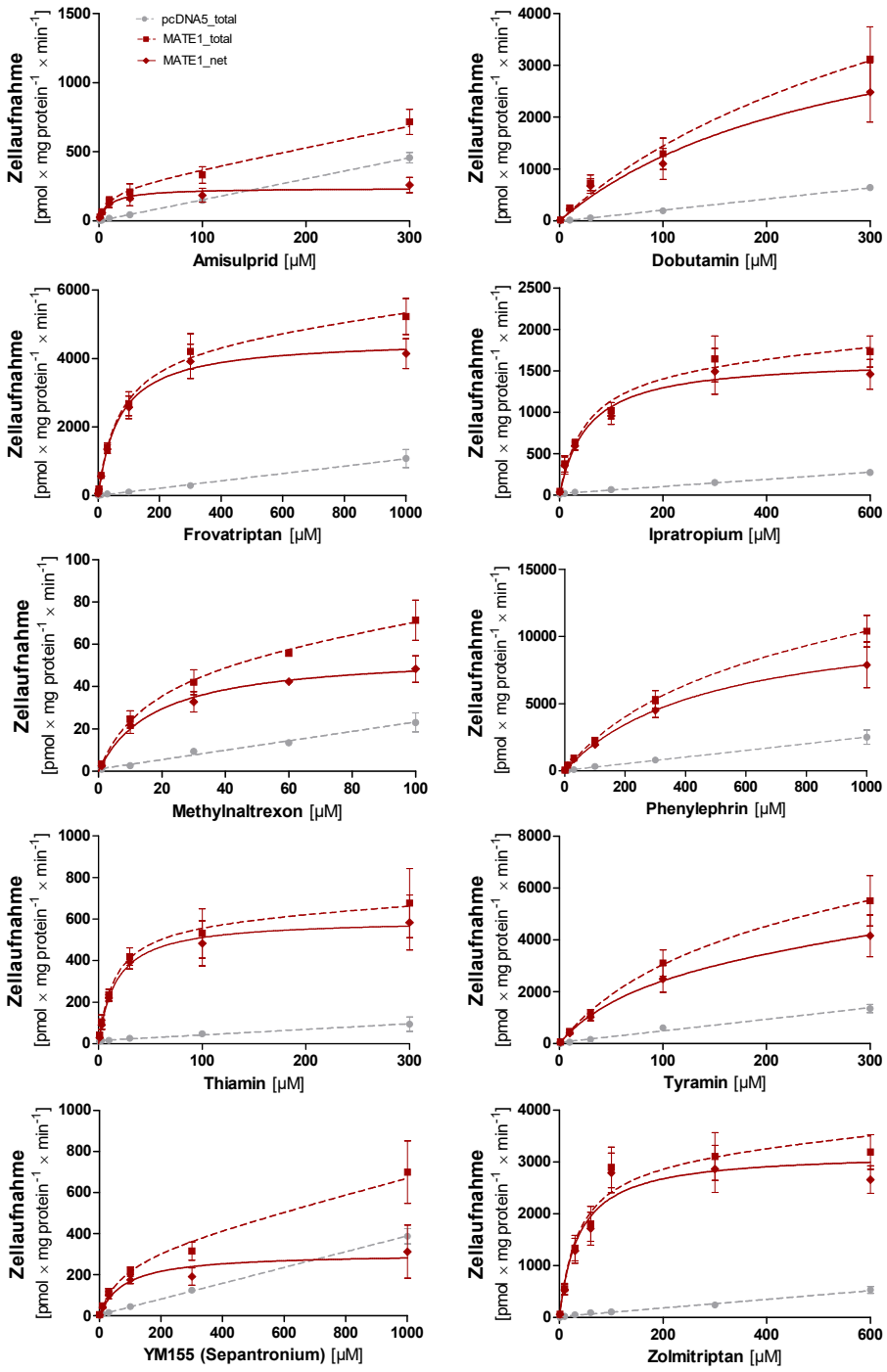

Abbildung 13: Konzentrationsabhängige Transportexperimente an MATE1. Die Transportexperimente wurden für jede Substanz mit mehreren unterschiedlichen Konzentrationen durchgeführt. Dazu wurden HEK 293 Zellen verwendet, welche stabil mit MATE1 transfiziert wurden. Die Inkubationszeit betrug eine Minute und es wurden jeweils drei unabhängige Messungen durchgeführt. Die Nettoaufnahme wurde durch Subtraktion der Gesamtaufnahme der pcDNA5 transfizierten Zellen von der Gesamtaufnahme der Transporter-überexprimierenden Zelllinie berechnet. Eine transportkinetische Michaelis-Menten-Analyse wurde für die Daten der Nettoaufnahme durchgeführt. Alle Daten sind als Mittelwerte ± SEM dargestellt. Die grau dargestellten Kurven stellen die totale Aufnahme in die Zelllinie pcDNA5 dar. Die gestrichelten roten Linien stehen für die totale Aufnahme in die MATE1-überexprimierende Zelllinie. Die Nettoaufnahme dieser Zelllinie ist durch die durchgängige rote Linie dargestellt.

Für alle zehn untersuchten Substanzen konnte eine Aufnahme durch die untersuchte Zelllinie festgestellt werden. Amisulprid zeigte eine recht hohe Affinität zu MATE1 bei geringer Substratkapazität (Tabelle 17). Für das Substrat Frovatriptan zeigte sich, bezogen auf den V_{max}-Wert von 4568 pmol x mg Protein^{-1} x min^{-1}, ein geringer K_m-Wert und damit bedeutend eine hohe Substrataffinität. Der konzentrationsabhängige Transport der Substanzen Dobutamin, Phenylephrin und Tyramin ähnelten sich, sie alle zeichnete ein verhältnismäßig hoher K_m-Wert, bei einem gleichzeitig hohen V_{max}-Wert aus. Für Zolmitriptan konnten neben einem niedrigen K_m-Wert ein hoher V_{max}-Wert ermittelt werden. Gleichzeitig konnte für diese Substanz die höchste intrinsische Clearance ermittelt werden.

Tabelle 17: Kinetische Parameter für ausgewählte Substrate des Transportproteins MATE1

Substanz	K_m [µM] ± SEM	V_{max} [pmol x mg Protein^{-1} x min^{-1}] ± SEM	Cl_{int} [mL x g Protein^{-1} x min^{-1}] ± SEM
Amisulprid	10,6 ± 6,33	238 ± 32,4	22,4 ± 16,4
Dobutamin	277 ± 224	4713 ± 2127	17,0 ± 21,4
Frovatriptan	70,4 ± 16,1	4568 ± 281	64,9 ± 18,8
Ipratropium	54,4 ± 18,7	1646 ± 157	30,3 ± 13,3
Methylnaltrexon	17,9 ± 6,85	55,8 ± 6,59	3,12 ± 1,57
Phenylephrin	474 ± 205	11611 ± 2238	24,5 ± 15,3
Thiamin	17,2 ± 7,26	599 ± 64,1	34,9 ± 18,5
Tyramin	85,5 ± 54,4	3657 ± 874	42,8 ± 37,5
YM155	80,9 ± 56,6	304 ± 58,8	3,76 ± 3,36
Zolmitriptan	38,1 ± 12,7	3185 ± 290	83,6 ± 35,5

3.5 MATE2-K

Zunächst wurden die Transportexperimente mit einer Standartkonzentration von 2,5 µM durchgeführt. Dies diente dazu zu ermitteln, bei welchen Substanzen es sich um ein Substrat, des Transportproteins MATE2-K, handelt. Die Zelllinien wurden jeweils eine Minute mit dem Substrat inkubiert (siehe 2.3.2.). Anschließend wurden die Proben für die HPLC-MS/MS-Analyse vorbereitet (siehe 2.3.5) und mittels dieser analysiert (siehe 2.3.6.). Die

Abbildung 14 stellt die Ratios der einzelnen Substanzen für das Transportprotein MATE2-K dar.

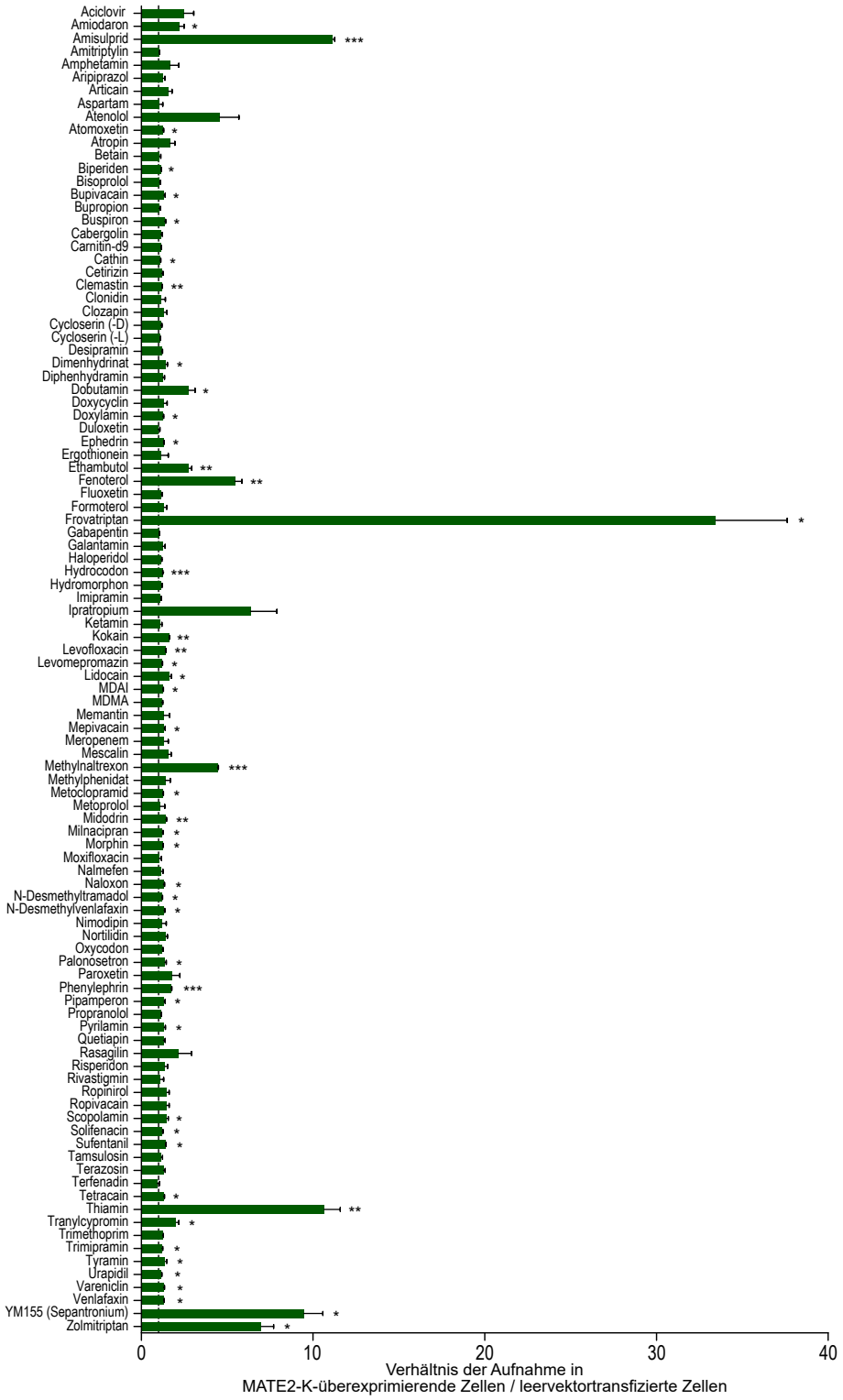

Abbildung 14: Transportraten der 102 Substanzen durch MATE2-K. Die Daten der Aufnahme-Verhältnisse bei MATE2-K sind als Mittelwert ± SEM angegeben. Die Signifikanz (P) wurde mit dem zweiseitigen Einstichproben-t-Test ermittelt, wobei geprüft wurde, ob sich die Ratio signifikant von 1 unterschied (P ≤ 0,05, *; P ≤ 0,01, **; P ≤ 0,001, ***). Es wurden drei voneinander unabhängige Durchgänge durchgeführt.

Von den Untersuchten 102 Substanzen konnten 23 als Substrat identifiziert werden. Von diesen konnte für 15 eine Ratio von über 2 ermittelt werden, somit zählen sie zu den guten Substraten. Die höchste Ratio wurde für die Substanz Frovatriptan gemessen (Tabelle 18). Die restlichen acht Substrate sind schlechte Substrate. Alle anderen Substanzen konnten nicht als Substrat identifiziert werden.

Tabelle 18: Gute und schlechte Substrate von MATE2-K mit Ratio und P-Wert.

Substrat	Ratio	P-Wert	Substrat	Ratio	P-Wert
Aciclovir	2,48	0,12	Kokain	1,60	0,003
Amiodaron	2,21	0,047	Lidocain	1,65	0,02
Amisulprid	11,1	0,0001	Mescalin	1,56	0,1
Amphetamin	1,68	0,32	Methylnaltrexon	4,43	0,0002
Articain	1,59	0,099	Paroxetin	1,79	0,23
Atenolol	4,56	0,09	Phenylephrin	1,75	0,0009
Atropin	1,67	0,14	Rasagilin	2,16	0,27
Dobutamin	2,77	0,04	Thiamin	10,6	0,01
Ethambutol	2,78	0,009	Tranylcypromin	2,03	0,02
Fenoterol	5,46	0,008	YM155 (Sepantropium)	9,45	0,017
Frovatriptan	33,4	0,02	Zolmitriptan	6,98	0,014
Ipratropium	6,36	0,07			

Für eine Auswahl von zehn Substanzen wurden anschließend konzentrationsabhängige Transportversuche durchgeführt. Für diese Experimente wurden die identischen Substanzen ausgewählt, wie auch für MATE1, um die beiden Transportproteine vergleichen zu können. Von den zehn ausgewählten Substanzen wurden zuvor acht als gute Substrate identifiziert. Phenylephrin wurde als schlechtes Substrat identifiziert und Tyramin als kein Substrat bestimmt. Die Abbildung 15 stellt die Graphen der Konzentrationsabhängigen Transport-experimente dar.

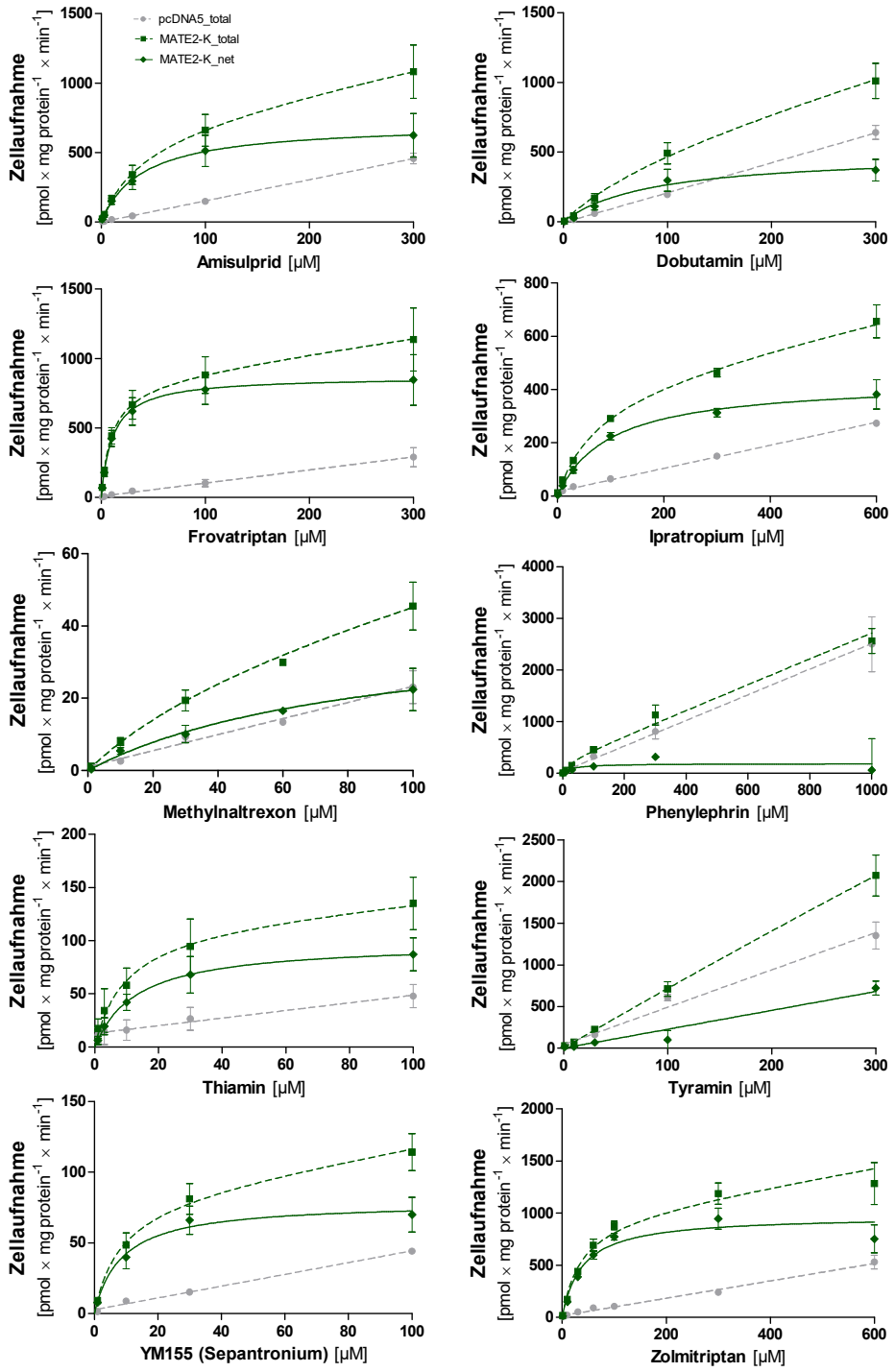

Abbildung 15: Konzentrationsabhängige Transportexperimente an MATE2-K. Die Transportexperimente wurden für jede Substanz mit unterschiedlichen Konzentrationen durchgeführt. Dazu wurden HEK 293 Zellen verwendet, welche stabil mit MATE2-K transfiziert wurden. Die Inkubationszeit betrug eine Minute. Es wurden jeweils drei unabhängige Durchgänge durchgeführt. Die Nettoaufnahme wurde durch Subtraktion der Gesamtaufnahme der pcDNA5 transfizierten Zellen von der Gesamtaufnahm der Transporter überexprimierenden Zelllinie berechnet. Eine transportkinetische Michaelis-Menten-Analyse wurde für die Daten der Nettoaufnahme durchgeführt. Alle Daten sind als Mittelwerte ± SEM dargestellt. Die grau dargestellten Kurven stellen die totale Aufnahme in die Zelllinie pcDNA5 dar. Die gestrichelten grünen Linien stehen für die totale Aufnahme in die MATE2-K-überexprimierende Zelllinie. Die Nettoaufnahme dieser Zelllinie ist durch die durchgängige grüne Linie dargestellt.

Für die Substanzen Tyramin und Phenylephrin konnte nahezu kein sättigungsbarer Transport ermittelt werden. Somit konnte gezeigt werden, dass sie keine Substrate des Transportproteins MATE2-K sind. Für Dobutamin hingegen konnte ein hoher K_m-Wert und ein V_{max}-Wert von 493,2 pmol x mg Protein^{-1} x min^{-1} festgestellt werden (Tabelle 19). Auf eine hohe Affinität für Frovatriptan ließ sich durch den ermittelten, geringen K_m-Wert schließen. Gleichzeitig zeichnete sich der Transport dieses Substrates durch eine hohe Substratkapazität aus. Im Vergleich zu den anderen Substanzen konnte für diese die höchste intrinsische Clearance ermittelt werden. Für Methylnaltrexon zeigten die Graphen ein gänzlich anderes Bild. Der hohe K_m-Wert und niedrige V_{max}-Wert zeigten eine geringe Substrataffinität, bei zeitgleich geringer Substratkapazität. Thiamin und YM155 zeigten eine mittelmäßige Affinität bei geringem V_{max}-Wert. Den höchsten Wert für V_{max}, der zehn untersuchten Substanzen, konnte für Zolmitriptan ermittelt werden und lag bei 973,7 pmol x mg Protein^{-1} x min^{-1}. Der, im Verhältnis zu diesem Wert, geringe K_m-Wert ließ Rückschlüsse auf die hohe Substrataffinität ziehen.

Tabelle 19: Kinetische Parameter für ausgewählte Substrate von MATE2-K

Substanz	**K_m [µM] ± SEM**	**V_{max} [pmol x mg Protein^{-1} x min^{-1}] ± SEM**	**Cl_{int} [mL x g Protein^{-1} x min^{-1}] ± SEM**
Amisulprid	39,9 ± 19,2	710 ± 104	17,8 ± 11,2
Dobutamin	86,4 ± 49,7	493 ± 107	5,71 ± 4,52
Frovatriptan	11,2 ± 4,29	869 ± 77,0	77,8 ± 36,8
Ipratropium	98,7 ± 18,0	433 ± 25,7	4,38 ± 1,06
Methylnaltrexon	86,8 ± 75,5	41,6 ± 19,9	0,48 ± 0,65
Phenylephrin	-	-	-
Thiamin	13,2 ± 6,58	98,4 ± 14,8	7,44 ± 4,82
Tyramin	-	-	-
YM155 (Sepantronium)	8,66 ± 4,62	78,9 ± 10,4	9,12 ± 6,06
Zolmitriptan	38,5 ± 9,69	974 ± 67,1	25,3 ± 8,09

3.6 SLC35G3

Zur besseren Charakterisierung des Transportproteins SLC35G3 wurde der Transport über dieses für 102 Substanzen untersucht. Dafür wurden für jede Substanz Transportexperimente mit einer Standardkonzentration von 2,5 µM durchgeführt (Abbildung 16). Die Zellen wurden für jeweils 2 Minuten mit dieser inkubiert (siehe 2.3.1.). Anschließend wurden die einzelnen Proben für die HPLC-MS/MS-Analyse vorbereitet (2.3.5) und mittels dieser analysiert (2.3.6).

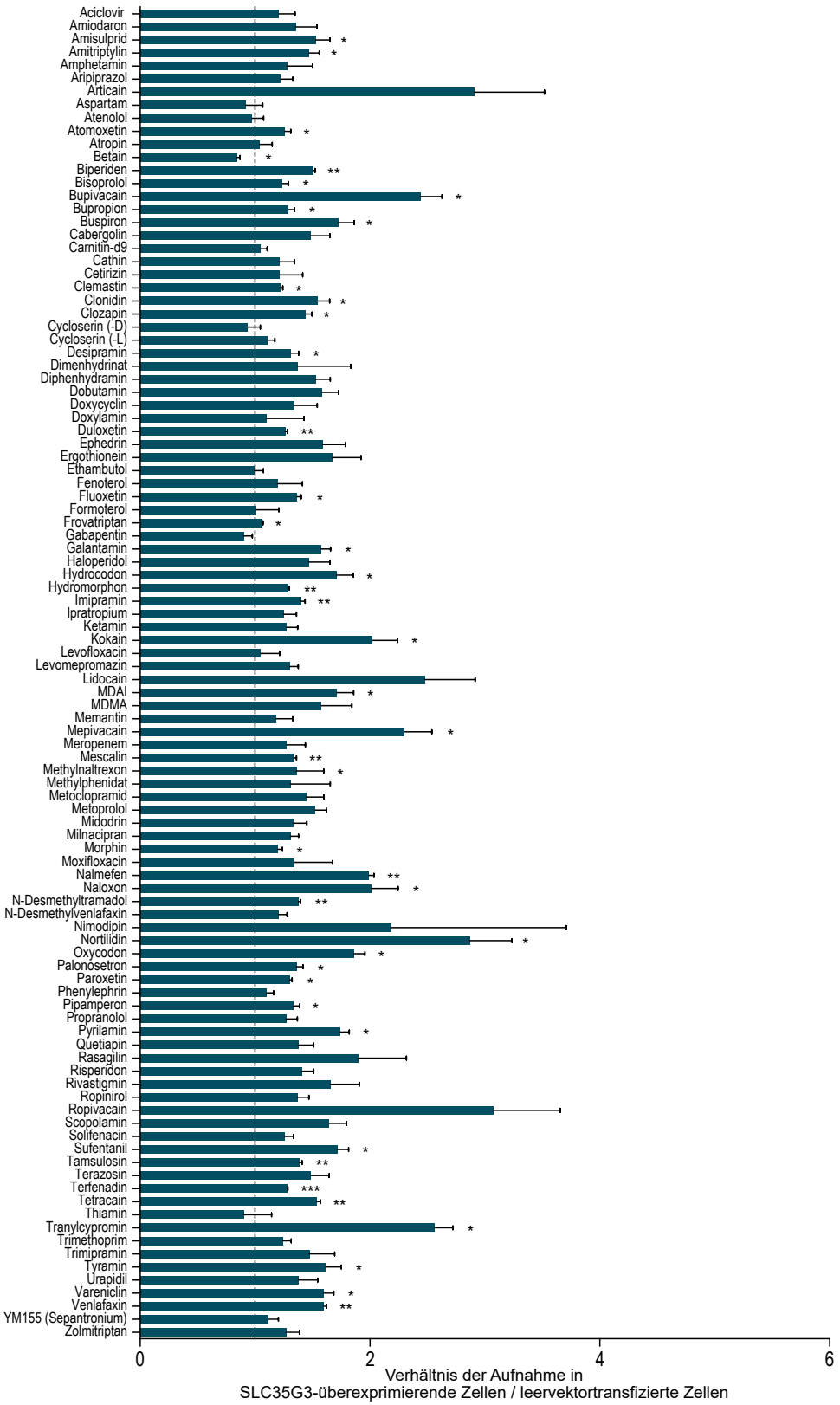

Abbildung 16: Transportraten der 102 Substanzen durch SLC35G3. Die Daten der Aufnahme-Verhältnisse bei SLC35G3 sind als Mittelwert ± SEM angegeben. Die Signifikanz (P) wurde mit dem zweiseitigen Einstichproben-t-Test ermittelt, wobei geprüft wurde, ob sich die Ratio signifikant von 1 unterschied ($P \leq 0{,}05$, *; $P \leq 0{,}01$, **; $P \leq 0{,}001$ = ***). Es wurden drei voneinander unabhängige Durchgänge durchgeführt.

Von 102 Substanzen konnten 10 als gute Substrate identifiziert werden. Weitere 24 Substanzen zählen zu den schlechten Substraten. Die höchste Ratio konnte für Ropivacain ermittelt werden und lag bei 3,07 (Tabelle 20).

Tabelle 20: Gute und schlechte Substrate von SLC35G3 mit Ratio und P-Wert.

Substrat	Ratio	P-Wert	Substrat	Ratio	P-Wert
Amisulprid	1,53	0,0498	Metoprolol	1,52	0,03
Articain	2,91	0,088	Nalmefen	1,99	0,002
Biperiden	1,50	0,0014	Naloxon	2,01	0,049
Bupivacain	2,44	0,02	Nimodipin	2,18	0,52
Buspiron	1,72	0,04	Nortilidin	2,87	0,04
Clonidin	1,54	0,04	Oxycodon	1,86	0,013
Diphenhydramin	1,53	0,06	Pyrilamin	1,74	0,011
Dobutamin	1,58	0,06	Rasagilin	1,90	0,17
Ephedrin	1,59	0,09	Rivastigmin	1,65	0,12
Ergothionein	1,67	0,12	Ropivacain	3,07	0,07
Galantamin	1,57	0,02	Scopolamin	1,64	0,054
Hydrocodon	1,71	0,04	Sufentanil	1,72	0,019
Kokain	2,02	0,045	Tetracain	1,54	0,004
Lidocain	2,48	0,08	Tranylcypromin	2,56	0,0101
MDAI	1,71	0,04	Tyramin	1,61	0,047
MDMA	1,58	0,16	Vareniclin	1,60	0,02
Mepivacain	2,30	0,03	Venlafaxin	1,60	0,002

Basierend auf diesen Daten wurden für fünf Substanzen weitere konzentrationsabhängige Transportexperimente durchgeführt (Abbildung 17).

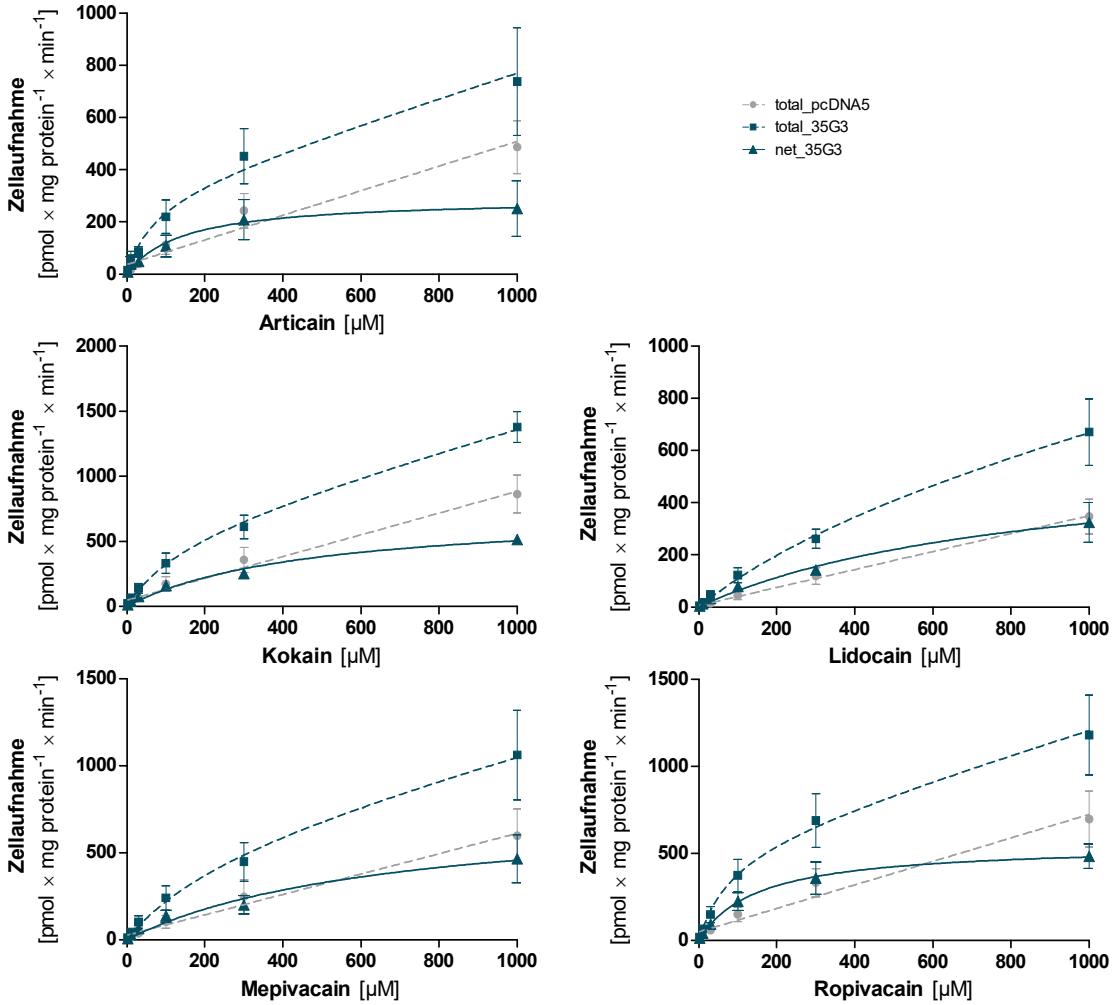

Abbildung 17: Konzentrationsabhängige Transportexperimente an SLC35G3. Transportexperimente wurden für jede Substanz mit unterschiedlichen Konzentrationen durchgeführt. Dazu wurden HEK 293 Zellen verwendet, welche stabil mit SLC35G3 transfiziert wurden. Die Inkubationszeit betrug zwei Minuten. Es wurden jeweils drei unabhängige Messungen (an unterschiedlichen Tagen) durchgeführt. Die Nettoaufnahme wurde durch Subtraktion der Gesamtaufnahme der pcDNA5 transfizierten Zellen von der Gesamtaufnahme der Transporter-überexprimierenden Zelllinie berechnet. Eine transportkinetische Michaelis-Menten-Analyse wurde für die Daten der Nettoaufnahme durchgeführt. Die Messwerte sind als Mittelwerte ± EM dargestellt. Die grau dargestellten Kurven stellen die totale Aufnahme in die Zelllinie pcDNA5 dar. Die gestrichelten blauen Linien stehen für die totale Aufnahme in die SLC35G3-überexprimierende Zelllinie. Die Nettoaufnahme dieser Zelllinie ist durch die durchgängige blaue Linie dargestellt.

Für alle fünf untersuchten Substanzen konnte eine Aufnahme durch die untersuchte Zelllinie festgestellt werden. Für die Substanzen Kokain, Lidocain und Mepivacain konnte eine niedrige Affinität des Transportproteins gezeigt werden (Tabelle 21). Articain und Ropivacain zeigten eine höhere Affinität, bei gleichzeitig geringerer Transportkapazität.

Tabelle 21: Kinetische Parameter für ausgewählte Substrate von SLC35G3.

Substanz	K_m [µM] ± SEM	V_{max} [pmol x mg Protein^{-1} x min^{-1}] ± SEM	Cl_{int} [mL x g Protein^{-1} x min^{-1}] ± SEM
Articain	143 ± 119	291 ± 76,8	2,04 ± 2,24
Kokain	466 ± 117	739 ± 82,2	1,59 ± 0,59
Lidocain	851 ± 526	595 ± 199	0,70 ± 0,67
Mepivacain	664 ± 503	761 ± 287	1,15 ± 1,30
Ropivacain	151 ± 60,7	551 ± 70,9	3,64 ± 1,93

3.7 Vergleich der Transportproteine

Auf die sechs Transportproteine wurden die gleichen 102 Substanzen bezüglich des Transportes untersucht. Dies ermöglichte einen Vergleich zwischen den Transportproteinen in Hinblick auf Überschneidungen der Substrate (Abbildung 18). Insgesamt 42 Substanzen waren keine Substrate für irgendeinen der sechs Transportproteine. Ganze 20 der Substanzen konnten für drei oder mehr der sechs Transportproteine als Substrat ermittelt werden. Lidocain konnte als Substrat von allen Transportproteinen, außer OCT3 identifiziert werden. Wie in der Abbildung 18 gezeigt, konnten vor allem Überschneidungen, in Hinblick auf die Substrate, der Transportproteine OCTN1 und OCTN2, sowie der Transportproteine MATE1 und MATE2-K ermittelt werden. In 19 Fällen wurde ein Substrat des Transportproteins MATE1 auch als Substrat des Transportproteins MATE2-K identifiziert. In Blick auf die Transportproteine OCTN1 und OCTN2 konnten sechs von zehn Substraten des Transportproteins OCTN1 auch als Substrat des Transportproteins OCTN2 identifiziert werden (Tabelle 22).

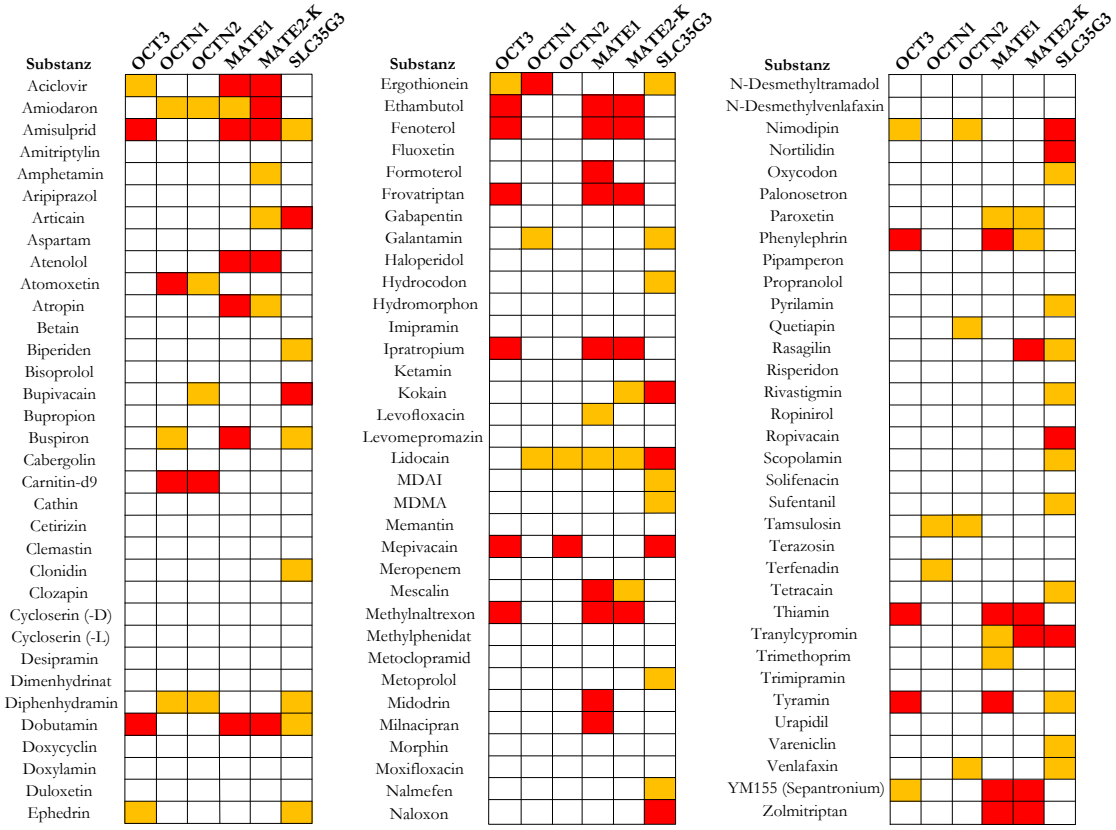

Abbildung 18: Gegenüberstellung der Ergebnisse der jeweiligen Transportproteine. Basierend auf den jeweiligen Transportexperimenten mit einer Standartkonzentration von 2,5 µM wurden die Substanzen in verschiedene Kategorien eingeteilt. Es wurde zwischen den Kategorien gutes Substrat (Ratio ≥ 2), schlechtes Substrat (Ratio 1,5 - 2) und kein Substrat (Ratio < 1,5) unterschieden. Substanzen, welche als gutes Substrat charakterisiert wurden, wurden für das jeweilige Transportprotein rot dargestellt. Die Farbe Orange zeigt, dass die Substanz als ein schlechtes Substrat für das jeweilige Transportprotein ermittelt wurde. Stellt eine Substanz, basierend auf diesen Experimenten kein Substrat dar, wurde sie als weiß dargestellt.

Tabelle 22: Überschneidungen der Substrate zwischen den Transportproteinen. Die Tabelle gibt an wie viele Überschneidungen es mit Blick auf die Substrate zwischen den Transportproteinen gab. Die Prozentangaben geben an wie viele Überschneidungen es in Bezug auf die Anzahl an gefundenen Substraten zu erkennen sind. Hierbei ist die Anzahl der Substrate des Transportproteins, zu dem diese Spalte gehört, der Wert, auf den Bezug genommen wird.

Transporter	OCT3	OCTN1	OCTN2	MATE1	MATE2-K	SLC35G3
OCT3	X	1 (10%)	2 (18,2%)	12 (46,2%)	11 (47,8%)	7 (20,5%)
OCTN1	1 (6,3%)	X	6 (54,5%)	3 (11,5%)	2 (8,7%)	5 (14,7%)
OCTN2	2 (12,5%)	6 (60%)	X	2 (7,7 %)	2 (8,7%)	6 (17,6%)
MATE1	12 (75%)	3 (30%)	2 (18,2%)	X	19 (82,6%)	6 (17,6%)
MATE2-K	11 (68,8%)	2 (20%)	2 (18,2%)	19 (73,1%)	X	7 (20,6%)
SLC35G3	7 (43,3)	5 (50%)	6 (54,5%)	6 (23,1%)	7 (30,4%)	X

4 Diskussion

Die Experimente sollten klären ob und in welchem Umfang der bisher noch nicht gut charakterisierte, aber vielfach in der Literatur zitierte, Protonen-Organische-Kationen-Antiporter möglicherweise in Wirklichkeit teilweise, oder sogar weitgehend, durch die untersuchten Transportproteine erklärt ist. Des Weiteren sollten neue Substrate der jeweiligen Transportproteine identifiziert werden, um die Funktionsweise dieser besser zu verstehen.

Im Rahmen dieser Zielsetzungen wurden Transportexperimente an den Transportproteinen OCT3 (SLC22A3), OCTN1 (SLC22A4), OCTN2 (SLC22A5), MATE1 (SLC47A1), MATE2-K (SLC47A2) und SLC35G3 durchgeführt. Hierfür wurden die Transportproteine in Hinblick auf ihre Transportaktivitäten für 102 Substanzen analysiert. Zur Klärung der Frage, ob die untersuchten Transportproteine im Zusammenhang mit dem Protonen-Organische-Kationen-Antiporter stehen, wurden die 102 getesteten Substanzen, basierend auf einer existierenden Liste von zuvor identifizierten Antiportersubstraten, gewählt. Diese Einordnung ergab sich insbesondere aus dem Transportverhalten dieser Substanzen an der hCMEC-Zelllinie, die gut das Transportverhalten an der menschlichen Blut-Hirn-Schranke reflektiert. Diese Liste wurde lediglich um einige wenige Substanzen ergänzt. Von den 102 Substanzen konnten für OCT3 16 (15,7%), OCTN1 10 (9,8%), OCTN2 11 (10,8%), MATE1 26 (25,5%), MATE2-K 23 (22,5%) und SLC35G3 34 (33,3%) Substanzen als Substrate identifiziert werden. Für eine Auswahl der ermittelten Substrate wurden zur Ermittlung detaillierter kinetischer Parameter konzentrationsabhängige Transportexperimente durchgeführt. Die Gegenüberstellung der Transportproteine zeigte unter anderem eine gewisse Substratüberschneidung zwischen OCTN1 und OCTN2, sowie MATE1 und MATE2-K.

4.1 Vergleich der Substrate mit zuvor publizierten Daten

4.1.1 OCT3

Für das Transportprotein OCT3 konnte in den vergangenen Jahren mehr als 50 Substrate identifiziert werden (Tabelle 23). Im Rahmen dieser Experimente wurden 16 der 102 Substanzen als Substrate für OCT3 identifiziert. Von diesen Substraten waren vier, welche als schlechte Substrate identifiziert wurden, zuvor noch nicht als Substrate identifiziert. Des Weiteren konnten die Substanzen Aciclovir und Dobutamin als Substrate identifiziert werden, welche zuvor von Gebauer als nicht Substrate charakterisiert wurden (2022b). Die Ergebnisse für die Substanzen Methylphenidat und Rasagilin, für welche ihm Rahmen dieser Experimente kein Transport über OCT3 festgestellt werden konnte, wiesen Diskrepanzen zu den bisherigen Erkenntnissen auf. So wurden diese beiden Substanzen zuvor von Gebauer als Substrate für OCT3 identifiziert (2022b). Eine mögliche Erklärung dieser

Diskrepanz liegt in der minimalen Abweichung der verwendeten Zelllinien. So wurde im Gegensatz zu der Zelllinie, welche Gebauer verwendet hat, in dieser Arbeit eine neue Zelllinie verwendet, welche die aktuelle Referenzsequenz beinhaltet. Im Rahmen dieser Erstellung ist eine Abweichung von zwei Aminosäuren in Bezug auf die von Gabauer verwendete Zelllinie ermittelt worden, die von der Arbeitsgruppe um H. Koepsell, Würzburg, zur Verfügung gestellt wurde.

Tabelle 23: Bekannte Substrate von OCT3. Die Tabelle listet neben den in den Transportexperimenten identifizierten Substraten weitere, durch Literatur belegte Substrate. Weiß hinterlegte Substrate sind in der Literatur belegt, jedoch im Rahmen dieser Experimente nicht berücksichtigt worden. Grün hinterlegte Substrate sind im Rahmen dieser Experimente, als diese bestätigt worden, oder neu identifiziert worden. Die Ergebnisse für rot hinterlegte Substanzen weisen eine Diskrepanz zu Angaben in der Literatur auf.

Substanz	Literatur	Substanz	Literatur
Aciclovir	(Gebauer et al. 2022b)	Methacholine	(Gebauer et al. 2022b)
Agmatin	(Koepsell 2020)	Methylnaltrexon	(Gebauer et al. 2022b)
Amifampridin	(Gebauer et al. 2022b)	Methylnicotinamid	(Gebauer et al. 2022b)
Amisulprid	(Pereira et al. 2014)	Methylphenidat	(Gebauer et al. 2022b)
Barberin	(Gebauer et al. 2022b)	Methylscopolamin	(Gebauer et al. 2022b)
Benzyltriethylammonium	(Gebauer et al. 2022b)	Moroxydin	(Gebauer et al. 2022b)
Buformin	(Gebauer et al. 2022b)	N-Desmethylranitidin	(Gebauer et al. 2022b)
Cimetidin	(Gebauer et al. 2022b)	N-Ethyllidocain	(Gebauer et al. 2022b)
Clidinium	(Gebauer et al. 2022b)	Nadolol	(Gebauer et al. 2022b)
Colterol	(Gebauer et al. 2022b)	Nimodipin	
Cycloguanil	(Gebauer et al. 2022b)	Oxymetazolin	(Gebauer et al. 2022b)
Debrisoquin	(Gebauer et al. 2022b)	Oxyphenonium	(Gebauer et al. 2022b)
Denatonium	(Gebauer et al. 2022b)	Phenformin	(Gebauer et al. 2022b)
Dimethylphenylpiperazinium	(Gebauer et al. 2022b)	Phenylephrin	(Gebauer et al. 2022a)
Dobutamin	(Gebauer et al. 2022b)	Pirbuterol	(Gebauer et al. 2022b)
Edrophonium	(Gebauer et al. 2022b)	Prenalterol	(Gebauer et al. 2022b)
Ephendrin		Proguanil	(Gebauer et al. 2022b)
Epinephrin	(Gebauer et al. 2022a)	Pyrithiamin	(Gebauer et al. 2022b)
Ergothionein		Rasagilin	(Gebauer et al. 2022b)
Ethambutol	(Gebauer et al. 2022b)	Salbutamol	(Jensen et al. 2020)
Famotidin	(Gebauer et al. 2022b)	Salsolidin	(Gebauer et al. 2022b)
Fenoterol	(Jensen et al. 2020)	Salsolinol	(Koepsell 2020)
Fenpiverinium	(Gebauer et al. 2022b)	Spartein	(Gebauer et al. 2022b)
Frovatriptan	(Gebauer et al. 2022b)	Thiamin	(Gebauer et al. 2022b)
Guanethidin	(Gebauer et al. 2022b)	Tiotropium	(Gebauer et al. 2022b)
Histamin	(Gebauer et al. 2022b)	Trospium	(Gebauer et al. 2022b)
Imeglimin	(Gebauer et al. 2022b)	Tyramin	(Koepsell 2020)
Ipratropium	(Gebauer et al. 2022b)	Xamoterol	(Gebauer et al. 2022b)
Isoetharin	(Gebauer et al. 2022b)	YM155 (Sepantronium)	
Ketamin	(Koepsell 2020)	1,3-Diphenylguanidin	(Gebauer et al. 2022b)
Mepenzolate	(Gebauer et al. 2022b)	4-Aminopyridin	(Gebauer et al. 2022b)
Mepivacain	(Gebauer et al. 2022b)	4-Hydroxydebrisoquin	(Gebauer et al. 2022b)
Metformin	(Gebauer et al. 2022b)	4-Hydroxymexiletin	(Gebauer et al. 2022b)

4.1.2 OCTN1

Von den 102 Substanzen konnten lediglich drei als gute Substrate von OCTN1 identifiziert werden. Die Substrate Ergothionein und Carnitin wurden zuvor schon von einigen

Arbeitsgruppen als Substrate identifiziert (Gründemann et al. 2005). Sie wurden in dieser Arbeit wiederholt getestet, um zu bestätigen, dass die beiden OCTN-Transporter tatsächlich die erwarteten Transporteigenschaften aufweisen. Neben dem guten OCTN1-Substrat Atomoxetin konnten sieben weitere Substrate identifiziert werden, welche zuvor nie als Substrate des Transportproteins OCTN1 beschrieben wurden (Tabelle 24). Diskrepant zu den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen stellten sich die Ergebnisse für fünf Substanzen dar (rot hinterlegt in Tabelle 24). Die Identifizierung anderer Arbeitsgruppen als Substrate konnten im Rahmen dieser Experimente nicht bestätigt werden.

Tabelle 24: Bekannte Substrate von OCTN1. Die Tabelle listet neben den in den Transportexperimenten identifizierten Substraten weitere, durch Literatur belegte Substrate. Weiß hinterlegte Substrate sind in der Literatur belegt, jedoch im Rahmen dieser Experimente nicht berücksichtigt worden. Grün hinterlegte Substrate sind im Rahmen dieser Experimente, als diese bestätigt worden, oder neu identifiziert worden. Die Ergebnisse für rot hinterlegte Substanzen weisen eine Diskrepanz zu Angaben in der Literatur auf.

Substanz	Literatur	Substanz	Literatur
Acetylcholin	(Pochini et al. 2012)	Gemcitabin	(Drenberg et al. 2017)
Amiodaron		Hercynin	(Grigat et al. 2007)
Amisulprid	(Pereira et al. 2014)	Ipratropium	(Nakamura et al. 2010)
Atomoxetin		Lidocain	
Buformin	(Futatsugi et al. 2016)	Metformin	(Futatsugi et al. 2016)
Buspiron		Phenformin	(Futatsugi et al. 2016)
Carnitin	(Pochini et al. 2024)	Pregabalin	(Akamine et al. 2015)
Clofarabin	(Drenberg et al. 2017)	Pyrilamin	(Yabuuchi et al. 1999)
Cytaribin	(Drenberg et al. 2017)	Quinidin	(Yabuuchi et al. 1999)
Diphenhydramin		Ribavirin	(Drenberg et al. 2017)
Ergothionein	(Koepsell 2020)	Tamsulosin	
Ethambutol	(Parvez et al. 2018)	Terfenadin	
Fludarabin	(Drenberg et al. 2017)	Tiotropium	(Nakamura et al. 2010)
Fluorouracil	(Drenberg et al. 2017)	Triethylamin	(Pochini et al. 2024)
Gabapentin	(Wada et al. 2015)	Verapamil	(Yabuuchi et al. 1999)
Galantamin		2'-Desoxycytidin	(Drenberg et al. 2017)

Eindeutige Klärungen der in Tabelle 24 hervorgehobenen Diskrepanzen konnte ich nicht finden. Es zeigten sich jedoch teils starke Abweichungen in den verwendeten Methodiken, welche diese begründen könnten (Tabelle 26). So wurde Gabapentin mittels Tierexperimenten (Wada et al. 2015) und Pyrilamin durch Experimente mit Xenopus Oozyten, als Substrat identifiziert (Yabuuchi et al. 1999). Für die Bestimmung von Ipratropium als Substrat verwendete Nakamura radioaktiv markiertes Ipratropium, Detektionsunterschiede könnten hierbei die Abweichungen erklären. Die von uns nicht bestätigen Substrate waren aber in den vorangehenden Publikationen auch, bis auf Amisulprid, keine sehr guten Substrate. Der Transport von Amisulprid wurde zuvor bei einer

Konzentration von 5µM untersucht. Ein Blick auf die weiteren konzentrationsabhängigen Transportergebnisse von Pereira lässt vermuten, dass es sich hierbei um ein Substrat handelt, welches vor allem für höhere Konzentrationen große Transportraten aufweist (2014). Es ist jedoch fraglich, ob diese, im menschlichen Körper überhaupt eine Rolle spielen. An dieser Stelle könnten in vivo Experimente zur Aufklärung beitragen. Es ist unter denen, die derartige Transportexperimente durchführen bekannt, dass die quantitativen Ergebnisse oft von Labor zu Labor variieren. Hier wären vielleicht noch weitere Vereinheitlichungen in der Durchführung der Experimente in Zukunft nötig. Zur weiteren Abklärung besteht eine Überlegung darin, dass OCTN1 Gen aus der Zelllinie noch einmal sequenzieren zu lassen. Eine Entstehung von Mutationen wäre in diesen Zelllinie nur dann zu erwarten, wenn dies mit einem erheblichen Selektionsvorteil bzw. höherer Wachstumsgeschwindigkeit einhergeht.

4.1.3 OCTN2

Neben dem schon bekannten Substrat Carnitin (Tamai et al. 1998) konnten zehn weitere identifiziert werden, welche zuvor in der Literatur nicht als OCTN2-Substrate beschrieben wurden (Tabelle 25). Von diesen neu identifizierten wies Mepivacain mit einer Ratio von 2,0 die höchste Transportrate auf. Indessen konnte für vier Substanzen kein Transport festgestellt werden, welche in der Literatur als Substrate charakterisiert wurden.

Tabelle 25: Substrate von OCTN2. Die Tabelle listet neben den in den Transportexperimenten identifizierten Substraten weitere, durch Literatur belegte Substrate. Weiß hinterlegte Substrate sind in der Literatur belegt, jedoch im Rahmen dieser Experimente nicht berücksichtigt worden. Grün hinterlegte Substrate sind im Rahmen dieser Experimente, als diese bestätigt worden, oder neu identifiziert worden. Die Ergebnisse für rot hinterlegte Substanzen weisen eine Diskrepanz zu Angaben in der Literatur auf.

Substanz	Literatur	Substanz	Literatur
Amiodaron		Mepivacain	
Amisulprid	(Pereira et al. 2014)	Mildronat	(Grigat et al. 2009)
Atomoxetin		Nimodipin	
Bupivacain		Pyrilamin	(Ohashi et al. 1999)
Carnitin	(Koepsell 2020)	Quetiapin	
Cephaloridin	(Ganapathy et al. 2000)	Sulprid	(Li et al. 2017)
Diphenhydramin		Tamsulosin	
Ethambutol	(Parvez et al. 2018)	Tiotropium	(Nakamura et al. 2010)
Etoposid	(Hu et al. 2012)	Venlafaxin	
Ipratropium	(Nakamura et al. 2010)	Verapamil	(Ohashi et al. 1999)
Lidocain			

Die ermittelten Differenzen sind in diesem Fall, genau wie auch schon bei OCTN1, nicht gänzlich zu klären. Es sind jedoch Abweichungen in der verwendeten Methodik zu erkennen

(Tabelle 26). Möglicherweise könnten konzentrationsabhängige Transportexperimente für alle Substanzen, für welche Differente Ergebnisse in der Literatur beschrieben wurden, zusätzliche Erkenntnisse bringen.

Tabelle 26: Diskrepanzen in der Literatur für die Substrate von OCTN1 und OCTN2

Substanz (getestete Transportprotein)	Ermittelte Transportrate	Transporteigenschaften in den vergangenen Publikationen
Amisulprid (OCTN1)	1,23	Transportrate 5,9 (getestet mit 5 µM) K_m 179,9 µM V_{max} 78,8 pmol x mg Protein^{-1} x min^{-1} Cl_{int} 0,4 mL x g Protein^{-1} x min^{-1} (Pereira et al. 2014)
Ethambutol (OCTN1)	1,39	Transportrate ca 3,5 (getestet 20 µM) K_m 336,8 µM V_{max} 3174 pmol x mg Protein^{-1} x min^{-1} Cl_{int} 9,5 mL x g Protein^{-1} x min^{-1} (Parvez et al. 2018)
Gabapentin (OCTN1)	1,33	Tierexperimente an Mäusen als Grundlage Keine Transportrate oder kinetische Parameter (Wada et al. 2015)
Ipratropium (OCTN1)	1,07	Radioaktiv markiertes Ipratropium K_m 444 µM V_{max} 238 pmol x mg Protein^{-1} x min^{-1} (Nakamura et al. 2010)
Pyrilamin (OCTN1)	1,11	Experimente mit Xenopus Oozyten radioaktiv markiertes Pyrilamin Transportrate ca. 2 (Yabuuchi et al. 1999)
Amisulprid (OCTN2)	1,15	Transportrate 3,2 (getestet mit 5µM) K_m 185,3 µM V_{max} 168,8 pmol x mg Protein^{-1} x min^{-1} Cl_{int} 0,9 mL x g Protein^{-1} x min^{-1} (Pereira et al. 2014)
Ethambutol (OCTN2)	1,23	Transportrate ca 4 (getestet 20µM) K_m 455,1 µM V_{max} 3993 pmol x mg Protein^{-1} x min^{-1} Cl_{int} 8,7 mL x g Protein^{-1} x min^{-1} (Parvez et al. 2018)
Ipratropium (OCTN2)	0,94	Radioaktiv markiertes Ipratropium K_m 53 µM V_{max} 76 pmol x mg Protein^{-1} x min^{-1} (Nakamura et al. 2010)
Pyrilamin (OCTN2)	0,89	Radioaktiv markiertes Pyrilamin Keine kinetischen Parameter Aufnahme deutlich geringer als für Carnitin (Ohashi et al. 1999)

4.1.4 MATE1

In den vergangenen 20 Jahren konnten über 30 Substrate für das Transportprotein MATE1 identifiziert werden (Tabelle 27). Im Rahmen dieser Arbeit sind 16 weitere hinzugekommen. Von den neu identifizierten Substraten wiesen Frovatriptan mit 32,6 und Zolmitriptan mit 22,1 die höchsten Transportraten auf. Diskrepante Ergebnisse lieferte, neben den Substanzen Atropin und Levofloxacin, welche in dieser Arbeit als Substrate identifiziert werden konnten, zuvor jedoch als Nicht-Substrat charakterisiert wurden, die Substanz Haloperidol. Diese wurde von Sekhar zuvor als Substrat identifiziert, im Rahmen dieser Experimente konnte dies jedoch nicht bestätigt werden (2019).

Tabelle 27: Substrate von MATE1. Die Tabelle listet neben den in den Transportexperimenten identifizierten Substraten weitere, durch Literatur belegte Substrate. Weiß hinterlegte Substrate sind in der Literatur belegt, jedoch im Rahmen dieser Experimente nicht berücksichtigt worden. Grün hinterlegte Substrate sind im Rahmen dieser Experimente, als diese bestätigt worden, oder neu identifiziert worden. Die Ergebnisse für rot hinterlegte Substanzen weisen eine Diskrepanz zu Angaben in der Literatur auf.

Substanz	Literatur	Substanz	Literatur
Aciclovir	(Tanihara et al. 2007)	Metformin	(Tanihara et al. 2007)
Amiodaron		Methylnaltrexon	
Amisulprid	(Sekhar et al. 2019)	Midodrin	
Atenolol	(Jensen et al. 2020)	Milnacipran	
Atropin	(Chen et al. 2017)	Nadolol	(Misaka et al. 2016)
Buspiron		Östronsulfat	(Tanihara et al. 2007)
Cephalexib	(Tanihara et al. 2007)	Oxaliplatin	(Yonezawa et al. 2006)
Cephradin	(Tanihara et al. 2007)	Paroxetin	
Cimetidin	(Tanihara et al. 2007)	Phenylephrin	
Cisplatin	(Yonezawa et al. 2006)	Pramipexol	(Knop et al. 2015)
Dobutamin		Procainamid	(Tanihara et al. 2007)
Emtracitabin	(Reznicek et al. 2017)	Quanidin	(Tanihara et al. 2007)
Ethambutol	(Te Brake et al. 2016)	Salbutamol	(Jensen et al. 2020)
Fenoterol	(Jensen et al. 2020)	Tetraethylammonium	(Tanihara et al. 2007)
Fexofenadin	(Matsushima et al. 2009)	Thiamin	(Tanihara et al. 2007)
Formoterol	(Jensen et al. 2020)	Topotecan	(Tanihara et al. 2007)
Frovatriptan		Tranylcypromin	
Ganciclovir	(Tanihara et al. 2007)	Trimethoprim	(Kito et al. 2019)
Haloperidol	(Sekhar et al. 2019)	Trospium	(Chen et al. 2017)
Ipratropium	(Chen et al. 2017)	Tyramin	(Koepsell 2020)
Kreatinin	(Tanihara et al. 2007)	YM155	
Levofloxacin	(Tanihara et al. 2007)	Zolmitriptan	
Lidocain		1-methyl-4-phenylpyridinium	(Tanihara et al. 2007)
Mescalin			

Chen lieferte die Ergebnisse für konzentrationsabhängige Transportexperimente mit Atropin, jedoch sind diesen keine einfachen Transportraten zu entnehmen (2017)(Tabelle 29). Diese Ergebnisse zeigten keinen Transport für Atropin, welches im Rahmen dieser Arbeit als Substrat identifiziert wurde. Um diese Diskrepanz besser nachvollziehen zu können wäre es eine Möglichkeit, konzentrationsabhängige Transportexperimente mit Atropin durchzuführen, um die kinetischen Parameter des Transports ermitteln zu können. Haloperidol wurde zuvor lediglich basierend auf in-silico-Rechenstudien als mögliches Substrat bezeichnet (Sekhar et al. 2019). Es wurden jedoch keine weiterreichenden Zellexperimente durchgeführt, um diese Vermutung zu belegen. Die Diskrepanz der Ergebnisse wird voraussichtlich aus dieser abweichenden Herangehensweise der Substrat-identifizierung resultieren.

4.1.5 MATE2-K

Von den 102 untersuchten Substanzen konnten 23 als Substrat für das Transportprotein MATE2-K identifiziert werden. Von diesen wurden sechs schon zuvor als Substrate identifiziert (Tabelle 28). Weitere drei Substanzen wurden zuvor von anderen Arbeitsgruppen als Substrate identifiziert, im Rahmen dieser Arbeit bestätigte sich dies jedoch nicht.

Tabelle 28: Substrate von MATE2-K. Die Tabelle listet neben den in den Transportexperimenten identifizierten Substraten weitere, durch Literatur belegte Substrate. Weiß hinterlegte Substrate sind in der Literatur belegt, jedoch im Rahmen dieser Experimente nicht berücksichtigt worden. Grün hinterlegte Substrate sind im Rahmen dieser Experimente, als diese bestätigt worden, oder neu identifiziert worden. Die Ergebnisse für rot hinterlegte Substanzen weisen eine Diskrepanz zu Angaben in der Literatur auf.

Substanz	Literatur	Substanz	Literatur
Aciclovir	(Tanihara et al. 2007)	Mescalin	
Amiodaron		Metformin	(Jensen et al. 2020)
Amisulprid		Methylnaltrexon	
Amphetamin		Nadolol	(Misaka et al. 2016)
Articain		Östrogensulfat	(Tanihara et al. 2007)
Atenolol	(Jensen et al. 2020)	Oxaliplatin	(Yonezawa et al. 2006)
Atropin		Paroxetin	
Cephalexin	(Tanihara et al. 2007)	Phenylephrin	
Cephradin	(Tanihara et al. 2007)	Pramipexol	(Knop et al. 2015)
Cimetidin	(Tanihara et al. 2007)	Procainamid	(Tanihara et al. 2007)
Cisplatin	(Yonezawa et al. 2006)	Rasagilin	
Dobutamin		Salbutamol	(Jensen et al. 2020)
Ethambutol	(Te Brake et al. 2016)	Tetraethylammonium	(Tanihara et al. 2007)
Fenoterol	(Jensen et al. 2020)	Thiamin	(Tanihara et al. 2007)
Formoterol	(Jensen et al. 2020)	Topotecan	(Tanihara et al. 2007)
Frovatriptan		Tranylcypromin	
Ganciclovir	(Tanihara et al. 2007)	Trimethoprim	(Kito et al. 2019)
Guanidin	(Tanihara et al. 2007)	Trospium	(Chen et al. 2017)
Ipratropium	(Chen et al. 2017)	Vareniclin	(Kajiwara et al. 2012)
Kokain		YM155	
Kreatinin	(Tanihara et al. 2007)	Zolmitriptan	
Lamivudin	(Müller et al. 2013)	1-methyl-4-phenylpyridinium	(Tanihara et al. 2007)
Lidocain			

Formoterol stellte sich als eine Substanze heraus, für die die Ergebnisse eine Diskrepanz zu den bisherigen Ergebnissen der Literatur aufwiesen. Die Ergebnisse von Jensen lassen vermuten, dass es sich bei dieser Substanz um ein eher schlechtes Substrat von MATE2-K handelt (2020). Es wurden im Vergleich zu dieser zitierten Arbeit jedoch Abweichungen in

der Detektion festgestellt, welche möglicherweise die Diskrepanz erklären (Tabelle 29). Trimethoprim wurde zuvor als Substrat identifiziert (Kito et al. 2019). Es wurde für diese Experimente eine Konzentration von 0.1 µM verwendet und keine konzentrations-abhängigen Transportexperimente durchgeführt. Diese deutlich geringere Konzentration könnte die ermittelte Transportrate beeinflussen und die Unterschiede der Ergebnisse begründen. Vareniclin wurde von Kajiwara als Substrat identifiziert (2012). Ein Blick auf die Ergebnisse zeigt jedoch, dass es lediglich eine Transportrate von ca. 1,3 ermittelt wurde, diese entspricht auch der in dieser Arbeit ermittelten Transportrate. Dies veranschaulicht die teils uneinheitliche Definition, ab welchem Wert man von einem Substrat spricht.

Tabelle 29: Diskrepanzen in der Literatur für die Substrate von MATE1 und MATE2-K

Substanz (getestete Transportprotein)	Ermittelte Transportrate	Transporteigenschaften in den vergangenen Publikationen
Atropin (MATE1)	2,27	Konzentrationsabhängige Transportexperimente ließen keine kinetischen Parameter ermitteln (Chen et al. 2017)
Haloperidol (MATE1)	1,23	Basierend auf in-silico-Rechenstudien vermutet (Sekhar et al. 2019)
Levofloxacin (MATE1)	1,93	Transportrate 1,2 (Tanihara et al. 2007)
Formoterol (MATE2-K)	1,32	Als eher schlechtes Substrat zu verstehen Verwendung anderer Säulen zur Auftrennung (Jensen et al. 2020)
Trimethoprim (MATE2-K)	1,2	Transportrate ca 5 0,1µM Trimethoprim, 2 Minuten inkubiert (Kito et al. 2019)
Vareniclin (MATE2-K)	1,3	Transportrate ca. 1,3 Konzentrationsabhängige Experimente fehlen (Kajiwara et al. 2012)

4.1.6 SLC35G3

Über ein Drittel der getesteten Substanzen konnten als meist eher schwache Substrate des Transportproteins SLC35G3 identifiziert werden. Dies lässt auf ein breites Spektrum der Substrate schließen, wobei die höchste identifizierte Ratio lediglich bei einem Wert von 3,1 lag. In der Literatur lassen sich nur vereinzelt Angaben zu diesem Transportprotein finden. Wenn man in der medizinischen Datenbank PubMed recherchiert, findet sich unter dem Stichwort SLC35G3 kein einziges Zitat. So sind die im Rahmen dieser Experimente identifizierten Substrate die ersten bekannten dieses Transportproteins (Tabelle 30).

Tabelle 30: Substrate von SLC35G3. Die Tabelle listet Substrate des Transportproteins SLC35G3. Die grün hinterlegten Substrate wurden im Rahmen dieser Arbeit identifiziert. Es sind keine weiteren Substrate bekannt. Zu den identifizierten Substraten konnten keine Ergebnisse in der Literatur gefunden werden.

Substanz	Literatur	Substanz	Literatur
Amisulprid		Metoprolol	
Articain		Nalmefen	
Biperiden		Naloxon	
Bupivacain		Nimodipin	
Buspiron		Nortilidin	
Clonidin		Oxycodon	
Diphenhydramin		Pyrilamin	
Dobutamin		Rasagilin	
Ephedrin		Rivastigmin	
Ergothionein		Ropivacain	
Galantamin		Scopolamin	
Hydrocodon		Sufentanil	
Kokain		Tetracain	
Lidocain		Tranylcypromin	
MDAI		Tyramin	
MDMA		Vareniclin	
Mepivacain		Venlafaxin	

Das SLC35G3-Gen ist zwar in einer Reihe von Gen- und Proteindatenbanken notiert und dort sind auch einige Assoziationen z.B. von Krankheiten mit dem Gen notiert, allerdings ohne, dass die Zusammenhänge mit Zitaten belegt und nachvollziehbar wären.

4.2 Vergleich der chemischen Struktur und anderer chemischer Eigenschaften

Die chemische Struktur und andere chemische Eigenschaften haben einen großen Einfluss auf den Transport von Substanzen (Veber et al. 2002). So spielen neben der Ladung auch weitere Eigenschaften, wie die Molekülmasse (Banks 2009) und Lipophilie eine entscheidende Rolle (Veber et al. 2002). Die 102 untersuchten Substanzen wiesen eine große Heterogenität in ihren chemischen Eigenschaften auf. So liegt zum Beispiel die Molekülmasse von Cycloserin bei lediglich 102,9 g/mol, wohingegen die von Amiodaron bei 645,3 g/mol liegt.

Um Vorhersagen über mögliche neue Substrate zu treffen, hilft es, die bekannten Substrate in Hinblick auf ihre Eigenschaften zu vergleichen. Ein Blick auf die Strukturformeln der

besten drei Substrate der jeweiligen Transportproteine zeigt, dass diese sich in ihren Strukturformeln teils grundlegend unterscheiden (Tabelle 31). So lassen sich die Strukturformeln der Substrate Tyramin und Frovatriptan des Transportproteins OCT3 schon auf den ersten Blick unterscheiden. Diese Erkenntnis der Heterogenität der Substrate von OCT3, in Hinblick auf die jeweiligen Strukturformeln, unterstützt die Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen, welche OCT3 als polyspezifischen Transporter charakterisieren (Roth et al. 2012). Gleichzeitig ist auffällig, dass neben Tyramin auch Phenylephrin als gutes Substrat identifiziert werden konnte. Diese beiden Substanzen weisen große strukturelle Übereinstimmung auf. Dies entspricht der Erwartung, dass Substanzen, welche in Hinblick auf ihre chemischen Eigenschaften den bekannten Substraten nahekommen, mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit auch als Substrate identifiziert werden können. Allerdings konnte auch schon gezeigt werden, dass teils schon minimale Moleküländerungen die Substrateigenschaften drastisch ändern können (Gebauer et al. 2022a).

Auch die Substrate der anderen hier betrachteten Transportproteine weisen eine Variabilität in Blick auf ihre Struktur auf. Auch hier zeigte sich eine große Vielfalt der Molekülstrukturen, sodass kein eindeutig differenzierendes so genanntes Pharmakophor für die 6 Transporter identifiziert werden konnte. Möglicherweise könnte aber die Analyse noch viel größerer Serien von Substraten doch gewisse Hinweise darauf liefern.

Tabelle 31: Strukturformeln der drei besten Substrate je Transportprotein. In der Tabelle sind die drei besten Substrate aller Transportproteine abgebildet. Die jeweiligen Strukturformeln sind MarvinSketch entnommen. Die Ladungen spiegeln diese, bei einem pH-Wert von 7,4 wieder.

Transport -protein	Substrat Strukturformel	Substrat Strukturformel	Substrat Strukturformel
OCT3	Ipratropium	Frovatriptan	Tyramin
OCTN1	Ergothionein	Carnitin	Atomoxetin
OCTN2	Carnitin	Mepivacain	Nimodipin
MATE1	Ipratropium	Thiamin	Frovatriptan
MATE2-K	Frovatriptan	Amisulprid	Thiamin OK
SLC35G3	Ropivacain	Articain	Nortilidin

Zur Gegenüberstellung der chemischen Parameter sind neben den schon erwähnten, der Molekülmasse, der Lipophilie und der Ladung, auch die topologische polare Oberfläche (TPSA) von Interesse. Die Abbildung 19 stellt die Abweichung der Substrate der jeweiligen Transportproteine in Hinblick der vier besonders relevanten chemischen Eigenschaften dar. Diese Gegenüberstellung veranschaulicht, dass die einzelnen Transportproteine bevorzugt Substanzen mit einer Molekülmasse zwischen knapp unter 150 g/mol bis hin zu 400 g/mol transportierten. Einige Substrate wie Amiodaron, welches eine Molekülmasse von 645,3 g/mol aufweist, wurden ebenfalls transportiert. Hierbei ist zu beachten, dass die getesteten 102 Substanzen überwiegend eine Molekülmasse zwischen 200 g/mol und 400 g/mol aufwiesen und somit nur eingeschränkt zu sagen ist, ob die Transporter nicht auch Substanzen mit einer deutlich abweichenden, insbesondere höheren, Molekülmassen transportieren. Auch in Hinblick auf Überschneidungen mit dem Protonen-Organische-Kationen-Antiporter wird der Molekülmasse lediglich eine geringe Bedeutung beigemessen (Doetsch et al. 2022).

Bezogen auf die Werte für logD7,4 der Substrate ist zu erkennen, dass der Median der Substrate von OCT3 sowohl für die guten Substrate, als auch für die schlechten Substrate im negativen Bereich liegt. Die anderen Transportproteine unterscheiden sich in diesem Punkt. Für alle anderen, außer SLC35G3, liegt der Median der guten Substrate im negativen Bereich, der der schlechten Substrate jedoch im positiven. Die Medianwerte der Substrate des Transportproteins SLC35G3 liegt sowohl für die guten, als auch für die schlechten Substrate im positiven Bereich. Diese Erkenntnis wird gestützt durch den Signifkanztest, welcher eine signifikante Abweichung zwischen den Substraten der verschiedenen Transportproteinen belegt.

Mit Blick auf den basischsten pK_s-Wert der Substrate lässt sich lediglich bei denen der schlechten Substrate ein augenscheinlicher Unterschied erkennen. Hierbei weichen die Werte der Substrate von OCT3 in Bezug zu allen anderen signifikant ab.

Die topologische polare Oberfläche der Substrate unterscheidet sich zwischen den Transportproteinen nicht signifikant. Es ist jedoch die Tendenz zu erkennen, dass die Substrate des Transportproteins SLC35G3, in Bezug zu denen der anderen Transportproteinen, eine tendenziell geringere polare Oberfläche aufweisen. Diese Charakteristik ist typisch für viele Substanzen, welche gut über die Blut-Hirn-Schranke gelangen und auch für Substrate des Protonen-Organische-Kationen-Antiporters (Sachkova et al. 2022).

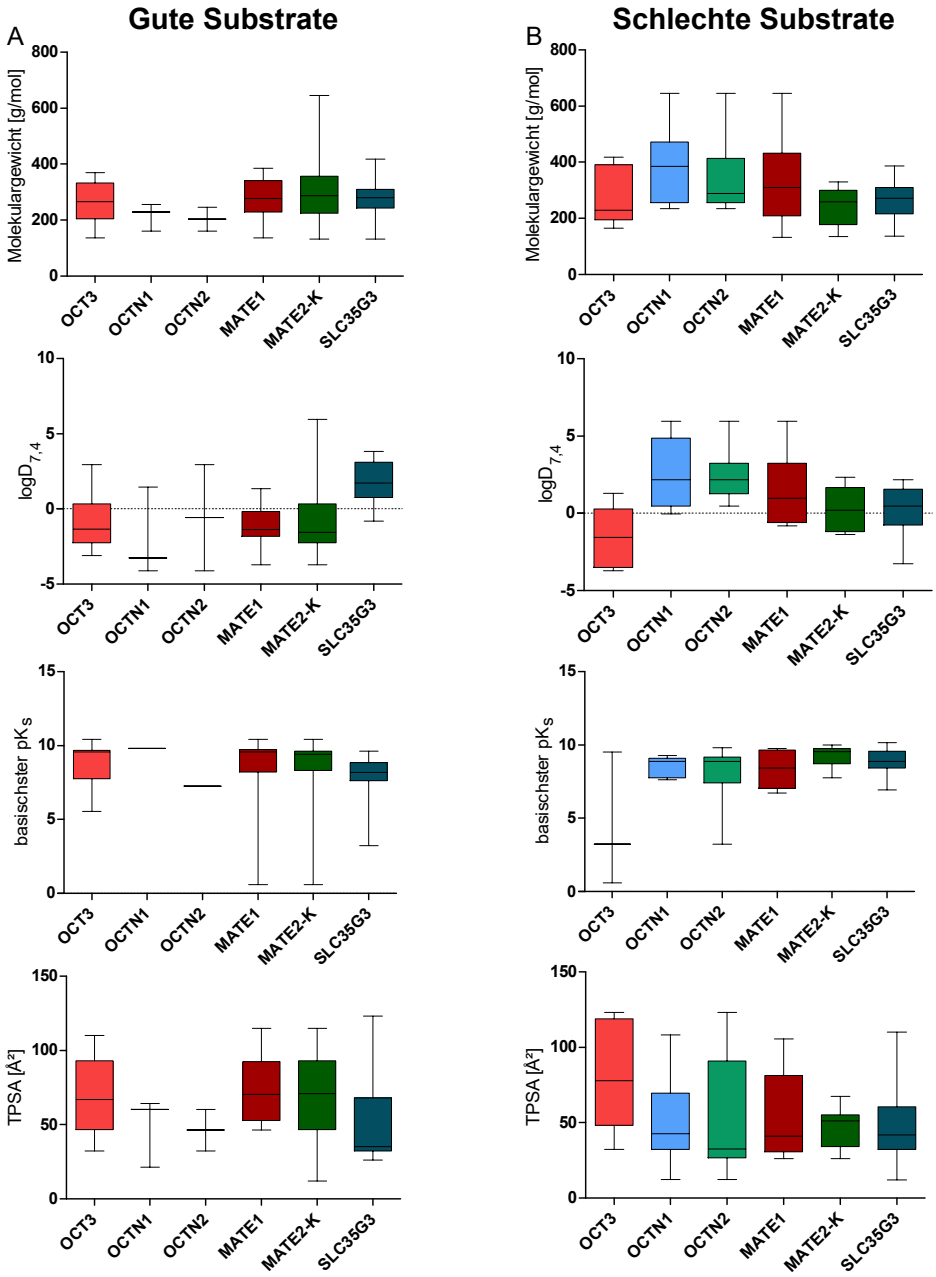

Abbildung 19: Chemische Eigenschaften der Substrate. Die linke Spalte betrachtet die guten Substrate der jeweiligen Transportproteine, wohingegen die rechte Spalte die schlechten Substrate betrachtet. Die Linie innerhalb des Interquatilsabstandes gibt den Median an. Die Whisker zeigen jeweils das Minimum und Maximum. In Blick auf die guten Substrate für OCTN1 und OCTN2 sind keine klassischen Boxen zu sehen, da lediglich zwei bzw. drei gute Substrate identifiziert wurden. Die Abkürzung TPSA steht für die topologische polare Oberfläche und bezeichnet die Oberflächensumme aller polaren Atome. Zur Ermittlung der statistischen Signifikanzen wurde eine einseitige ANNOVA mit anschließendem Bonferroni-Test durchgeführt. So konnten signifikante Unterschiede zwischen den Substraten in Blick auf den LogD7,4 festgestellt werden. Für die guten Substraten zeigte der Post-Hoc-Test einen signifikanten Unterschied zwischen den Substraten von OCT3 und SLC35G3. Für die schlechten Substrate zwischen OCT3 und OCTN1 sowie OCTN2. Auch für die basischsten pK_s-Werte der schlechten Substrate konnte eine signifikante Differenz zwischen den Werten der Substrate von OCT3 und allen anderen ermittelt werden. Zur Erstellung der Boxplots wurde das Programm GraphPad Prism(5.01) verwendet.

4.3 Vergleich mit der Transportaktivität an hCMEC Zellen

In Bezug auf den Protonen-Organische-Kationen-Antiporter sind nur wenige Details bekannt. Auch das Gen konnte bisher nicht identifiziert werden. Es ist unklar, ob es sich hierbei um ein einzelnes Transportprotein handelt, oder ein Zusammenspiel aus mehreren Transportproteinen (Sachkova et al. 2022). Eine der Zielsetzungen dieser Arbeit ist es zu klären, ob die untersuchten Transportproteine im Zusammenhang mit dem Protonen-Organische-Kationen-Antiporter stehen könnten. Die Gegenüberstellung der getesteten Substanzen, in Blick auf den jeweiligen Transportraten der getesteten Transportproteinen und der Antiporteraktivitäten, dient dazu mögliche Überschneidungen oder Differenzen herauszustellen (Abbildung 20).

Für alle sechs untersuchten Transportproteine konnten zwischen 10 und 34 Substrate identifiziert werden. Jeweils ein großer Anteil der Substrate konnte zuvor als Substrat des Protonen-Organische-Kationen-Antiporters identifiziert werden. Allein diese Erkenntnis lässt wenige Rückschlüsse auf einen Zusammenhang der untersuchten Transportproteine und dem Protonen-Organische-Kationen-Antiporters zu. Dies liegt schon daran, dass ca. 4/5 der getesteten Substanzen zuvor als Antiportersubstrate identifiziert wurden und somit die Wahrscheinlichkeit von Überschneidungen im Rahmen dieser Experimente sehr hoch lag.

Betrachtet man das Transportprotein OCT3 genauer, fällt auf, dass die besten fünf Substrate lediglich schlechte Antiportersubstrate sind, oder diesbezügliche Angeben fehlen. Weitere 5 seiner 16 Substrate konnten zuvor nicht als Antiportersubstrate identifiziert werden. Auch für die Transportproteine OCTN1 und OCTN2 ist zu erkennen, dass für jeweils über 60 der getesteten Antiportersubstrate keine gesteigerte Transportraten ermittelt werden konnten (Tabelle 32). Für MATE1 und MATE2-K konnte gezeigt werden, dass insbesondere für viele der guten Substrate keine Antiporteraktivitäten ermittelt wurden, so zum Beispiel für Substrate wie Atenolol, Ethambutol und Fenoterol. Die Substrate des Transportproteins SLC35G3 zeigten eine breite Überschneidung zu den des Antiporters. Für viele gute Antiportersubstrate, wie z. B. Imipramin, konnte jedoch keine gesteigerte Transportrate ermittelt werden. Dieses Bild der Substratüberschneidung legt nahe, dass ein Zusammenhang zwischen den getesteten Transportproteinen und dem Protonen-Organische-Kationen-Antiporter unwahrscheinlich ist. Untermauert wird diese These durch die chemischen Eigenschaften der jeweiligen Substrate. Sachkova zeigte, dass die TPSA-Werte der typischen Antiportersubstrate hauptsächlich im Bereich von 25 – 50 liegen (Sachkova et al. 2022). Wie in Abbildung 19 zu sehen ist steht das im Gegensatz zu den Werten für die guten Substrate der Transportproteine OCT3, MATE1 und MATE2-K, welche hauptsächlich im Bereich zwischen 50 und 100 angesiedelt sind. Gegensätze sind auch in Blick auf den logD7,4 zu sehen, welcher für die Substrate des Protonen-Organische-Kationen-Antiporters vornehmlich im leicht positiven Bereich liegt (Sachkova et al. 2022). Für die guten Substrate

der untersuchten Transportproteine liegt dieser überwiegend im negativen Bereich. Einzige Ausnahme stellt das Transportprotein SLC35G3 dar.

Substanz	OCT3	OCTN1	OCTN2	MATE1	MATE2-K	SLC35G3	TS
Aciclovir	1,6	1,0	1,2	2,2	2,5	1,2	1,11
Amiodaron	1,3	1,6	1,6	1,7	2,2	1,4	0,66
Amisulprid	2,6	1,2	1,2	11,0	11,1	1,5	0,89
Amitriptylin	1,2	1,3	1,0	1,1	1,0	1,5	0,09
Amphetamin	0,8	1,0	1,0	1,0	1,7	1,3	0,05
Aripiprazol	1,0	1,4	1,2	1,3	1,3	1,2	0,81
Articain	0,9	0,9	1,0	1,3	1,6	2,9	0,50
Aspartam	0,8	0,9	1,1	1,3	1,1	0,9	1,71
Atenolol	1,0	0,9	0,9	18,7	4,6	1,0	1,27
Atomoxetin	1,0	2,0	1,9	1,1	1,2	1,3	0,24
Atropin	1,0	1,3	1,1	2,3	1,7	1,0	0,72
Betain	0,9	1,1	1,0	0,8	1,1	0,8	1,04
Biperiden	1,1	1,3	1,3	1,2	1,1	1,5	0,26
Bisoprolol	1,2	1,3	1,1	1,2	1,1	1,2	0,34
Bupivacain	0,9	1,5	1,9	1,1	1,3	2,4	0,65
Bupropion	1,2	1,3	1,2	1,2	1,0	1,3	0,17
Buspiron	1,2	1,9	1,4	2,4	1,4	1,7	0,60
Cabergolin	1,2	1,2	1,1	1,2	1,1	1,5	0,41
Carnitin-d9	1,0	2,3	3,0	1,2	1,1	1,0	
Cathin	0,7	1,1	1,0	1,4	1,1	1,2	0,35
Cetirizin	1,1	1,1	0,9	1,2	1,2	1,2	0,92
Clemastin	1,1	1,0	1,0	1,3	1,2	1,2	0,43
Clonidin	0,8	1,0	1,0	1,1	1,2	1,5	
Clozapin	1,1	1,0	1,1	1,1	1,3	1,4	0,10
Cycloserin (-D)	1,0	1,1	0,9	1,2	1,1	0,9	1,02
Cycloserin (-L)	1,2	1,1	1,0	1,2	1,1	1,1	1,05
Desipramin	1,0	1,2	1,1	1,3	1,2	1,3	0,14
Dimenhydrinat	1,0	1,1	1,1	1,2	1,4	1,4	0,36
Diphenhydramin	1,0	1,7	1,8	1,0	1,2	1,5	
Dobutamin	2,4	1,1	0,7	17,4	2,8	1,6	0,83
Doxycyclin	1,2	1,1	1,2	1,3	1,3	1,3	1,45
Doxylamin	0,5	0,9	0,8	1,2	1,3	1,1	0,44
Duloxetin	1,1	1,4	1,3	1,2	1,0	1,3	0,10
Ephedrin	1,9	0,8	0,8	1,4	1,3	1,6	0,30
Ergothionein	1,8	36,1	0,9	1,0	1,2	1,7	
Ethambutol	2,4	1,4	1,2	14,1	2,8	1,0	0,97
Fenoterol	2,1	1,1	0,8	15,2	5,5	1,2	1,32
Fluoxetin	1,1	1,4	1,2	1,3	1,2	1,4	0,12
Formoterol	1,0	1,4	1,3	3,3	1,3	1,0	0,99
Frovatriptan	8,9	1,0	0,8	32,6	33,4	1,1	0,86
Gabapentin	0,8	1,3	1,1	0,7	1,0	0,9	1,25
Galantamin	0,9	1,8	1,1	1,2	1,2	1,6	0,83
Haloperidol	1,0	0,7	0,9	1,2	1,2	1,5	0,54
Hydrocodon	0,9	0,9	0,9	1,1	1,2	1,7	0,91
Hydromorphon	0,8	1,1	0,8	1,2	1,2	1,3	0,78
Imipramin	1,0	1,2	1,2	1,3	1,1	1,4	0,07
Ipratropium	31,2	1,1	0,9	38,9	6,4	1,2	0,85
Ketamin	1,4	1,3	1,2	1,3	1,1	1,3	0,55
Kokain	1,2	1,2	1,0	1,3	1,6	2,0	0,16
Levofloxacin	0,8	1,0	1,1	1,9	1,4	1,0	1,07
Levomepromazin	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,3	0,32

Substanz	OCT3	OCTN1	OCTN2	MATE1	MATE2-K	SLC35G3	TS
Lidocain	1,2	1,7	1,9	1,6	1,7	2,5	0,79
MDAI	0,8	0,9	1,0	1,1	1,2	1,7	0,23
MDMA	0,9	1,1	1,1	1,1	1,2	1,6	0,06
Memantin	1,0	1,2	1,0	1,1	1,3	1,2	0,19
Mepivacain	2,2	1,5	2,0	1,2	1,3	2,3	0,68
Meropenem	1,4	1,2	1,1	1,3	1,3	1,3	1,10
Mescalin	1,1	1,1	1,1	4,0	1,6	1,3	0,41
Methylnaltrexon	3,2	1,2	1,1	12,0	4,4	1,4	1,15
Methylphenidat	0,7	1,2	1,5	1,2	1,4	1,3	0,14
Metoclopramid	0,9	1,1	1,0	1,1	1,3	1,4	0,51
Metoprolol	0,7	1,0	1,0	1,1	1,1	1,5	0,38
Midodrin	1,0	1,2	1,0	4,5	1,4	1,3	1,36
Milnacipran	0,8	1,0	0,8	2,5	1,2	1,3	0,69
Morphin	0,9	1,1	0,7	1,2	1,2	1,2	0,90
Moxifloxacin	1,0	1,0	1,0	1,2	1,0	1,3	0,96
Nalmefen	1,1	1,2	1,2	1,1	1,2	2,0	0,51
Naloxon	1,1	1,0	0,8	1,4	1,3	2,0	0,61
N-Desmethyltramadol	0,7	1,0	0,9	1,1	1,2	1,4	
N-Desmethylvenlafaxin	0,8	1,2	1,0	1,2	1,3	1,2	0,55
Nimodipin	1,9	1,5	2,0	1,3	1,2	2,2	1,27
Nortilidin	1,4	0,8	0,8	1,2	1,4	2,9	0,53
Oxycodon	0,8	1,2	1,1	1,1	1,2	1,9	0,48
Palonosetron	0,9	1,2	1,3	1,3	1,4	1,4	0,37
Paroxetin	1,2	1,2	1,3	1,9	1,8	1,3	0,10
Phenylephrin	5,4	1,1	1,0	13,8	1,8	1,1	0,90
Pipamperon	0,9	1,3	1,1	1,3	1,3	1,3	0,33
Propranolol	1,0	1,1	1,0	1,2	1,1	1,3	0,10
Pyrilamin	1,0	1,1	0,9	1,4	1,3	1,7	
Quetiapin	0,9	1,3	1,5	1,1	1,3	1,4	0,47
Rasagilin	0,7	0,6	0,8	1,2	2,2	1,9	0,53
Risperidon	0,9	1,3	1,4	1,1	1,4	1,4	0,49
Rivastigmin	0,8	1,5	1,4	1,0	1,1	1,7	0,49
Ropinirol	0,9	1,0	0,9	1,4	1,5	1,4	0,63
Ropivacain	1,3	1,0	1,0	1,2	1,5	3,1	0,26
Scopolamin	0,8	1,2	1,0	1,2	1,5	1,6	0,54
Solifenacin	1,0	1,1	1,3	1,3	1,2	1,3	0,36
Sufentanil	1,1	1,1	1,0	1,3	1,4	1,7	0,14
Tamsulosin	1,0	1,7	1,7	1,4	1,2	1,4	0,78
Terazosin	1,2	1,3	1,1	1,2	1,3	1,5	0,62
Terfenadin	1,2	1,6	1,1	1,1	0,9	1,3	0,58
Tetracain	1,0	1,3	1,4	1,1	1,3	1,5	0,51
Thiamin	4,0	0,8	0,7	33,4	10,6	0,9	1,22
Tranylcypromin	1,0	0,9	1,1	1,6	2,0	2,6	0,21
Trimethoprim	0,9	0,9	1,3	1,5	1,2	1,2	0,73
Trimipramin	1,0	1,2	1,1	1,2	1,2	1,5	0,28
Tyramin	5,8	1,1	0,9	10,1	1,4	1,6	
Urapidil	0,9	1,0	1,1	1,2	1,2	1,4	0,64
Vareniclin	0,7	1,2	1,0	1,2	1,3	1,6	
Venlafaxin	0,9	1,4	1,8	1,2	1,3	1,6	0,31
YM155 (Sepantronium)	1,9	1,0	0,9	6,2	9,5	1,1	1,00
Zolmitriptan	1,2	1,3	1,1	22,2	7,0	1,3	1,24

Abbildung 20: Vergleich der Transportaktivitäten mit denen der hCMEC Zelllinie. Die Abbildung vergleicht die 102 Substanzen in Blick auf ihre Transportraten der sechs untersuchten Transportproteine. Des Weiteren werden diese mit den Transportraten des Protonen-Organische-Kationen-Antiporters verglichen. Die Werte für die Transportproteine OCT3, OCTN1, OCTN2, MATE1, MATE2-K und SLC35G3 wurden im Rahmen dieser Arbeit erhoben. Die Werte der TS (Trans-Stimulation) wurden der Publikation von Doetsch (2022) und weiterer, innerhalb des Institutes durchgeführter, Experimente entnommen. Diese Werte wurden ermittelt, indem Diphenhydramin, bzw 5,6-Methylendioxa-2-aminoindan, als Substrate mit Sondenfunktion verwendet wurden. Die Aktivität wurde bestimmt als Verhältnis des in den Zellen verbleibenden DPH oder MDAI, zur Kontrollinkubation ohne Substrat. Es wurde eine Inkubationszeit von 2 Minuten gewählt (Doetsch et al. 2022). Die Farben der Abbildung stellen sich wie folgt dar. In Blick auf die sechs untersuchten Transportproteine: Hellblau = kein Substrat (Ratio < 1,5), Lila = schlechtes Substrat (Ratio 1,5 – 2), Hellrot = gutes Substrat (Ratio 2 – 5), Dunkelrot = sehr gutes Substrat (Ratio >5). Für die Werte der Trans-Stimulation: Hellblau = kein Substrat (Ratio >0,9), Lila = schlechtes Substrat (Ratio 0,7 – 0,9), Hellrot = gutes Substrat (Ratio 0,5 – 0,7), Dunkelrot = sehr gutes Substrat (Ratio <0,5).

Tabelle 32: Vergleich der Substrate, zu denen des untersuchten Antiporters.

Transportprotein	Substrate	Substrate, die AP-Substrate sind	Substrate, die keine AP-Substrate sind	AP-Substrate, die kein Transport zeigen
OCT3	16	6	8	64
OCTN1	10	7	0	63
OCTN2	11	8	1	62
MATE1	26	13	12	57
MATE2-K	23	14	9	56
SLC35G3	27	26	2	44

4.4 Limitationen und Ausblick

Die in dieser Arbeit verwendete Methode zeichnet sich vor allem durch den hohen Durchsatz aus und ermöglicht es, einen guten Überblick über eine große Zahl an getesteten Substanzen und Transportproteinen zu erlangen. Sie bringt jedoch auch einige Limitationen mit sich, welche bei der Versuchsplanung und Betrachtung der Ergebnisse zu bedenken sind. So können aus den Transportexperimenten, unter Verwendung nur einer Standardkonzentration von 2,5 µM, keine Rückschlüsse auf die kinetischen Parameter des Transports gezogen werden. Zum Erlangen dieser Parameter wären konzentrations-abhängige Transportexperimente für alle Substrate nötig gewesen, welche detailliertere Einblicke geben würden. Diese wurden jedoch nur für ausgewählte Substrate durchgeführt. Die Ergebnisse der konzentrationsabhängigen Experimente für den Transport von Phenylephrin über das Transportprotein MATE2-K veranschaulicht diese Bedeutung. Im Rahmen der Experimente unter Verwendung einer Standartkonzentration konnte Phenylephrin zunächst als schlechtes Substrat identifiziert werden, die konzentrations-abhängigen Transportexperimente zeigten jedoch keinen Transport. Um solche Fehlerquellen möglichst zu minimieren, wurden alle Versuche dreimal wiederholt, dennoch sind Abweichungen nicht gänzlich auszuschließen. Eine weitere Problematik liegt in der Ermittlung der Signifikanzen. So zeigte beispielsweise der t-Test, für die Ergebnisse der Testung von Carnitin auf das Transportprotein MATE1, eine sehr hohe Signifikanz für eine Abweichung in Bezug zu dem Wert 1, obwohl die ermittelte Transportrate lediglich bei 1,2 lag. Für das Substrat mit der höchsten ermittelten Transportrate konnte jedoch keine Signifikanz ermittelt werden. Dies lag daran, dass der Messfehler im Bereich von hohen Transportraten oft größer ist als bei kleineren. Dieses Beispiel verdeutlicht die Schwierigkeit, die Ergebnisse im Zusammenhang mit den ermittelten Signifikanzen zu betrachten. Ein weiterer zu bedenkender Punkt liegt darin, dass die Expressionslevel der Transportproteine zwischen den Zelllinien nicht zwangsläufig identisch sind und die Werte für die Transportraten in Hinblick auf ihre Höhe zwischen den Zelllinien nur begrenzt zu vergleichen sind. Auch ist zu bedenken, dass in vitro Modelle nicht vollumfänglich die

Situation im menschlichen Körper abbilden können, Vorsicht ist jedoch auch geboten, wenn Rückschlüsse von Tierexperimenten auf den Menschen gezogen werden sollen (Xia et al. 2007). Ein weiterer Faktor, welcher die Aussagekraft der Arbeit beeinflusst, ist die Substratauswahl. Hier wäre es von Vorteil eine noch größere Substratzahl zu testen, welche nach Zufallsprinzip ausgewählt wird. Zu beachten ist jedoch, dass auch Medikamente nicht nach dem Zufallsprinzip entwickelt werden und es somit nur bedingt sinnvoll wäre. Perspektivisch wäre eine Möglichkeit auch eine größere Zahl endogener Substanzen bezüglich des Transportes zu testen.

Das Wissen über carrier-vermittelte Transportsysteme, welche unter anderem auch eine Passagemöglichkeit der BHS darstellt, ist von enormer Bedeutung (Pardridge 2012). Diese Bedeutung ist darin begründet, dass Transportproteine eine erhebliche Rolle in der Verlagerung von Medikamenten und körpereigenen Substanzen durch Membranen spielen (Nies et al. 2023). Dies hat eine erhebliche Auswirkung hinsichtlich der Reaktion auf Medikamente, Wechselwirkungen dieser und Krankheitsanfälligkeiten (Nies et al. 2023). Durch die Entdeckung neuer Substrate können die Funktionen der einzelnen Transportproteine weiter geklärt werden (Nies et al. 2023). Ein besseres Verständnis der Transportproteine ist ebenfalls wichtig, da eine Vielzahl der SLC-Transporter als arzneimittelfähig identifiziert werden konnte (Lin et al. 2015). So werden einige bekannte Medikamente über SLC-Transporter transportiert (Gyimesi und Hediger 2023). Die bessere Charakterisierung ermöglicht es niedermolekulare Arzneimittel so zu modellieren, dass sie Carrier-vermittelt durch die BHS gelangen können und gezielt im ZNS ihre Wirkung entfalten können (Pardridge 2012).

Neben der in dieser Arbeit verwendeten Herangehensweise neue Substrate zu identifizieren, gibt es einige weitere Verfahren. Neben den in vitro durchgeführten Experimenten gibt es auch die Möglichkeit in vivo Experimente durchzuführen, bei welchen oftmals mit Knockouts bei Mäusen oder Ratten gearbeitet wird (Jala et al. 2021). Die Entdeckung der Kristallstrukturen von immer mehr Transportproteinen ermöglichte es, neue Wege in der Substratidentifizierung zu gehen (Lin et al. 2015). So können mit Hilfe von menschlichen Homologiemodellen und Docking-Studien Bindungsstellen der Transportproteine identifiziert werden und Prognosen über die Wirkung bekannter Medikamente auf die Transportproteine abgegeben werden (Lin et al. 2015). Die Fortschritte im Bereich der Strukturbiologie ermöglichen gleichzeitig detailliertere Einblicke in die Mechanismen der Transportproteine zu erlangen (Baril et al. 2023). Eine weitere Herangehensweise zur Entdeckung neuer Substrate stellt das in silico Ligandenscreening dar, welches auf Ähnlichkeiten der bekannten Substrate basiert (Nies et al. 2023).

Die Ergebnisse dieser Arbeit erweitern das bekannte Substratspektrum der untersuchten Transportproteine und ermöglichen es somit diese besser zu verstehen und charakterisieren zu können. Neben der Möglichkeit basierend auf der besseren Charakterisierung der Transportproteine in Zukunft neue Medikamente entwickeln zu können, könnte die

Auswirkung von Mutationen in den Transportproteinen besser verstanden werden. So konnten durch Khanppnavar über 50 codierende Varianten für OCT3 identifiziert werden, welche teilweise erheblichen Einfluss auf die Transporteigenschaften haben (Khanppnavar et al. 2022). Die weitere Charakterisierung dieser und weiterer Transportproteine, sowie des Protonen-Organische-Kationen-Antiporters, soll in Zukunft das Verständnis des carrier-vermittelten Transportes über die Blut-Hirn-Schranke Stück für Stück erweitern.

5 Zusammenfassung

Um ins Gehirn zu gelangen, müssen Medikamente und andere Substanzen die Blut-Hirn-Schranke überwinden. Durch diese ist der Austausch von Substanzen zwischen dem Blut und dem Zentralnervensystem reguliert. Eine Möglichkeit des Austauschs über die Blut-Hirn-Schranke stellt neben der einfachen Diffusion der carriervermittelte Transport dar. Dieser ermöglicht eine gesteuerte Selektivität des Transportes über Membranen und spielt eine essenzielle Rolle für den spezifischen Transport endogener und exogener Substanzen über die Blut-Hirn-Schranke. In den letzten 25 Jahren konnten mehrere hundert Membrantransportproteine identifiziert werden. Für viele Transportproteine konnten jedoch bisher nur wenige Daten gesammelt werden und somit bleibt deren Funktion bis heute unklar. Zu diesen Transportproteinen gehört auch der Protonen-Organische-Kationen-Antiporter

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Transportproteine OCT3 (SLC22A3), OCTN1 (SLC22A4), OCTN2 (SLC22A5), MATE1 (SLC47A1), MATE2-K (SLC47A2) und SLC35G3 hinsichtlich ihrer Transporteigenschaften für 102 ausgewählte Substanzen, untersucht. Ziel war es zu untersuchen, ob die Substanzen durch die untersuchten Transportproteine transportiert werden und, sofern ein guter Transport erkennbar war, auch die transportkinetischen Parameter zu ermitteln. Die Ergebnisse sollten anschließend verglichen werden mit Transportraten vermittelt über den Protonen-Organische-Kationen-Antiporter, welche in der Vergangenheit ermittelt wurden. Durch diesen Vergleich sollte ermittelt werden, inwieweit der Protonen-Organische-Kationen-Antiporter durch einzelne der untersuchten Transportproteine zu erklären ist, mit anderen Worten, diese Transportproteine und der Protonen-Organische-Kationen-Antiporter identisch sind

Für die Experimente wurden transfizierte HEK293-Zellen verwendet, welche das jeweilige Transportprotein überexprimierten. Zunächst wurde mittels Transportexperimenten unter Verwendung einer Standardkonzentration der jeweiligen Substanz von 2,5 µM ermittelt, ob die Substanzen durch die Transportproteine transportiert werden. Anschließend wurden für ausgewählte Substrate konzentrationsabhängige Transportexperimente durchgeführt, um die transportkinetischen Parameter zu ermitteln.

Von den 102 getesteten Substanzen konnten für OCT3 16, OCTN1 10, OCTN2 11, MATE1 26, MATE2-K 23 und SLC35G3 34 Substanzen als Substrate identifiziert werden. Hierbei konnte vielfach eine Überschneidung zwischen Substraten von OCTN1 und OCTN2, sowie von Substraten von MATE1 und MATE2-K festgestellt werden. Anschließende konzentrationsabhängige Transportexperimente konnten zeigen, dass die Transportproteine für die unterschiedlichen Substrate bei SLC35G3 generell eine ähnliche moderate Affinität (KM) aufwiesen, während unterschiedliche Substrate der anderen Transportproteine deutliche Unterschiede in den Affinitäten zeigten.

Der Vergleich der neuen Ergebnisse zu den bisher bekannten Substraten des Protonen-Organische-Kationen-Antiporters zeigte nur eine minimale Überschneidung im Substratspektrum. Auch konnten Differenzen in den chemischen Eigenschaften der Substrate des Antiporters und der anderen hier untersuchten Transportproteine aufgezeigt werden. Diese Erkenntnisse lassen es unwahrscheinlich erscheinen, dass die untersuchten Transportproteine im Zusammenhang mit dem Protonen-Organische-Kationen-Antiporter stehen.

Die Ergebnisse helfen dabei, die Transportproteine besser charakterisieren und die Funktionsweisen besser verstehen zu können. Stück für Stück soll somit das Verständnis der Blut-Hirn-Schranke und des Transports über diese erweitert werden. Diese Erkenntnisse könnten langfristig ermöglichen, medikamentöse Wechselwirkungen besser zu verstehen und neue Medikamente zu entwickeln. Auch könnte in Zukunft basierend auf diesen Charakterisierungen der Substratspektren gezielt die genetischen Variationen der Transportproteine untersucht werden.

6 Literaturverzeichnis

Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E (2006): Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. Nat Rev Neurosci 7, 41–53

Abbott NJ, Patabendige AAK, Dolman DEM, Yusof SR, Begley DJ (2010): Structure and function of the blood-brain barrier. Neurobiol Dis 37, 13–25

Akamine T, Koyanagi S, Kusunose N, Hashimoto H, Taniguchi M, Matsunaga N, Ohdo S (2015): Dosing time-dependent changes in the analgesic effect of pregabalin on diabetic neuropathy in mice. J Pharmacol Exp Ther 354, 65–72

Al-Awqati Q (1999): One hundred years of membrane permeability: does Overton still rule? Nat Cell Biol 1, E201-202

Armulik A, Genové G, Betsholtz C (2011): Pericytes: Developmental, Physiological, and Pathological Perspectives, Problems, and Promises. Dev Cell 21, 193–215

Banks WA (2009): Characteristics of compounds that cross the blood-brain barrier. BMC Neurol 9, 1–5

Banks WA (2012): Brain meets body: the blood-brain barrier as an endocrine interface. Endocrinology 153, 4111–4119

Baril SA, Gose T, Schuetz JD (2023): How Cryo-EM Has Expanded Our Understanding of Membrane Transporters. Drug Metab Dispos 51, 904–922

Beis K (2015): Structural basis for the mechanism of ABC transporters. Biochem Soc Trans 43, 889–893

Campos-Bedolla P, Walter F, Veszelka S, Deli MA (2014): Role of the blood-brain barrier in the nutrition of the central nervous system. Arch Med Res 45, 610–638

César-Razquin A, Snijder B, Frappier-Brinton T, Isserlin R, Gyimesi G, Bai X, Reithmeier RA, Hepworth D, Hediger MA, Edwards AM, Superti-Furga G (2015): A Call for Systematic Research on Solute Carriers. Cell 162, 478–487

Chen J, Brockmöller J, Seitz T, König J, Chen X, Tzvetkov MV (2017): Tropane alkaloids as substrates and inhibitors of human organic cation transporters of the SLC22 (OCT) and the SLC47 (MATE) families. Biol Chem 398, 237–249

Cocucci E, Kim J, Bai Y, Pabla N (2017): Role of Passive Diffusion, Transporters, and Membrane Trafficking-Mediated Processes in Cellular Drug Transport. Clin Pharmacol Ther 101, 121–129

Colas C, Ung PM-U, Schlessinger A (2016): SLC Transporters: Structure, Function, and Drug Discovery. MedChemComm 7, 1069–1081

Conde A, Diallinas G, Chaumont F, Chaves M, Gerós H (2010): Transporters, channels, or simple diffusion? Dogmas, atypical roles and complexity in transport systems. Int J Biochem Cell Biol 42, 857–868

Cremer JE, Cunningham VJ, Pardridge WM, Braun LD, Oldendorf WH (1979): Kinetics of blood-brain barrier transport of pyruvate, lactate and glucose in suckling, weanling and adult rats. J Neurochem 33, 439–445

Daneman R, Prat A (2015): The blood-brain barrier. Cold Spring Harb Perspect Biol 7

Doetsch D, Ansari S, Jensen O, Gebauer L, Dücker C, Brockmöller J, Sachkova A (2022): Substrates of the Human Brain Proton-Organic Cation Antiporter and Comparison with Organic Cation Transporter 1 Activities. Int J Mol Sci 23, 8430

Drenberg CD, Gibson AA, Pounds S, Shi L, Rhinehart DP, Li L, Hu S, Du G, Nies AT, Schwab M, et al. (2017): OCTN1 Is a High-Affinity Carrier of Nucleoside Analogues. Cancer Res 77, 2102–2111

Dueck MH, Paul M, Wiesner RH, Boerner U (2004): [Why does blood have a pH-value of 7.4? The theory of acid-base management]. Anaesthesist 53, 1046–1053

Ehrlich P: Das Sauerstoff-Bedürfniss des Organismus. Eine farbenanalytische Studie; August Hirschwald, Berlin 1885

Ferrari L, Crestan V, Sabattini G, Vinco F, Fontana S, Gozzi A (2010): Brain penetration of local anaesthetics in the rat: Implications for experimental neuroscience. J Neurosci Methods 186, 143–149

Fischer W, Neubert RHH, Brandsch M (2007): Clonidine accumulation in human neuronal cells. Eur J Pharm Sci Off J Eur Fed Pharm Sci 32, 291–295

Forrest LR, Krämer R, Ziegler Z (2011): The structural basis of secondary active transport mechanisms. Biochim Biophys Acta 1807, 167–188

Futatsugi A, Masuo Y, Kawabata S, Nakamichi N, Kato Y (2016): L503F variant of carnitine/organic cation transporter 1 efficiently transports metformin and other biguanides. J Pharm Pharmacol 68, 1160–1169

Ganapathy ME, Huang W, Rajan DP, Carter AL, Sugawara M, Iseki K, Leibach FH, Ganapathy V (2000): beta-lactam antibiotics as substrates for OCTN2, an organic cation/carnitine transporter. J Biol Chem 275, 1699–1707

Gaohua L, Miao X, Dou L (2021): Crosstalk of physiological pH and chemical pKa under the umbrella of physiologically based pharmacokinetic modeling of drug absorption, distribution, metabolism, excretion, and toxicity. Expert Opin Drug Metab Toxicol 17, 1103–1124

Garrett Q, Xu S, Simmons PA, Vehige J, Flanagan JL, Willcox MD kuru (2008): Expression and localization of carnitine/organic cation transporter OCTN1 and OCTN2 in ocular epithelium. Invest Ophthalmol Vis Sci 49, 4844–4849

Gasser PJ, Hurley MM, Chan J, Pickel VM (2017): Organic cation transporter 3 (OCT3) is localized to intracellular and surface membranes in select glial and neuronal cells within the basolateral amygdaloid complex of both rats and mice. Brain Struct Funct 222, 1913–1928

Gebauer L, Rafehi M, Brockmöller J (2022a): Stereoselectivity in the Membrane Transport of Phenylethylamine Derivatives by Human Monoamine Transporters and Organic Cation Transporters 1, 2, and 3. Biomolecules 12

Gebauer L, Jensen O, Brockmöller J, Dücker C (2022b): Substrates and Inhibitors of the Organic Cation Transporter 3 and Comparison with OCT1 and OCT2. J Med Chem 65, 12403–12416

Geier EG, Chen EC, Webb A, Papp A, Yee SW, Sadee W, Giacomini G (2013): Profiling solute carrier transporters in the human blood-brain barrier. Clin Pharmacol Ther 94, 636–639

Giacomini KM, Huang S-M, Tweedie DJ, Benet LZ, Brouwer KLR, Chu X, Dahlin A, Evers R, Fischer V, Hillgren KM, et al. (2010): Membrane transporters in drug development. Nat Rev Drug Discov 9, 215–236

Grigat S, Harlfinger S, Pal S, Striebinger R, Golz S, Geerts A, Lazar A, Schömig E, Gründemann D (2007): Probing the substrate specificity of the ergothioneine transporter with methimazole, hercynine, and organic cations. Biochem Pharmacol 74, 309–316

Grigat S, Fork C, Bach M, Golz S, Geerts A, Schömig E, Gründemann D (2009): The Carnitine Transporter *SLC22A5* Is Not a General Drug Transporter, but It Efficiently Translocates Mildronate. Drug Metab Dispos 37, 330–337

Gründemann D, Schechinger B, Rappold G, Schömig E (1998): Molecular identification of the corticosterone-sensitive extraneuronal catecholamine transporter. Nat Neurosci 1, 349–351

Gründemann D, Harlfinger S, Golz S, Geerts A, Lazar A, Berkels R, Jung N, Rubbert A, Schömig E (2005): Discovery of the ergothioneine transporter. Proc Natl Acad Sci 102, 5256–5261

Gyimesi G, Hediger MA (2023): Transporter-Mediated Drug Delivery. Molecules 28, 1151

Hadley B, Litfin T, Day CJ, Haselhorst T, Zhou Y, Tiralongo J (2019): Nucleotide Sugar Transporter SLC35 Family Structure and Function. Comput Struct Biotechnol J 17, 1123–1134

Hall CN, Reynell C, Gesslein B, Hamilton NB, Mishra A, Sutherland BA, O'Farrell FM, Buchan AM, Lauritzen M, Attwell D (2014): Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease. Nature 508, 55–60

Hawkins BT, Davis TP (2005): The Blood-Brain Barrier/Neurovascular Unit in Health and Disease. Pharmacol Rev 57, 173–185

He X, Szewczyk P, Karyakin A, Evin M, Hong W-X, Zhang Q, Chang G (2010): Structure of a Cation-bound Multidrug and Toxic Compound Extrusion Transporter. Nature 467, 991

Hosoya K, Tachikawa M (2011): Roles of organic anion/cation transporters at the blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers involving uremic toxins. Clin Exp Nephrol 15, 478–485

Hu C, Lancaster CS, Zuo Z, Hu S, Chen Z, Rubnitz JE, Baker SD, Sparreboom A (2012): Inhibition of OCTN2-mediated transport of carnitine by etoposide. Mol Cancer Ther 11, 921–929

Hughes JD, Blagg J, Price DA, Bailey S, Decrescenzo GA, Devraj R, Ellsworth E, Fobian YM, Gibbs ME, Gilles RW, et al. (2008): Physiochemical drug properties associated with in vivo toxicological outcomes. Bioorg Med Chem Lett 18, 4872–4875

Indiveri C, Galluccio M, Scalise M, Pochini L (2013): Strategies of Bacterial Over Expression of Membrane Transporters Relevant in Human Health: The Successful Case of the Three Members of OCTN Subfamily. Mol Biotechnol 54, 724–736

Ishida N, Kuba T, Aoki K, Miyatake S, Kawakita M, Sanai Y (2005): Identification and characterization of human Golgi nucleotide sugar transporter SLC35D2, a novel member of the SLC35 nucleotide sugar transporter family. Genomics 85, 106–116

Jala A, Ponneganti S, Vishnubhatla DS, Bhuvanam G, Mekala PR, Varghese B, Radhakrishnanand P, Adela R, Murty US, Borkar RM (2021): Transporter-mediated drug-drug interactions: advancement in models, analytical tools, and regulatory perspective. Drug Metab Rev 53, 285–320

Jensen O, Rafehi M, Tzvetkov MV, Brockmöller J (2020): Stereoselective cell uptake of adrenergic agonists and antagonists by organic cation transporters. Biochem Pharmacol 171, 113731

Kadry H, Noorani B, Cucullo L (2020): A blood–brain barrier overview on structure, function, impairment, and biomarkers of integrity. Fluids Barriers CNS 17, 69

Kajiwara M, Masuda S, Watanabe S, Terada T, Katsura T, Inui K (2012): Renal tubular secretion of varenicline by multidrug and toxin extrusion (MATE) transporters. Drug Metab Pharmacokinet 27, 563–569

Kaksonen M, Roux A (2018): Mechanisms of clathrin-mediated endocytosis. Nat Rev Mol Cell Biol 19, 313–326

Khanppnavar B, Maier J, Herborg F, Gradisch R, Lazzarin E, Luethi D, Yang J-W, Qi C, Holy M, Jäntsch K, et al. (2022): Structural basis of organic cation transporter-3 inhibition. Nat Commun 13, 6714

Kito T, Ito S, Mizuno T, Maeda K, Kusuhara H (2019): Investigation of non-linear Mate1-mediated efflux of trimethoprim in the mouse kidney as the mechanism underlying drug-drug interactions between trimethoprim and organic cations in the kidney. Drug Metab Pharmacokinet 34, 87–94

Knop J, Hoier E, Ebner T, Fromm MF, Müller F (2015): Renal tubular secretion of pramipexole. Eur J Pharm Sci Off J Eur Fed Pharm Sci 79, 73–78

Knyazev E, Nersisyan S, Tonevitsky A (2021): Endocytosis and Transcytosis of SARS-CoV-2 Across the Intestinal Epithelium and Other Tissue Barriers. Front Immunol 12, 636–666

Koepsell H (2011): Substrate recognition and translocation by polyspecific organic cation transporters. Biol Chem 392, 95–101

Koepsell H (2013): The SLC22 family with transporters of organic cations, anions and zwitterions. Mol Aspects Med 34, 413–435

Koepsell H (2015): Role of organic cation transporters in drug-drug interaction. Expert Opin Drug Metab Toxicol 11, 1619–1633

Koepsell H (2020): Organic Cation Transporters in Health and Disease. Pharmacol Rev 72, 253–319

Koepsell H, Lips K, Volk C (2007): Polyspecific organic cation transporters: structure, function, physiological roles, and biopharmaceutical implications. Pharm Res 24, 1227–1251

Komatsu T, Hiasa M, Miyaji T, Kanamoto T, Matsumoto T, Otsuka M, Moriyama Y, Omote H (2011): Characterization of the human MATE2 proton-coupled polyspecific organic cation exporter. Int J Biochem Cell Biol 43, 913–918

Kou L, Sun R, Ganapathy V, Yao G, Chen R (2018): Recent advances in drug delivery via the organic cation/carnitine transporter 2 (OCTN2/SLC22A5). Expert Opin Ther Targets 22, 715–726

Krah A, Huber R, Zachariae U, Bond PJ (2020): On the ion coupling mechanism of the MATE transporter ClbM. Biochim Biophys Acta Biomembr 1862, 183137

Kurosawa T, Tega Y, Higuchi K, Yamaguchi T, Nakakura T, Mochizuki T, Kusuhara H, Kawabata K, Deguchi Y (2018): Expression and Functional Characterization of Drug Transporters in Brain Microvascular Endothelial Cells Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells. Mol Pharm 15, 5546–5555

Kusakizako T, Miyauchi H, Ishitani R, Nureki O (2020): Structural biology of the multidrug and toxic compound extrusion superfamily transporters. Biochim Biophys Acta Biomembr 1862, 183154

Li L, Weng Y, Wang W, Bai M, Lei H, Zhou H, Jiang H (2017): Multiple organic cation transporters contribute to the renal transport of sulpiride. Biopharm Drug Dispos 38, 526–534

Lin L, Yee SW, Kim RB, Giacomini KM (2015): SLC Transporters as Therapeutic Targets: Emerging Opportunities. Nat Rev Drug Discov 14, 543–560

Liu X: SLC Family Transporters. In: Liu X, Pan G (Hrsg.): Drug Transporters in Drug Disposition, Effects and Toxicity (Advances in Experimental Medicine and Biology). Band 1141; Springer Singapore, Singapore 2019, 101–202

Locher KP (2009): Structure and mechanism of ATP-binding cassette transporters. Philos Trans R Soc B Biol Sci 364, 239–245

Lochhead JJ, Yang J, Ronaldson PT, Davis TP (2020): Structure, Function, and Regulation of the Blood-Brain Barrier Tight Junction in Central Nervous System Disorders. Front Physiol 11, 914

Longo N, Frigeni M, Pasquali M (2016): Carnitine transport and fatty acid oxidation. Biochim Biophys Acta 1863, 2422–2435

Masuda S, Terada T, Yonezawa A, Tanihara Y, Kishimoto K, Katsura T, Ogawa O, Inui K (2006): Identification and Functional Characterization of a New Human Kidney–Specific H+/Organic Cation Antiporter, Kidney-Specific Multidrug and Toxin Extrusion 2. J Am Soc Nephrol 17, 2127–2135

Mather LE (2010): The acute toxicity of local anesthetics. Expert Opin Drug Metab Toxicol 6, 1313–1332

Matsushima S, Maeda K, Inoue K, Ohta K, Yuasa H, Kondo T, Nakayama H, Horita S, Kusuhara H, Sugiyama Y (2009): The inhibition of human multidrug and toxin extrusion 1 is involved in the drug-drug interaction caused by cimetidine. Drug Metab Dispos Biol Fate Chem 37, 555–559

Meyer-Tönnies MJ, Tzvetkov MV (2023): The end of the beginning in understanding SLC22 polyspecificity. Trends Pharmacol Sci 44, 397–399

Misaka S, Knop J, Singer K, Hoier E, Keiser M, Müller F, Glaeser H, König J, Fromm MF (2016): The Nonmetabolized β-Blocker Nadolol Is a Substrate of OCT1, OCT2, MATE1, MATE2-K, and P-Glycoprotein, but Not of OATP1B1 and OATP1B3. Mol Pharm 13, 512–519

Müller F, König J, Hoier E, Mandery K, Fromm MF (2013): Role of organic cation transporter OCT2 and multidrug and toxin extrusion proteins MATE1 and MATE2-K for transport and drug interactions of the antiviral lamivudine. Biochem Pharmacol 86, 808–815

Nakamura T, Nakanishi T, Haruta T, Shirasaka Y, Keogh JP, Tamai I (2010): Transport of ipratropium, an anti-chronic obstructive pulmonary disease drug, is mediated by organic cation/carnitine transporters in human bronchial epithelial cells: implications for carrier-mediated pulmonary absorption. Mol Pharm 7, 187–195

Neumaier F, Zlatopolskiy BD, Neumaier B (2021): Drug Penetration into the Central Nervous System: Pharmacokinetic Concepts and In Vitro Model Systems. Pharmaceutics 13, 1542

Nies AT, Damme K, Kruck S, Schaeffeler E, Schwab M (2016): Structure and function of multidrug and toxin extrusion proteins (MATEs) and their relevance to drug therapy and personalized medicine. Arch Toxicol 90, 1555–1584

Nies AT, König J, Leuthold P, Damme K, Winter S, Haag M, Masuda S, Kruck S, Daniel H, Spanier B, et al. (2023): Novel drug transporter substrates identification: An innovative approach based on metabolomic profiling, in silico ligand screening and biological validation. Pharmacol Res 196, 106941

Nigam SK (2015): What do drug transporters really do? Nat Rev Drug Discov 14, 29–44

Nigam SK (2018): The SLC22 Transporter Family: A Paradigm for the Impact of Drug Transporters on Metabolic Pathways, Signaling, and Disease. Annu Rev Pharmacol Toxicol 58, 663–687

Nishimura M, Suzuki Satoshi, Satoh T, Suzuki Shinsaku (2009): Tissue-specific mRNA expression profiles of human solute carrier 35 transporters. Drug Metab Pharmacokinet 24, 91–99

Ohashi R, Tamai I, Yabuuchi H, Nezu JI, Oku A, Sai Y, Shimane M, Shimane A (1999): Na(+)-dependent carnitine transport by organic cation transporter (OCTN2): its pharmacological and toxicological relevance. J Pharmacol Exp Ther 291, 778–784

Okabe M, Szakács G, Reimers MA, Suzuki T, Hall MD, Abe T, Weinstein JN, Gottesman MM (2008): Profiling SLCO and SLC22 genes in the NCI-60 cancer cell lines to identify drug uptake transporters. Mol Cancer Ther 7, 3081–3091

Otsuka M, Matsumoto T, Morimoto R, Arioka S, Omote H, Moriyama Y (2005): A human transporter protein that mediates the final excretion step for toxic organic cations. Proc Natl Acad Sci 102, 17923–17928

Pandit R, Chen L, Götz J (2020): The blood-brain barrier: Physiology and strategies for drug delivery. Adv Drug Deliv Rev 165–166, 165–166

Pardridge P (2012): Drug transport across the blood-brain barrier. J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab 32, 1959–1972

Pardridge WM, Oldendorf WH (1975a): Kinetic analysis of blood-brain barrier transport of amino acids. Biochim Biophys Acta 401, 128–136

Pardridge WM, Oldendorf WH (1975b): Kinetics of blood-brain transport of hexoses. Biochim Biophys Acta 382, 377–392

Parker JL, Newstead S (2019): Gateway to the Golgi: Molecular mechanisms of nucleotide sugar transporters. Curr Opin Struct Biol 57, 127–134

Parker JL, Corey RA, Stansfeld PJ, Newstead S (2019): Structural basis for substrate specificity and regulation of nucleotide sugar transporters in the lipid bilayer. Nat Commun 10, 4657

Parvez MM, Kaisar N, Shin HJ, Lee YJ, Shin J-G (2018): Comprehensive Substrate Characterization of 22 Antituberculosis Drugs for Multiple Solute Carrier (SLC) Uptake Transporters In Vitro. Antimicrob Agents Chemother 62, e00512-18

Patel MM, Patel P (2017): Crossing the Blood-Brain Barrier: Recent Advances in Drug Delivery to the Brain. CNS Drugs 31, 109–133

Pelis RM, Wright SH (2014): SLC22, SLC44, and SLC47 transporters--organic anion and cation transporters: molecular and cellular properties. Curr Top Membr 73, 233–261

Pereira JNDS, Tadjerpisheh S, Abed MA, Saadatmand AR, Weksler B, Romero IA, Couraud P-O, Brockmöller J, Tzvetkov MV (2014): The Poorly Membrane Permeable Antipsychotic Drugs Amisulpride and Sulpiride Are Substrates of the Organic Cation Transporters from the SLC22 Family. AAPS J 16, 1247–1258

Pochini L, Scalise M, Galluccio M, Pani G, Siminovitch KA, Indiveri C (2012): The human OCTN1 (SLC22A4) reconstituted in liposomes catalyzes acetylcholine transport which is defective in the mutant L503F associated to the Crohn's disease. Biochim Biophys Acta 1818, 559–565

Pochini L, Scalise M, Galluccio M, Indiveri C (2013): OCTN cation transporters in health and disease: role as drug targets and assay development. J Biomol Screen 18, 851–867

Pochini L, Galluccio M, Scalise M, Console L, Indiveri C (2019): OCTN: A Small Transporter Subfamily with Great Relevance to Human Pathophysiology, Drug Discovery, and Diagnostics. SLAS Discov 24, 89–110

Pochini L, Barone F, Console C, Brunocilla C, Galluccio M, Scalise M, Indiveri C (2024): OCTN1 (SLC22A4) displays two different transport pathways for organic cations or zwitterions. Biochim Biophys Acta Biomembr 1866, 184263

Reese TS, Karnovsky MJ (1967): Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenouse peroxidase. J Cell Biol 34, 207–217

Reznicek J, Ceckova M, Cerveny L, Müller F, Staud F (2017): Emtricitabine is a substrate of MATE1 but not of OCT1, OCT2, P-gp, BCRP or MRP2 transporters. Xenobiotica Fate Foreign Compd Biol Syst 47, 77–85

Roth M, Obaidat A, Hagenbuch B (2012): OATPs, OATs and OCTs: the organic anion and cation transporters of the SLCO and SLC22A gene superfamilies. Br J Pharmacol 165, 1260–1287

Sachkova A, Doetsch DA, Jensen O, Brockmöller J, Ansari S (2021): How do psychostimulants enter the human brain? Analysis of the role of the proton-organic cation antiporter. Biochem Pharmacol 192, 114751

Sachkova A, Jensen O, Dücker C, Ansari S, Brockmöller J (2022): The mystery of the human proton-organic cation antiporter: One transport protein or many? Pharmacol Ther 239, 108283

Sallee FR, Pollock BG (1990): Clinical pharmacokinetics of imipramine and desipramine. Clin Pharmacokinet 18, 346–364

Samodelov SL, Kullak-Ublick GA, Gai Z, Visentin M (2020): Organic Cation Transporters in Human Physiology, Pharmacology, and Toxicology. Int J Mol Sci 21, 7890

Sato T, Masuda S, Yonezawa A, Tanihara Y, Katsura T, Inui K (2008): Transcellular transport of organic cations in double-transfected MDCK cells expressing human organic cation transporters hOCT1/hMATE1 and hOCT2/hMATE1. Biochem Pharmacol 76, 894–903

Sekhar GN, Fleckney AL, Boyanova ST, Rupawala H, Lo R, Wang H, Farag DB, Rahman KM, Broadstock M, Reeves S, Thomas SA (2019): Region-specific blood–brain barrier transporter changes leads to increased sensitivity to amisulpride in Alzheimer's disease. Fluids Barriers CNS 16, 38

Simons K, Sampaio JL (2011): Membrane organization and lipid rafts. Cold Spring Harb Perspect Biol 3, a004697

Sofroniew MV, Vinters HV (2010): Astrocytes: biology and pathology. Acta Neuropathol (Berl) 119, 7–35

Song Z (2013): Roles of the nucleotide sugar transporters (SLC35 family) in health and disease. Mol Aspects Med 34, 590–600

Sosicka P, Maszczak-Seneczko D, Bazan B, Shauchuk Y, Kaczmarek B, Olczak M (2017): An insight into the orphan nucleotide sugar transporter SLC35A4. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res 1864, 825–838

Staud F, Cerveny L, Ahmadimoghaddam D, Ceckova M (2013): Multidrug and toxin extrusion proteins (MATE/SLC47); role in pharmacokinetics. Int J Biochem Cell Biol 45, 2007–2011

Tamai I, Ohashi R, Nezu J, Yabuuchi H, Oku A, Shimane M, Sai Y, Tsuji A (1998): Molecular and functional identification of sodium ion-dependent, high affinity human carnitine transporter OCTN2. J Biol Chem 273, 20378–20382

Tamai I, Ohashi R, Nezu JI, Sai Y, Kobayashi D, Oku A, Shimane M, Tsuji A (2000): Molecular and functional characterization of organic cation/carnitine transporter family in mice. J Biol Chem 275, 40064–40072

Tanaka Y, Iwaki S, Tsukazaki T (2017): Crystal Structure of a Plant Multidrug and Toxic Compound Extrusion Family Protein. Struct Lond Engl 1993 25, 1455–1460

Tanihara Y, Masuda S, Sato T, Katsura T, Ogawa O, Inui K-I (2007): Substrate specificity of MATE1 and MATE2-K, human multidrug and toxin extrusions/H(+)-organic cation antiporters. Biochem Pharmacol 74, 359–371

Te Brake LHM, van den Heuvel JJMW, Buaben AO, van Crevel R, Bilos A, Russel FG, Aarnoutse RE, Koenderink JB (2016): Moxifloxacin Is a Potent In Vitro Inhibitor of OCT- and MATE-Mediated Transport of Metformin and Ethambutol. Antimicrob Agents Chemother 60, 7105–7114

Theodoulou FL, Kerr I (2015): ABC transporter research: going strong 40 years on. Biochem Soc Trans 43, 1033–1040

Trescot AM, Datta S, M M, Hansen H (2008): Opioid pharmacology. Pain Physician 11, 133–153

Veber DF, Johnson SR, Cheng H-Y, Smith BR, Ward KW, Kopple KD (2002): Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. J Med Chem 45, 2615–2623

Vitorino C, Silva S, Bicker J, Falcão A, Fortuna A (2019): Antidepressants and nose-to-brain delivery: drivers, restraints, opportunities and challenges. Drug Discov Today 24, 1911–1923

Wada E, Koyanagi S, Kusunose N, Akamine T, Masui H, Hashimoto H, Matsunaga N, Ohdo S (2015): Modulation of peroxisome proliferator-activated receptor-α activity by bile acids causes circadian changes in the intestinal expression of Octn1/Slc22a4 in mice. Mol Pharmacol 87, 314–322

Wagner DJ, Huang T, Wang J (2016): Polyspecific organic cation transporters and their impact on drug intracellular levels and pharmacodynamics. Pharmacol Res 111, 237–246

Wang Y, Xiong J, Xiao F, Zhang W, Cheng K, Rao J, Niu B, Tong X, Qu N, Zhang R, et al. (2023): LogD7.4 prediction enhanced by transferring knowledge from chromatographic retention time, microscopic pKa and logP. J Cheminformatics 15, 76

Winter GE, Radic B, Mayor-Ruiz C, Blomen VA, Trefzer C, Kandasamy RK, Huber KVM, Gridling M, Chen D, Klampfl T, et al. (2014): The solute carrier SLC35F2 enables YM155-mediated DNA damage toxicity. Nat Chem Biol 10, 768–773

Wood HCS (1952): Ionization, pH and biological activity. Nature 170, 994–996

Wu L-G, Hamid E, Shin W, Chiang H-C (2014): Exocytosis and Endocytosis: Modes, Functions, and Coupling Mechanisms. Annu Rev Physiol 76, 301–331

Wu X, Huang W, Prasad PD, Seth P, Rajan DP, Leibach FH, Chen J, Conway SJ, Ganapathy V (1999): Functional Characteristics and Tissue Distribution Pattern of Organic Cation Transporter 2 (OCTN2), an Organic Cation/Carnitine Transporter. J Pharmacol Exp Ther 290, 1482–1492

Xia CQ, Milton MN, Gan L-S (2007): Evaluation of drug-transporter interactions using in vitro and in vivo models. Curr Drug Metab 8, 341–363

Yabuuchi H, Tamai I, Nezu J, Sakamoto K, Oku A, Shimane M, Oku Y, Tsuji A (1999): Novel membrane transporter OCTN1 mediates multispecific, bidirectional, and pH-dependent transport of organic cations. J Pharmacol Exp Ther 289, 768–773

Yonezawa A, Masuda S, Yonezawa S, Katsura T, Inui K (2006): Cisplatin and oxaliplatin, but not carboplatin and nedaplatin, are substrates for human organic cation transporters (SLC22A1-3 and multidrug and toxin extrusion family). J Pharmacol Exp Ther 319, 879–886

Zakrzewska S, Mehdipour AR, Malviya VN, Nonaka T, Koepke J, Muenke C, Hausner W, Hummer G, Safarian S, Michel H (2019): Inward-facing conformation of a multidrug resistance MATE family transporter. Proc Natl Acad Sci U S A 116, 12275–12284

Zanos P, Moaddel R, Morris PJ, Riggs LM, Highland JN, Georgiou P, Pereira EFR, Albuquerque EX, Thomas CJ, Zarate CA, Gould TD (2018): Ketamine and Ketamine Metabolite Pharmacology: Insights into Therapeutic Mechanisms. Pharmacol Rev 70, 621–660

Zhang X, Cherrington NJ, Wright SH (2007): Molecular identification and functional characterization of rabbit MATE1 and MATE2-K. Am J Physiol-Ren Physiol 293, 360–370

Zhang Xiaohong, Zhang Xiao, Baker J, Tama F, Chang G, Wright SH (2012): Twelve transmembrane helices form the functional core of mammalian MATE1 (multidrug and toxin extruder 1) protein. J Biol Chem 287, 27971–27978

Zhu C, Kb KB, Nigam R, Bush KT, Springer S, Springer MH, Wu W, Nigam S (2015): Evolutionary Analysis and Classification of OATs, OCTs, OCTNs, and Other SLC22 Transporters: Structure-Function Implications and Analysis of Sequence Motifs. PloS One 10, e0140569

Zolnerciks JK, Andress EJ, Nicolaou M, Linton KJ (2011): Structure of ABC transporters. Essays Biochem 50, 43–61

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich die Möglichkeit ergreifen, mich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Jürgen Brockmöller zu bedanken. Dieser Dank bezieht sich neben der Ermöglichung meiner Dissertation und wissenschaftlichen Tätigkeit in seiner Abteilung auch auf das entgegengebrachte Vertrauen in meine Person. Weiterer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Jochen Staiger für seine Unterstützung als Zweitbetreuer.

Auch möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Abteilung, für die stets hilfreiche wissenschaftliche und organisatorische Unterstützung, bedanken. An dieser Stelle gebührt ein besonderer Dank Kyra-Elisa Redeker für die geduldige Einarbeitung, die konstruktive Zusammenarbeit und Unterstützung bei allen Schwierigkeiten.