

**Identifizierung und funktionelle Charakterisierung von Transportsystemen  
für pharmakologisch aktive Substanzen an humanen Keratinozyten**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

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

von

Frau Diplom-Pharmazeutin Franziska Grafe

geb. am: 16.08.1975                      in: Halberstadt

Gutachter:

1. PD Dr. Matthias Brandsch, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
2. Prof. Dr. Reinhard Neubert, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
3. Prof. Dr. Frederick H. Leibach, Medical College of Georgia, USA

Halle (Saale), 15. März 2004

Tag der Verteidigung: 01.07.2004

**INHALTSVERZEICHNIS**

1	Einleitung und Zielstellung.....	1
2	Die menschliche Haut.....	4
	2.1 Allgemeiner Aufbau und physiologische Funktion.....	4
	2.2 Grundlagen der dermalen und transdermalen Wirkstoffaufnahme.....	7
3	Transport von Biotin.....	10
	3.1 Allgemeine Aspekte zu den verwendeten Substanzen.....	10
	3.1.1 Biotin.....	10
	3.1.2 Pantothensäure.....	12
	3.1.3 Liponsäure.....	13
	3.2 Der natriumabhängige Multivitamintransporter SMVT.....	14
	3.2.1 Charakterisierung des Transportes von Biotin.....	14
	3.2.2 Untersuchungen zur Substratspezifität des SMVT.....	19
	3.3 Transport von Biotin über ein hochaffines Transportsystem.....	23
	3.3.1 Charakterisierung der hochaffinen Biotinaufnahme.....	23
	3.3.2 Bestimmung der Substratspezifität des hochaffinen Biotintransportes.....	25
4	Transport von Taurin.....	26
	4.1 Allgemeine Aspekte zu Taurin.....	26
	4.2 Charakterisierung des Taurintransportes.....	29
	4.3 Untersuchungen zur Substratspezifität des Taurintransportes.....	32
5	Transport von Clonidin.....	35
	5.1 Allgemeine Aspekte zu Clonidin.....	35
	5.2 Charakterisierung des Clonidintransportes.....	36
	5.3 Untersuchungen zur Substratspezifität des Clonidintransportes.....	39
6	Transport von Cholin.....	45
	6.1 Allgemeine Aspekte zu Cholin.....	45
	6.2 Charakterisierung und Spezifität des Cholintransportes.....	46
7	Transport weiterer Substanzen.....	51
	7.1 Transport von Dipeptiden.....	51
	7.2 Transport von Serotonin.....	53

8	Zusammenfassung und Ausblick.....	56
9	Literaturverzeichnis.....	59
10	Veröffentlichte Originalarbeiten	
10.1	Transport of biotin in human keratinocytes <b>Grafe, F.</b> , Wohlrab, W., Neubert, R.H., Brandsch, M. <i>Journal of Investigative Dermatology</i> 120, 428-433, 2003	
10.2	Functional characterization of sodium- and chloride-dependent taurine transport in human keratinocytes <b>Grafe, F.</b> , Wohlrab, W., Neubert, R.H., Brandsch, M. <i>European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics</i> 57, 337-341, 2004	
10.3	Carrier-mediated transport of clonidine in human keratinocytes <b>Grafe, F.</b> , Wohlrab, W., Neubert, R., Brandsch, M. <i>European Journal of Pharmaceutical Sciences</i> 21, 309-312, 2004	
10.4	Functional characterization of a high-affinity choline transport system in human keratinocytes Hoffmann, K., <b>Grafe, F.</b> , Wohlrab, W., Neubert, R.H., Brandsch M. <i>Journal of Investigative Dermatology</i> 119, 118-121, 2002	

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

ACE	Angiotensin-Konversionsenzym
ACh	Acetylcholin
BHS	Blut-Hirn-Schranke
Caco-2	humane Kolonkarzinomzelllinie
CAT	Transporter für kationische Aminosäuren
CHT1	Cholintransporter 1
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
GLUT	Glucosetransporter
Gly-Sar	Glycylsarcosin
GPA	$\beta$ -Guanidinopropionsäure
HaCaT	humane Keratinozytenzelllinie
HepG2	humane Leberkarzinomzelllinie
HT-29	humane Kolonkarzinomzelllinie
IC <sub>50</sub>	Konzentration eines Inhibitors, die nötig ist, um 50 % der spezifischen Aufnahme eines Standardsubstrates zu hemmen
JAR	humane plazentale Choriokarzinomzelllinie
K <sub>i</sub>	Inhibitorkonstante
K <sub>t</sub>	Michaelis-Menten-Konstante (Affinitätskonstante des Transporters)
MCT	Monocarboxylattransporter
MDCK	Nierenzelllinie vom Hund
MPP <sup>+</sup>	Methylphenylpyridinium <sup>+</sup>
n	Anzahl der Parallelbestimmungen
NHEK	native humane epidermale Keratinozyten
OCT	organischer Kationentransporter
OCTN	organischer Kationentransporter
PBMC	peripheral blood mononuclear cells (humane Lymphozyten)
PEPT	Protonen-Peptid-Symporter
pK <sub>a</sub>	Säurekonstante
S	Substratkonzentration
SC	Stratum corneum
S.E.	Standardfehler
SERT	Serotonintransporter
SMVT	natriumabhängiger Multivitamintransporter
TAUT	Taurintransporter
TEA	Tetraethylammonium
TTS	Transdermales Therapeutisches System
v	Transportgeschwindigkeit
V <sub>max</sub>	Maximalgeschwindigkeit des Transporters
ZNS	Zentralnervensystem

## 1 Einleitung und Zielstellung

Die Translokation der Substanzen durch die Epithelien des Organismus erfolgt durch verschiedene Mechanismen. Ausgehend vom Energieverbrauch werden die Transportprozesse grundlegend in passiv und aktiv unterteilt. Der passive Prozess ist vor allem für den vorwiegend unspezifischen, energieunabhängigen Transport von Stoffen entlang eines Konzentrationsgradienten verantwortlich. Im Gegensatz dazu ist der aktive Transport an das Vorhandensein einer Energiequelle gebunden und ermöglicht die spezifische Translokation entgegen einem Konzentrationsgefälle (Silbernagl und Despopoulos, 2003).

Die Untersuchung aktiver Transportprozesse gewinnt in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung. Diese Vorgänge sind wichtig für die Aufnahme und Verteilung von Nahrungsbestandteilen im menschlichen Körper. Darüber hinaus lassen sie sich auch bei der organ-spezifischen Pharmakotherapie ausnutzen und sie ermöglichen Aussagen bezüglich Neben- und Wechselwirkungen eines Pharmakons. Ihre Untersuchung im Organismus führte zur Entdeckung einer Vielzahl von Transportsystemen. Es konnten spezifische Carrier für organische Kationen (z.B. Cholin) und organische Anionen, Nukleoside, Monosaccharide, Neurotransmitter (z.B. Serotonin), Aminosäuren (z.B. Taurin) und Peptide (Di- und Tripeptide), Monocarboxylate, wasserlösliche Vitamine (z.B. Biotin), Phosphate, Gallensäuren und Fettsäuren im menschlichen Organismus nachgewiesen werden. Dabei ließ sich feststellen, dass zwischen den einzelnen Organen Unterschiede hinsichtlich der Expressionsmuster der Transportsysteme existieren. Zahlreiche Transportstudien erfolgten am Zentralnervensystem, an der Plazenta, am Darm und an der Niere (Übersichten bei Ganapathy et al., 2000; Inui et al., 2000; Lee et al., 2001; Steffansen et al., 2004; Tsuji und Tamai, 1996).

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Charakterisierung von Carrier-vermittelten Transportsystemen an Zellen der menschlichen Haut. Im Gegensatz zu bereits zahlreich untersuchten Systemen anderer Organe ist die Untersuchung an humanen Hautzellen relativ jung. In der Literatur sind bisher nur wenige Studien zu diesem Thema beschrieben. Sie erfolgten teilweise parallel zu der vorliegenden Arbeit. Gherzi et al. konnten zu Beginn der 90er Jahre in der humanen Epidermis die Expression des Glucosetransporters GLUT1 nachweisen. Dieses System transportiert Glucose mittels erleichterter Diffusion und dient des weiteren als Kanal für Wasser, so dass GLUT1 eine wichtige Rolle bei der Versorgung der oberen Epidermisschichten mit Nährstoffen und Wasser spielt (Gherzi et al., 1992). Wenige Jahre später untersuchte eine andere Arbeitsgruppe das Expressionsmuster der Glucose-

transporter in proliferierenden Keratinozyten. Dabei stellte sich heraus, dass neben GLUT1 auch die Isoformen GLUT2, GLUT3 und GLUT5 in den Zellen vorkommen (Shen et al., 2000).

Neben Glucose besitzen auch andere Nahrungsbestandteile, z.B. Fettsäuren, Aminosäuren und Cholin, eine Funktion in der humanen Epidermis, so dass der Transport dieser Substanzen ebenfalls von Interesse ist. Während Harris et al. (1998) in kultivierten humanen Keratinozyten die mRNA für das Fettsäuretransportprotein FATP nachweisen konnten, gelang der Arbeitsgruppe um Schnorr an der gleichen Zellspezies der Beweis der Expression von Transportsystemen für kationische Aminosäuren (CAT-1 und CAT-2) (Schnorr et al., 2003). Mit Hilfe von CAT kommt es zum Influx von L-Arginin und damit zur Modulation von Proliferation und Differenzierung der epidermalen Hautzellen. Das Amin Cholin ist ebenfalls an der Regulation der Keratinozytendifferenzierung beteiligt. Haberberger und Pfeil wiesen die Expression des hochaffinen Cholintransporters CHT1 in humanen Keratinozyten nach (Haberberger et al., 2002; Pfeil et al., 2003). Analog zu dem organischen Kation Cholin werden auch organische Anionen über spezifische Transportsysteme in die Haut aufgenommen: Transporter der Familie der organischen Anionen transportierenden Polypeptide (OATP) (Schiffer et al., 2003).

Die genannten Transportsysteme sind für die Aufnahme der entsprechenden Substanzen in die Zelle verantwortlich. Im Gegensatz dazu konnten auch Systeme nachgewiesen werden, die spezifisch Stoffe aus den Keratinozyten transportieren. Die Familie der ABC-Transporter (adenosine triphosphate binding cassette transporter) ist an der Regulation der zellulären Ceramid-Homöostase, am Phospholipidtransport sowie an der Translokation von Cholesterol, amphiphilen Anionen und Konjugaten lipophiler Substanzen mit Glutathion, Glucuronat und Sulfat beteiligt (Kielar et al., 2003). MDR-Transporter (multidrug resistance transporter) stellen weitere Systeme dar, die für einen Efflux verantwortlich sind und eine Resistenz der Zellen gegen bestimmte Arzneistoffe hervorrufen können (Baron et al., 2001).

Im Mittelpunkt der Untersuchungen der vorliegenden Arbeit stand die funktionelle Charakterisierung der Transportprozesse für folgende Substanzen an humanen Keratinozyten:

- 1. Biotin, einem für die Hautfunktion wichtigen Vitamin**
- 2. Taurin, einer konditionell-essentiellen Aminosäure**
- 3. Clonidin, einem Pharmakon zur Therapie der Hypertonie**
- 4. Cholin, einem natürlich vorkommenden Kation**

Weitere Untersuchungen beschäftigten sich mit dem Transport von Peptiden und Serotonin. Dabei stellte sich ausschließlich die Frage, ob die jeweiligen Substrate nur durch Diffusion oder auch durch spezifische Carrier in die Zelle aufgenommen werden.

Die Mehrzahl der Studien erfolgte an der humanen Keratinozytenzelllinie HaCaT (**h**uman **a**dult **l**ow **c**alcium **h**igh **t**emperature **k**eratinocytes). Diese permanente epitheliale Zelllinie ist phänotypisch spontan transformiert, besitzt jedoch keine benignen bzw. malignen Eigenschaften. Die Zelllinie stammt aus der Peripherie eines malignen Melanoms von der oberen Rückenhaut eines 62 Jahre alten männlichen Patienten (Boukamp et al., 1988). Ausgehend von der Mutation beider Allele des p53-Genes ergibt sich eine spontane Immortalität der Zellen, die bis zu 140 Passagen zulässt. Beim Vergleich der Zelllinie mit nativen humanen epidermalen Keratinozyten ergibt sich eine weitgehende Übereinstimmung hinsichtlich der biochemischen Zusammensetzung und der funktionellen Parameter (Boukamp et al., 1988). Die Zellen der Primärkultur besitzen im Gegensatz zur Zelllinie eine komplette Differenzierungskapazität, lassen sich aber nur über 2 bis 3 Passagen kultivieren.

## 2 Die menschliche Haut

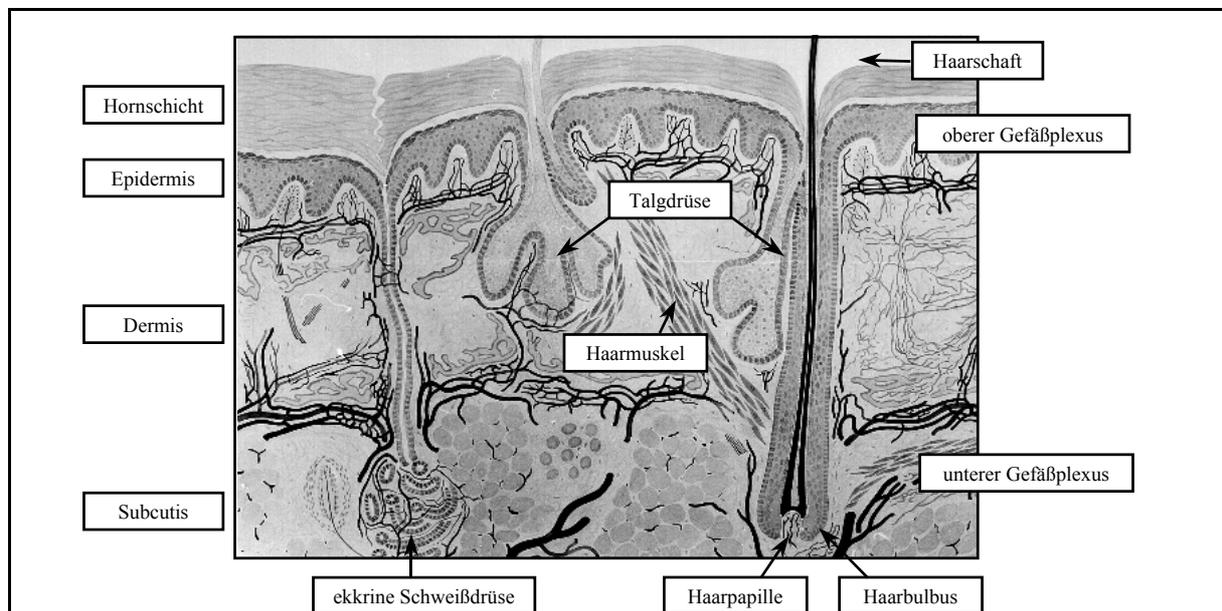
### 2.1 Allgemeiner Aufbau und physiologische Funktion

Die Haut nimmt eine Fläche von 0,25 m<sup>2</sup> (beim Neugeborenen) bis 2 m<sup>2</sup> (beim Erwachsenen) ein und stellt damit das größte menschliche Organ dar. Sie besitzt eine durchschnittliche Masse von 11 kg, das entspricht 7-15 % des Körpergewichtes (Kanitakis, 2002).

Physiologisch hat sie vielfältige Funktionen auszuüben. Sie dient vorrangig dem mechanischen, chemischen und immunologischen Schutz des Körpers, aber auch als Sinnesorgan, zur Wärmeregulation und zur Regulation des Wasser- und Elektrolythaushaltes (Chuong et al., 2002; Wokalek, 1992).

Die Haut ist grob schematisch aus drei Schichten aufgebaut, die abhängig von der Lokalisation unterschiedlich dick sein können (Abbildung 1):

- Epidermis (Oberhaut),
- Dermis (Cutis, Lederhaut, Corium) und
- Subcutis (Unterhaut) (Kanitakis, 2002).



**Abb. 1: Aufbau der menschlichen Haut** (nach Loth, 1986)

Die Epidermis stellt ein mehrschichtiges, etwa 60-180 µm dickes, sich selbst erneuerndes, verhornendes Plattenepithel dar, das hauptsächlich (ca. 90 %) aus Keratinozyten gebildet wird

und für die Barrierefunktion und die mechanische Widerstandsfähigkeit der Haut verantwortlich ist (Loth, 1986; Neubert et al., 2001).

Neben den Keratinozyten sind dendritische Melanozyten, Langerhans-Zellen und Merkel-Zellen typisch für die Epidermis. Melanozyten sind zur Melaninsynthese befähigt und tragen dadurch zur Eigenfarbe und zum Schutz der Haut vor der aggressiven Wirkung des UV-Lichtes bei. Als Abwehr der Haut gegen eindringende Keime dienen die Langerhans-Zellen mit ihrer Makrophagenfunktion. Merkel-Zellen fungieren als Sensor bei der Übertragung von Berührungseizen (Chuong et al., 2002).

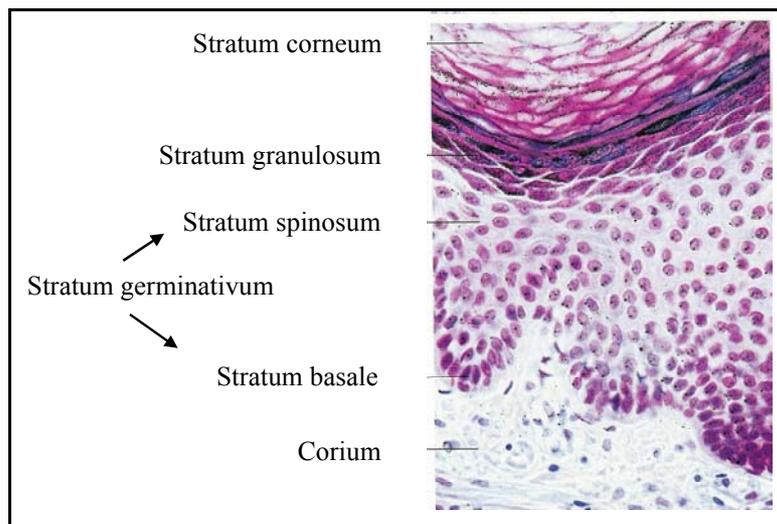
Histologisch besteht die Epidermis aus dem Stratum corneum, einer kernlosen Zellschicht, aus der lebenden Epidermis sowie eingelagerten Anhangsgebilden (Talg-, Schweiß- und Duftdrüsen, aber auch Haare und Nägel) (Pfeifer et al., 1995). Die lebende Epidermis ist zusammengesetzt aus Stratum basale, Stratum spinosum und Stratum granulosum (Loth, 1986; Abbildung 2). Im Stratum basale (innerste, proliferierende Schicht), das aus einer einzigen Lage von Basalzellen (Stammzellen) besteht und auf der Basalmembran aufsitzt, werden durch Zellteilung neue Keratinozyten gebildet. Diese verändern mit der Zeit ihre Gestalt und Zusammensetzung (Basalzelle, Stachelzelle, Körnerzelle, Hornzelle) und durchwandern so das Stratum spinosum und Stratum granulosum bis sie schließlich absterben und als tote Hornschuppen (Korneozyten) das Stratum corneum bilden. Dabei erfolgen Deformierung und Differenzierung der Keratinozyten: Abplattung der Zellen, Auflösung der Zellkerne und Zellorganellen, Dehydratation, Ausbildung der interzellulären Lipidsubstanz und schließlich die Verhornung. Die Zeit von der Bildung der Zellen in der Basalschicht bis zum Stratum granulosum beträgt ungefähr 2-4 Wochen. Weitere 2 Wochen dauert das Durchwandern des Stratum corneum mit anschließender Desquamation der Korneozyten (Elias und Friend, 1975; Loth, 1986).

Das Stratum corneum (SC), auch als Hornschicht bezeichnet, bildet die äußere Schicht der Epidermis und dient hauptsächlich als Permeabilitätsbarriere. Diese Schutzschicht besteht aus 14 bis 27 Lagen fest gepackter, plättchenartiger, kernloser, keratinreicher und laufend abschilfernder Korneozyten (Hornzellen) (Eckert, 1989; Loth, 1986). Die Dicke des Stratum corneum schwankt zwischen 6 und 15  $\mu\text{m}$ , wobei sie an Handfläche und Fußsohle wesentlich stärker als an anderen Körperteilen ausgeprägt ist (Loth, 1986).

Bei Untersuchungen des pH-Wertes der Haut konnte nachgewiesen werden, dass das SC im Vergleich zum Stratum granulosum (neutraler pH-Wert) einen sauren pH-Wert von ungefähr

4.0-4.9 besitzt. Dieser saure pH-Wert ist eine wesentliche Voraussetzung für die Barrierefunktion des SC. Eine Erhöhung des pH-Wertes ist mit einer Abnahme von Integrität und Kohäsion verbunden und bewirkt dadurch eine verminderte Barriere und ein leichteres Eindringen von Keimen (Behne et al., 2002; Fluhr et al., 2001; Hachem et al., 2003; Übersicht bei Chuong et al., 2002; Matousek und Campbell, 2002). In früheren Arbeiten war bereits ein Zusammenhang zwischen einem veränderten pH-Wert und verschiedenen Hautkrankheiten festgestellt worden. So spielt der pH-Wert eine wesentliche Rolle in der Pathogenese, Vorbeugung und Behandlung von Kontaktdermatiden, atopischer Dermatitis, Ichthyose und Wunden (Matousek und Campbell, 2002; Öhman und Vahlquist, 1998; Rippe et al., 2002).

Grundlegend lässt sich der Aufbau des SC als Zwei-Kompartiment-Modell beschreiben (Elias, 1981, Elias und Friend, 1975; Elias und Menon, 1991) (ein Überblick über verschiedene Modelle zur Hautbarriere findet sich bei Norlén, 2003). Entdifferenzierte, proteinhaltige Zellen sind nach dem Ziegelstein-Mörtel-Prinzip in eine Matrix eingebettet, die auch als interstitielle Lipidphase betrachtet werden kann. Für die physikalische und chemische Stabilität sind die Zellen verantwortlich, während die interzellulären, unpolaren Lipide als Kittsubstanz die Penetration von Wasser und darin gelösten Stoffen verhindern und damit die Wasserrückhaltung und die Wasserverdunstung kontrollieren (Wertz et al., 1989a, 1989b). Unlösliche Keratinanteile, eine hydratisierbare und quellfähige Substanz, Wasser und Lipide sind als Hauptbestandteile der Hornschicht zu nennen. Hiervon befinden sich im Intrazellularraum vor allem Keratin und Lipide. Keratin macht ungefähr 80 % der Gesamtmasse der Korneozyten aus (Eckert, 1989). Die dichte Packung der Bestandteile in der Zelle führt zu einer hohen Stabilität, Stärke und Elastizität. Das Zellinnere ist zusätzlich von einer verhornten Zellhülle, dem „cornified envelope“, aus Loricrin, kleinen, prolinreichen Proteinen, Filaggrin, Elafin, Involucrin und Cystatin umgeben (Steinert und Marekov, 1995). Im Interzellularraum befinden sich Ceramide (Sphingolipide), Fettsäuren und Cholesterol in äquimolaren Anteilen (Lampe et al., 1983b; Man et al., 1993; Übersicht bei Coderch et al. 2003). In geringeren Konzentrationen sind Cholesterolester, Triglyceride, Glycosphingolipide und Cholesterolsulfat in den Zellzwischenräumen vorhanden (Lampe et al., 1983a, 1983b). Die Anwesenheit der Lipide in der entsprechenden Zusammensetzung und deren spezifische strukturelle Organisation kann als essentiell für die Ausprägung einer intakten Barrierefunktion (z.B. Schutz vor Wasserverlust) angesehen werden (Proksch et al., 1993; Wertz und Downing, 1982; Williams und Elias, 1987).



**Abb. 2: Mikroskopische Aufnahme der Epidermis und der Dermis** (Fingerhaut, Färbung mit Hämalaun-Eosin, 300fache Vergrößerung) (nach Kühnel, 2002)

Die Dermis (Cutis) stellt ein Bindegewebe mit komplexen biologischen Aufgaben (v.a. Ernährung der Epidermis, Bereitstellung von Abwehrzellen) dar und ist zudem für die mechanische Festigkeit der Haut verantwortlich. Des weiteren sind in dieser Schicht Nerven, Blutgefäße, die den tiefen und subepidermalen Plexus verbinden, sowie Hautanhangsgebilde, wie Schweißdrüsen, Haare und Talgdrüsen lokalisiert (Loth, 1986; Pfeifer et al., 1995; Wokalek, 1992).

Unterhalb der Dermis befindet sich die Subcutis. Sie besteht aus lockerem Bindegewebe, in das Fettzellen eingelagert sind, und dient als Energiereserve, Wärmeschutz und mechanischer Puffer für den Organismus (Loth, 1986; Wokalek, 1992).

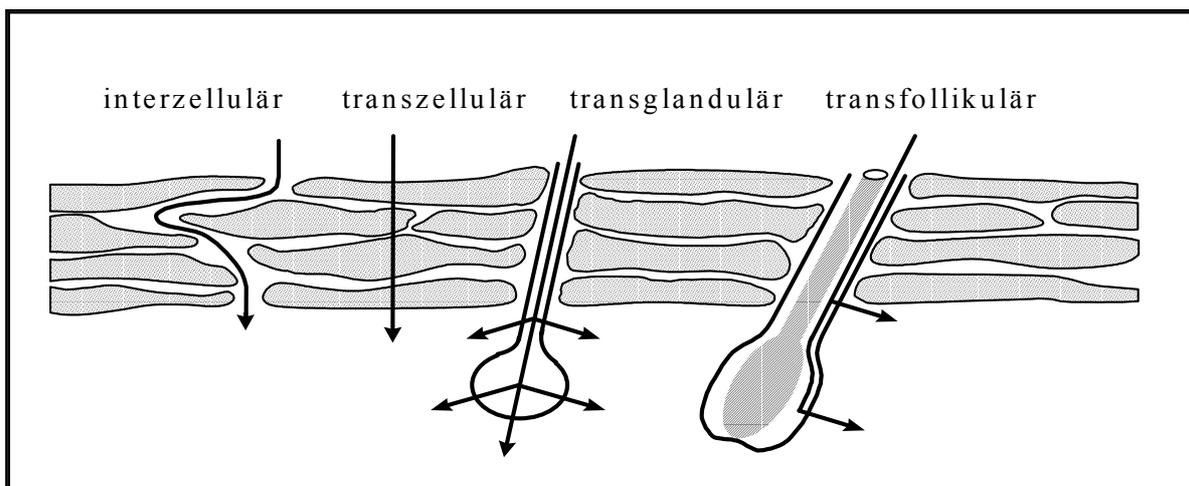
## 2.2 Grundlagen der dermalen und transdermalen Wirkstoffaufnahme

Entsprechend den strukturellen Gegebenheiten der Haut können Stoffe das Stratum corneum auf vier verschiedenen Wegen durchdringen, die in Abbildung 3 aufgezeigt sind: Diffusion durch die Hornschicht auf transzellulärem oder interzellulärem Weg und Diffusion durch die Anhangsgebilde auf transfollikulärem oder transglandulärem Weg (Neubert et al., 2001). Da die Querschnittsfläche der Anhangsgebilde nur etwa 0,1 bis 1 % der gesamten Hautoberfläche beträgt, ist dieser Transportweg vermutlich von untergeordneter Bedeutung. Er spielt lediglich eine gewisse Rolle für:

- Elektrolyte und andere sehr polare Moleküle,

- große Moleküle,
- eine gewisse Zeit nach der Applikation der Arzneizubereitung, bevor sich der Diffusionsstrom des Wirkstoffes dem Fließgleichgewicht annähert und
- den Fall, dass sich die zu therapierenden Bereiche in den Anhangsgebilden oder deren unmittelbarer Nachbarschaft befinden.

Der Haupttransportweg von Substanzen durch die Hornschicht scheint der interzelluläre zu sein (Loth, 1986; Neubert et al., 2001).



**Abb. 3: Penetrationswege durch das Stratum corneum** (nach Neubert et al., 2001)

Die Permeabilität des Stratum corneum hängt von folgenden Parametern ab:

- Dicke,
- Dichtigkeit der Zellpackung und der intrazellulären Struktur,
- Lipidgehalt und molare Zusammensetzung,
- Hydratation,
- Lebensalter,
- eventuell vorhandene Verletzungen und
- pathologische Hautveränderungen (z.B. Ekzeme) (Loth, 1986).

Beim Transport durch die Hornschicht spielen auch die Eigenschaften des verwendeten Wirkstoffes eine wesentliche Rolle:

- Lipophilie oder Hydrophilie,
- räumliche Struktur und Größe des Stoffes und
- das Vorhandensein von funktionellen Gruppen (Pfeifer et al., 1995).

Substanzen von kleiner Molekülgröße, bei denen die hydrophilen und die lipophilen Eigenschaften in einem ausgewogenen Verhältnis vorliegen, können die Haut gut permeieren. Eine hinreichende Wasserlöslichkeit und keine oder eine nur geringe Proteinbindung sind ebenfalls begünstigende Faktoren bei der Permeation (Loth, 1987).

Der Transport von Substanzen durch die Epidermis wird ausgehend vom Energieverbrauch des Vorganges grundsätzlich in passive und aktive Prozesse eingeteilt. Passive Transportprozesse verbrauchen keine Energie und finden entlang eines Konzentrationsgradienten statt. Aktive Prozesse hingegen sind an das Vorhandensein einer Energiequelle, aber nicht an einen Gradienten gebunden. Sie finden sogar gegen einen Konzentrationsgradienten statt (Silbernagl und Despopoulos, 2003).

Die Diffusion verläuft als gerichteter Transport entlang eines Konzentrationsgefälles. Die meisten biologisch wichtigen Stoffe sind sehr polar, so dass die einfache Diffusion dieser Substanzen durch die Membran viel zu langsam verlaufen würde. Für diese Substanzen ermöglicht die erleichterte Diffusion über einen Carrier das Überwinden einer Membran. Im Gegensatz zum aktiven Transport findet die erleichterte Diffusion nur entlang eines elektrochemischen Gradienten statt. Oftmals ist es jedoch notwendig, Stoffe gegen ein Konzentrationsgefälle und/oder ein elektrisches Gefälle zu transportieren. Dies ist nur mittels aktiver Transportmechanismen möglich (Silbernagl und Despopoulos, 2003).

Carrier-vermittelte Transportprozesse (passive und aktive) besitzen folgende Eigenschaften:

- Sättigung des Transportsystems,
- Strukturspezifität und
- unterschiedliche Affinität gegenüber ähnlichen Stoffen (Silbernagl und Despopoulos, 2003).

Bestimmte Membranproteine können auch mehrere verschiedene Ionen- bzw. Molekülararten gleichzeitig transportieren. Erfolgt der Transport von zwei Stoffen in die gleiche Richtung, so spricht man von einem Symport. Als Antiport oder Gegentransport bezeichnet man den Transport zweier Stoffe über einen Carrier in entgegengesetzter Richtung (Silbernagl und Despopoulos, 2003).

### 3 Transport von Biotin

#### 3.1 Allgemeine Aspekte zu den verwendeten Substanzen

##### 3.1.1 Biotin

Biotin wurde in den 1930er Jahren in der Hefe als Wachstumsfaktor entdeckt. Kurze Zeit später fand man in der Leber und wiederum in der Hefe einen protektiven Faktor gegen Eiweißschäden – Vitamin H. Ungefähr 10 Jahre später stellte sich heraus, dass es sich bei dem entdeckten Vitamin H und bei Biotin entgegen früherer Annahmen um ein und dieselbe Substanz handelt (Sweetman und Nyhan, 1986).

Im Organismus spielt das (+)-Stereoisomer des Vitamins eine signifikante Rolle als Coenzym verschiedener Carboxylasen im Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel. Diese Enzymgruppe katalysiert die ATP-abhängige CO<sub>2</sub>-Fixierung und Übertragung und spielt eine wichtige Rolle bei der Lipogenese, der Gluconeogenese, beim Abbau von Aminosäuren, bei der Fettsäuresynthese und darüber hinaus bei der Metabolisierung von Fettsäuren mit ungerader Anzahl an Kohlenstoffatomen und bei der Synthese von Tricarbonsäuren im Organismus (Bender, 1999; Dakshinamurti und Chauhan, 1988; Sweetman und Nyhan, 1986). Zwei weitere wichtige Enzyme stehen im engen Zusammenhang mit der Funktion des Vitamins als Coenzym: die Holocarboxylasesynthetase und die Biotinidase. Zusätzlich zu der Funktion als Coenzym besitzt Biotin einen Einfluss auf die Genexpression, indem es mit Histonen reagiert und kovalent an diese bindet. Bei dieser Funktion ist die Biotinidase von Bedeutung: Sie wirkt als intrazelluläres, biotinbindendes Protein und katalysiert die kovalente Bindung an die Histone. Die Biotinylierung der Histone scheint ein für die Embryonalentwicklung wichtiger Schritt zu sein, bei Biotinmangel konnte bei schwangeren Mäusen ein teratogener Einfluss beobachtet werden (Bender, 1999; Watanabe, 1983). In einem Versuch mit fastenden Ratten konnte ein Zusammenhang zwischen Biotin und der Glucokinase festgestellt werden. Das Vitamin induziert die Synthese von Glucokinase, einem Enzym, das in der Leber für die Aufnahme und den Metabolismus von Glucose nach Nahrungsaufnahme verantwortlich ist und auch in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas exprimiert wird. Da es beim Diabetes mellitus Typ I zu einem Mangel an diesem Enzym kommt, könnte Biotin auf diese Krankheit einen positiven, wenn auch nicht heilenden, Effekt besitzen (Bender, 1999).

Der diätetische Bedarf für Biotin beim Menschen ist nicht genau bekannt. Das liegt zum einen an Unterschieden hinsichtlich der Verfügbarkeit des Vitamins aus der Nahrung und zum anderen an den Schwankungen der Biotinsynthese durch die intestinale Flora. Es ist jedoch davon auszugehen, dass die tatsächliche tägliche Aufnahme des Vitamins von ungefähr 30 bis

100 µg eine adäquate Zufuhr gewährleistet (Dakshinamurti und Chauhan, 1988; Jung et al., 1998; Sweetman und Nyhan, 1986). Im Blutplasma von gesunden Probanden wurden nach der Aufnahme der genannten durchschnittlichen Mengen mit der Nahrung Biotinkonzentrationen von  $418 \pm 368$  ng/l (entspricht  $1,7 \pm 1,5$  nM) gefunden (Jung et al., 1998). Neben dem frei vorliegenden Biotin ist ein gewisser Teil des Plasmabiotin auch an Albumine,  $\alpha$ -,  $\beta$ -Globuline oder an Glykoproteine gebunden (Sweetman und Nyhan, 1986).

Ein Biotinmangel wurde nach dem längerfristigen Verzehr von großen Mengen roher Eier, bei der Therapie mit Antikonvulsiva, bei Patienten nach Hämodialyse oder parenteraler Ernährung und bei entzündlichen Darmerkrankungen festgestellt (Bender, 1999; Dakshinamurti und Chauhan, 1988; Fernandez-Banares et al., 1989; Krause et al., 1982, 1985). Die klinischen Symptome eines Biotinmangels sind vielfältig: Glossitis, Anorexie, Nausea, Depressionen, Halluzinationen, Somnolenz, Panik, Erbrechen, Mattigkeit. Neben diesen allgemeinen Symptomen sind auch die Haut und deren Anhangsgebilde bei vielen Patienten geschädigt. So zeigen die Betroffenen Xerosis, allgemeine Blässe (Pallor), periorifiziale Ekzeme, Alopecie, Desquamation oder eine atopische Dermatitis (Makino et al., 1999; Miller, 1989; Sweetman und Nyhan, 1986). Bei Säuglingen wird der Zusammenhang zwischen einem Biotinmangel und dem plötzlichen Kindstod diskutiert (Bender, 1999). Biotin wird sehr häufig zur Therapie brüchiger Fingernägel eingesetzt. Nach oraler Gabe des Vitamins kommt es zu einer Zunahme der Nageldicke und zu Veränderungen der Nageloberfläche (Colombo et al., 1990). Verschiedene Arbeitsgruppen versuchten des weiteren herauszufinden, ob Biotin neben den beschriebenen Effekten auf die Hautanhangsgebilde auch einen nachweisbaren Einfluss auf verschiedene Parameter der Haut selbst besitzt. Limat et al. (1996) nutzten dabei kultivierte humane follikuläre Keratinozyten. Bei den Untersuchungen ließen sich trotz zunehmender Biotinkonzentration keine morphologischen Veränderungen feststellen: Sowohl die Proliferation der Zellen als auch die Keratinexpression und damit das Keratinmuster blieben unbeeinflusst. Die Aktivität der biotinabhängigen Carboxylasen und der Biotinidase blieben zunächst konstant. Erst bei einer Reduzierung der Biotinkonzentration im Medium nahm die Aktivität der Enzyme ab. Huschka (1998) untersuchte den Einfluss von Biotin auf native Keratinozyten und auf die humane Keratinozytenzelllinie HaCaT. Auch in dieser Arbeit konnten keinerlei Anhaltspunkte für einen Eingriff des Vitamins in regulierende Prozesse des Wachstums erhalten werden. Differenzierung, Keratinisierung und apoptotische Vorgänge unterlagen keiner Regulation durch Biotin. Nach Wachstum der Zellen in einem mit dem Vitamin angereicherten Medium konnte er jedoch ein verändertes Fettsäuremuster feststellen. Der Gehalt der gesättigten

Fettsäuren Myristin-, Palmitin- und Stearinsäure und der ungesättigten Ölsäure stieg an, während sich die Konzentration der Linolsäure nicht veränderte. In früheren Arbeiten wurde ein Zusammenhang zwischen dem Gehalt verschiedener Fettsäuren und dem pH-Wert der Haut beschrieben (Fluhr et al., 2001; siehe Kapitel 2.1). Ausgehend von den genannten Erkenntnissen könnte Biotin einen regulierenden Einfluss auf den pH-Wert und damit auf die Barrierefunktion der Haut besitzen.

### 3.1.2 Pantothensäure

Pantothensäure stellt ein essentielles B-Vitamin dar. Im Jahre 1939 wurde sie als „Antidermatitisfaktor“ und „Leberfiltratfaktor“ entdeckt und später als Vitamin B<sub>5</sub> bezeichnet (Tahiliani und Beinlich, 1991).

Die tägliche Aufnahme beträgt ungefähr 4 bis 7 mg. Der Bedarf ist bei älteren Menschen, bei Kindern, Schwangeren und unter Einnahme oraler Kontrazeptiva erhöht (Tahiliani und Beinlich, 1991). Im humanen Blutplasma wurden die Konzentration der freien und der gebundenen Pantothensäure gemessen. Der gebundene Anteil ist mit 0,04 µM im Vergleich zu 0,69 µM freier Säure sehr gering (Rychlik, 2000).

Ein Mangel an Pantothensäure im Organismus führt zu Kopfschmerzen, Müdigkeit, Schwächegefühl, Persönlichkeitsveränderungen, Schlafstörungen, einer Beeinträchtigung der motorischen Koordination und gastrointestinalen Störungen (Tahiliani und Beinlich, 1991).

Im Organismus wird Pantothensäure zur Biosynthese von Coenzym A benötigt. Coenzym A ist ein Acylgruppencarrier, der als Cofaktor in zahlreiche enzymatische Reaktionen inklusive Fettsäureoxidation, Kohlenhydratstoffwechsel, Oxidation von Pyruvat, Laktat, Ketonkörpern und Aminosäuren und in viele synthetische Reaktionen involviert ist (Bender, 1999; Tahiliani und Beinlich, 1991).

Dexpanthenol stellt das alkoholische Analogon der Pantothensäure dar, das im Organismus zur Säure oxidiert wird. Die Substanz penetriert gut durch die Haut und erreicht dort lokal hohe Konzentrationen. Aufgrund seiner Wirkung als Moisturizer verbessert Dexpanthenol die Hydratation des Stratum corneum, reduziert den transepidermalen Wasserverlust und hält die Zartheit und Elastizität der Haut aufrecht. Des weiteren trägt es bei zu einer Aktivierung der Fibroblastenproliferation und damit zur beschleunigten Reepithelisierung nach Verletzungen der Haut. Darüber hinaus besitzt Dexpanthenol nützliche Effekte bei Patienten nach einer Hauttransplantation, bei der Narbenbehandlung, der Therapie von Verbrennungen, verschiedener Dermatosen, Juckreiz und Erythemen (Ebner et al., 2002).

### 3.1.3 Liponsäure

$\alpha$ -Liponsäure stellt eine endogene, schwefelhaltige Carbonsäure mit einer Disulfidgruppierung dar, die bei physiologischem pH-Wert als Anion vorliegt. Sie kommt in pflanzlichen und tierischen Geweben als Lipoyllysin vor und ist ein Coenzym im  $\alpha$ -Ketosäure-Dehydrogenasekomplex (Moini et al., 2002; Patrick, 2000; Sen und Packer, 2000). Das niedrige Molekulargewicht und der amphiphile Charakter sind Voraussetzungen für die Absorption der Liponsäure aus der Nahrung im Darm und die Verteilung im Organismus in lipophilen und hydrophilen Kompartimenten. Aufgrund der Fähigkeit zum Überwinden der Blut-Hirn-Schanke ist die Liponsäure in der Lage, sich auch im Gehirn anzureichern. In diesem Organ, im Nervengewebe, in den Lymphknoten und in vielen anderen Geweben besitzt sie einen antioxidativen Effekt, indem sie mit verschiedenen reaktiven Sauerstoffspezies, die während der Lipidperoxidation gebildet werden, reagiert. Zusätzlich zu dieser direkten Wirkung besitzt die Kombination Liponsäure/Dihydroliponsäure auch eine indirekte: Sie regeneriert andere Antioxidantien wie Ascorbinsäure (Vitamin C), Tocopherol (Vitamin E), Ubiquinon und Glutathion (Biewenga et al., 1997; Packer et al., 2001; Patrick, 2000; Sen und Packer, 2000). Der Redoxstatus der Thiolstruktur der Dihydroliponsäure spielt des weiteren eine zentrale Rolle in der Regulation verschiedener endogener Prozesse. So werden die Proteinstruktur und -aktivität, der Metabolismus von Xenobiotika, die Zellproliferation und Apoptose, die Signaltransduktion und die Immunregulation beeinflusst (Sen und Packer, 2000).

Freie Radikale spielen bei der Hautalterung eine wichtige Rolle. Durch metabolische Aktivität kommt es zur ständigen Bildung verschiedener reaktiver Sauerstoffspezies. Der Organismus ist in der Lage, sich gegen solche oxidativen Angriffe auf Lipide, Proteine und die DNA durch hochmolekulare enzymatische und niedermolekulare nicht-enzymatische Antioxidantien zu schützen. Während der physiologischen Hautalterung oder einer durch UV-Licht hervorgerufenen Hautschädigung kommt es zur Abnahme der antioxidativen Abwehrmechanismen und zum Anstieg der Lipid- und Proteinoxidationsrate und darauf basierend zu einer Zunahme irreversibler Zellschäden. Die Liponsäure und ihre aktive Form, die Dihydroliponsäure, sind in der Lage, in Keratinozyten Glutathion und damit Tocopherol und Ubiquinon zu regenerieren. Aufgrund dieses antioxidativen Effektes kommt es zu einer verminderten Schädigung nach UV-Exposition (Podda und Grundmann-Kollmann, 2001).

Die Liponsäure wird in der Prävention und Behandlung des Typ II-Diabetes (nicht-insulinpflichtiger Diabetes mellitus) eingesetzt. Bei dieser Erkrankung kommt es u.a. zu

einem Ungleichgewicht zwischen der Konzentration der freien Radikale und den antioxidativen Mechanismen des Organismus. Die Liponsäure fängt freie Radikale wie Hydroxylradikale, hypochlorige Säure, Peroxynitrit ab und reduziert dadurch den oxidativen Stress auf den Organismus (Packer et al., 2001; Ruhe und McDonald, 2001).

Ein weiteres wichtiges Einsatzgebiet der Liponsäure stellt die adjuvante Therapie der HIV-Infektion dar. Der durch die Infektion und andere Faktoren ausgelöste oxidative Stress induziert die virale Aktivierung des HI-Virus (humanes Immundefizienzvirus) und eine Schädigung der DNA. Durch Apoptose kommt es zur Reduktion der T-Helferzellen und damit zu einer Immunsuppression. Nach Anwendung von Liponsäure kommt es zu erhöhten Glutathionspiegeln, einer Erhöhung der Konzentration von Ascorbat im Plasma, einem Anstieg der Plasmathiolspiegel, Senkung der Konzentration der Lipidperoxide, zur Hemmung der Reversen Transkriptase, zur verminderten HIV-Replikation und zu einer Erhöhung der Anzahl von T-Helferzellen (Patrick, 2000).

### **3.2 Der natriumabhängige Multivitamintransporter SMVT**

Vgl. Anlage 10.1 (Grafe et al., 2003)

#### **3.2.1 Charakterisierung des Transportes von Biotin**

Der Transport von Biotin im menschlichen und tierischen Organismus ist von wesentlicher Bedeutung, da der Körper nicht dazu befähigt ist, das Vitamin zu synthetisieren. Biotin wird mit der Nahrung aufgenommen oder von der Darmflora synthetisiert und anschließend im Darm resorbiert. Der Mechanismus der Aufnahme in den Körper war lange ungeklärt, bevor in den 60er und 70er Jahren ein spezifischer Transportmechanismus für Biotin im Hamsterdarm beschrieben wurde (Berger et al., 1972; Spencer und Brody, 1964). In den nachfolgenden Jahren konnte durch verschiedene Arbeitsgruppen der Biotintransporter an unterschiedlichen Geweben charakterisiert werden. Es fanden Studien an der Plazenta (Grassl, 1992), an der Niere (Baur und Baumgartner, 1993; Podevin und Barbarat, 1986;), am Darm (Said und Redha, 1987, Said et al., 1987), an der Leber (Said et al. 1990a, 1992) und an der Blut-Hirn-Schranke (Shi et al., 1993) statt. Eine Übersicht über die an unterschiedlichen Geweben gefundenen Ergebnisse findet sich bei Dyer und Said (1997). Bei den Untersuchungen fand man, dass es sich um ein natriumabhängiges Transportsystem handelt, welches neben Biotin auch andere physiologisch relevante Substanzen wie Liponsäure und Pantothenensäure erkennt und transportiert (siehe auch Kapitel 3.2.2). Aufgrund seiner Substratspezifität wurde der Carrier nach seiner Klonierung als SMVT (sodium-dependent

multivitamin transporter) bezeichnet (Übersicht bei Prasad und Ganapathy, 2000). In einer jüngeren Arbeit wurde die Herstellung eines polyklonalen Kaninchen-Antikörpers gegen den humanen SMVT beschrieben, mit dessen Hilfe der Nachweis des Transportsystems in verschiedenen Zellkulturen gelang (Griffin et al., 2002).

Der SMVT ist zur Aufnahme der Vitamine aus der Nahrung im Darm und zur Verteilung im Organismus notwendig. Die Aktivität des Multivitamintransporters hängt von verschiedenen exogenen und endogenen Faktoren ab. Es konnte nachgewiesen werden, dass es bei Nierenerkrankungen, bei der langfristigen Therapie mit Antikonvulsiva und bei chronischer Alkoholfuhr zu einer reduzierten Aufnahme von Biotin im Darm kommt (Said et al., 1989b, 1990b; Übersicht bei Dyer und Said, 1997). Die mit der Nahrung zugeführte Biotinmenge reguliert ebenfalls den intestinalen Transportprozess. Bei einer Unterversorgung kommt es zu einer Erhöhung der Anzahl der Transportproteine. Damit versucht der Organismus die zugeführte, jedoch zu geringe Menge des Vitamins optimal zu nutzen. Im Gegensatz dazu kommt es bei einem Überschuss an Biotin zur Erniedrigung der Anzahl der Transportproteine (Downregulation) (Said et al., 1989a; Übersicht bei Dyer und Said, 1997).

Obwohl die Bedeutung von Biotin an der Haut bekannt ist (siehe Kapitel 3.1.1) und der Transport an verschiedenen Geweben aufgeklärt werden konnte, existieren bisher keine Studien zur Aufnahme des Vitamins in Zellen der Haut. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit galt es daher herauszufinden, ob der natriumabhängige Multivitamintransporter auch in humanen Keratinozyten für die Aufnahme von Biotin verantwortlich ist.

Um einen Carrier-vermittelten Transport des Biotins nachzuweisen, wurde zu Beginn der Studien die zeitabhängige Aufnahme von 6 nM [<sup>3</sup>H]Biotin in Anwesenheit und in Abwesenheit von extrazellulärem Na<sup>+</sup> in HaCaT Zellen gemessen. Der Transport in Gegenwart eines Inkubationspuffers mit Na<sup>+</sup> erwies sich als um den Faktor 4-5 größer als der in einem Medium, in dem Natriumchlorid durch Cholinchlorid substituiert war (**Anlage 10.1**). Diese Beobachtung erlaubt die Schlussfolgerung, dass es sich bei dem beobachteten Carrier-vermittelten Transport um einen stark natriumabhängigen Prozess handelt, wie er aus der Literatur für SMVT bekannt ist (Übersicht bei Dyer und Said, 1997). Die Aufnahme von [<sup>3</sup>H]Biotin in Gegenwart von Na<sup>+</sup> erwies sich bis zu einer Inkubationszeit von 5 Minuten als linear. Bei einer Verlängerung der Zeit kam es zur Sättigung des Transportsystems, ersichtlich am Abflachen der Kurve (**Anlage 10.1**).

In einem weiteren Versuch wurde die Bedeutung verschiedener Ionengradienten untersucht. Dazu wurden im Inkubationsmedium Na<sup>+</sup> oder Cl<sup>-</sup> ausgetauscht und der Einfluss auf das

System im Vergleich zum Kontrollmedium mit  $\text{Na}^+$  und  $\text{Cl}^-$  betrachtet. Beim Austausch von  $\text{Na}^+$  ließen sich die bereits genannten Ergebnisse bestätigen, die Aufnahme wurde auf ungefähr 20 % reduziert. Bei der Substitution von  $\text{Cl}^-$  im Medium war die Transportrate mit der der Kontrolle vergleichbar (**Anlage 10.1**). Dies erlaubt die Schlussfolgerung, dass der Carrier-vermittelte Transport von Biotin völlig unabhängig von der Anwesenheit von  $\text{Cl}^-$  ist.

Im Rahmen der gleichen Versuchsreihe wurde die Hemmbarkeit des gefundenen Systems getestet, indem der Transport des radioaktiv markierten Biotin in Gegenwart eines Überschusses an unmarkiertem Biotin gemessen wurde. Die Aufnahme von 6 nM [ $^3\text{H}$ ]Biotin aus einem  $\text{Na}^+$ -haltigen Medium wurde durch 10 mM Biotin um 92 % reduziert. Die restlichen 8 % stellen den nicht hemmbaren Anteil des Systems dar, der aus Diffusion und/oder unspezifischer Bindung resultiert. Dieser Anteil konnte durch die Substitution von  $\text{Na}^+$  oder  $\text{Cl}^-$  im Inkubationsmedium nicht gehemmt werden (**Anlage 10.1**).

Bei Veränderung des extrazellulären pH-Wertes in einem Bereich von 6,0 bis 8,5 in Anwesenheit oder Abwesenheit von  $\text{Na}^+$  fand keine Beeinflussung der Biotinaufnahme statt. Das gefundene Transportsystem erwies sich somit als pH-unabhängig.

Die Temperatur während der Inkubationsdauer scheint dagegen, wie für ein Carrier-vermitteltes System zu erwarten, relevant zu sein. Die Aufnahmerate bei 4°C erwies sich als signifikant kleiner als bei Raumtemperatur, und diese wiederum war geringer als bei 37°C (**Anlage 10.1**).

Ausgehend von den genannten Ergebnissen wurden die nachfolgenden Versuche bei einem physiologischen pH-Wert von 7,5 in einem Inkubationsmedium mit  $\text{Na}^+$  und  $\text{Cl}^-$  und über einen Inkubationszeitraum von 5 Minuten bei Raumtemperatur durchgeführt.

Die kinetischen Parameter eines Carrier-vermittelten Transportes wie Maximalgeschwindigkeit und Affinitätskonstante sind spezifisch für ein Substrat und erlauben einen Vergleich mit den in der Literatur am gleichen Carrier an unterschiedlichen Geweben erhaltenen Werten. Zur Bestimmung der Parameter wurde die Biotinaufnahme in Abhängigkeit von der Biotinkonzentration in einem Bereich von 1-500  $\mu\text{M}$  gemessen. Die für die Auswertung erforderliche Diffusionskonstante, d.h. der nicht-hemmbare Anteil, konnte durch die Bestimmung der Aufnahme von 12 nM [ $^3\text{H}$ ]Biotin bei gleichzeitiger Anwesenheit eines Überschusses von 10 mM Biotin bestimmt werden. Der erhaltene Wert wurde von den für die verschiedenen Konzentrationen erhaltenen Aufnahmeraten subtrahiert, um den sättigbaren, Carrier-vermittelten Anteil zu erhalten. Bei der Auswertung der erhaltenen Ergebnisse und Auftragung der Biotinaufnahme (= Geschwindigkeit des Transportsystems,  $v$ ) gegen die Biotinkonzentration (= Substratkonzentration,  $S$ ) ergibt sich eine Michaelis-Menten-Kinetik.

Bei niedrigen Substratkonzentrationen ist die Geschwindigkeit annähernd der Konzentration proportional. Mit zunehmender Konzentration von Biotin nähert sich die Transportgeschwindigkeit asymptotisch einem Maximalwert und ist fast konzentrationsunabhängig. Durch nichtlineare Regression der in Form der Michaelis-Menten-Auftragung dargestellten Ergebnisse konnten die Michaelis-Menten-Konstante  $K_t$  (Affinitätskonstante; Substratkonzentration, bei der der Transport des Substrates mit der Hälfte der Maximalgeschwindigkeit abläuft) mit  $22,7 \pm 1,0 \mu\text{M}$  und die Maximalgeschwindigkeit  $V_{\text{max}}$  des Transportes mit  $163,6 \pm 3,5 \text{ pmol}/(5 \text{ min} \cdot \text{mg Protein})$  bestimmt werden (**Anlage 10.1**). Des Weiteren folgte eine Transformation der aus dem Versuch erhaltenen Ergebnisse und die anschließende Auftragung nach Eadie-Hofstee. Die lineare Regression ergibt eine Gerade mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,9864. Dieses Ergebnis erlaubt die Vermutung, dass in dem gewählten Konzentrationsbereich nur ein System am Transport von Biotin beteiligt ist (**Anlage 10.1**). Der Vergleich der in der Literatur für den SMVT an verschiedenen Geweben und Organismen beschriebenen Michaelis-Menten-Konstanten mit dem in dieser Arbeit an humanen Keratinozyten bestimmten Wert (Tabelle 1) lässt erkennen, dass die Konstanten in einem Bereich von 1 bis  $123 \mu\text{M}$  liegen. Ausgehend davon ergibt sich die Schlussfolgerung, dass auch in humanen Keratinozyten der  $\text{Na}^+$ -abhängige Multivitamintransporter exprimiert wird. Damit ist es erstmalig gelungen, die Existenz des SMVT an Zellen der menschlichen Haut nachzuweisen.

**Tab. 1: Kinetische Parameter ( $K_t$  und  $V_{max}$ ) des SMVT verschiedener Gewebe und Spezies (\* $V_{max}$ -Werte der verschiedenen Untersuchungen sind aufgrund unterschiedlicher Präparationen nicht vergleichbar)**

Zelltyp	$K_t$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{max}$	Literatur
Humane Keratinozytenzelllinie HaCaT	23	163,6 pmol/(5 min·mg Protein)	Grafe et al., 2003 (Anlage 10.1)
Apikale Membranvesikel der Kaninchennierenrinde	28	-	Podevin und Barbarat, 1986
„everted sac“ des Rattendarms (Jejunum)	4	3,1 nmol/(25 min·g Feuchtgewicht)	Said und Redha, 1987
Apikale Membranvesikel des humanen Darms	5	13,5 pmol/(20 s·mg Protein)	Said et al., 1987
Apikale Membranvesikel des Rattendarms (Jejunum)	8	0,9 pmol/(s·mg Protein)	Said und Redha, 1988
Apikale Membranvesikel des Rattendarms (Ileum)	8	0,4 pmol/(s·mg Protein)	Said und Redha, 1988
Basolaterale Membranvesikel des humanen Darms	1	0,9 pmol/(15 s·mg Protein)	Said et al., 1988
Apikale Membranvesikel der Rattenniere	55	217 pmol/(25 s·mg Protein)	Baur et al., 1990
Basolaterale Membranvesikel der Rattenleber	1	1,8 pmol/(20 s·mg Protein)	Said et al., 1990a
Apikale Membranvesikel des Kaninchendarms	7	10,7 pmol/(10 s·mg Protein)	Said und Derweesh, 1991
Apikale Membranvesikel der humanen Plazenta	21	4,5 nmol/(min·mg Protein)	Grassl, 1992
Basolaterale Membranvesikel der humanen Leber	1	4,8 pmol/(10 s·mg Protein)	Said et al., 1992
Apikale Membranvesikel der humanen Niere	31	82 nmol/(30 s·mg Protein)	Baur und Baumgartner, 1993
Primärkultur von Endothelzellen des Rinderhirns (BHS)	123	3,0 nmol/(min·mg Protein)	Shi et al., 1993
Humane Darmzelllinie Caco-2	10	520 pmol/(min·mg Protein)	Ma et al., 1994
Humane Leberzelllinie HepG2	19	6,8 nmol/(min·mg Protein)	Said et al., 1994
Humane Kolonepithelzelllinie NCM460	20	38,8 pmol/(3 min·mg Protein)	Said et al., 1998
Primärkultur von Endothelzellen des Kälberhirns (BHS)	47	101 pmol/(min·mg Protein)	Baur und Baumgartner, 2000
Apikale Membranvesikel der Rattennierenrinde	27	2,1 pmol/(10 s·mg Protein)	Nabokina et al., 2003
Apikale Membranvesikel des Rattendarms (Jejunum)	11	4,7 pmol/(10 s·mg Protein)	Nabokina et al., 2003

### 3.2.2 Untersuchungen zur Substratspezifität des SMVT

Neben den allgemeinen Charakteristika eines Carrier-vermittelten Transportsystems finden sich in der bereits im Kapitel 3.2.1 erwähnten Literatur Hinweise auf die Substratspezifität und Substrataffinität des Systems. Der Carrier erkennt und transportiert neben Vitamin H auch Pantothersäure und Liponsäure, weshalb er auch als Multivitamintransporter bezeichnet wurde. Weiterführende Untersuchungen beschäftigten sich mit dem Einfluss verschiedener Derivate und Analoga von Biotin und Pantothersäure (Podevin und Barbarat, 1986; Said et al., 1987).

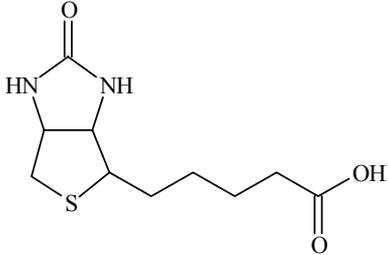
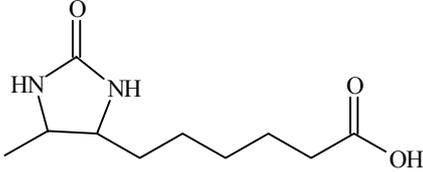
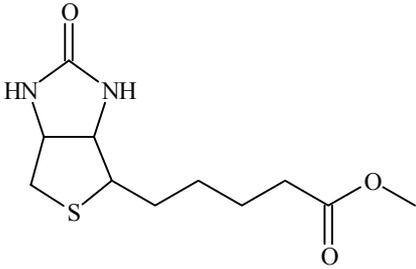
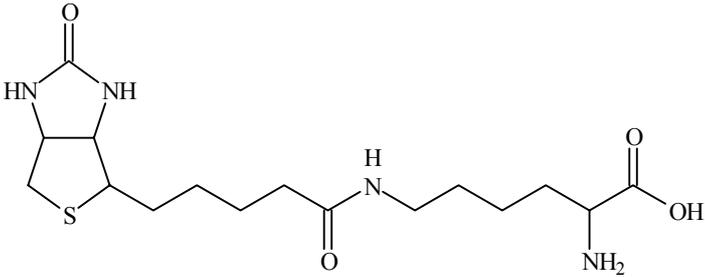
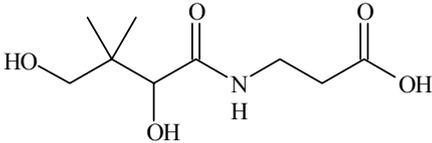
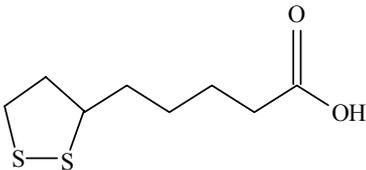
Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Substratspezifität an humanen Keratinozyten getestet. Zunächst fanden Versuche zur Hemmbarkeit der Aufnahme von 6 nM [<sup>3</sup>H]Biotin an der humanen Keratinozytenzelllinie HaCaT statt. In Anwesenheit von unmarkiertem Biotin, Pantothersäure oder Liponsäure (jeweils 1 mM) wurde der Transport um etwa 80 % reduziert, so dass geschlossen werden kann, dass für diese drei Substanzen ein und dasselbe Transportsystem verantwortlich ist. Mit Hilfe von Derivaten des Biotins sollten des weiteren Aussagen über die strukturellen Voraussetzungen des Transportes erhalten werden. Dazu wurden Desthiobiotin, Biotinmethylester und Biocytin in einer Konzentration von jeweils 1 mM untersucht. Bei Desthiobiotin kam es zu einer mit Biotin vergleichbaren Hemmung. Während Biotinmethylester eine geringe, aber signifikante Reduktion der [<sup>3</sup>H]Biotinaufnahme erzielte, konnte für Biocytin keine Verringerung der aufgenommenen Biotinmenge nachgewiesen werden (**Anlage 10.1**). In der Tabelle 2 sind die Strukturformeln von Liponsäure, Pantothersäure und von Biotin und seinen Derivaten dargestellt. Anhand der beschriebenen Beobachtungen und der Strukturen können erste Aussagen über die strukturellen Voraussetzungen gemacht werden. Biotin, Desthiobiotin, Pantothersäure und Liponsäure weisen eine lange Seitenkette mit einer freien Carboxylgruppe auf. Bei Veränderung dieser Gruppierung durch Veresterung (Biotinmethylester) oder Amidbildung (Biocytin) reduziert sich die Affinität oder wird ganz aufgehoben. Es lässt sich vermuten, dass die freie Carboxylfunktion essentiell für die Bindung an den SMVT ist. Die Substrate weisen des weiteren eine heterocyclische Ringstruktur auf. Bei der Pantothersäure bildet sich eine ringförmige Struktur durch Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Aminogruppierung der  $\beta$ -Alaninstruktur und der Hydroxylgruppe der Pantothersäure-Struktur. Diese Ergebnisse liefern lediglich erste Erkenntnisse und müssen durch weiterführende Untersuchungen noch belegt und konkretisiert werden.

Für die Aminosäuren Leucin, Tryptophan, das Vitamin Thiamin und das Amin Cholin, die keine Verwandtschaft mit den gefundenen Substraten aufwiesen, konnte kein Einfluss auf das System festgestellt werden.

Um die erhaltenen Ergebnisse an der Primärkultur zu bestätigen, wurden unmarkiertes Biotin, Pantothersäure, Liponsäure und Leucin hinsichtlich Beeinflussung der Aufnahme von 6 nM [<sup>3</sup>H]Biotin an nativen humanen epidermalen Keratinozyten getestet. Die erhaltenen Ergebnisse korrelieren gut mit den an der Zellkultur erhaltenen: Bei einer Substratkonzentration von 0,5 mM hemmten Biotin, Pantothersäure und Liponsäure den Transport auf ungefähr 24-37 %, während es durch Leucin zu keiner Veränderung der Biotinaufnahme kam (**Anlage 10.1**).

Zur Bestimmung der Affinitäten der gefundenen Substrate, fanden sowohl an HaCaT als auch an NHEK Kompetitionsstudien statt. Die Aufnahme von [<sup>3</sup>H]Biotin setzt sich aus Diffusion und Carrier-vermitteltem Transport zusammen. Mit Erhöhung der Konzentration an Substrat wird die Carrier-vermittelte Aufnahme von [<sup>3</sup>H]Biotin in die Zellen verringert und tendiert bei einem Überschuss an Substrat gegen einen konstanten Wert, d.h. es findet nur noch Diffusion des radioaktiv markierten Biotin in die Zelle statt. Diejenige Konzentration, bei der die Substanz die transportervermittelte Aufnahme von [<sup>3</sup>H]Biotin in die Zellen um 50 % hemmt, bezeichnet man auch als IC<sub>50</sub>-Wert. Die erhaltenen IC<sub>50</sub>-Werte wurden nach der von Cheng und Prusoff (1973) beschriebenen Gleichung in die in der Tabelle 2 dargestellten Inhibitionskonstanten (K<sub>i</sub>-Werte) umgerechnet. Die Affinitätskonstanten für Biotin, Desthiobiotin, Pantothersäure und Liponsäure lagen im Bereich von 1 bis 15 µM. Die Bestimmung der Affinität von Biotin an nativen humanen epidermalen Keratinozyten ergab einen K<sub>i</sub>-Wert von 17 µM, der mit der an der Zelllinie erhaltenen Affinitätskonstante von 23 µM gut übereinstimmt.

**Tab. 2: Strukturformeln von Biotin und Analoga, Pantothersäure und Liponsäure sowie ihre an HaCaT für die Hemmung der Aufnahme von [<sup>3</sup>H]Biotin ermittelten Affinitätskonstanten K<sub>i</sub>**

Verbindung	Strukturformel	K <sub>i</sub>
Biotin		10,7 ± 0,9 μM
Desthiobiotin		15,2 ± 2,5 μM
Biotinmethylester		>> 1 mM
Biocytin		>> 1 mM
Pantothersäure		1,1 ± 0,3 μM
Liponsäure		oxidierte Form: 4,6 ± 0,6 μM reduzierte Form: 11,4 ± 0,9 μM

Die Liponsäure kann in zwei unterschiedlichen Formen vorliegen. In der oxidierten Form besitzt die Substanz eine Disulfidgruppe und bildet einen fünfgliedrigen Heterocyclus. Bei Vorliegen der reduzierten Form ist die Disulfidbrücke gespalten und zu zwei Sulfhydrylgruppen umgewandelt. Die  $K_i$ -Werte der beiden Formen unterscheiden sich: Aufgrund der cyclischen Struktur besitzt die oxidierte Form eine höhere Affinität (Tabelle 2). Aus den ermittelten Konstanten ergibt sich folgende Rangfolge für die Affinität zum SMVT-System: Pantothensäure > oxidierte Liponsäure > Biotin = reduzierte Liponsäure > Desthiobiotin.

Anhand der Affinitätsbestimmungen lässt sich keine Aussage darüber treffen, welche Art von Hemmung eine Substanz hervorruft. Um den Hemmtyp von Pantothensäure zu bestimmen, wurde die Substratabhängigkeit der Biotinaufnahme ohne Pantothensäure und mit einer Konzentration von 2  $\mu\text{M}$  (nahe  $K_i$ ) untersucht. Die Auswertung der Ergebnisse folgte mittels Michaelis-Menten- und Eadie-Hofstee-Auftragung. Während der Vergleich der  $V_{\max}$ -Werte in Abwesenheit und in Anwesenheit von Pantothensäure keine signifikanten Unterschiede ergab, verdoppelte sich die Michaelis-Menten-Konstante in Anwesenheit des Inhibitors. In der Auftragung nach Eadie-Hofstee lässt sich dies daran erkennen, dass die erhaltenen Geraden für die Konzentrationsabhängigkeit des Systems in Abwesenheit und in Anwesenheit des Inhibitors unterschiedliche Anstiege aufwiesen und sich auf der y-Achse bzw. im 1. Quadranten schneiden (**Anlage 10.1**). Eine Erhöhung von  $K_t$  bei konstantem  $V_{\max}$ -Wert ist ein Charakteristikum für eine kompetitive Hemmung. Dabei bindet der Inhibitor (Pantothensäure) an die gleiche Bindungsstelle wie das Substrat (Biotin) und verhindert somit dessen Bindung und den anschließenden Transport.

Die Konzentration von Pantothensäure im menschlichen Plasma beträgt ungefähr 0,5-1  $\mu\text{M}$  (Rychlik, 2000). Der natriumabhängige Multivitamintransporter könnte aufgrund der ermittelten Affinitätskonstante von 1  $\mu\text{M}$  für Pantothensäure im menschlichen Organismus für die Aufnahme des B-Vitamins in die Keratinozyten verantwortlich sein. Biotin liegt im Körper in einer Konzentration von 0,2-2 nM (Jung et al., 1998) vor. Ein Transportsystem mit einer Affinitätskonstante von 23  $\mu\text{M}$  ist demzufolge unter physiologischen Bedingungen nicht dazu befähigt, Biotin zu transportieren. Der in der Literatur lange Zeit als Biotintransporter beschriebene SMVT scheint in humanen Keratinozyten (analog den Lymphozyten) nicht das Haupttransportsystem zur Aufnahme von Vitamin H zu sein (Prasad und Ganapathy, 2003). Da das Vitamin aber in der Haut eine wichtige Rolle spielt (Kapitel 3.1.1) muss es ein weiteres System zu seiner Aufnahme geben.

### 3.3 Transport von Biotin über ein hochaffines Transportsystem

Vgl. Anlage 10.1 (Grafe et al., 2003)

#### 3.3.1 Charakterisierung der hochaffinen Biotinaufnahme

Mardach et al. (2002) beschrieben einen dreijährigen Patienten, der eine hohe Biotinabhängigkeit zeigte, die weder auf einen Biotinidase- oder Holocarboxylasemangel noch auf eine zu geringe Biotinzufuhr mit der Nahrung zurückgeführt werden konnte, sondern auf einem Defekt im Transportsystem beruht. Bei einem Biotinentzug kam es zu einem intrazellulären Biotinmangel und zu einer abnormalen Azidurie trotz unveränderter Aktivität biotinabhängiger Carboxylasen in Lymphozyten und Fibroblasten. Die Aufnahme des Vitamins in die Blutzellen war signifikant reduziert. Bei dem Versuch, diesen heterozygot, autosomal rezessiven Gendefekt zu erklären, stellte sich heraus, dass die Transportrate von Pantothersäure und die SMVT-Gensequenz normal waren. Aufgrund dieser Befunde kann davon ausgegangen werden, dass der beobachtete Biotinmangel in den Zellen nicht durch einen Defekt des Multivitamintransporters, sondern durch ein anderes defektes Transportsystem hervorgerufen wurde.

Im Jahr 1998 veröffentlichten Zemleni und Mock ihre Ergebnisse zur Aufnahme von Biotin an humanen Lymphozyten (PBMC). In ihren Untersuchungen verwendeten sie eine Konzentration von ungefähr 0,5 nM [<sup>3</sup>H]Biotin, bei der sie einen Carrier-vermittelten Transport nachweisen konnten, der natriumabhängig ist und dessen Aktivität sich durch Temperaturerhöhung vergrößert. Bei der Bestimmung der Zeitabhängigkeit stellten sie fest, dass die Aufnahme von Biotin bis zu einer Inkubationszeit von 30 Minuten linear ist. Die Aufnahme von Biotin in Abhängigkeit von der Substratkonzentration ergab eine Sättigungskinetik. Nach der Transformation nach Lineweaver-Burk und anschließender linearer Regression erhielten sie eine Michaelis-Menten-Konstante  $K_t$  von 2,6 nM und eine Maximalgeschwindigkeit von 2,9 fmol/(30 min·10<sup>6</sup> Zellen). Diese sehr hohe Affinität des Transportsystems für Biotin und die Linearität der Aufnahme über einen Zeitraum von 30 Minuten widersprechen den in der Literatur an anderen Zelltypen ermittelten Ergebnissen für den natriumabhängigen Multivitamintransporter, der eine Affinitätskonstante im mikromolaren Bereich besitzt (Tabelle 1).

Die zur Untersuchung des SMVT an humanen Keratinozyten genutzte Konzentration von 6 nM [<sup>3</sup>H]Biotin ist aufgrund der an Lymphozyten für das hochaffine Biotintransportsystem beschriebenen Affinitätskonstante im unteren nanomolaren Bereich zu hoch. In einem Bereich von 1 bis 500 µM Biotin zur Untersuchung der kinetischen Parameter des SMVT (Kapitel

3.2.1) wäre das hochaffine zweite Transportsystem für das Vitamin schon gesättigt und könnte somit nicht nachgewiesen werden. Ausgehend davon wurde zum Nachweis des hochaffinen Carriers die [<sup>3</sup>H]Biotinkonzentration auf 0,5 bzw. 1 nM reduziert. Unter den veränderten Bedingungen standen als erstes die Zeit- und die Natriumabhängigkeit an der humanen Keratinozytenzelllinie HaCaT im Mittelpunkt der Untersuchungen. Im Gegensatz zu den Ergebnissen zum natriumabhängigen Multivitamintransporter erwies sich die Aufnahme des radioaktiv markierten Substrates bis zu einer Inkubationszeit von 30 Minuten als linear. Bei Substitution der Natrium-Ionen im Inkubationsmedium durch Cholin-Ionen kam es zur Reduzierung der aufgenommenen Biotinmenge auf ungefähr 16 % (**Anlage 10.1**). Die nachfolgende Versuchsreihe galt der Ermittlung der kinetischen Parameter  $V_{\max}$  und  $K_t$ . Dazu wurde die Konzentration des radioaktiv markierten Biotins im Bereich von 0,1 bis 10 nM variiert und anschließend die konzentrationsabhängige Aufnahme untersucht. Die Auftragung nach Michaelis-Menten und die nichtlineare Regression (Auswertung analog Kapitel 3.2.1) ergaben eine Michaelis-Menten-Konstante  $K_t$  von 2,6 nM und eine Maximalgeschwindigkeit  $V_{\max}$  von 63 fmol/(30 min·mg Protein) (**Anlage 10.1**). Die erhaltenen Ergebnisse korrelieren gut mit den in der Literatur an Lymphozyten beschriebenen (Zempleni und Mock, 1998) und erlauben die Schlussfolgerung, dass an Lymphozyten und an humanen Keratinozyten neben dem SMVT ein zweites hochaffines Transportsystem existiert (siehe auch Kapitel 3.3.2).

Die Arbeitsgruppe um Zempleni untersuchte kürzlich die Frage, ob der Monocarboxylattransporter MCT für den hochaffinen Transport von Biotin in humanen Lymphozyten (PBMC) verantwortlich ist (Daberkow et al., 2003). Dazu testeten sie die MCT-Substrate Laktat, Acetat, Pyruvat, Hexanoat, DL- $\beta$ -Hydroxybutyrat und  $\alpha$ -Ketoisocaprat auf ihren Einfluss. Die ausgesuchten Substanzen sowie die Inhibitoren des MCT Probenecid, Sulfinpyrazon, p-Chloromercuribenzensulfonsäure und 4,4'-Diisothiocyanostilben-2,2'-disulfonsäure hemmten die Biotinaufnahme in humane Lymphozyten. Des weiteren wurde die Expression verschiedener Monocarboxylattransporter in PBMC Zellen untersucht. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass Lymphozyten Gene exprimieren, die MCT1, MCT2 und MCT5 kodieren. Während nach der Expression von MCT1 in humanen T-Zellen die Aufnahme von Biotin zunahm, ließ sich nach Expression in humanen Plazenta- und Lungenzellen und in Prostatazellen der Ratte keine Veränderung feststellen. In der gleichen Studie wurde der Einfluss der Proliferation der Zellen auf den Transport von Laktat als ein Substrat des MCT untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass sich die Aufnahme im Verlauf der Proliferation erhöht (Daberkow et al., 2003). In einer früheren Studie konnte nachgewiesen

werden, dass es während der Proliferation der PBMC zu einer gesteigerten Aufnahme von Biotin als Ergebnis der erhöhten Anzahl an Transportproteinen auf der Zelloberfläche bei gleichbleibender Affinität kommt (Zempleni und Mock, 1999). Ausgehend von den angeführten Ergebnissen kann davon ausgegangen werden, dass MCT die Aufnahme von Biotin in humane Lymphozyten vermittelt. Eine Mutation des MCT1-Gens könnte für einen angeborenen defekten Biotintransport, wie er durch Mardach et al. (2002) beschrieben wurde, verantwortlich sein.

### 3.3.2 Bestimmung der Substratspezifität des hochaffinen Biotintransportes

Die Substratspezifität des zweiten, hochaffinen Biotintransportsystems unterscheidet sich stark von der des Multivitamintransporters (siehe auch Kapitel 3.2.2). Zempleni und Mock (1998) stellten fest, dass die Aufnahme von [<sup>3</sup>H]Biotin in PBMC Zellen sich nur durch unmarkiertes Biotin, Desthiobiotin und Biocytin hemmen ließ. Andere strukturverwandte Substanzen sowie die Liponsäure hatten keinen Einfluss auf den Transport.

An der humanen Keratinozytenzelllinie HaCaT wurde untersucht, ob und in welchem Maße unmarkiertes Biotin, Pantothenensäure und Liponsäure in einer Konzentration von jeweils 20 nM die Aufnahme des radioaktiven Substrates zu reduzieren vermögen. Während unmarkiertes Biotin den Transport von 1 nM [<sup>3</sup>H]Biotin hemmen konnte, hatten Pantothenensäure und Liponsäure keinen Einfluss. Die Bestimmung der Affinität wurde in einem weiteren Versuch durchgeführt. Mit Hilfe der Verdrängung des radioaktiven Biotins konnte für das unmarkierte Biotin ein IC<sub>50</sub>-Wert von ungefähr 3 nM bestimmt werden (**Anlage 10.1**). Das System ist damit um einen Faktor von mehr als 1000 affiner als das SMVT-System. Dies erlaubt den effizienten Transport von Biotin im Körper bei physiologischen Konzentrationen von 0,2-2 nM (Jung et al., 1998). Der hochaffine Transport dürfte somit der Haupttransportweg sein.

Nach neuesten Erkenntnissen ist in den humanen Lymphozyten der Monocarboxylattransporter 1 für den hochaffinen Transport von Biotin verantwortlich (Daberkow et al., 2003). Die im Rahmen dieser Arbeit an Keratinozyten erhaltenen Ergebnisse sind mit denen an PBMC ermittelten vergleichbar (Zempleni und Mock, 1998) und erlauben die Schlussfolgerung, dass MCT1 auch in Keratinozyten exprimiert wird und damit für den Transport von Biotin aus dem Blut in die Keratinozyten verantwortlich sein sollte.

## 4 Transport von Taurin

### 4.1 Allgemeine Aspekte zu Taurin

Im Jahre 1827 wurde aus der Galle eines Ochsen (*Bos taurus*) eine bis dahin unbekannte Aminosäure isoliert, die später Taurin genannt wurde. Taurin (2-Aminoethansulfonsäure) ist eine  $\beta$ -Aminosäure mit amphoterem Charakter (isoelektrischer Punkt I.P. = 5,12), die im Vergleich zu anderen Aminosäuren anstelle einer Carboxylfunktion eine Sulfonsäuregruppe besitzt. Sowohl diese Säuregruppierung ( $pK_a = 1,5$ ) als auch die basische Aminogruppe ( $pK_a = 8,74$ ) besitzen eine höhere Azidität als die analogen Gruppierungen anderer Aminosäuren. Im physiologischen pH-Bereich um 7,4 liegt Taurin aufgrund der hohen Azidität fast komplett zwitterionisch vor. Die hohe Wasserlöslichkeit und die niedrige Lipophilie des Taurins bedingen die sehr langsam Diffusion durch biologische Membranen (Übersicht bei Chesney, 1985; Huxtable, 1992; Wright et al., 1986).

Im Säugetierorganismus stellt Taurin einen ubiquitären Bestandteil in allen Zellen dar. Da die Sulfonsäuregruppe der Aminosäure keine Peptidbindung eingehen kann, ist Taurin nicht am Aufbau von Proteinen beteiligt und liegt im Körper nur in freier Form sowie zu einem viel geringeren Teil in Form von einfachen Peptiden vor. In den Körperflüssigkeiten, z.B. im Plasma, in der Zerebrospinalflüssigkeit und in der extrazellulären Flüssigkeit kommen Taurinkonzentrationen von ungefähr 10-100  $\mu\text{M}$  vor (Übersicht bei Chesney, 1985; Huxtable, 1992; Wright et al., 1986). Pitkänen et al. (2003) konnten im Blutserum von verschiedenen Patienten Konzentrationen im Bereich von 108-169  $\mu\text{M}$  bestimmen. Im Gegensatz zu diesen geringen extrazellulären Taurinkonzentrationen ist die intrazelluläre Konzentration in den Organen sehr viel höher. Die Gewebe mit den höchsten Taurinkonzentrationen sind die Retina, für die bis zu 80 mM Taurin gemessen wurden, das Herz, das Gehirn und die Muskulatur. Auch in Blutplättchen, erregbaren Geweben und sekretorischen Strukturen liegen hohe Taurinspiegel vor (Übersicht bei Chesney, 1985; Huxtable, 1992; Wright et al., 1986).

Eine Reduktion der Taurinkonzentration im Körper konnte nach Operationen, im Zustand der Sepsis oder des Traumas, bei Entzündungen, bei unterernährten Krebspatienten und bei der Epilepsie nachgewiesen werden (Chesney, 1985; O'Flaherty et al., 1997a; Redmond et al., 1998). Dieser Mangel führt zu verschiedenen klinischen Bildern: Entwicklungsstörungen, Zerstörung der Retina, Immundefizienz, Entwicklung einer Kardiomyopathie und Beeinträchtigung des Zellwachstums mit daraus resultierender Wachstumsretardierung (Birdsall, 1998; Chesney, 1985; Martensson et al., 1987; Roe, 1966; Satoh und Sperelakis, 1998; Zackheim, 1982). Durch Supplementation von Taurin in der Nahrung kann ein Schutz vor

Ischämie und Herzschwäche und ein therapeutischer Effekt bei bereits bestehenden kardiovaskulären Erkrankungen, bei Sepsis, akuter Hepatitis, Hypercholesterinämie, Epilepsie, Alzheimer und cystischer Fibrose erzielt werden (Barakat et al., 2002; Birdsall, 1998; Kandler, 1989; Satoh und Sperelakis, 1998; Zackheim, 1982).

**Tab. 3: Allgemeine Funktionen von Taurin**

<b>Funktion</b>	<b>Organ/Gewebe</b>	<b>Literatur</b>
Osmoregulation	Lunge, Niere, Gehirn, Haut	Alfieri et al., 2002; Beck et al., 1998; Brust et al., 1992; Chesney, 1985; Huxtable, 1992; Janeke et al., 2003; Oja und Saransaari, 1996; Solis et al., 1988; Thurston et al., 1980; Timbrell et al., 1995; Uchida et al., 1991
Bildung von Gallensalzen	Leber	Chesney, 1985; Huxtable, 1992; Oja und Saransaari, 1996
Membranstabilisierung	Retina, Herz, Muskeln, Lymphozyten	Chesney, 1985; Huxtable, 1992; Kandler, 1989; Lombardini, 1985; Oja und Saransaari, 1996; Redmond et al., 1998; Timbrell et al., 1995; Wright et al., 1986
Schutz vor Apoptose	Lunge	Alfieri et al., 2002
Neuromodulator/ -protektion/ -inhibitor/ -transmitter	Gehirn, Nervensystem	Barakat et al., 2002; Chesney, 1985; Kuriyama, 1980; Lin et al., 1985; Oja und Saransaari, 1996; Okamoto et al., 1983; Taber et al., 1986
Antioxidans	Spermien, Haut, Auge	Alvarez und Storey, 1983; Değim et al., 2002; Huxtable, 1992; Pasantes-Morales und Cruz, 1985; Redmond et al., 1998; Wright et al., 1986
Proteinstabilisierung		Arakawa und Timasheff, 1985
Calciummodulation	Retina, Herz, Haut, Lymphozyten	Chesney, 1985; Huxtable, 1992; Lobo et al., 2001; Lombardini, 1985, 1991; Redmond et al., 1998; Satoh und Sperelakis, 1998; Timbrell et al., 1995
Antikonvulsivum	Gehirn	Chesney, 1985; Huxtable, 1992
Schutz vor toxischen Stoffen/Entgiftung	Lunge, Leber	Gordon et al., 1986; Huxtable, 1992; Nakashima et al., 1982; Timbrell et al., 1995; Wright et al., 1986
Einfluss auf die Herzfrequenz/Kardioprotektion	Herz	Huxtable et al., 1980; Satoh, 1998
Thermoregulation	Gehirn	Frosini et al., 2003; Huxtable, 1992
Radioprotektion		Huxtable, 1992
Einfluss auf Zellproliferation		Kandler, 1989
Erhöhung der Wasserlöslichkeit/Bioverfügbarkeit von Lipiden	Retina, Blutplättchen	Petrosian und Haroutounian, 2000
Immunmodulation	Blut	Redmond et al., 1998

Taurin gilt als wichtigster organischer Osmolyt. Darüber hinaus wurden in den letzten Jahren weitere Funktionen postuliert und nachgewiesen. Eine Übersicht über die in der Literatur erwähnten und (noch) diskutierten Aufgaben ist in Tabelle 3 dargestellt.

Während die allgemeinen Funktionen und die Verteilung von Taurin bereits in vielen Geweben und Organen diskutiert und untersucht wurden, existieren nur wenige Arbeiten zu Taurin in der Haut. Die Arbeitsgruppe um Lobo untersuchte die Konzentration und die Verteilung von Taurin in den oberen Hautschichten der Ratte. Die Aminosäure konnte in den vaskulären Endothelzellen der Dermis nachgewiesen werden. Bei der Untersuchung der Epidermis stellte sich heraus, dass Taurin hauptsächlich in der Granularschicht und nur in zu einem geringen Teil im oberen Teil des Stratum spinosum vorhanden ist. In der Basalschicht, im unteren Stratum spinosum und im Stratum corneum konnte die Aminosäure nicht nachgewiesen werden. Nach Isolierung der verschiedenen Hautschichten und Bestimmung der Konzentration ließen sich die Aussagen konkretisieren. Während in den lebenden Schichten der Epidermis eine Konzentration von  $7,1 \pm 0,8 \mu\text{mol/g}$  Frischgewebe bestimmt wurde, betrug die des Stratum corneum nur  $< 0,073 \pm 0,05 \mu\text{mol/g}$  Frischgewebe. Des Weiteren konnte durch die Untersuchungen nachgewiesen werden, dass die Verteilung von Taurin in der Haut nicht konstant ist. Mit zunehmender Differenzierung kommt es zur Akkumulation der Aminosäure in den Keratinozyten. Bevor die Zellen die Hornschicht erreichen und im Anschluss daran von der Hautoberfläche abgeschilfert werden, kommt es zur Freisetzung des in den Zellen gespeicherten Taurins. Damit steht den Hautzellen neben der Aufnahme der Aminosäure aus dem Blut und der Biosynthese aus Cystein eine weitere Taurinquelle zur Verfügung (Lobo et al., 2001).

Die funktionelle Bedeutung von Taurin in der Haut ist noch nicht genau aufgeklärt. Es wird jedoch angenommen, dass die beschriebenen allgemeinen Funktionen der Aminosäure auch in den Hautzellen eine Relevanz besitzen. So könnte die calciummodulierende Wirkung des Taurins bei der Differenzierung der Keratinozyten eine wichtige Rolle spielen (Lobo et al., 2001). Die Bedeutung dieser Aminosäure bei der Apoptose konnte bereits nachgewiesen werden. Bei einer Erhöhung der extrazellulären Osmolarität kommt es zu einer Erhöhung der Taurinkonzentration in den Keratinozyten und damit zum Schutz der Zellen vor dem Zelltod (Janeke et al., 2003).

Neben den bereits genannten Effekten des Taurins stellt seine antioxidative Wirkung eine weitere wichtige Funktion in der Haut dar. Bereits in früheren Arbeiten konnte die Bedeutung von freien Radikalen bei der Wundheilung und bei der Schädigung des Kollagens

nachgewiesen werden (Foschi et al., 1988; Högstrom, 1987; White und Heckler, 1990). Değim et al. (2002) beschrieben den positiven Einfluss von topisch appliziertem Taurin auf die Wundheilung. Dabei kam es zur Reduktion der Peroxidation der Lipide, zu einer Abnahme der Konzentration von Malondialdehyd, einer Erhöhung der Hydroxyprolin-konzentration und daraus resultierend zu einer Verringerung der Kollagenschädigung (Değim et al., 2002; Gordon et al., 1986). Darüber hinaus bewirkt Taurin eine Membranstabilisierung und damit verbunden eine verminderte Ionen- und Wasserpermeabilität (Huxtable, 1992; Nakashima et al., 1982; Pasantés-Morales und Cruz, 1985).

Die Taurinspiegel im Organismus könnten in einem Zusammenhang mit einer sehr häufig auftretenden Hautkrankheit, der Psoriasis, stehen. Durch eine zu niedrige Aufnahme der Aminosäure aus der Nahrung (Zackheim, 1982) oder eine Taurintoleranz (Roe, 1966) könnte eine Erkrankung ausgelöst oder verschlimmert werden. Der genaue Mechanismus konnte indessen noch nicht hinreichend aufgeklärt werden und sollte in den nächsten Jahren noch weiter untersucht werden.

## 4.2 Charakterisierung des Taurintransportes

**Vgl. Anlage 10.2 (Grafe et al., 2004a)**

In der Literatur wurde bereits ein Taurintransportsystem in verschiedenen Geweben identifiziert und charakterisiert. So konnte gezeigt werden, dass ein Carrier-vermittelter Transport für Taurin in der Leber (Bucuvalas et al., 1987), in der Plazenta (Kulanthaivel et al., 1991; Miyamoto et al., 1988), im Darm (Übersicht bei O'Flaherty et al., 1997b), in der Retina (Leibach et al., 1993; Miyamoto et al., 1991), in der Niere (Jessen und Sheikh, 1991; Uchida et al., 1991), im Choroidplexus (Chung et al., 1994; Keep und Xiang, 1996), an der Blut-Hirn-Schranke (Tamai et al., 1995) und in Gliazellen (Barakat et al., 2002; Tchoumkeu-Nzouessa und Rebel, 1996) existiert. Der auch als TAUT bezeichnete Transporter wird in die Na<sup>+</sup>- und Cl<sup>-</sup>-abhängige Neurotransmitter-Transporter-Familie SLC6 eingeordnet (Chen et al., 2004).

Der Taurintransporter besitzt eine große Bedeutung bei der Osmoregulation im Körper. Es konnte nachgewiesen werden, dass es unter hyperosmotischen extrazellulären Bedingungen zu einer vermehrten Bildung der TAUT-mRNA kommt. Die darauf beruhende erhöhte Anzahl an Transportproteinen führt zu einer gesteigerten Aufnahme von Taurin in die Zelle. Im Gegensatz dazu kommt es bei Hypoosmolarität zu einer Verringerung der mRNA und zu einer schnellen Freisetzung von Taurin aus der Zelle (Chen et al., 2004; Warskulat et al., 1997).

Die ersten TAUT-Knock-out-Mäuse wurden im Jahre 2002 beschrieben. Bei diesen Mäusen war die Taurinkonzentration im Plasma, in der Niere, in der Leber, im Auge und in den Skelett- und Herzmuskeln stark erniedrigt. Es ließ sich feststellen, dass es dadurch zu einer reduzierten Fruchtbarkeit, einem stark erniedrigten Gewicht und einer retinalen Degeneration, ähnlich der Retinitis pigmentosa beim Menschen, kam (Heller-Stilb et al., 2002).

Ausgehend von der Bedeutung von Taurin und dem bereits durch verschiedene Arbeitsgruppen beschriebenen System, wurde in der vorliegenden Arbeit der Carrier-vermittelte Transport von Taurin an der Haut untersucht (**Anlage 10.2**). Janeke et al. (2003) gelang der Nachweis der Anwesenheit und Verteilung von TAUT in der Haut mittels Western-Blot Analyse und Immunofluoreszenz. Während sich diese Untersuchungen jedoch vor allem mit der Identifizierung des Proteins und dessen Aufgabe bei der Osmoregulation beschäftigen, konzentrierte sich die vorliegende Arbeit auf die funktionelle Charakterisierung.

Es konnte festgestellt werden, dass es in der humanen Keratinozytenzelllinie HaCaT und in nativen humanen epidermalen Keratinozyten zu einer  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Cl}^-$ -abhängigen Akkumulation des radioaktiv markierten Taurins gegen einen Konzentrationsgradienten kommt (**Anlage 10.2**). In Abwesenheit von  $\text{Na}^+$  und gleichzeitiger Anwesenheit von  $\text{Cl}^-$  wird die Aufnahme von [ $^3\text{H}$ ]Taurin auf ungefähr 2 % gesenkt. Zu einer Reduzierung der in die Zellen aufgenommenen [ $^3\text{H}$ ]Taurinkonzentration auf circa 5 % kommt es in der Abwesenheit von  $\text{Cl}^-$ -Ionen.

Auch in anderen Geweben und Organen konnte die  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Cl}^-$ -Abhängigkeit des Taurintransporters nachgewiesen werden. Dabei konnte festgestellt werden, dass die treibende Kraft jedoch nicht die einfache Anwesenheit der Ionen ist, sondern dass der Gradient zwischen ihrer intrazellulären und extrazellulären Konzentration entscheidend ist. Des Weiteren konnte in verschiedenen Arbeiten die Stöchiometrie des Transportsystems ermittelt werden. Ein Taurinmolekül wird mit einem Chlorid-Ion und 2-3 Natrium-Ionen in die Zelle transportiert. Daraus lässt sich schließen, dass es sich um einen elektrogenen, sekundär aktiven Cotransporter handelt (Miyamoto et al., 1989a; Tamai et al., 1995; Tchoumkeu-Nzouessa und Rebel, 1996). Für den Einfluss des pH-Wertes auf den Transport lassen sich in der Literatur keine oder nur sehr widersprüchliche Aussagen finden. Bei Untersuchungen an HaCaT Zellen konnte eine gewisse pH-Abhängigkeit festgestellt werden: Das Optimum lag bei pH-Werten zwischen 6,0 und 7,5. Bei einer Erhöhung des pH-Wertes nahm die aufgenommene Menge an [ $^3\text{H}$ ]Taurin ab (**Anlage 10.2**). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass eine gewisse Abhängigkeit des Transporters von der Protonenkonzentration der Untersuchungslösung existiert. Über den

gesamten gemessenen pH-Bereich von 6,0 bis 8,5 liegt die Sulfonsäuregruppe des Taurinmoleküls im dissoziierten Zustand vor. Im Gegensatz dazu ist der Dissoziationsgrad der Aminogruppe vom pH-Wert abhängig: Mit Zunahme des pH-Wertes verringert sich der protonierte Anteil.

Die Bestimmung der kinetischen Parameter erfolgte mittels Verdrängung des radioaktiv markierten Taurin durch unmarkiertes Taurin. Die erhaltenen Daten wurden in Form einer Michaelis-Menten Auftragung dargestellt und anschließend in die Eadie-Hofstee Auftragung transformiert (analog 3.2.1). Die in dieser Darstellung erhaltene Gerade lässt vermuten, dass es sich nur um ein Transportsystem für Taurin handelt (**Anlage 10.2**). Aus den ermittelten Daten lassen sich eine Affinitätskonstante  $K_t$  (Michaelis-Menten-Konstante) von  $5,1 \pm 0,2 \mu\text{M}$  und eine maximale Geschwindigkeit  $V_{\text{max}}$  von  $320,5 \pm 2,8 \text{ pmol}/(10 \text{ min} \cdot \text{mg Protein})$  ermitteln. Die ermittelte Michaelis-Menten-Konstante an HaCaT und auch die entsprechenden Werte an anderen Organen und Geweben liegen im mikromolaren Bereich (Tabelle 4). Daraus lässt sich schließen, dass es sich bei dem Taurintransporter um ein hochaffines System handelt.

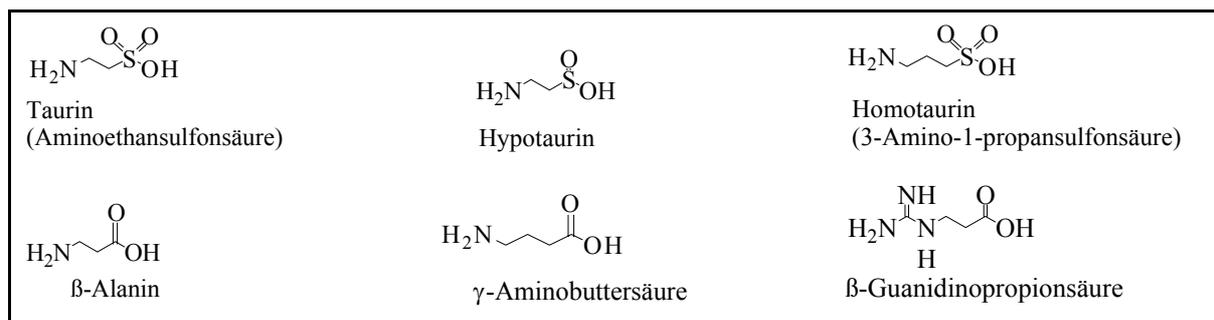
**Tab. 4: Kinetische Parameter ( $K_t$  und  $V_{max}$ ) des Taurintransportes bei verschiedenen Geweben und Spezies (\* $V_{max}$ -Werte der verschiedenen Untersuchungen sind aufgrund unterschiedlicher Versuchsbedingungen nicht vergleichbar)**

Zelltyp	$K_t$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{max}^*$	Literatur
Humane Keratinozytenzelllinie HaCaT	5,1	321 pmol/(10 min·mg Protein)	Grafe et al., 2004a (Anlage 10.2)
Basolaterale Membranvesikel der Rattenleber	174	1 nmol/(min·mg Protein)	Bucuvalas et al., 1987
Apikale Membranvesikel der humanen Plazenta	6,5	28 pmol/(15 s·mg Protein)	Miyamoto et al., 1988
Apikale Membranvesikel des Kaninchendünndarm	14	15 pmol/(15 s·mg Protein)	Miyamoto et al., 1989a
Apikale Membranvesikel des Retinapigmentepithels vom Rind	96	267 pmol/(15 s·mg Protein)	Miyamoto et al., 1991
Humane plazentale Choriokarzinomzelllinie JAR	2,3	89 pmol/ (3 min·mg Protein)	Kulanthaivel et al., 1991
MDCK-Zellen (apikal)	10	50 pmol/(min·mg Protein)	Uchida et al., 1991
MDCK-Zellen (basolateral)	56	933 pmol/(min·mg Protein)	Uchida et al., 1991
Humane Kolonkarzinomzelllinie HT-29	9,8	954 pmol/(10 min·mg Protein)	Brandsch et al., 1993
Choroidplexus vom Kaninchen	100	111 nmol/(15 min·mg Protein)	Chung et al., 1994
Primärkultur von Endothelzellen des Rinderhirns (BHS, apikal)	12	4,3 nmol/(30 min·mg Protein)	Tamai et al., 1995
Primärkultur von Endothelzellen des Rinderhirns (BHS, basolateral)	14	2,8 nmol/(30 min·mg Protein)	Tamai et al., 1995
Humane Kolonkarzinomzelllinie Caco-2	0,7	7,3 pmol/(10 min·mg Protein)	Brandsch et al., 1995

### 4.3 Untersuchungen zur Substratspezifität des Taurintransportes

Vgl. Anlage 10.2 (Grafe et al., 2004a)

Bei Studien zur Hemmbarkeit der [ $^3\text{H}$ ]Taurinaufnahme an der humanen Keratinozytenzelllinie und an nativen humanen Keratinozyten konnte festgestellt werden, dass das gefundene Transportsystem neben der Aminosäure Taurin auch strukturverwandte Substanzen (Abbildung 4) erkennt und transportiert.



**Abb. 4: Strukturformeln von Taurin und strukturverwandten Substanzen**

Im Anschluss an die Untersuchung der Substratspezifität fanden Versuche zur Bestimmung der Affinitäten von Hypotaurin, Taurin,  $\beta$ -Alanin,  $\beta$ -Guanidinopropionsäure und  $\gamma$ -Aminobuttersäure an der HaCaT Zelllinie statt (Methode siehe Kapitel 3.2.2). Für die untersuchten Stoffe ergibt sich folgende Rangfolge der Hemmung der Aufnahme von [ $^3\text{H}$ ]Taurin: Hypotaurin > Taurin >  $\beta$ -Alanin >  $\beta$ -Guanidinopropionsäure (GPA) >  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA). Die für die Substanzen ermittelten  $\text{IC}_{50}$ -Werte lagen im Bereich zwischen 4 und 300  $\mu\text{M}$  und sind in Tabelle 5 dargestellt. Bei der Affinitätsbestimmung von Taurin an NHEK Zellen konnte ein Wert von 3  $\mu\text{M}$  ermittelt werden, der dem an der Zelllinie bestimmten von 5  $\mu\text{M}$  nahe liegt.

**Tab. 5:  $\text{IC}_{50}$ -Werte verschiedener Verbindungen für die Hemmung der Aufnahme von [ $^3\text{H}$ ]Taurin an der humanen Keratinozytenzelllinie HaCaT**

Inhibitor	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )
Taurin	$5,0 \pm 0,2$
Hypotaurin	$4,0 \pm 0,2$
$\beta$ -Alanin	$26,3 \pm 2,3$
$\gamma$ -Aminobuttersäure	$299,4 \pm 16,5$
$\beta$ -Guanidinopropionsäure	$42,7 \pm 3,0$

Aus den erhaltenen Ergebnissen lässt sich erkennen, dass das System vor allem  $\beta$ -Aminosäuren akzeptiert. Die als Substrate charakterisierten Verbindungen weisen einen

unsubstituierten C-Terminus und N-Terminus auf. Die  $\beta$ -Guanidinopropionsäure stellt das Amidinoderivat einer  $\beta$ -Aminosäure dar (Abbildung 4), das vermutlich aufgrund der freien  $\text{NH}_2$ -Gruppe weiterhin (d.h. trotz Substitution des N-Terminus) als Substrat erkannt und transportiert wird. GABA stellt eine  $\gamma$ -Aminosäure dar, die ebenfalls eine, wenn auch geringere, Affinität besitzt. Bei der Untersuchung einer weiteren  $\gamma$ -Aminosäure ( $\gamma$ -Hydroxybuttersäure) und einer  $\alpha$ -Aminosäure ( $\alpha$ -Methylaminoisobuttersäure) ließ sich keine Hemmung des Taurintransportes erkennen. Für die Erkennung als Substrat für das Transportsystem scheint es des weiteren von Bedeutung zu sein, dass die Verbindungen einen amphoteren Charakter besitzen. Befinden sich zwischen der protonierbaren Aminogruppe und der deprotonierbaren Säuregruppierung zwei C-Atome, wird die Substanz mit einer hohen Affinität erkannt und transportiert. Wird das Rückgrat um ein C-Atom verlängert, wird die Substanz weiterhin transportiert, wenn auch mit einer geringeren Affinität (**Anlage 10.2**).

Weiterführende Untersuchungen zur Spezifität dienten der Klärung der Frage, ob andere Systeme in den Transport von Taurin involviert sind. Dazu wurden Serotonin, Leucin und Cholin ausgewählt. Für diese Substanzen sind spezifische Transportsysteme an anderen Zellen und Geweben beschrieben. Die gewählten Verbindungen wiesen bis auf Serotonin aber keine Hemmung auf. Der protonenabhängige Aminosäuretransporter PAT1 ist für die Aufnahme von Glycin, L-Prolin und L-Alanin im Darm verantwortlich. Bei Untersuchungen zur Aufnahme von L-Prolin über PAT1 in Caco-2 Zellen konnte festgestellt werden, dass sich die Aufnahme von L-[ $^3\text{H}$ ]Prolin durch unmarkiertes Taurin hemmen ließ (Metzner et al., 2004). Bei der Untersuchung des Transportes von [ $^3\text{H}$ ]Taurin in Gegenwart von unmarkiertem L-Prolin konnte im Gegensatz dazu keine Hemmung festgestellt werden.

Die Ergebnisse zur Substratspezifität erlauben die Schlussfolgerung, dass das in Keratinozyten gefundene Transportsystem spezifisch für Taurin, Hypotaurin,  $\beta$ -Alanin, GPA, GABA und 3-Amino-1-propansulfonsäure ist (**Anlage 10.2**).

In früher durchgeführten Studien wurden ähnliche Untersuchungen hinsichtlich Substratspezifität durchgeführt. So konnte in der Niere (Uchida et al., 1991), an Gliazellen (Barakat et al., 2002; Tchoumkeu-Nzouessa und Rebel, 1996), im Gehirn (Smith et al., 1992), im Darm (Moyer et al., 1988; Satsu et al., 1997), an Endothelzellen der Aorta (Qian et al., 2000), an retinalen Pigmentepithelzellen (Leibach et al., 1993), an der Blut-Hirn-Schranke (Tamai et al., 1995), am Herz (Huxtable et al., 1980), am Choroidplexus (Chung et al., 1994) und in der Plazenta (Kulanthavel et al., 1991) ebenfalls ein spezifisches, hochaffines Transportsystem für Taurin und Analoga nachgewiesen werden.

## 5 Transport von Clonidin

### 5.1 Allgemeine Aspekte zu Clonidin

Clonidin ist ein Imidazolin-Derivat, dessen Synthese erstmals im Jahre 1966 beschrieben wurde. Seit diesem Zeitpunkt werden seine Wirkungen auf den menschlichen Organismus untersucht und verschiedene Einsatzgebiete diskutiert (Übersicht bei Lowenthal et al., 1988). Aufgrund seiner hohen Lipophilie penetriert Clonidin nach Applikation rasch ins Gehirn und kann dort zentral wirksam werden. Die Erregung postsynaptischer  $\alpha_2$ -Adrenozeptoren im Zentralnervensystem (ZNS) unterdrückt sympathische Impulse im Vasomotorenzentrum und erniedrigt den Sympathikotonus. Die verminderte Sympathikusaktivität ist eine Voraussetzung für die zentrale antihypertonische und analgetische Wirksamkeit des Clonidins (Hayashi und Maze, 1993). Neben der Beeinflussung postsynaptischer Rezeptoren kommt es auch zu einer Stimulation zentraler präsynaptischer  $\alpha$ -Rezeptoren und damit zu einer Reduzierung der Sekretion des Neurotransmitters Noradrenalin (Hayashi und Maze, 1993; Hein, 2001). Eine Erniedrigung der Plasmakonzentration an Noradrenalin bewirkt eine Senkung der Herzfrequenz und des arteriellen Blutdruckes (Pluskwa et al., 1991).

Ausgehend von der blutdruckregulierenden Wirkung wird Clonidin zur Behandlung der Hypertonie, hypertensiver Krisen, akuter und chronischer Herzerkrankungen, akuter Myokardinfarkte oder hypertensiver Kardiomyopathie mit subklinischer diastolischer Dysfunktion eingesetzt (Gavras et al., 2001; Mansoor und Frishman, 2002). Die Beeinflussung der zentralen Regulation der Wachheit und Schmerzempfindung bedingt den Einsatz des Arzneistoffs als Prämedikation bei einer Anästhesie (De Kock et al., 1992; Hayashi und Maze, 1993; Segal et al., 1991) oder in der postoperativen Schmerztherapie (Bernard et al., 1991).

Aufgrund der bradykarden, vasokonstriktiven und antiarrhythmischen Wirkungen und der Förderung des koronaren Blutflusses gilt Clonidin darüber hinaus als therapeutische Option bei Belastungsangina und als Prävention vor myokardialer Ischämie (Hayashi und Maze, 1993; Heusch et al., 1985).

Weitere in der Literatur diskutierte Anwendungsgebiete von Clonidin sind die Therapie der sekretorischen Diarrhöe (Hayashi und Maze, 1993; McArthur et al., 1982), die Behandlung bronchoobstruktiver Erkrankungen (Lindgren et al., 1986), die Raucherentwöhnung (Kotlyar und Hatsukami, 2002), der Opiatentzug (Gowing et al., 2002), die Migränetherapie (Willems et al., 2003), die Schmerztherapie hyperalgetischer Patienten (Davis et al., 1991), die Therapie

von Hitzewallungen bei postmenopausalen Frauen (Laufer et al., 1982) und die anxiolytische Therapie von Patienten mit panischer Unruhe (Uhde et al., 1989).

## **5.2 Charakterisierung des Clonidintransportes**

**Vgl. Anlage 10.3 (Grafe et al., 2004b)**

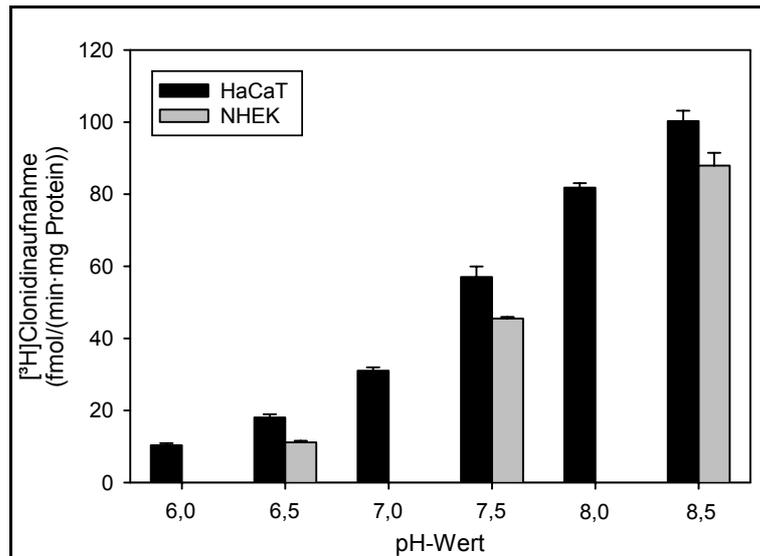
Neben der gebräuchlichen oralen Applikation des Clonidins steht seit ungefähr 20 Jahren auch ein Clonidin-haltiges transdermales therapeutisches System (TTS) zur Verfügung. Dieses transdermale System wird allein oder in Kombination mit Diuretika, Calciumantagonisten und ACE-Hemmern zur Bluthochdrucktherapie oder zur Therapie der Spastizität nach Rückenmarksverletzungen eingesetzt (Burris, 1993; Popli et al., 1983; Weingarden und Belen, 1992). Popli et al. (1983) verglichen in einer Studie die therapeutischen Effekte nach oraler und transdermaler Applikation. Sie konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Anwendungsformen hinsichtlich gemessenen Blutdruckwerten und Plasmaspiegeln feststellen. Die detektierten Konzentrationen bei der Therapie mit Clonidin lagen im Bereich von 0,32-1,40 ng/ml (Popli et al., 1983). Im Vergleich zur oralen Anwendung bietet Clonidin in Form eines TTS jedoch verschiedene Vorteile. Während die orale Arzneiform täglich eingenommen werden muss, reicht bei der transdermalen Anwendung die Applikation eines Pflasters einmal in der Woche. Dieses Therapieschema erhöht die Patientencompliance. Das Pflaster setzt kontinuierlich eine therapeutische Dosis frei und schützt die Patienten somit sicher vor Bluthochdruckkrisen. Die Plasmaspiegel erweisen sich als konstanter, so dass ein gleichmäßiger Schutz auch am Morgen gewährleistet ist (Arndts und Arndts, 1984; Langley und Heel, 1988). Des Weiteren kann mittels transdermaler Applikation der First-pass-Effekt in der Leber umgangen werden (Guy et al., 1987). Das Auftreten von zentralen Nebenwirkungen wie Mundtrockenheit und Sedierung war im Vergleich zur oralen Anwendung reduziert (Fillingim et al., 1989).

Als Nachteile wurden lokale Hautreizungen, Erytheme, Hautschuppungen, Blasenbildung, Entzündungen, Verhärtungen, allergische Kontaktdermatiden und Hyper- oder Depigmentationen beschrieben (Langley und Heel, 1988; Prisant, 2002).

Clonidin diffundiert aufgrund seiner hohen Lipophilie durch das Stratum corneum. Zwischen dieser obersten Hautschicht und dem Gefäßplexus befinden sich weitere Zellschichten, die vorwiegend aus Keratinozyten bestehen (siehe 2.1). Der Transport durch die lebende

Epidermis zu den Blutgefäßen stellt einen wichtigen Prozess der dermalen und transdermalen Arzneistoffapplikation dar, der im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht werden sollte. In den ersten Untersuchungen zum Transport von [<sup>3</sup>H]Clonidin an der humanen Keratinozytenzelllinie HaCaT ließ sich feststellen, dass die Aufnahme des radioaktiv markierten Substrates von der Inkubationszeit abhängig ist. Mit zunehmender Dauer erhöhte sich die aufgenommene Menge an [<sup>3</sup>H]Clonidin. Während bis zu einer Zeit von einer Minute die Erhöhung der intrazellulären Konzentration linear ist, lässt sich oberhalb dieses Zeitraumes ein Abflachen des Kurvenverlaufes beobachten. Diese Beobachtung könnte auf das Erreichen der maximalen Kapazität des Transportsystems zurückzuführen sein (**Anlage 10.3**). Bei der Untersuchung der Aufnahme in Anwesenheit und Abwesenheit von Na<sup>+</sup> im Inkubationsmedium konnte festgestellt werden, dass die Aufnahme von [<sup>3</sup>H]Clonidin Na<sup>+</sup>-unabhängig ist (**Anlage 10.3**). Im Gegensatz dazu veränderte sich die Aufnahme von [<sup>3</sup>H]Clonidin in Abhängigkeit vom pH-Wert des Untersuchungsmediums. Nach Erhöhung des pH-Wertes kam es zu einer gesteigerten Aufnahme an radioaktivem Clonidin. Bei einem pH-Wert von 6,0 konnte in den Zellen eine Clonidinkonzentration von  $10,4 \pm 0,6$  fmol/(min·mg Protein) bestimmt werden. Im Vergleich dazu lag die Konzentration in den Zellen bei einem pH-Wert von 8,5 etwa um den Faktor 10 höher und betrug  $100,3 \pm 2,9$  fmol/(min·mg Protein) (**Anlage 10.3**). An nativen Keratinozyten konnte dieses Phänomen ebenfalls beobachtet werden. Eine vergleichende Darstellung der pH-abhängigen Aufnahme von [<sup>3</sup>H]Clonidin an der humanen Keratinozytenzelllinie HaCaT und an nativen humanen epidermalen Keratinozyten erfolgt in der Abbildung 5.

Für die pH-abhängige Änderung der Transportrate von Clonidin lässt sich ein Zusammenspiel verschiedener Ursachen vermuten. Mit der Erhöhung des pH-Wertes nimmt der Anteil an unprotoniertem Clonidin ( $pK_a = 8,25$ ) zu. Während bei einem pH-Wert von 6,0 ungefähr 99 % in der protonierten Form vorliegen, sind es bei 8,5 nur noch 36 %. Aus dieser Verschiebung des Konzentrationsverhältnisses zugunsten der unprotonierten Form des Moleküls könnte eine erhöhte Diffusionsrate resultieren. Als weitere Ursache für die gesteigerte Aufnahme mit Erhöhung des pH-Wertes wäre eine modifizierte Aktivität des Transportsystems durch den veränderten pH-Wert denkbar. Eine dritte Möglichkeit ist eine Kopplung des Transportes von Clonidin in die Zelle an den Transport von Protonen aus der Zelle, d.h. das Vorhandensein eines Antiporters.



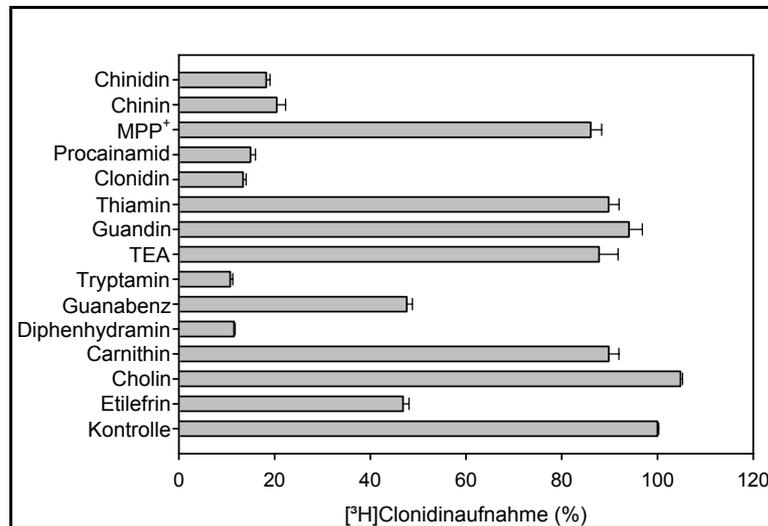
**Abb. 5: Aufnahme von  $[^3\text{H}]$ Clonidin bei verschiedenen pH-Werten in HaCaT Zellen und in native humane epidermale Keratinozyten (NHEK).** Die Aufnahme von  $[^3\text{H}]$ Clonidin (1 nM) wurde in Puffer mit NaCl gemessen. Die Inkubationszeit betrug 1 min. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  S.E.,  $n \geq 3$ .

Zur Ermittlung der kinetischen Parameter des Transportsystems wurde die Sättigungskinetik der Clonidinaufnahme an HaCaT Zellen bestimmt (analog 3.2.1). Die Aufnahme von radioaktiv markiertem Clonidin wurde in Gegenwart steigender Konzentrationen (3 nM bis 2,5 mM) an unmarkiertem Clonidin gemessen. Mittels nichtlinearer Regression ergibt sich eine Maximalgeschwindigkeit des Transportsystems ( $V_{\max}$ -Wert) von  $15,7 \pm 1,0$  nmol/(min·mg Protein) und eine Michaelis-Menten-Konstante ( $K_t$ ) von  $0,30 \pm 0,05$  mM (**Anlage 10.3**). Darüber hinaus wurden die Daten auch als Eadie-Hofstee-Plot aufgetragen ( $v$  gegen  $v/S$ ). Die erhaltenen Werte ergaben eine Gerade mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,9753. Das erlaubt die Schlussfolgerung, dass nur ein System für den Transport von Clonidin verantwortlich ist (**Anlage 10.3**). Auch aus der Eadie-Hofstee-Auftragung lassen sich die Maximalgeschwindigkeit ( $V_{\max}$ ) und die Michaelis-Menten-Konstante ( $K_t$ ) bestimmen. Die ermittelten Werte ( $V_{\max} = 18,2 \pm 1,4$  nmol/(min·mg Protein) und  $K_t = 0,40 \pm 0,05$  mM) entsprechen recht gut denen aus der Michaelis-Menten-Auftragung.

### 5.3 Untersuchungen zur Substratspezifität des Clonidintransportes

Vgl. Anlage 10.3 (Grafe et al., 2004b)

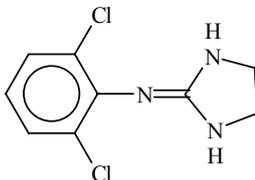
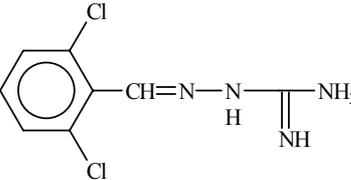
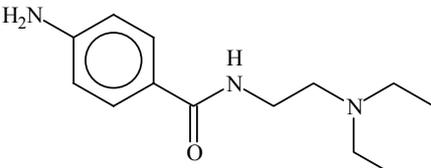
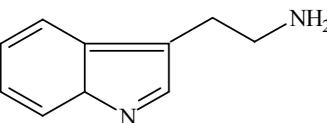
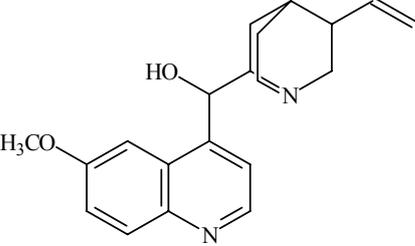
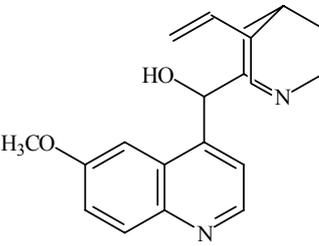
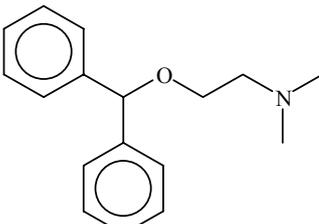
In diesem Teil der Arbeit wurde versucht, weitere Substrate neben dem untersuchten Clonidin zu finden, um das System genauer zu charakterisieren. Wiederum wurden Stoffe ausgewählt, die bekannt dafür sind, dass sie von anderen bereits beschriebenen Transportsystemen erkannt und transportiert werden oder eine dem Clonidin ähnliche Struktur aufweisen. Dabei wurden physiologische Substanzen, wie Cholin und Thiamin und pharmazeutisch relevante, wie Diphenhydramin und Chinin ausgesucht. Die mittels Verdrängung des radioaktiv markierten Clonidins erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 6 dargestellt.



**Abb. 6: Substratspezifität der Aufnahme von [<sup>3</sup>H]Clonidin in HaCaT Zellen.** Die Aufnahme von [<sup>3</sup>H]Clonidin (3 nM) wurde in Gegenwart verschiedener Substanzen (10 mM bzw. 0,1 mM bei Guanabenz) in Puffer mit NaCl und einem pH-Wert von 8,5 gemessen. Die Inkubationszeit betrug 1 min. Dargestellt sind die Mittelwerte ± S.E., n ≥ 4.

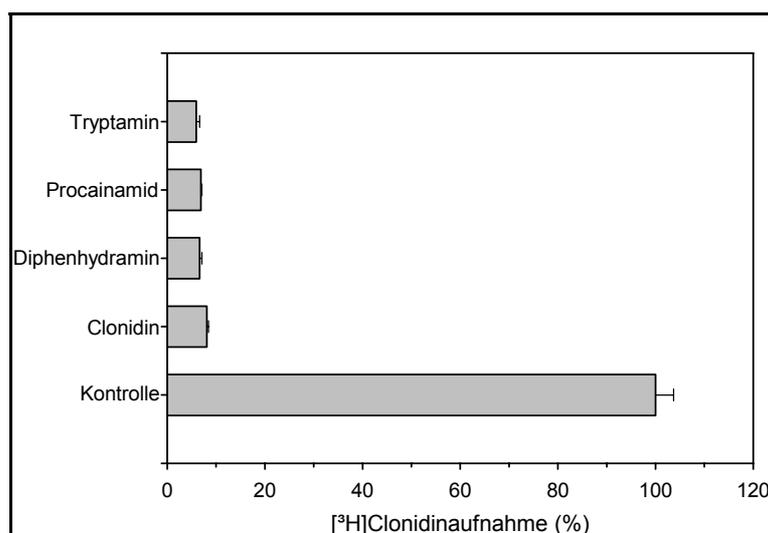
Es ist erkennbar, dass Cholin, Carnithin, TEA, Guanidin, Thiamin und MPP<sup>+</sup> keinen Einfluss auf die Aufnahme von [<sup>3</sup>H]Clonidin in HaCaT Zellen besitzen. Etilefrin hemmt die Aufnahme nur zu einem geringen Grad. Im Gegensatz dazu wird der Transport von [<sup>3</sup>H]Clonidin in die Zelle durch unmarkiertes Clonidin, Diphenhydramin, Guanabenz, Tryptamin, Procainamid, Chinin und Chinidin sehr stark gehemmt.

**Tab. 6: Strukturformeln, Wirkungsmechanismen und pharmazeutische Anwendungen verschiedener Inhibitoren der [<sup>3</sup>H]Clonidinaufnahme (nach Mutschler et al., 2001)**

Verbindung	Strukturformel	Wirkung/ Pharmazeutische Anwendung
Clonidin		zentral angreifender $\alpha_2$ -Adrenozeptor-Agonist/ Antihypertonikum (siehe auch 5.1)
Guanabenz		zentral angreifender $\alpha_2$ -Adrenozeptor-Agonist/ Antihypertonikum
Procainamid		Natriumkanalblocker/ Antiarrhythmikum
Tryptamin		Blutdrucksteigerung/ Naturstoff
Chinin		Blutschizontoid/ Prophylaxe und Therapie der Malaria
Chinidin		Natriumkanalblocker/ Antiarrhythmikum
Diphenhydramin		H <sub>1</sub> -Antihistaminikum/ Antiemetikum

In der Tabelle 6 sind die Strukturformeln und die Wirkungen bzw. pharmazeutischen Anwendungen der die [ $^3\text{H}$ ]Clonidinaufnahme beeinflussenden Substanzen zusammenfassend dargestellt. Ein Vergleich der Strukturen ergibt, dass die Substanzen entweder einen tertiären Stickstoff in Form einer N-Diethyl- oder N-Dimethylgruppierung (Procainamid, Diphenhydramin) oder ein N-Atom mit einer Doppelbindung zu dem benachbarten C-Atom (Clonidin, Guanabenz, Tryptamin, Chinin, Chinidin) aufweisen. Stoffe mit einem quartären Stickstoff, z.B. TEA,  $\text{MPP}^+$  oder Cholin, haben keinen Einfluss auf die spezifische Aufnahme von Clonidin.

Die Untersuchung der Substratspezifität wurde auch an nativen humanen epidermalen Keratinozyten durchgeführt. Dabei wurde das Spektrum der untersuchten Substanzen auf unmarkiertes Clonidin, Diphenhydramin, Procainamid und Tryptamin begrenzt. Die erhaltenen Ergebnisse sind in der Abbildung 7 dargestellt. Die erzielte Hemmung stimmt mit der an HaCaT Zellen erhaltenen überein und bestätigt somit die ermittelte Substratspezifität.



**Abb. 7: Substratspezifität der Aufnahme von [ $^3\text{H}$ ]Clonidin in native humane epidermale Keratinozyten (NHEK).** Die Aufnahme von [ $^3\text{H}$ ]Clonidin (3 nM) wurde in Gegenwart verschiedener Substanzen (10 mM) in Puffer mit NaCl und einem pH-Wert von 8,5 gemessen. Die Inkubationszeit betrug 1 min. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  S.E.,  $n \geq 3$ .

Des Weiteren wurde die Affinität der ermittelten Substrate an HaCaT Zellen bestimmt (analog Kapitel 3.2.2). Zunächst wurde in einem Versuch die Affinität von Clonidin und gleichzeitig der Diffusionsanteil des [ $^3\text{H}$ ]Clonidintransportes bestimmt. Letzterer beträgt 8 %. Im

Anschluss fand die Affinitätsbestimmung von Diphenhydramin, Guanabenz, Procainamid, Tryptamin, Chinin und Chinidin statt. Aus den ermittelten Werten wurden mittels nichtlinearer Regression unter Festlegung des Maximums (= 100 %) und des Minimums (= 10 %) die  $IC_{50}$ -Werte errechnet und in die entsprechenden Inhibitionskonstanten umgewandelt. Die ermittelten  $K_i$ -Werte lagen im Bereich von 0,08 bis 0,89 mM (**Anlage 10.3**). Aus den Werten lässt sich folgende Rangfolge der Hemmung erkennen: Guanabenz > Chinin = Chinidin > Diphenhydramin > Tryptamin = Clonidin > Procainamid.

Zur Bestimmung der Art der Hemmung der Inhibitoren wurden Diphenhydramin und Tryptamin beispielhaft ausgesucht und deren Effekt auf die kinetischen Parameter des Clonidintransportes ermittelt (analog 3.2.2). Bei der Transformation der erhaltenen Daten nach Eadie-Hofstee wurden für die Versuche mit und ohne Inhibitor Geraden erhalten, die sich nahe der y-Achse schneiden. Daraus lässt sich erkennen, dass durch die Anwesenheit von Diphenhydramin bzw. Tryptamin die Affinitätskonstante erhöht wurde und die Maximalgeschwindigkeit konstant blieb (**Anlage 10.3**). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass Clonidin, Diphenhydramin und Tryptamin vom gleichen Transportsystem transportiert werden.

In der Literatur lassen sich verschiedene Arbeiten finden, die sich mit dem Transport von Clonidin, Diphenhydramin, Tryptamin, Procainamid, Chinin und Chinidin und/oder deren Einfluss auf Transportsysteme beschäftigen. An verschiedenen Geweben wurden Systeme charakterisiert, die sich unter anderem hinsichtlich ihrer Substratspezifität unterscheiden. Eine Zusammenfassung der Eigenschaften der charakterisierten Systeme ist in Tabelle 7 dargestellt. Diese Auflistung erlaubt einen Vergleich mit dem von uns gefundenen System und lässt Ähnlichkeiten und Unterschiede zwischen den verschiedenen Systemen erkennen.

Das Transportsystem für Clonidin an humanen Keratinozyten akzeptiert keine quartären Amine wie TEA und  $MPP^+$ . Im Gegensatz dazu stellen diese beiden permanenten organischen Kationen Substrate des extraneuronalen Monoamintransporters (Martel und Azevedo, 2003), des organischen Kationen- $H^+$ -Austauschers (Ganapathy et al., 1988), des  $Na^+$ - $H^+$ -Austauschers (Balkovetz et al., 1986) und der organischen Kationentransporter (OCT1-3, OCTN1-2) dar. Ein weiterer Unterschied zu dem an humanen Keratinozyten beschriebenen Transportsystem ist die Affinität der organischen Kationentransporter zu Guanidin (OCT1-3) und Carnithin (OCTN1-2) (Dresser et al., 2001). Während Guanidin und Carnithin keinen Einfluss auf den Carrier-vermittelten Transport von Clonidin aufweisen, werden die Substanzen von den organischen Kationentransportern als Substrate erkannt und transportiert.

Guanidin ist des Weiteren als ein Substrat des organischen Kationen- $H^+$ -Antiporters (Ganapathy et al., 1988) und des Guanidin- $H^+$ -Antiporters (Miyamoto et al., 1989b) bekannt. Der Transport von Clonidin an humanen Keratinozyten könnte aufgrund der beobachteten pH-Abhängigkeit ebenfalls einen Antiporter darstellen. Die dargestellten Unterschiede in der Substratspezifität erlauben jedoch die Schlussfolgerung, dass die erwähnten Austauscher ebenso wenig am Transport von Clonidin an Keratinozyten beteiligt sind wie der extra-neuronale Monoamintransporter und die organischen Kationentransporter.

In einer früheren Arbeit konnte an humanen Keratinozyten ein System nachgewiesen werden, das für den Transport von Cholin verantwortlich ist (Hoffmann et al., 2002). Dieses System akzeptiert Diphenhydramin und, im Gegensatz zum Clonidintransporter, auch Guanidin und Thiamin. Während Clonidin die Aufnahme von Cholin in Keratinozyten hemmt, übt Cholin auf den Transport von Clonidin keinen Einfluss aus. Dieser Unterschied erlaubt den Schluss, dass es sich bei den Transportsystemen für Cholin und Clonidin um zwei verschiedene Systeme handelt.

Die Arbeitsgruppe um Mizuuchi untersuchte den Transport von Diphenhydramin und Procainamid am Darm von Mensch und Kaninchen. Sie fanden ein bisher molekularbiologisch nicht identifiziertes System, das sich von den Transportern für die organischen Kationen darin unterscheidet, dass es keine quartären Amine wie TEA und  $MPP^+$ , sondern nur tertiäre Amine wie Diphenhydramin und Procainamid akzeptiert. Auch Guanidin und Thiamin beeinflussten die Aufnahme der untersuchten Substrate nicht (Katsura et al., 2000; Mizuuchi et al., 1999, 2000a, 2000b). Der Transport von Clonidin an Keratinozyten weist die gleiche Substratspezifität auf. Neben dieser Gemeinsamkeit besitzen die beschriebenen Systeme eine weitere: Mit Erhöhung des extrazellulären pH-Wertes erhöht sich die Aufnahme des zu untersuchenden Substrates. Weitere Arbeitsgruppen um Goldberg, Han und Huwyler veröffentlichten Ergebnisse, die Ähnlichkeiten zu den Beobachtungen an humanen Keratinozyten und an Darmzellen aufweisen (Goldberg et al., 1987; Han et al., 2001; Huwyler et al., 1997). Es lässt sich vermuten, dass es sich bei allen beschriebenen Systemen um das gleiche Transportsystem handelt, das im Darm, im ZNS, in der Retina und in der Haut für die Aufnahme und den Transport von tertiären physiologischen Aminen und von Arzneistoffen wie Diphenhydramin, Procainamid und Clonidin verantwortlich ist.

**Tab. 7: Substratspezifität verschiedener bekannter Transportsysteme für Clonidin, Diphenhydramin, Tryptamin, Procainamid, Chinin und Chinidin u.a.**

Carrier	Organ (Spezies)	Substrate bzw. Inhibitoren	Substanzen mit geringem oder ohne Einfluss auf das System	Literatur
unbekannt	Haut (Mensch)	Clonidin, Diphenhydramin, Procainamid, Tryptamin, Chinin, Chinidin, Guanabenz	TEA, MPP <sup>+</sup> , Thiamin, Guanidin, Carnithin, Cholin	Grafe et al., 2004b <b>(Anlage 10.3)</b>
unbekannt	ZNS (Kaninchen, Ratte)	Diphenhydramin		Goldberg et al., 1987
unbekannt	Gehirn (Schwein)	Clonidin	Cholin	Huwlyer et al., 1997
unbekannt	Darm (Mensch)	Diphenhydramin	TEA, Cholin	Mizuuchi et al., 1999
H <sup>+</sup> -tertiäre Amine-Antiporter	Darm (Mensch)	Diphenhydramin, Procainamid	MPP <sup>+</sup> , TEA	Mizuuchi et al., 2000a
H <sup>+</sup> -tertiäre Amine-Antiporter	Darm (Mensch)	Diphenhydramin	TEA, Guanidin	Mizuuchi et al., 2000b
H <sup>+</sup> -tertiäre Amine-Antiporter	Darm (Kaninchen)	Procainamid	Guanidin, TEA, Thiamin, Diphenhydramin	Katsura et al., 2000
unbekannt	Retina (Mensch)	Verapamil, Chinidin, Diphenhydramin	Guanidin, TEA, Carnithin	Han et al., 2001
unbekannt	Haut (Mensch)	Cholin, Guanidin, Thiamin, Clonidin, Diphenhydramin	TEA	Hoffmann et al., 2002
extraneuronaler Monoamin-transporter		MPP <sup>+</sup> , Clonidin, TEA		Martel und Azevedo, 2003
Organischer Kationen-H <sup>+</sup> -Antiporter	Plazenta (Mensch)	Guanidin, Clonidin, TEA	Cholin	Ganapathy et al., 1988
Guanidin-H <sup>+</sup> -Antiporter	Niere (Kaninchen)	Guanidin, Clonidin	TEA, Cholin	Miyamoto et al., 1989b
OCT1	Niere, Leber, Darm, Gehirn (Mensch)	Cholin, Clonidin, Guanidin, MPP <sup>+</sup> , Procainamid, Chinin, Chinidin, TEA	Carnithin	Übersicht bei Dresser et al., 2001
OCT2	Niere, Leber, Darm, Gehirn (Mensch)	Cholin, Guanidin, MPP <sup>+</sup> , Procainamid, Chinin, Chinidin, TEA	Carnithin	Übersicht bei Dresser et al., 2001
OCT3	Niere, Leber, Darm, Gehirn (Mensch)	Cholin, Clonidin, Guanidin, MPP <sup>+</sup> , Procainamid, TEA	Carnithin, Chinin, Chinidin	Übersicht bei Dresser et al., 2001
OCTN1	Niere, Leber, Darm, Gehirn (Mensch)	Carnithin, MPP <sup>+</sup> , Procainamid, Chinin, Chinidin, TEA	Cholin, Clonidin, Guanidin	Übersicht bei Dresser et al., 2001
OCTN2	Niere, Leber, Darm, Gehirn (Mensch)	Carnithin, Cholin, Clonidin, MPP <sup>+</sup> , Procainamid, Chinin, Chinidin, TEA	Guanidin	Übersicht bei Dresser et al., 2001
Na <sup>+</sup> -H <sup>+</sup> -Austauscher	Plazenta (Mensch)	TEA	Cholin	Balkovetz et al., 1986

## 6 Transport von Cholin

### 6.1 Allgemeine Aspekte zu Cholin

Cholin stellt ein quartäres Amin dar, das frei oder in Form von Lecithin oder Sphingomyelin in der Natur in vielen Pflanzen, tierischen Organen und Geweben vorkommt (Canty und Zeisel, 1994).

Der Mensch besitzt nur eine begrenzte Kapazität zur Eigensynthese, so dass Cholin ein partielles Vitamin darstellt, dessen Aufnahme mehr als 7 – 10 mmol pro Tag beträgt (Zeisel, 2000; Zeisel und Blusztajn, 1994). Im Plasma des venösen Blutes liegen nur  $8,4 \pm 3,1 \mu\text{M}$  in freier Form vor. Im Gegensatz dazu ist die Konzentration des an Phospholipide gebundenen Anteils eine Größenordnung höher:  $2,6 \pm 0,6 \text{ mM}$  (Buchman et al., 2001). Im menschlichen Gehirn wurden, bedingt durch die Synthese von Cholin in den Neuronen, höhere Level als im Plasma gefunden. Aufgrund der aus der Nahrung in den Blutkreislauf aufgenommenen Menge und des Transportes durch die Blut-Hirn-Schranke (siehe Kapitel 6.2) hängen die Konzentrationen im Plasma und im Gehirn jedoch eng zusammen (Blusztajn und Wurtman, 1983).

Im menschlichen Organismus wird Cholin zur Synthese verschiedener Moleküle benötigt, die von physiologischer Bedeutung sind. Die Metabolite sind wichtig als renale Osmolyte (Betain, Glycerophosphocholin), für die strukturelle Integrität der Zellmembranen (Phosphatidylcholin = Lecithin, Sphingomyelin), die Übertragung von Methylgruppen im Stoffwechsel (Betain), die cholinerge Neurotransmission (Acetylcholin), die Signaltransduktion (Lysophosphatidylcholin, Lysosphingomyelin) und für den Transport und den Metabolismus von Cholesterol (Phosphatidylcholin) (Canty und Zeisel, 1994; Zeisel, 1992; Zeisel und Blusztajn, 1994). Der Plättchenaktivierende Faktor (PAF) stellt ein weiteres wichtiges Metabolisierungsprodukt dar, das u.a. in Leukozyten, Makrophagen und Endothelzellen gebildet wird und als Hormon bei allergischen Reaktionen eine Rolle spielt (Zeisel und Blusztajn, 1994).

Darüber hinaus spielt Cholin eine wichtige Rolle für die Entwicklung und Funktion des Gehirns. Die Konzentration desamins ist vor allem in der zweiten Hälfte der fetalen Entwicklung für die Bildung des cholinergen Systems im Hippokampus und damit für die spatiale und temporale Gedächtnisfunktion von wesentlicher Bedeutung (Cermak et al., 1998; Zeisel, 1992; Zeisel und Blusztajn, 1994).

Ein Cholinmangel konnte bei Patienten mit verschiedenen Leberfunktionsstörungen und unter parenteraler Ernährung nachgewiesen werden und führt zu Nieren- und Leberdysfunktionen,

Unfruchtbarkeit, Wachstumsbeeinträchtigungen, Bluthochdruck und zu einer Verschlechterung der Gedächtnisleistung (Buchman et al., 2001; Canty und Zeisel, 1994; Cermak et al., 1998; Zeisel und Blusztajn, 1994).

Die Demenz vom Alzheimer-Typ stellt eine wichtige Erkrankung dar, bei der ebenfalls erniedrigte CholinKonzentrationen im Körper gemessen wurden. Bei dieser Krankheit kommt es zur Degeneration der cholinergen Neuronen, so dass das Vitamin nicht in ausreichenden Konzentrationen synthetisiert werden kann und die Produktion von Acetylcholin und die Lecithinsynthese verringert sind (Canty und Zeisel, 1994).

Neben der Beeinflussung allgemeiner Funktionen wurde auch die Bedeutung des Vitamins in Zellen der Haut untersucht. Während die Supplementation auf dermale Fibroblasten und epidermale Melanozyten keinen Einfluss zu haben scheint, besitzen Keratinozyten einen hohen Bedarf an Cholin. Eine Konzentration von 36 – 180  $\mu\text{M}$  im Medium von kultivierten Zellen erwies sich als Optimum und führte zu einer Verbesserung von Wachstum und Morphologie (Gordon et al., 1988). Humane Keratinozyten synthetisieren und speichern ACh, scheiden es aus und bauen es ab, so dass sich in den Zellen die Aktivität der Cholinacetyltransferase und der Acetylcholinesterase nachweisen ließ. Acetylcholin stellt in der Epidermis vermutlich einen regulatorischen autokrinen/parakrinen Mediator dar (Grando, 1997; Grando et al., 1993). Des weiteren reguliert ACh in der Haut die Schweißdrüsensekretion (Grant et al., 1991), die Pigmentation (Iyengar, 1989), den Blutfluss (Stephenson und Kolka, 1990), die vaskuläre Permeabilität (Aggarwal et al., 1986) und die Aktivität der Mastzellen (Masini et al., 1985). Aufgrund der Bedeutung des cholinergen Systems könnte es bei einer Veränderung des Acetylcholinmetabolismus zu verschiedenen Hauterkrankungen, z.B. atopischer Dermatitis oder Urtikaria, kommen (Grando et al., 1993).

## **6.2 Charakterisierung und Spezifität des Cholintransportes**

**Vgl. Anlage 10.4 (Hoffmann et al., 2002)**

Das mit der Nahrung zugeführte Cholin gelangt über den Magen-Darm-Trakt in den Blutkreislauf und wird so im menschlichen Organismus verteilt. Die Aufnahme aus dem Extrazellulärraum in den Intrazellulärraum der Gewebe und Organe kann über verschiedene Membrantransportsysteme erfolgen.

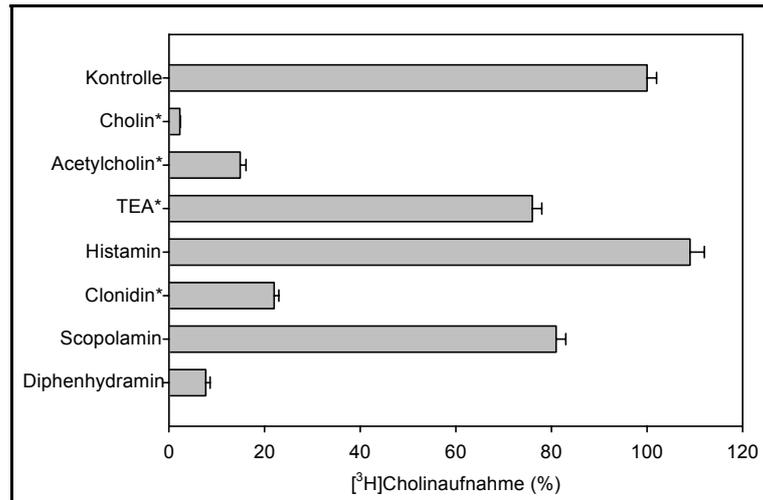
In den letzten 20 Jahren wurde der Mechanismus des Transportes von Cholin an der Plazenta (Eaton und Sooranna, 1998; Grassl, 1994; Sweiry und Yudilevich, 1985; van der Aa et al., 1994), an der Niere (Bevan und Kinne, 1990; Grunewald et al., 1997), am Darm (Saitoh et al.,

1992) und am Gehirn (Allen und Smith, 2001; Friedrich et al., 2001; Sawada et al., 1999; Villalobos et al., 1999) untersucht. In diesen Geweben konnte ein hochaffines, spezifisches Transportsystem nachgewiesen werden, das neben Cholin vor allem seine Derivate Hemi-cholin-3 und Acetylcholin akzeptiert.

An humanen Fibroblasten der menschlichen Haut wurde ebenfalls ein hochaffines Aufnahmesystem für Cholin entdeckt und beschrieben (Maltese und Doucette, 1988). Nachdem die Bedeutung des Amins an humanen Keratinozyten nachgewiesen werden konnte (siehe Kapitel 6.1; Grando, 1997; Grando et al., 1993), stellte sich die Frage, ob auch diese Hautzellen ein Transportsystem für Cholin besitzen. Die Arbeitsgruppe um Haberberger und Pfeil konnte mit Hilfe der RT-PCR (Reverse Transkription-Polymerase-Ketten-Reaktion) die mRNA des hochaffinen Cholintransporters CHT1 in der humanen Keratinozytenzelllinie HaCaT nachweisen. Des Weiteren gelang durch ein polyklonales Antiserum der Nachweis des CHT1-Proteins in der Zelllinie (Haberberger et al., 2002; Pfeil et al., 2003). Zeitgleich zu diesen Studien charakterisierte Kathrin Hoffmann den Carrier-vermittelten Transport von Cholin in humane Keratinozyten auf funktioneller Ebene. Die Aufnahme von [<sup>3</sup>H]Cholin in HaCaT Zellen konnte durch die Anwesenheit von Na<sup>+</sup> im Medium leicht und durch die Verschiebung des pH-Wertes von 5,5 auf 7,5 stark erhöht werden. Mit Hilfe der konzentrationsabhängigen Aufnahme konnten die Sättigbarkeit nachgewiesen und die kinetischen Parameter Michaelis-Menten-Konstante (15 µM) und Maximalgeschwindigkeit (1 nmol/(10 min·mg Protein)) bestimmt werden (**Anlage 10.4**; Hoffmann et al., 2002).

Aufbauend auf den Untersuchungen von K. Hoffmann fanden im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit weitere Studien zur Substratspezifität des gefundenen hochaffinen Transportsystems für Cholin an HaCaT und NHEK Zellen statt. In der Abbildung 8 sind die Ergebnisse schematisch dargestellt.

Die Aufnahme von [<sup>3</sup>H]Cholin in humane Keratinozyten ist in Gegenwart von unmarkiertem Cholin, Acetylcholin, Clonidin bzw. Diphenhydramin auf 2-15 % reduziert. Das Transportsystem scheint demzufolge in der Lage zu sein, tertiäre und quartäre Amine als Substrate zu erkennen und zu transportieren. Im Gegensatz zu diesem System für Cholin akzeptiert der Clonidintransporter nur tertiäre Amine: Die Aufnahme von Clonidin in humane Keratinozyten ließ sich durch Diphenhydramin, nicht jedoch durch Cholin hemmen (Kapitel 5.3). Diese unterschiedlichen strukturellen Anforderungen erlauben die Schlussfolgerung, dass es sich bei den Transportsystemen für Cholin und Clonidin um zwei verschiedene Carrier handelt.

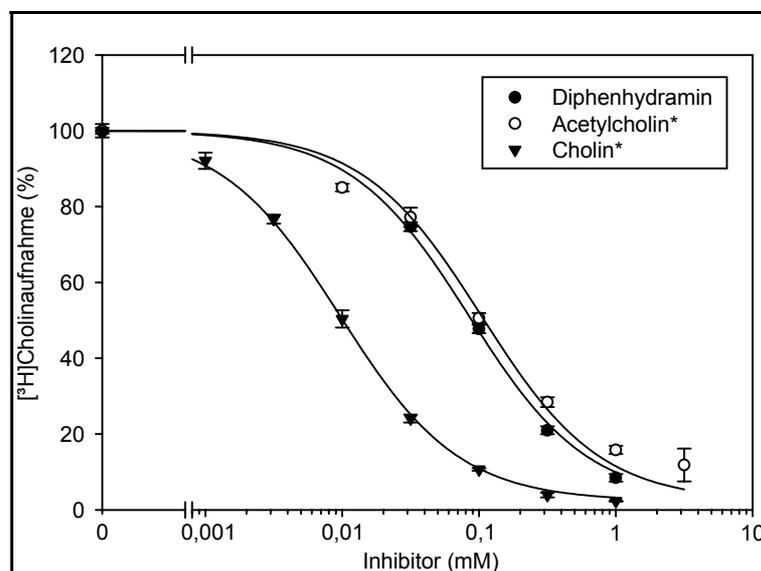


**Abb. 8: Substratspezifität der Aufnahme von [<sup>3</sup>H]Cholin in HaCaT Zellen.** Die Aufnahme von [<sup>3</sup>H]Cholin (3 nM) wurde in Gegenwart verschiedener Substanzen (1 mM) in einem Puffer mit NaCl und einem pH-Wert von 7,5 gemessen. Die Inkubationszeit betrug 10 min. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  S.E.,  $n \geq 4$ . (Zum Vergleich wurden die Ergebnisse für Cholin, Acetylcholin, TEA und Clonidin (\*) der Promotionsarbeit von K. Hoffmann entnommen.)

Als weitere Inhibitoren erwiesen sich Hemicholin-3, Guanidin und Thiamin (Promotionsarbeit K. Hoffmann; **Anlage 10.4**; Hoffmann et al., 2002). In Anwesenheit von Scopolamin oder Histamin konnte hingegen nur eine schwache bzw. keine Abnahme der aufgenommenen Menge festgestellt werden (Abbildung 8). Anhand dieser Beobachtungen lässt sich erkennen, dass neben dem Vorhandensein eines tertiären oder quartären Amins weitere Strukturmerkmale von Bedeutung sind. So scheinen z.B. die Art und der Abstand der Heteroatome einen Einfluss auf die Affinität des Moleküls zum Transportsystem zu besitzen. Genaue Aussagen zu den strukturellen Anforderungen lassen sich jedoch aufgrund der begrenzten Anzahl der untersuchten Substanzen nicht treffen.

Als organisches Kation stellt Cholin ein Substrat der organischen Kationentransporter dar. Diese Familie wurde in den letzten Jahren intensiv untersucht und besteht aus OCT1-3 (Gründemann et al., 1994; Übersicht bei Burckhardt und Wolff, 2000; Dresser et al., 2001), und aus OCTN1-2 (Übersicht bei Dresser et al., 2001). TEA ist ein permanentes organisches Kation, das als Standardsubstrat für die Familie der organischen Kationentransporter gilt (Dresser et al., 2001). In den an den Keratinozyten durchgeführten Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass TEA nur ein schwacher Inhibitor der Aufnahme von [<sup>3</sup>H]Cholin ist.

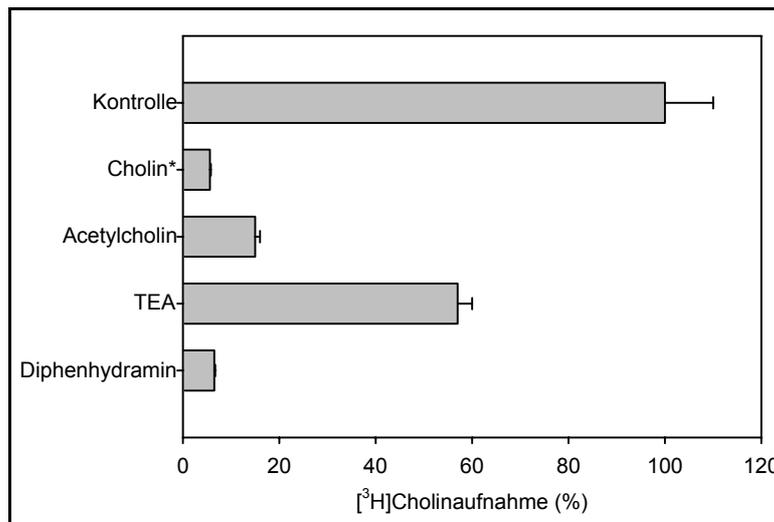
Ausgehend von dieser Beobachtung lässt sich vermuten, dass der hochaffine Transport von Cholin in humane Keratinozyten über ein System erfolgt, das nicht zur Familie der organischen Kationentransporter gehört. Friedrich et al. (2001) konnten nachweisen, dass TEA auch auf die Cholinaufnahme in Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke der Ratte keinen Einfluss besitzt. Insgesamt war die Substratspezifität an diesen Zellen der von humanen Keratinozyten sehr ähnlich. Die Keratinozyten und die Endothelzellen scheinen demzufolge ein identisches oder zumindest ähnliches Carrier-System für Cholin zu besitzen. Zur Bestimmung der Affinitäten ausgewählter Substanzen fanden an der HaCaT Zelllinie Kompetitionsstudien (analog 3.2.2) statt (Abbildung 9).



**Abb. 9: Bestimmung der  $IC_{50}$ -Werte für Inhibitoren der Aufnahme von  $[^3H]$ Cholin in HaCaT Zellen.** Die Aufnahme von  $[^3H]$ Cholin (3 nM) wurde in Gegenwart steigender Konzentrationen der Substanzen in einem Puffer mit NaCl und einem pH-Wert von 7,5 gemessen. Die Inkubationszeit betrug 10 min. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  S.E.,  $n \geq 4$ . (Zum Vergleich wurden die Ergebnisse für Cholin und Acetylcholin (\*) der Promotionsarbeit von K. Hoffmann entnommen.)

Ausgehend von den in Form einer halblogarithmischen Kurve dargestellten Werten konnten für Cholin ein  $IC_{50}$ -Wert von 10  $\mu$ M, für Diphenhydramin 85  $\mu$ M und für Acetylcholin 104  $\mu$ M ermittelt werden (**Anlage 10.4**; Hoffmann et al., 2002). Aus den Ergebnissen der Experimente zur Substratspezifität und denen zur Affinitätsbestimmung ergibt sich für die Hemmung des Transportes von radioaktiv markiertem Cholin an HaCaT Zellen folgende Reihenfolge: Cholin > Diphenhydramin > Acetylcholin.

Bei der Untersuchung der Substratspezifität an nativen humanen epidermalen Keratinozyten in der Primärkultur konnte festgestellt werden, dass auch in den nativen Zellen ein Transportsystem für Cholin exprimiert wird. Die Aufnahme von [<sup>3</sup>H]Cholin wurde durch unmarkiertes Cholin, Acetylcholin und Diphenhydramin stark und durch TEA nur zu einem geringen Teil gehemmt (Abbildung 10, **Anlage 10.4**; Hoffmann et al., 2002). Im Anschluss an diese Untersuchung wurde die Affinitätskonstante von Cholin an NHEK Zellen bestimmt: Sie beträgt  $13 \pm 1 \mu\text{M}$  (**Anlage 10.4**; Hoffmann et al., 2002).



**Abb. 10: Substratspezifität der Aufnahme von [<sup>3</sup>H]Cholin in native humane epidermale Keratinozyten (NHEK).** Die Aufnahme von [<sup>3</sup>H]Cholin wurde in Gegenwart verschiedener Substanzen (1 mM) in einem Puffer mit NaCl und einem pH-Wert von 7,5 gemessen. Die Inkubationszeit betrug 10 min. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  S.E.,  $n \geq 4$ . (Zum Vergleich wurde der Wert für Cholin (\*) der Promotionsarbeit von K. Hoffmann entnommen.)

Die an den nativen Keratinozyten durchgeführten Studien lieferten Ergebnisse, die gut mit den an der Zelllinie HaCaT erhaltenen korrelieren und erlauben die Schlussfolgerung, dass in beiden Kulturen das gleiche hochaffine Transportsystem für Cholin exprimiert wird.

Bei einer Plasmakonzentration des freien Cholin von  $8 \mu\text{M}$  (Buchman et al., 2001) und einer für die Keratinozyten optimalen Konzentration des Amins von  $36 - 180 \mu\text{M}$  (Gordon et al., 1988), besitzt das System mit einer Affinitätskonstante von  $15 \mu\text{M}$  physiologische Bedeutung für die Versorgung der Keratinozyten der menschlichen Haut mit dem Vitamin Cholin.

## 7 Transport weiterer Substanzen

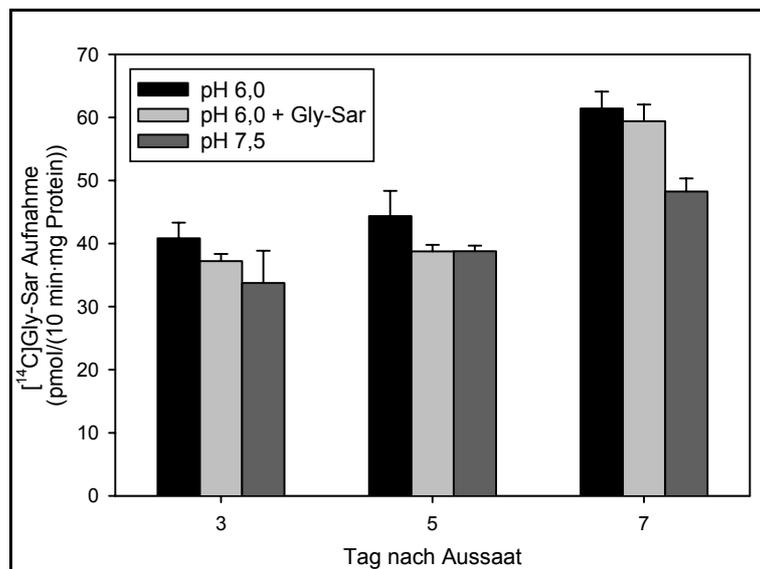
### 7.1 Transport von Dipeptiden

In der Literatur lassen sich zahlreiche Studien über den Transport von Peptiden an menschlichen Geweben finden. Die beschriebenen Peptidtransportsysteme gehören zur SLC15-Superfamilie der Protonen-Oligopeptid-Transporter (Übersicht bei Daniel und Kottra, 2004; Meredith und Boyd, 2000). Der Peptidtransporter 1 (PEPT1) und der Peptidtransporter 2 (PEPT2) sind die am besten untersuchten Systeme der Familie (Übersicht bei Leibach und Ganapathy, 1996; Meredith und Boyd, 2000). Die beiden Transporter unterscheiden sich hinsichtlich ihres Expressionsmusters, ihrer Substrataffinitäten und ihrer Transportkapazität. PEPT1 ist ein niedrigaffines System mit hoher Kapazität, das hauptsächlich in den Zellen des Dünndarms, des vorderen Bereichs des proximalen Tubulus der Niere (Pars convoluta) und des Gallengangs exprimiert wird (Übersicht bei Adibi, 1997; Meredith und Boyd, 2000). Im Gegensatz dazu stellt PEPT2 einen hochaffinen Transporter dar, der jedoch eine niedrigere Kapazität besitzt. PEPT2 konnte hauptsächlich in den Zellen des hinteren Bereiches des proximalen Tubulus der Niere (Pars recta), aber auch in denen der Lunge und des Zentralnervensystems nachgewiesen werden (Ramamoorthy et al., 1995; Übersicht bei Meredith und Boyd, 2000). Anhand des Expressionsmusters der Peptidtransporter lässt sich feststellen, dass diese neben der Aufnahme von Nahrungspeptiden auch für die Verteilung der Peptide im Organismus und deren Reabsorption in der Niere verantwortlich sind (Übersicht bei Meredith und Boyd, 2000).

Die Peptidtransporter stellen Cotransporter dar, die extrazelluläre Protonen mit dem Substrat, d.h. dem Di- oder Tripeptid, in die Zelle transportieren (Übersicht bei Leibach und Ganapathy, 1996; Meredith und Boyd, 2000). Neben der Aufnahme von Peptiden besitzen die Peptidtransporter auch pharmazeutische Relevanz. Antibiotika wie die Penicilline und Cephalosporine, Angiotensin-Konversionsenzym-Hemmer (ACE-Hemmer), Renininhibitoren, Bestatin und die  $\delta$ -Aminolävulinsäure stellen ebenfalls Substrate für PEPT1 und PEPT2 dar (Übersicht bei Inui et al., 2000; Meredith und Boyd, 2000; Yang et al., 1999).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit stellte sich die Frage, ob es auch an humanen Keratinozyten ein spezifisches System für die Aufnahme von Peptidomimetika gibt. Zur Klärung dieser Frage fanden Untersuchungen an der humanen Keratinozytenzelllinie HaCaT statt. Die Zellen wurden an den Tagen 3, 5 und 7 nach der Aussaat mit  $10 \mu\text{M}$  [ $^{14}\text{C}$ ]Glycylsarcosin bei einer Temperatur von  $37^\circ\text{C}$  über einen Zeitraum von 10 Minuten inkubiert. Glycylsarcosin

stellt ein Modellpeptid dar, das in der Literatur aufgrund seiner Hydrolysebeständigkeit für Transportstudien zum Peptidtransport beschrieben ist. Bei zwei verschiedenen pH-Werten (6,0 und 7,5) wurde in der Abwesenheit bzw. bei pH 6,0 auch in der Anwesenheit von unmarkiertem Glycylsarcosin die Aufnahme von [ $^{14}\text{C}$ ]Gly-Sar bestimmt. Die erhaltenen Ergebnisse sind in der Abbildung 11 dargestellt.



**Abb. 11: Aufnahme von [ $^{14}\text{C}$ ]Glycylsarcosin in HaCaT Zellen in Abhängigkeit vom pH-Wert des Inkubationsmediums.** Die Aufnahme von [ $^{14}\text{C}$ ]Gly-Sar (50  $\mu\text{M}$ ) wurde in Abwesenheit oder Gegenwart von 10 mM unmarkiertem Glycylsarcosin in einem Puffer mit NaCl gemessen. Die Inkubationszeit betrug 10 min. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  S.E.,  $n \geq 3$ .

Anhand des Diagramms lässt sich erkennen, dass die Aufnahme von [ $^{14}\text{C}$ ]Gly-Sar am Tag 7 nach Aussaat, im Vergleich zu Tag 3 und Tag 5, am höchsten ist. Tendenziell scheint eine Verlängerung der Kultivierungsdauer eine Zunahme der Aufnahmekapazität des Modellpeptides zu bewirken.

Der Peptidtransporter ist ein protonenabhängiges System. Durch einen zelleinwärts gerichteten Protonengradienten kommt es zur Stimulation des tertiär aktiven Transportsystems. Bei einem niedrigen pH-Wert von 6,0 transportiert das System aufgrund des stärker ausgeprägten Gradienten mehr Substrat in die Zelle als bei einem höheren pH-Wert von z.B. 7,5.

In humanen Keratinozyten besteht zwischen den pH-Werten 6,0 und 7,5 nur am Tag 7 ein signifikanter Unterschied. An diesem Tag ist die Aufnahme des Peptides bei pH 7,5 geringer als bei pH 6,0.

Des Weiteren wurde die Aufnahme von [<sup>14</sup>C]Glycylsarcosin in Gegenwart eines Überschusses an unmarkiertem Glycylsarcosin gemessen: Der Transport von [<sup>14</sup>C]Gly-Sar in die Keratinozyten wurde nicht reduziert. Die Ergebnisse an der Zelllinie konnten durch Versuche an nativen humanen epidermalen Keratinozyten in der Primärkultur bestätigt werden und erlauben die Schlussfolgerung, dass humane Keratinozyten keinen Peptidtransporter exprimieren.

## 7.2 Transport von Serotonin

Serotonin, 5-Hydroxytryptamin, stellt ein biogenes Amin dar (Kema et al., 2000). Es handelt sich um einen Wachstumsfaktor, der vasodilatierend und immunmodulierend wirksam ist. Serotonin ist in grundlegende Entwicklungsprozesse inklusive der Zellproliferation, der Migration, der Differenzierung und Morphogenese involviert. Als Neurotransmitter besitzt das Amin ebenfalls physiologische Relevanz und spielt eine Rolle als Hormon, Cytokin und Immunmodulator und bei der Entstehung von Stress, Angst und Depressionen. (Buznikov et al., 2001; Graeff et al., 1996; Kema et al., 2000; Seuwen und Pouyssegur, 1990).

Serotonin wird über einen spezifischen, hochaffinen Carrier in die Zelle transportiert. Das Transportsystem konnte in der Plazenta (Balkovetz et al., 1989), in der Lunge (Lee und Fanburg, 1986), im Gehirn (O'Reilly und Reith, 1988), in Blutplättchen (Rudnick, 1977; Rudnick und Nelson, 1978; Sneddon, 1969), in den Neuroglia (Inazu et al., 2001), in Mastzellen (Gripenberg, 1976) und in Endothelzellen der Aorta (Robinson-White et al., 1981; Shepro et al., 1975) nachgewiesen werden. Der als SERT bezeichnete Transporter ist sowohl von dem Vorhandensein eines Na<sup>+</sup>-Gradienten als auch eines Cl<sup>-</sup>-Gradienten abhängig (Balkovetz et al., 1989; Lee und Fanburg, 1986; O'Reilly und Reith, 1988). Des Weiteren ist der Carrier hochaffin für den Neurotransmitter Serotonin: die Bestimmung der kinetischen Parameter ergab eine Michaelis-Menten-Konstante zwischen 50 und 500 nM (Balkovetz et al., 1989; O'Reilly und Reith, 1988; Rudnick, 1977). Als Inhibitoren des Serotonintransporters erwiesen sich trizyklische Antidepressiva und selektive Serotoninwiederaufnahmehemmer (Inazu et al., 2001; Rudnick, 1977). Durch die Hemmung der Aufnahme von Serotonin durch Cocain und Amphetamine lässt sich deren zentrale euphorisierende und stimulierende Wirkung erklären (Chang et al., 1996; Inazu et al., 2001; Ramamoorthy et al., 1993).

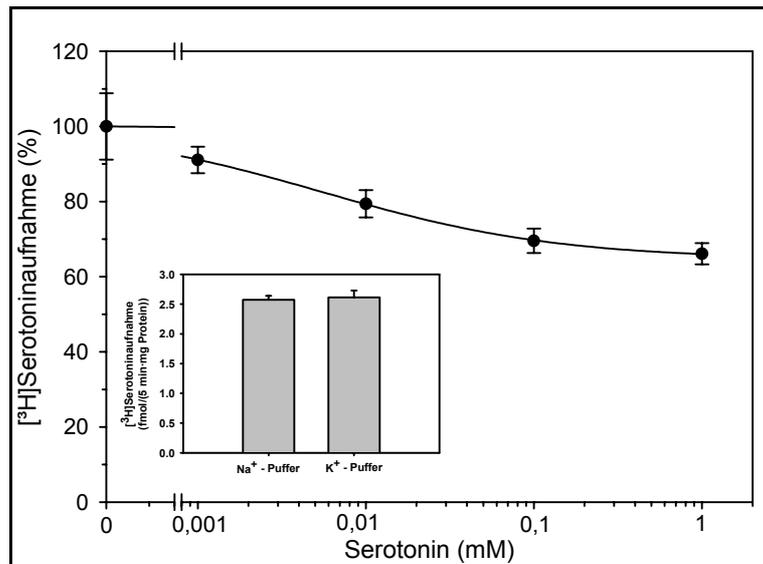
In der Haut besitzt Serotonin ödemfördernde, vasodilatatorische, proinflammatorische und/oder juckreizauslösende Effekte (Kema et al., 2000; Seuwen und Pouyssegur, 1990). Die Wirkung von Serotonin wird durch die Interaktion des Neurotransmitters mit membranständigen Rezeptoren ausgelöst. Slominski et al. (2003) gelang es, die Expression dieser Rezeptoren in der menschlichen Haut nachzuweisen.

Aus früheren Arbeiten lässt sich vermuten, dass neben den Keratinozyten hauptsächlich die Melanozyten für die Synthese von Serotonin verantwortlich sind. So ergaben immunologische Untersuchungen an humaner Haut, dass ca. 90 % der Serotoninantikörper im Zytoplasma und im Kern von Melanozyten gebunden wurden (Johansson et al., 1998). Nach der Bildung von Serotonin in den Melanozyten können die Zellen das Amin in Melatonin umwandeln oder sie transportieren es aus der Zelle. Im Extrazellulärraum steht es für die Aufnahme durch die Keratinozyten zur Verfügung.

Wie wird das freigesetzte Serotonin in die Keratinozyten transportiert? Gibt es analog dem bereits an den Plasmamembranen von serotoninergen Neuronen, Blutplättchen oder der Plazenta charakterisierten System eine Carrier-vermittelte Aufnahme in die Keratinozyten? In einer Übersichtsarbeit von Slominski et al. (2002) wird ein immunologischer Nachweis eines Serotonintransporters in HaCaT Zellen erwähnt, ohne dass die Originaldaten angeführt werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit galt es herauszufinden, ob der Serotonintransport an humanen Keratinozyten ähnliche Charakteristika aufweist wie das an anderen Zellen beschriebene System SERT. Dazu wurde zunächst die Konzentrationsabhängigkeit der [<sup>3</sup>H]Serotoninaufnahme an der Keratinozytenzelllinie HaCaT untersucht. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 12 dargestellt. Es lässt sich nur eine geringe Hemmung des Transport von [<sup>3</sup>H]Serotonin erkennen. In der Literatur wurde für den plazentalen Serotonintransporter ein IC<sub>50</sub>-Wert für Serotonin von 70 nM beschrieben (Balkovetz et al., 1989). Abweichend davon ließ sich an HaCaT Zellen bei dieser Konzentration keine Hemmung feststellen.

In der Abbildung 12 sind des weiteren die Ergebnisse der Untersuchungen zur Na<sup>+</sup>-Abhängigkeit der Serotoninaufnahme dargestellt. Die Aufnahme von [<sup>3</sup>H]Serotonin in einem Puffer mit NaCl betrug  $2,57 \pm 0,07$  fmol/(5 min·mg Protein). Im Vergleich dazu nahmen die Keratinozyten aus einem Puffer, in dem die Na<sup>+</sup>-Ionen durch K<sup>+</sup>-Ionen substituiert worden waren  $2,62 \pm 0,11$  fmol/(5 min·mg Protein) auf. Der Transport von [<sup>3</sup>H]Serotonin in HaCaT Zellen erwies sich demzufolge als Na<sup>+</sup>-unabhängig. Im Gegensatz dazu ergaben die Untersuchungen des SERT eine starke Abhängigkeit von der Na<sup>+</sup>-Ionenkonzentration im Inkubationspuffer (O'Reilly und Reith, 1988).



**Abb. 12: Aufnahme von  $[^3\text{H}]$ Serotonin in HaCaT Zellen in Abhängigkeit von der Konzentration an unmarkiertem Serotonin.** Die Aufnahme wurde in Gegenwart steigender Serotoninkonzentrationen in einem Puffer mit NaCl und einem pH-Wert von 7,5 gemessen. Die Inkubationszeit betrug 10 min. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  S.E.,  $n \geq 4$ . **Inset: Einfluss von extrazellulärem  $\text{Na}^+$  auf die spezifische Aufnahme von  $[^3\text{H}]$ Serotonin in HaCaT Zellen.** Die Aufnahme von  $[^3\text{H}]$ Serotonin (1 nM) wurde in Puffer pH 7.5 mit oder ohne extrazelluläres  $\text{Na}^+$  über einen Zeitraum von 5 min gemessen. Für den  $\text{Na}^+$ -freien Puffer wurde das NaCl durch KCl substituiert. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  S.E.,  $n \geq 3$ .

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Transport von Serotonin in den Keratinozyten vermutlich nicht durch den beschriebenen Serotonintransporter SERT erfolgt. Serotonin könnte stattdessen durch Diffusion oder ein Transportsystem mit einer niedrigen Affinität aufgenommen werden.

## 8 Zusammenfassung und Ausblick

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Identifizierung und funktionellen Charakterisierung von Transportsystemen an der humanen Keratinozytenzelllinie HaCaT und an nativen humanen epidermalen Keratinozyten. Neben dem Transport der physiologischen Substanzen Biotin, Taurin und Cholin stand das therapeutisch relevante Clonidin im Mittelpunkt der Studien. Darüber hinaus wurde die Aufnahme von Peptiden und Serotonin untersucht.

### 1. Transport von Biotin

- Humane Keratinozyten exprimieren den natriumabhängigen Multivitamintransporter SMVT.
- Das Vorhandensein eines  $H^+$ - oder  $Cl^-$  - Gradienten hat keinen Einfluss auf die [ $^3H$ ]Biotinaufnahme.
- Die Untersuchung der kinetischen Parameter des SMVT ergibt eine Michaelis-Menten-Konstante ( $K_t$ ) von  $22,7 \pm 1,0 \mu M$  und eine maximale Transportgeschwindigkeit ( $V_{max}$ ) von  $163,6 \pm 3,5 pmol/(5 min \cdot mg Protein)$ .
- SMVT transportiert neben Biotin auch Liponsäure, Pantothersäure und Desthiobiotin, jedoch nicht Biocytin und Biotinmethylester.
- Das SMVT-System scheint vor allem für die Aufnahme von Pantothersäure in humane Keratinozyten verantwortlich zu sein.
- Durch Messungen mit geringeren [ $^3H$ ]Biotinkonzentrationen lässt sich ein zweites Transportsystem mit einer sehr hohen Affinität nachweisen. Die Aufnahme von Biotin über diesen Transporter ist nicht durch Liponsäure und Pantothersäure hemmbar. Im Gegensatz zum Multivitamintransporter transportiert das hochaffine System unter physiologischen Bedingungen bevorzugt Biotin. Bei diesem Carrier könnte es sich um den Monocarboxylattransporter MCT1 handeln.

### 2. Transport von Taurin

- Humane Keratinozyten exprimieren den Taurintransporter TAUT.
- Der Transport von [ $^3H$ ]Taurin erweist sich als sehr stark abhängig von einem nach innen gerichteten  $Na^+$ - und  $Cl^-$  - Gradienten.

- Die Taurinaufnahme ist sättigbar mit einer Michaelis-Menten-Konstante von  $5,1 \mu\text{M}$  und einer Maximalgeschwindigkeit von  $320,5 \text{ pmol}/(10 \text{ min}\cdot\text{mg Protein})$ .
- Durch  $\beta$ -Aminosäuren (Taurin,  $\beta$ -Alanin, Hypotaurin,  $\beta$ -Guanidinopropionsäure), nicht jedoch durch  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Aminosäuren, mit Ausnahme der  $\gamma$ -Aminobuttersäure, wird die Aufnahme von [ $^3\text{H}$ ]Taurin gehemmt.

### 3. Transport von Clonidin

- Humane Keratinozyten exprimieren ein hochaffines Transportsystem für tertiäre Amine.
- Der Transport von [ $^3\text{H}$ ]Clonidin in die Hautzellen ist  $\text{Na}^+$ -unabhängig.
- Durch eine Erhöhung des extrazellulären pH-Wertes kommt es zu einer gesteigerten Aufnahme von Clonidin.
- Die Michaelis-Menten-Konstante ( $K_t$ ) des Transportsystems beträgt  $0,19 \text{ mM}$  und die Maximalgeschwindigkeit ( $V_{\text{max}}$ )  $12,1 \text{ nmol}/(\text{min}\cdot\text{mg Protein})$ .
- Diphenhydramin, Guanabenz, Procainamid, Tryptamin, Chinin und Chinidin, jedoch nicht das quartäre Amin Cholin hemmen die Clonidinaufnahme.

### 4. Transport von Cholin

- Humane Keratinozyten exprimieren ein Transportsystem, das spezifisch tertiäre und quartäre Amine erkennt und transportiert.
- Das Transportsystem für Cholin ist nur partiell  $\text{Na}^+$ -abhängig. Diese teilweise Abhängigkeit lässt sich durch die gleichzeitige Anwesenheit des natriumabhängigen CHT1-Systems erklären (Haberberger et al., 2002; Pfeil et al., 2003).
- Der Transport von Cholin ist abhängig vom extrazellulären pH-Wert. Bei einer Erhöhung des pH-Wertes kommt es zur gesteigerten Aufnahme des Amins, das Optimum liegt bei pH 7,5.
- Die Untersuchung der Abhängigkeit des Systems von der Substratkonzentration ergibt einen  $K_t$ -Wert von  $14,8 \mu\text{M}$  und einen  $V_{\text{max}}$ -Wert von  $1,0 \text{ nmol}/(10 \text{ min}\cdot\text{mg Protein})$ .
- Die Aufnahme von [ $^3\text{H}$ ]Cholin in die Keratinozyten wird durch unmarkiertes Cholin, Hemicholin-3 und Acetylcholin gehemmt. Verschiedene kationische Arzneistoffe wie Diphenhydramin, Clonidin und Atropin interagieren ebenfalls mit dem Transportsystem.

### **5. Aufnahme von Peptiden**

- Humane Keratinozyten exprimieren keinen Peptidtransporter.
- Peptide werden mittels Diffusion in die Zelle transportiert.

### **6. Aufnahme von Serotonin**

- In humanen Keratinozyten konnte der Serotonintransporters SERT funktionell nicht nachgewiesen werden.
- Die Aufnahme von Serotonin in die Keratinozyten erfolgt mit Hilfe eines bisher unbekanntes niedrigaffinen Transportsystems oder durch Diffusion.

Folgende Schwerpunkte könnten im Mittelpunkt weiterer Arbeiten stehen:

- Aufklärung der strukturellen Erfordernisse der Transportsysteme
- Untersuchung des Einflusses von therapeutisch relevanten Wirkstoffen (dermal oder transdermal) auf die Aufnahme der physiologischen Substanzen Biotin, Taurin und Cholin und Ausnutzung der Systeme als Arzneistofftransporter
- Klonierung des Taurintransporters TAUT aus humanen Keratinozyten
- Molekularbiologische Untersuchungen zur Identität und Expression des hochaffinen Transportsystems für Biotin und der Systeme für Clonidin und Cholin in den Keratinozyten
- Funktionelle Charakterisierung der Carrier für Biotin, Taurin, Clonidin und Cholin an Fibroblasten und Melanozyten der menschlichen Haut
- Studien zur Regulation der Transportsysteme.

## 9 Literaturverzeichnis

- Adibi, S.A. (1997) The oligopeptide transporter (Pept-1) in human intestine: biology and function. *Gastroenterology* 113, 332-340
- Aggarwal, P.K., Kumar, L., Garg, S.K., Mathur, V.S. (1986) Effect of *Rumex nepalensis* extracts on histamine, acetylcholine, carbachol, bradykinin, and PGs evoked skin reactions in rabbits. *Ann. Allergy* 56, 177-182
- Alfieri, R.R., Cavazzoni, A., Petronini, P.G., Bonelli, M.A., Caccamo, A.E., Borghetti, A.F., Wheeler, K.P. (2002) Compatible osmolytes modulate the response of porcine endothelial cells to hypertonicity and protect them from apoptosis. *J. Physiol.* 540, 499-508
- Allen, D.D., Smith, Q.R. (2001) Characterization of the blood-brain barrier choline transporter using the in situ rat brain perfusion technique. *J. Neurochem.* 76, 1032-1041
- Alvarez, J.G., Storey, B.T. (1983) Taurine, hypotaurine, epinephrine and albumin inhibit lipid peroxidation in rabbit spermatozoa and protect against loss of motility. *Biol. Reprod.* 29, 548-555
- Arakawa, T., Timasheff, S.N. (1985) The stabilization of proteins by osmolytes. *Biophys. J.* 47, 411-414
- Arndts, D., Arndts, K. (1984) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of transdermally administered clonidine. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 26, 79-85
- Balkovetz, D.F., Leibach, F.H., Mahesh, V.B., Devoe, L.D., Cragoe, E.J., Jr., Ganapathy, V. (1986)  $\text{Na}^+$  -  $\text{H}^+$  exchanger of human placental brush-border membrane: identification and characterization. *Am. J. Physiol.* 251, C852-C860
- Balkovetz, D.F., Tiruppathi, C., Leibach, F.H., Mahesh, V.B., Ganapathy, V. (1989) Evidence for an imipramine-sensitive serotonin transporter in human placental brush-border membranes. *J. Biol. Chem.* 264, 2195-2198
- Barakat, L., Wang, D., Bordey, A. (2002) Carrier-mediated uptake and release of taurine from Bergmann glia in rat cerebellar slices. *J. Physiol.* 541, 753-767
- Baron, J.M., Höller, D., Schiffer, R., Frankenberg, S., Neis, M., Merk, H.F., Jugert, F.K. (2001) Expression of multiple cytochrome P450 enzymes and multidrug resistance-associated transport proteins in human skin keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 116, 541-548
- Baur, B., Baumgartner, E.R. (1993)  $\text{Na}^+$ -dependent biotin transport into brush-border membrane vesicles from human kidney cortex. *Eur. J. Physiol.* 422, 499-505
- Baur, B., Baumgartner, E.R. (2000) Biotin and biocytin uptake into cultured primary calf brain microvessel endothelial cells of the blood-brain barrier. *Brain Res.* 858, 348-355
- Baur, B., Wick, H., Baumgartner, E.R. (1990)  $\text{Na}^+$ -dependent biotin transport into brush-border membrane vesicles from rat kidney. *Am. J. Physiol.* 258, F840-F847
- Beck, F.X., Burger-Kentischer, A., Müller, E. (1998) Cellular response to osmotic stress in the renal medulla. *Eur. J. Physiol.* 436, 814-827

- Behne, M.J., Meyer, J.W., Hanson, K.M., Barry, N.P., Murata, S., Crumrine, D., Clegg, R.W., Gratton, E., Holleran, W.M., Elias, P.M., Mauro, T.M. (2002) NHE1 regulates the stratum corneum permeability barrier homeostasis. *J. Biol. Chem.* 277, 47399-47406
- Bender, D.A. (1999) Optimum nutrition: thiamin, biotin and pantothenate. *Proc. Nutr. Soc.* 58, 427-433
- Berger, E., Long, E., Semenza, G. (1972) The sodium activation of biotin absorption in hamster small intestine in vitro. *Biochim. Biophys. Acta* 255, 873-887
- Bernard, J.M., Hommeril, J.L., Passuti, N., Pinaud, M. (1991) Postoperative analgesia by intravenous clonidine. *Anesthesiology* 75, 577-582
- Bevan, C., Kinne, R.K. (1990) Choline transport in collecting duct cells isolated from the rat renal inner medulla. *Eur. J. Physiol.* 417, 324-328
- Biewenga, G.P., Haenen, G.R., Bast, A. (1997) The pharmacology of the antioxidant lipoic acid. *Gen. Pharmacol.* 29, 315-331
- Birdsall, T.C. (1998) Therapeutic applications of taurine. *Alt. Med. Rev.* 3, 128-136
- Blusztajn, J.K., Wurtman, R.J. (1983) Choline and cholinergic neurons. *Science* 221, 614-620
- Boukamp, P., Petrussevska, R.T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A., Fusenig, N.E. (1988) Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J. Cell Biol.* 106, 761-771
- Brandsch, M., Miyamoto, Y., Ganapathy, V., Leibach, F.H. (1993) Regulation of taurine transport in human colon carcinoma cell lines (HT-29 and Caco-2) by protein kinase C. *Am. J. Physiol.* 264, G939-G946
- Brandsch, M., Ramamoorthy, S., Marczin, N., Catravas, J.D., Leibach, J.W., Ganapathy, V., Leibach, F.H. (1995) Regulation of taurine transport by Escherichia coli heat-stable enterotoxin and guanylin in human intestinal cell lines. *J. Clin. Invest.* 96, 361-369
- Brust, P., Christensen, T., Diemer, N.H. (1992) Decrease of extracellular taurine in the rat dorsal hippocampus after central nervous administration of vasopressin. *J. Neurochem.* 58, 1427-1431
- Buchman, A.L., Sohel, M., Moukarzel, A., Bryant, D., Schanler, R., Awal, M., Burns, P., Dorman, K., Belfort, M., Jenden, D.J., Killip, D., Roch, M. (2001) Plasma choline in normal newborns, infants, toddlers, and in very-low-birth-weight neonates requiring total parenteral nutrition. *Nutrition* 17, 18-21
- Bucuvalas, J.C., Goodrich, A.L., Suchy, F.J. (1987) Hepatic taurine transport: a Na<sup>+</sup>-dependent carrier on the basolateral plasma membrane. *Am. J. Physiol.* 253, G351-G358
- Burckhardt, G., Wolff, N.A. (2000) Structure of renal organic anion and cation transporters. *Am. J. Physiol.* 278, F853-F866
- Burris, J.F. (1993) The USA experience with the clonidine transdermal therapeutic system. *Clin. Auton. Res.* 3, 391-396
- Buznikov, G.A., Lambert, H.W., Lauder, J.M. (2001) Serotonin and serotonin-like substances as regulators of early embryogenesis and morphogenesis. *Cell Tissue Res.* 305, 177-186

- Canty, D.J., Zeisel, S.H. (1994) Lecithin and choline in human health and disease. *Nutr. Rev.* 52, 327-339
- Cermak, J.M., Holler, T., Jackson, D.A., Blusztajn, J.K. (1998) Prenatal availability of choline modifies development of the hippocampal cholinergic system. *FASEB J.* 12, 349-357
- Chang, A.S., Chang, S.M., Starnes, D.M., Schroeter, S., Bauman, A.L., Blakely, R.D. (1996) Cloning and expression of mouse serotonin transporter. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 43, 185-192
- Chen, N.H., Reith, M.E., Quick, M.W. (2004) Synaptic uptake and beyond: the sodium- and chloride-dependent neurotransmitter transporter family SLC6. *Eur. J. Physiol.* 447, 519-531
- Cheng, Y., Prusoff, W.H. (1973) Relationship between the inhibition constant ( $K_i$ ) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition ( $IC_{50}$ ) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* 22, 3099-3108
- Chesney, R.W. (1985) Taurine: its biological role and clinical implications. *Adv. Pediatr.* 32, 1-42
- Chung, S.J., Ramanathan, V., Giacomini, K.M., Brett, C.M. (1994) Characterization of a sodium-dependent taurine transporter in rabbit choroid plexus. *Biochim. Biophys. Acta* 1193, 10-16
- Chuong, C.M., Nickoloff, B.J., Elias, P.M., Goldsmith, L.A., Macher, E., Maderson, P.A., Sundberg, J.P., Tagami, H., Plonka, P.M., Thestrup-Pedersen, K., Bernard, B.A., Schröder, J.M., Dotto, P., Chang, C.H., Williams, M.L., Feingold, K.R., King, L.E., Kligman, A.M., Rees, J.L., Christophers, E. (2002) What is the 'true' function of skin? *Exp. Dermatol.* 11, 159-187
- Coderch, L., López, O., de la Maza, A., Parra, J.L. (2003) Ceramides and skin function. *Am. J. Clin. Dermatol.* 4, 107-129
- Colombo, V.E., Gerber, F., Bronhofer, M., Floersheim, G.L. (1990) Treatment of brittle fingernails and onychoschizia with biotin: scanning electron microscopy. *J. Am. Acad. Dermatol.* 23, 1127-1132
- Daberkow, R.L., White, B.R., Cederberg, R.A., Griffin, J.B., Zempleni, J. (2003) Monocarboxylate transporter 1 mediates biotin uptake in human peripheral blood mononuclear cells. *J. Nutr.* 133, 2703-2706
- Dakshinamurti, K., Chauhan, J. (1988) Regulation of biotin enzymes. *Ann. Rev. Nutr.* 8, 211-233
- Daniel, H., Kottra, G. (2004) The proton oligopeptide cotransporter family SLC15 in physiology and pharmacology. *Eur. J. Physiol.* 447, 610-618
- Davis, K.D., Treede, R.D., Raja, S.N., Meyer, R.A., Campbell, J.N. (1991) Topical application of clonidine relieves hyperalgesia in patients with sympathetically maintained pain. *Pain* 47, 309-317
- Değim, Z., Çelebi, N., Sayan, H., Babül, A., Erdoğan, D., Take, G. (2002) An investigation on skin wound healing in mice with a taurine-chitosan gel formulation. *Amino Acids* 22, 187-198

- De Kock, M., Martin, N., Scholtes, J.L. (1992) Central effects of epidural and intravenous clonidine in patients anesthetized with enflurane/nitrous oxide. An electroencephalographic analysis. *Anesthesiology* 77, 457-462
- Dresser, M.J., Leabman, M.K., Giacomini, K.M. (2001) Transporters involved in the elimination of drugs in the kidney: organic anion transporters and organic cation transporters. *J. Pharm. Sci.* 90, 397-421
- Dyer, D.L., Said, H.M. (1997) Biotin uptake in cultured cell lines. *Methods Enzymol.* 279, 393-405
- Eaton, B.M., Sooranna, S.R. (1998) Regulation of the choline transport system in superfused microcarrier cultures of BeWo cells. *Placenta* 19, 663-669
- Ebner, F., Heller, A., Rippke, F., Tausch, I. (2002) Topical use of dexpanthenol in skin disorders. *Am. J. Clin. Dermatol.* 3, 427-433
- Eckert, R.L. (1989) Structure, function, and differentiation of the keratinocyte. *Physiol. Rev.* 69, 1316-1345
- Elias, P.M. (1981) Epidermal lipids, membranes, and keratinization. *Int. J. Dermatol.* 20, 1-19
- Elias, P.M., Friend, D.S. (1975) The permeability barrier in mammalian epidermis. *J. Cell Biol.* 65, 180-191
- Elias, P.M., Menon, G.K. (1991) Structural and lipid biochemical correlates of the epidermal permeability barrier. *Adv. Lipid Res.* 24, 1-26
- Fernandez-Banares, F., Abad-Lacruz, A., Xiol, X., Gine, J.J., Dolz, C., Cabre, E., Esteve, M., Gonzalez-Huix, F., Gassull, M.A. (1989) Vitamin status in patients with inflammatory bowel disease. *Am. J. Gastroenterol.* 84, 744-748
- Fillingim, J.M., Matzek, K.M., Hughes, E.M., Johnson, P.A., Sharon, G.S. (1989) Long-term treatment with transdermal clonidine in mild hypertension. *Clin. Ther.* 11, 398-408
- Fluhr, J.W., Kao, J., Jain, M., Ahn, S.K., Feingold, K.R., Elias, P.M. (2001) Generation of free fatty acids from phospholipids regulates stratum corneum acidification and integrity. *J. Invest. Dermatol.* 117, 44-51
- Foschi, D., Trabucchi, E., Musazzi, M., Castoldi, L., Di Mattia, D., Radaelli, E., Marazzi, M., Franzini, P., Berlusconi, A. (1988) The effects of oxygen free radicals on wound healing. *Int. J. Tissue React.* 10, 373-379
- Friedrich, A., George, R.L., Bridges, C.C., Prasad, P.D., Ganapathy, V. (2001) Transport of choline and its relationship to the expression of the organic cation transporters in a rat brain microvessel endothelial cell line (RBE4). *Biochim. Biophys. Acta* 1512, 299-307
- Frosini, M., Sesti, C., Saponara, S., Ricci, L., Valoti, M., Palmi, M., Machetti, F., Sgaragli, G. (2003) A specific taurine recognition site in the rabbit brain is responsible for taurine effects on thermoregulation. *Br. J. Pharmacol.* 139, 487-494
- Ganapathy, V., Ganapathy, M.E., Nair, C.N., Mahesh, V.B., Leibach, F.H. (1988) Evidence for an organic cation-proton antiport system in brush-border membranes isolated from the human term placenta. *J. Biol. Chem.* 263, 4561-4568

- Ganapathy, V., Prasad, P.D., Ganapathy, M.E., Leibach, F.H. (2000) Placental transporters relevant to drug distribution across the maternal-fetal interface. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 294, 413-420
- Gavras, I., Manolis, A.J., Gavras, H. (2001) The  $\alpha_2$ -adrenergic receptors in hypertension and heart failure: experimental and clinical studies. *J. Hypertens.* 19, 2115-2124
- Gherzi, R., Melioli, G., De Luca, M., D'Agostino, A., Distefano, G., Guastella, M., D'Anna, F., Franzi, A.T., Cancedda, R. (1992) "HepG2/erythroid/brain" type glucose transporter (GLUT1) is highly expressed in human epidermis: keratinocyte differentiation affects GLUT1 levels in reconstituted epidermis. *J. Cell. Physiol.* 150, 463-474
- Goldberg, M.J., Spector, R., Chiang, C.K. (1987) Transport of diphenhydramine in the central nervous system. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 240, 717-722
- Gordon, P.R., Gelman, L.K., Gilchrest, B.A. (1988) Demonstration of a choline requirement for optimal keratinocyte growth in a defined culture medium. *J. Nutr.* 118, 1487-1494
- Gordon, R.E., Shaked, A.A., Solano, D.F. (1986) Taurine protects hamster bronchioles from acute NO<sub>2</sub>-induced alterations. A histologic, ultrastructural, and freeze-fracture study. *Am. J. Pathol.* 125,585-600
- Gowing, L.R., Farrell, M., Ali, R.L., White, J.M. (2002)  $\alpha_2$ -Adrenergic agonists in opioid withdrawal. *Addiction* 97, 49-58
- Graeff, F.G., Guimaraes, F.S., De Andrade, T.G., Deakin, J.F. (1996) Role of 5-HT in stress, anxiety, and depression. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 54, 129-141
- Grafe, F., Wohlrab, W., Neubert, R.H., Brandsch, M. (2003) Transport of biotin in human keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 120, 428-433 (**Anlage 10.1**)
- Grafe, F., Wohlrab, W., Neubert, R.H., Brandsch, M. (2004a) Functional characterization of sodium and chloride dependent taurine transport in human keratinocytes. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 57, 337-341 (**Anlage 10.2**)
- Grafe, F., Wohlrab, W., Neubert, R., Brandsch, M. (2004b) Carrier-mediated transport of clonidine in human keratinocytes. *Eur. J. Pharm. Sci.* 21, 309-312 (**Anlage 10.3**)
- Grando, S.A. (1997) Biological functions of keratinocyte cholinergic receptors. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* 2, 41-48
- Grando, S.A., Kist, D.A., Qi, M., Dahl, M.V. (1993) Human keratinocytes synthesize, secrete, and degrade acetylcholine. *J. Invest. Dermatol.* 101, 32-36
- Grant, M.P., Landis, S.C., Siegel, R.E. (1991) The molecular and pharmacological properties of muscarinic cholinergic receptors expressed by rat sweat glands are unaltered by denervation. *J. Neurosci.* 11, 3763-3771
- Grassl, S.M. (1992) Human placental brush-border membrane Na<sup>+</sup>-biotin cotransport. *J. Biol. Chem.* 267, 17760-17765
- Grassl, S.M. (1994) Choline transport in human placental brush-border membrane vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 1194, 203-213

- Griffin, J.B., Stanley, J.S., Zemleni, J. (2002) Synthesis of a rabbit polyclonal antibody to the human sodium-dependent multivitamin transporter. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 72, 195-198
- Gripenberg, J. (1976) Inhibition of reserpine, guanethidine and imipramine of the uptake of 5-hydroxytryptamine by rat peritoneal mast cells in vitro. *Acta Physiol Scand.* 96, 407-416
- Gründemann, D., Gorboulev, V., Gambaryan, S., Vehyl, M., Koepsell, H. (1994) Drug excretion mediated by a new prototype of polyspecific transporter. *Nature* 372, 549-552
- Grunewald, R.W., Oppermann, M., Müller, G.A. (1997) Choline transport and its osmotic regulation in renal cells derived from the rabbit outer medullary thick ascending limb of Henle. *Eur. J. Physiol.* 434, 815-821
- Guy, R.H., Hadgraft, J., Bucks, D.A. (1987) Transdermal drug delivery and cutaneous metabolism. *Xenobiotica* 17, 325-343
- Haberberger, R.V., Pfeil, U., Lips, K.S., Kummer, W. (2002) Expression of the high-affinity choline transporter, CHT1, in the neuronal and non-neuronal cholinergic system of human and rat skin. *J. Invest. Dermatol.* 119, 943-948
- Hachem, J.P., Crumrine, D., Fluhr, J., Brown, B.E., Feingold, K.R., Elias, P.M. (2003) pH directly regulates epidermal permeability barrier homeostasis, and stratum corneum integrity/cohesion. *J. Invest. Dermatol.* 121, 345-353
- Han, Y.H., Sweet, D.H., Hu, D.N., Pritchard, J.B. (2001) Characterization of a novel cationic drug transporter in human retinal pigment epithelial cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 296, 450-457
- Harris, I.R., Farrell, A.M., Memon, R.A., Grunfeld, C., Elias, P.M., Feingold, K.R. (1998) Expression and regulation of mRNA for putative fatty acid transport related proteins and fatty acyl CoA synthase in murine epidermis and cultured human keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 111, 722-726
- Hayashi, Y., Maze, M. (1993) Alpha<sub>2</sub> adrenoceptor agonists and anaesthesia. *Br. J. Anaesth.* 71, 108-118
- Hein, L. (2001)  $\alpha_2$ -adrenerge Rezeptoren: Molekulare Struktur und In-vivo-Funktion. *Z. Kardiol.* 90, 607-612
- Heller-Stilb, B., van Roeyen, C., Rascher, K., Hartwig, H.G., Huth, A., Seeliger, M.W., Warskulat, U., Häussinger, D. (2002) Disruption of the taurine transporter gene (taut) leads to retinal degeneration in mice. *FASEB J.* 16, 231-233
- Heusch, G., Schipke, J., Thamer, V. (1985) Clonidine prevents the sympathetic initiation and aggravation of poststenotic myocardial ischemia. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 7, 1176-1182
- Högstrom, H. (1987) Mechanisms and prevention of decrease in wound margin strength in intestinal anastomoses and laparotomy wounds. *Acta Chir. Scand. Suppl.* 539, 1-63
- Hoffmann, K., Grafe, F., Wohlrab, W., Neubert, R.H., Brandsch, M. (2002) Functional characterization of a high-affinity choline transport system in human keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 119, 118-121 (**Anlage 10.4**)

- Huschka, C. (1998) Untersuchungen zur Wirkung von Biotin auf humane Keratinozyten und zur Modulation der Biotinpenetration in humane Haut. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Huwylar, J., Fricker, G., Török, M., Schneider, M., Drewe, J. (1997) Transport of clonidine across cultured brain microvessel endothelial cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 282, 81-85
- Huxtable, R.J. (1992) Physiological actions of taurine. *Physiol. Rev.* 72, 101-163
- Huxtable, R.J., Chubb, J., Azari, J. (1980) Physiological and experimental regulation of taurine content in the heart. *Fed. Proc.* 39, 2685-2690
- Inazu, M., Takeda, H., Ikoshi, H., Sugisawa, M., Uchida, Y., Matsumiya, T. (2001) Pharmacological characterization and visualization of the glial serotonin transporter. *Neurochem. Int.* 39, 39-49
- Inui, K.I., Masuda, S., Saito, H. (2000) Cellular and molecular aspects of drug transport in the kidney. *Kidney Int.* 58, 944-958
- Iyengar, B. (1989) Modulation of melanocytic activity by acetylcholine. *Acta Anat.* 136, 139-141
- Janeke, G., Siefken, W., Carstensen, S., Springmann, G., Bleck, O., Steinhart, H., Höger, P., Wittern, K.P., Wenck, H., Stäb, F., Sauermann, G., Schreiner, V., Doering, T. (2003) Role of taurine accumulation in keratinocyte hydration. *J. Invest. Dermatol.* 121, 354-361
- Jessen, H., Sheikh, M.I. (1991) Renal transport of taurine in luminal membrane vesicles from rabbit proximal tubule. *Biochim. Biophys. Acta* 1064, 189-198
- Johansson, O., Liu, P.Y., Bondesson, L., Nordlind, K., Olsson, M.J., Löntz, W., Verhofstad, A., Liang, Y., Gangi, S. (1998) A serotonin-like immunoreactivity is present in human cutaneous melanocytes. *J. Invest. Dermatol.* 111, 1010-1014
- Jung, U., Helbich-Endermann, M., Bitsch, R., Schneider, S., Stein, G. (1998) Are patients with chronic renal failure (CRF) deficient in biotin and is regular biotin supplementation required? *Z. Ernährungswiss.* 37, 363-367
- Kanitakis, J. (2002) Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur. J. Dermatol.* 12, 390-399
- Katsura, T., Mizuuchi, H., Hashimoto, Y., Inui, K.I. (2000) Transport of procainamide via H<sup>+</sup>/tertiary amine antiport system in rabbit intestinal brush-border membrane. *Am. J. Physiol.* 279, G799-G805
- Keep, R.F., Xiang, J. (1996) Choroid plexus taurine transport. *Brain Res.* 715, 17-24
- Kema, I.P., de Vries, E.G., Muskiet, F.A. (2000) Clinical chemistry of serotonin and metabolites. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 747, 33-48
- Kendler, B.S. (1989) Taurine: an overview of its role in preventive medicine. *Prev. Med.* 18, 79-100

- Kielar, D., Kaminski, W.E., Liebisch, G., Piehler, A., Wenzel, J.J., Möhle, C., Heimerl, S., Langmann, T., Friedrich, S.O., Böttcher, A., Barlage, S., Drobnik, W., Schmitz, G. (2003) Adenosine triphosphate binding cassette (ABC) transporters are expressed and regulated during terminal keratinocyte differentiation: a potential role for ABCA7 in epidermal lipid reorganization. *J. Invest. Dermatol.* 121, 465-474
- Kotlyar, M., Hatsukami, D.K. (2002) Managing nicotine addiction. *J. Dent. Educ.* 66, 1061-1073
- Krause, K.H., Berlit, P., Bonjour, J.P. (1982) Impaired biotin status in anticonvulsant therapy. *Ann. Neurol.* 12, 485-486
- Krause, K.H., Bonjour, J.P., Berlit, P., Kochen, W. (1985) Biotin status of epileptics. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 447, 297-313
- Kühnel, W. (2002) Taschenatlas der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie. Gustav Thieme Verlag, Stuttgart
- Kulanthaivel, P., Cool, D.R., Ramamoorthy, S., Mahesh, V.B., Leibach, F.H., Ganapathy, V. (1991) Transport of taurine and its regulation by protein kinase C in the JAR human placental choriocarcinoma cell line. *Biochem. J.* 277, 53-58
- Kuriyama, K. (1980) Taurine as a neuromodulator. *Fed. Proc.* 39, 2680-2684
- Lampe, M.A., Burlingame, A.L., Whitney, J., Williams, M.L., Brown, B.E., Roitman, E., Elias, P.M. (1983a) Human stratum corneum lipids: characterization and regional variations. *J. Lipid Res.* 24, 120-130
- Lampe, M.A., Williams, M.L., Elias, P.M. (1983b) Human epidermal lipids: characterization and modulations during differentiation. *J. Lipid Res.* 24, 131-140
- Langley, M.S., Heel, R.C. (1988) Transdermal clonidine. A preliminary review of its pharmacodynamic properties and therapeutic efficacy. *Drugs* 35, 123-142
- Laufer, L.R., Erlik, Y., Meldrum, D.R., Judd, H.L. (1982) Effect of clonidine on hot flashes in postmenopausal women. *Obstet. Gynecol.* 60, 583-586
- Lee, G., Dallas, S., Hong, M., Bendayan, R. (2001) Drug transporters in the central nervous system: brain barriers and brain parenchyma considerations. *Pharmacol. Rev.* 53, 569-596
- Lee, S.L., Fanburg, B.L. (1986) Serotonin uptake by bovine pulmonary artery endothelial cells in culture. I. Characterization. *Am. J. Physiol.* 250, C761-C765
- Leibach, J.W., Cool, D.R., Del Monte, M.A., Ganapathy, V., Leibach, F.H., Miyamoto, Y. (1993) Properties of taurine transport in a human retinal pigment epithelial cell line. *Curr. Eye Res.* 12, 29-36
- Leibach, F.H., Ganapathy, V. (1996) Peptide transporters in the intestine and the kidney. *Annu. Rev. Nutr.* 16, 99-119
- Limat, A., Suormala, T., Hunziker, T., Waelti, E.R., Braathen, L.R., Baumgartner, R. (1996) Proliferation and differentiation of cultured human follicular keratinocytes are not influenced by biotin. *Arch. Dermatol. Res.* 288, 31-38
- Lin, C.T., Song, G.X., Wu, J.Y. (1985) Is taurine a neurotransmitter in rabbit retina? *Brain Res.* 337, 293-298

- Lindgren, B.R., Ekstrom, T., Andersson, R.G. (1986) The effect of inhaled clonidine in patients with asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.* 134, 266-269
- Lobo, M.V., Alonso, F.J., Latorre, A., Martín del Río, R. (2001) Taurine levels and localisation in the stratified squamous epithelia. *Histochem. Cell Biol.* 115, 341-347
- Lombardini, J.B. (1985) Effects of taurine on calcium ion uptake and protein phosphorylation in rat retinal membrane preparations. *J. Neurochem.* 45, 268-275
- Lombardini, J.B. (1991) Taurine: retinal function. *Brain Res. Rev.* 16, 151-169
- Loth, H. (1986) Grundlagen des intra- und transdermalen Transports von Arzneistoffen, I. *Acta Pharm. Technol.* 32, 109-114
- Loth, H. (1987) Grundlagen des intra- und transdermalen Transports von Arzneistoffen, II. *Acta Pharm. Technol.* 33, 3-14
- Lowenthal, D.T., Matzek, K.M., MacGregor, T.R. (1988) Clinical pharmacokinetics of clonidine. *Clin. Pharmacokinet.* 14, 287-310
- Ma, T.Y., Dyer, D.L., Said, H.M. (1994) Human intestinal cell line Caco-2: a useful model for studying cellular and molecular regulation of biotin uptake. *Biochim. Biophys. Acta* 1189, 81-88
- Makino, Y., Osada, K., Sone, H., Sugiyama, K., Komai, M., Ito, M., Tsunoda, K., Furukawa, Y. (1999) Percutaneous absorption of biotin in healthy subjects and in atopic dermatitis patients. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 45, 347-352
- Maltese, W.A., Doucette, D.M. (1988) High-affinity choline uptake in cultured skin fibroblasts from individuals with dystonia. *Adv. Neurol.* 50, 183-186
- Man, M.Q., Feingold, K.R., Elias, P.M. (1993) Exogenous lipids influence permeability barrier recovery in acetone-treated murine skin. *Arch. Dermatol.* 129, 728-738
- Mansoor, G.A., Frishman, W.H. (2002) Comprehensive management of hypertensive emergencies and urgencies. *Heart Dis.* 4, 358-371
- Mardach, R., Zempleni, J., Wolf, B., Cannon, M.J., Jennings, M.L., Cress, S., Boylan, J., Roth, S., Cederbaum, S., Mock, D.M. (2002) Biotin dependency due to a defect in biotin transport. *J. Clin. Invest.* 109, 1617-1623
- Martensson, J., Larsson, J., Nordstrom, H. (1987) Amino acid metabolism during the anabolic phase of severely burned patients: with special reference to sulphur amino acids. *Eur. J. Clin. Invest.* 17, 130-135
- Martel, F., Azevedo, I. (2003) An update on the extraneuronal monoamine transporter (EMT): characteristics, distribution and regulation. *Curr. Drug Metab.* 4, 313-318
- Masini, E., Fantozzi, R., Conti, A., Blandina, P., Brunelleschi, S., Mannaioni, P.F. (1985) Immunological modulation of cholinergic histamine release in isolated rat mast cells. *Agents Actions* 16, 152-154
- Matousek, J.L., Campbell, K.L. (2002) A comparative review of cutaneous pH. *Vet. Dermatol.* 13, 293-300

- McArthur, K.E., Anderson, D.S., Durbin, T.E., Orloff, M.J., Dharmasathaphorn, K. (1982) Clonidine and lidamide to inhibit watery diarrhea in a patient with lung cancer. *Ann. Intern. Med.* 96, 323-325
- Meredith, D., Boyd, C.A. (2000) Structure and function of eukaryotic peptide transporters. *Cell. Mol. Life Sci.* 57, 754-778
- Metzner, L., Kalbitz, J., Brandsch, M. (2004) Transport of pharmacologically active proline derivatives by the human proton-coupled amino acid transporter hPAT1. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, im Druck
- Miller, S.J. (1989) Nutritional deficiency and the skin. *J. Am. Acad. Dermatol.* 21, 1-30
- Miyamoto, Y., Balkovetz, D.F., Leibach, F.H., Mahesh, V.B., Ganapathy, V. (1988) Na<sup>+</sup> +Cl<sup>-</sup>-gradient-driven, high-affinity, uphill transport of taurine in human placental brush-border membrane vesicles. *FEBS Lett.* 231, 263-267
- Miyamoto, Y., Kulanthaivel, P., Leibach, F.H., Ganapathy, V. (1991) Taurine uptake in apical membrane vesicles from the bovine retinal pigment epithelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 32, 2542-2551
- Miyamoto, Y., Tirupathi, C., Ganapathy, V., Leibach, F.H. (1989a) Active transport of taurine in rabbit jejunal brush-border membrane vesicles. *Am. J. Physiol.* 257, G65-G72
- Miyamoto, Y., Tirupathi, C., Ganapathy, V., Leibach, F.H. (1989b) Multiple transport systems for organic cations in renal brush-border membrane vesicles. *Am. J. Physiol.* 256, F540-F548
- Mizuuchi, H., Katsura, T., Ashida, K., Hashimoto, Y., Inui, K.I. (2000a) Diphenhydramine transport by pH-dependent tertiary amine transport system in Caco-2 cells. *Am. J. Physiol.* 278, G563-G569
- Mizuuchi, H., Katsura, T., Hashimoto, Y., Inui, K.I. (2000b) Transepithelial transport of diphenhydramine across monolayers of the human intestinal epithelial cell line Caco-2. *Pharm. Res.* 17, 539-545
- Mizuuchi, H., Katsura, T., Saito, H., Hashimoto, Y., Inui, K.I. (1999) Transport characteristics of diphenhydramine in human intestinal epithelial Caco-2 cells: contribution of pH-dependent transport system. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 290, 388-392
- Moini, H., Packer, L., Saris, N.E. (2002) Antioxidant and prooxidant activities of  $\alpha$ -lipoic acid and dihydrolipoic acid. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 182, 84-90
- Moyer, M.S., Goodrich, A.L., Rolfes, M.M., Suchy, F.J. (1988) Ontogenesis of intestinal taurine transport: evidence for a  $\beta$ -carrier in developing rat jejunum. *Am. J. Physiol.* 254, G870-G877
- Mutschler, E., Geisslinger, G., Kroemer, H.K., Schäfer-Korting, M. (2001) Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart
- Nabokina, S.M., Subramanian, V.S., Said, H.M. (2003) Comparative analysis of ontogenic changes in renal and intestinal biotin transport in the rat. *Am. J. Physiol.* 284, F737-F742

- Nakashima, T., Taniko, T., Kuriyama, K. (1982) Therapeutic effect of taurine administration on carbon tetrachloride-induced hepatic injury. *Jpn. J. Pharmacol.* 32, 583-589
- Neubert, R., Wohlrab, W., Marsch, W. (2001) *Dermatopharmazie: Vehikel – Wirkstoffe - Pharmakologie*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart
- Norlén, L. (2003) Molecular skin barrier models and some central problems for the understanding of skin barrier structure and function. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* 16, 203-211
- Öhman, H., Vahlquist, A. (1998) The pH gradient over the stratum corneum differs in X-linked recessive and autosomal dominant ichthyosis: a clue to the molecular origin of the “acid skin mantle”? *J. Invest. Dermatol.* 111, 674-677
- O’Flaherty, L., Stapleton, P.P., Redmond, H.P., Bouchier-Hayes, D. (1997a) Dexamethasone and lipopolysaccharide regulation of taurine transport in Caco-2 cells. *J. Surg. Res.* 69, 331-336
- O’Flaherty, L., Stapleton, P.P., Redmond, H.P., Bouchier-Hayes, D.J. (1997b) Intestinal taurine transport: a review. *Eur. J. Clin. Invest.* 27, 873-880
- Oja, S.S., Saransaari, P. (1996) Taurine as osmoregulator and neuromodulator in the brain. *Metab. Brain Dis.* 11, 153-164
- Okamoto, K., Kimura, H., Sakai, Y. (1983) Evidence for taurine as an inhibitory neurotransmitter in cerebellar stellate interneurons: selective antagonism by TAG (6-aminomethyl-3-methyl-4H,1,2,4-benzothiadiazine-1,1-dioxide). *Brain Res.* 265, 163-168
- O’Reilly, C.A., Reith, M.E. (1988) Uptake of [<sup>3</sup>H]serotonin into plasma membrane vesicles from mouse cerebral cortex. *J. Biol. Chem.* 263, 6115-6121
- Packer, L., Kraemer, K., Rimbach, G. (2001) Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetes complications. *Nutrition* 17, 888-895
- Pasantes-Morales, H., Cruz, C. (1985) Taurine and hypotaurine inhibit light-induced lipid peroxidation and protect rod outer segment structure. *Brain Res.* 330, 154-157
- Patrick, L. (2000) Nutrients and HIV: part three – N-acetylcysteine, alpha-lipoic acid, L-glutamine, and L-carnitine. *Altern. Med. Rev.* 5, 290-305
- Petrosian, A.M., Haroutounian, J.E. (2000) Taurine as a universal carrier of lipid soluble vitamins: a hypothesis. *Amino Acids* 19, 409-421
- Pfeifer, S., Pflugel, P., Borchert, H.H. (1995) *Biopharmazie: Pharmakokinetik – Bioverfügbarkeit - Biotransformation*. Ullstein Mosby GmbH, Berlin, Wiesbaden
- Pfeil, U., Haberberger, R.V., Lips, K.S., Eberling, L., Grau, V., Kummer, W. (2003) Expression of the high-affinity choline transporter CHT1 in epithelia. *Life Sci.* 72, 2087-2090
- Pitkänen, H.T., Oja, S.S., Kempainen, K., Seppä, J.M., Mero, A.A. (2003) Serum amino acid concentrations in aging men and women. *Amino Acids* 24, 413-421
- Pluskwa, F., Bonnet, F., Saada, M., Macquin-Mavier, I., Becquemin, J.P., Catoire, P. (1991) Effects of clonidine on variation of arterial blood pressure and heart rate during carotid artery surgery. *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.* 5, 431-436

- Podda, M., Grundmann-Kollmann, M. (2001) Low molecular weight antioxidants and their role in skin ageing. *Clin. Exp. Dermatol.* 26, 578-582
- Podevin, R.A., Barbarat, B. (1986) Biotin uptake mechanisms in brush-border and basolateral membrane vesicles isolated from rabbit kidney cortex. *Biochim. Biophys. Acta* 856, 471-481
- Popli, S., Stroka, G., Ing, T.S., Daugirdas, J.T., Norusis, M.J., Hano, J.E., Gandhi, V.C. (1983) Transdermal clonidine for hypertensive patients. *Clin. Ther.* 5, 624-628
- Prasad, P.D., Ganapathy, V. (2000) Structure and function of mammalian sodium-dependent multivitamin transporter. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 3, 263-266
- Prasad, P.D., Ganapathy, V. (2003) Keratinocytes join forces with immune cells in the prosecution of SMVT as a "false" biotin transporter. *J. Invest. Dermatol.* 120, xi-xii
- Prisant, L.M. (2002) Transdermal clonidine skin reactions. *J. Clin. Hypertens. (Greenwich)* 4, 136-138
- Proksch, E., Holleran, W.M., Menon, G.K., Elias, P.M., Feingold, K.R. (1993) Barrier function regulates epidermal lipid and DNA synthesis. *Br. J. Dermatol.* 128, 473-482
- Qian, X., Vinnakota, S., Edwards, C., Sarkar, H.K. (2000) Molecular characterization of taurine transport in bovine aortic endothelial cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1509, 324-334
- Ramamoorthy, S., Bauman, A.L., Moore, K.R., Han, H., Yang-Feng, T., Chang, A.S., Ganapathy, V., Blakely, R.D. (1993) Antidepressant- and cocaine-sensitive human serotonin transporter: molecular cloning, expression, and chromosomal localization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 2542-2546
- Ramamoorthy, S., Liu, W., Ma, Y.Y., Yang-Feng, T.L., Ganapathy, V., Leibach, F.H. (1995) Proton/peptide cotransporter (PEPT2) from human kidney: functional characterization and chromosomal localization. *Biochim. Biophys. Acta* 1240, 1-4
- Redmond, H.P., Stapleton, P.P., Neary, P., Bouchier-Hayes, D. (1998) Immunonutrition: the role of taurine. *Nutrition* 14, 599-604
- Rippke, F., Schreiner, V., Schwanitz, H.J. (2002) The acidic milieu of the horny layer: new findings on the physiology and pathophysiology of skin pH. *Am. J. Clin. Dermatol.* 3, 261-272
- Robinson-White, A., Peterson, S., Hechtman, H.B., Shepro, D. (1981) Serotonin uptake by isolated adipose capillary endothelium. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 216, 125-128
- Roe, D.A. (1966) Taurine intolerance in psoriasis. *J. Invest. Dermatol.* 46, 420-430
- Rudnick, G. (1977) Active transport of 5-hydroxytryptamine by plasma membrane vesicles isolated from human blood platelets. *J. Biol. Chem.* 252, 2170-2174
- Rudnick, G., Nelson, P.J. (1978) Platelet 5-hydroxytryptamine transport, an electroneutral mechanism coupled to potassium. *Biochemistry* 17, 4739-4742
- Ruhe, R.C., McDonald, R.B. (2001) Use of antioxidant nutrients in the prevention and treatment of type 2 diabetes. *J. Am. Coll. Nutr.* 20, 363S-369S

- Rychlik, M. (2000) Quantification of free and bound pantothenic acid in foods and blood plasma by a stable isotope dilution assay. *J. Agric. Food Chem.* 48, 1175-1181
- Said, H.M., Derweesh, I. (1991) Carrier-mediated mechanism for biotin transport in rabbit intestine: studies with brush-border membrane vesicles. *Am. J. Physiol.* 261, R94-R97
- Said, H.M., Hoefs, J., Mohammadkhani, R., Horne, D.W. (1992) Biotin transport in human liver basolateral membrane vesicles: a carrier-mediated, Na<sup>+</sup> gradient-dependent process. *Gastroenterology* 102, 2120-2125
- Said, H.M., Korchid, S., Horne, D.W., Howard, M. (1990a) Transport of biotin in basolateral membrane vesicles of rat liver. *Am. J. Physiol.* 259, G865-G872
- Said, H.M., Ma, T.Y., Kamanna, V.S. (1994) Uptake of biotin by human hepatoma cell line, HepG2: a carrier-mediated process similar to that of normal liver. *J. Cell. Physiol.* 161, 483-489
- Said, H.M., Mock, D.M., Collins, J.C. (1989a) Regulation of intestinal biotin transport in the rat: effect of biotin deficiency and supplementation. *Am. J. Physiol.* 256, G306-G311
- Said, H.M., Ortiz, A., McCloud, E., Dyer, D., Moyer, M.P., Rubin, S. (1998) Biotin uptake by human colonic epithelial NCM460 cells: a carrier-mediated process shared with pantothenic acid. *Am. J. Physiol.* 275, C1365-C1371
- Said, H.M., Redha, R. (1987) A carrier-mediated system for transport of biotin in rat intestine in vitro. *Am. J. Physiol.* 252, G52-G55
- Said, H.M., Redha, R. (1988) Biotin transport in rat intestinal brush-border membrane vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 945, 195-201
- Said, H.M., Redha, R., Nylander, W. (1987) A carrier-mediated, Na<sup>+</sup> gradient-dependent transport for biotin in human intestinal brush-border membrane vesicles. *Am. J. Physiol.* 253, G631-G636
- Said, H.M., Redha, R., Nylander, W. (1988) Biotin transport in basolateral membrane vesicles of human intestine. *Gastroenterology* 94, 1157-1163
- Said, H.M., Redha, R., Nylander, W. (1989b) Biotin transport in the human intestine: inhibition by anticonvulsant drugs. *Am. J. Clin. Nutr.* 49, 127-131
- Said, H.M., Sharifian, A., Bagherzadeh, A., Mock, D. (1990b) Chronic ethanol feeding and acute ethanol exposure in vitro: effect on intestinal transport of biotin. *Am. J. Clin. Nutr.* 52, 1083-1086
- Saitoh, H., Kobayashi, M., Sugawara, M., Iseki, K., Miyazaki, K. (1992) Carrier-mediated transport system for choline and its related quaternary ammonium compounds on rat intestinal brush-border membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 1112, 153-160
- Satoh, H. (1998) Cardiac actions of taurine as a modulator of the ion channels. *Adv. Exp. Med. Biol.* 442, 121-128
- Satoh, H., Sperelakis, N. (1998) Review of some actions of taurine on ion channels of cardiac muscle cells and others. *Gen. Pharmac.* 30, 451-463
- Satsu, H., Watanabe, H., Arai, S., Shimizu, M. (1997) Characterization and regulation of taurine transport in Caco-2, human intestinal cells. *J. Biochem.* 121, 1082-1087

- Sawada, N., Takanaga, H., Matsuo, H., Naito, M., Tsuruo, T., Sawada, Y. (1999) Choline uptake by mouse brain capillary endothelial cells in culture. *J. Pharm. Pharmacol.* 51, 847-852
- Schiffer, R., Neis, M., Höller, D., Rodríguez, F., Geier, A., Gartung, C., Lammert, F., Dreuw, A., Zwadlo-Klarwasser, G., Merk, H., Jugert, F., Baron, J.M. (2003) Active influx transport is mediated by members of the organic anion transporting polypeptide family in human epidermal keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 120, 285-291
- Schnorr, O., Suschek, C.V., Kolb-Bachofen, V. (2003) The importance of cationic amino acid transporter expression in human skin. *J. Invest. Dermatol.* 120, 1016-1022
- Segal, I.S., Jarvis, D.J., Duncan, S.R., White, P.F., Maze, M. (1991) Clinical efficacy of oral-transdermal clonidine combinations during the perioperative period. *Anesthesiology* 74, 220-225
- Sen, C.K., Packer, L. (2000) Thiol homeostasis and supplements in physical exercise. *Am. J. Clin. Nutr.* 72, 653S-669S
- Seuwen, K., Pouyssegur, J. (1990) Serotonin as a growth factor. *Biochem. Pharmacol.* 39, 985-990
- Shen, S., Wertheimer, E., Sampson, S.R., Tennenbaum, T. (2000) Characterization of glucose transport system in keratinocytes: insulin and IGF-1 differentially affect specific transporters. *J. Invest. Dermatol.* 115, 949-954
- Shepro, D., Batbouta, J.C., Robblee, L.S., Carson, M.P., Belamarich, F.A. (1975) Serotonin transport by cultured bovine aortic endothelium. *Circ. Res.* 36, 799-806
- Shi, F., Bailey, C., Malick, A.W., Audus, K.L. (1993) Biotin uptake and transport across bovine brain microvessel endothelial cell monolayers. *Pharm. Res.* 10, 282-288
- Silbernagl, S., Despopoulos, A. (2003) *Taschenatlas der Physiologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Slominski, A., Pisarchik, A., Semak, I., Sweatman, T., Wortsman, J., Szczesniewski, A., Slugocki, G., McNulty, J., Kauser, S., Tobin, D.J., Jing, C., Johansson, O. (2002) Serotonergic and melatonergic systems are fully expressed in human skin. *FASEB J.* 16, 896-898
- Slominski, A., Pisarchik, A., Zbytek, B., Tobin, D.J., Kauser, S., Wortsman, J. (2003) Functional activity of serotonergic and melatonergic systems expressed in the skin. *J. Cell. Physiol.* 196, 144-153
- Smith, K.E., Borden, L.A., Wang, C.H., Hartig, P.R., Brancheck, T.A., Weinshank, R.L. (1992) Cloning and expression of a high affinity taurine transporter from rat brain. *Mol. Pharmacol.* 42, 563-569
- Sneddon, J.M. (1969) Sodium-dependent accumulation of 5-hydroxytryptamine by rat blood platelets. *Br. J. Pharmacol.* 37, 680-688
- Solis, J.M., Herranz, A.S., Herreras, O., Lerma, J., Martín del Río, R. (1988) Does taurine act as an osmoregulatory substance in the rat brain? *Neurosci. Lett.* 91, 53-58
- Spencer, R.P., Brody, K.R. (1964) Biotin transport by small intestine of rat, hamster, and other species. *Am. J. Physiol.* 206, 653-657

- Steffansen, B., Nielsen, C.U., Brodin, B., Eriksson, A.H., Andersen, R., Frokjaer, S. (2004) Intestinal solute carriers: an overview of trends and strategies for improving oral drug absorption. *Eur. J. Pharm. Sci.* 21, 3-16
- Steinert, P.M., Marekov, L.N. (1995) The proteins elafin, filaggrin, keratin intermediate filaments loricrin, and small proline-rich proteins 1 and 2 are isodipeptide cross-linked components of the human epidermal cornified cell envelope. *J. Biol. Chem.* 270, 17702-17711
- Stephenson, L.A., Kolka, M.A. (1990) Acetylcholinesterase inhibitor, pyridostigmine bromide, reduces skin blood flow in humans. *Am. J. Physiol.* 258, R951-R957
- Sweetman, L., Nyhan, W.L. (1986) Inheritable biotin-treatable disorders and associated phenomena. *Ann. Rev. Nutr.* 6, 317-343
- Sweiry, J.H., Yudilevich, D.L. (1985) Characterization of choline transport at maternal and fetal interfaces of the perfused guinea-pig placenta. *J. Physiol.* 366, 251-266
- Taber, K.H., Lin, C.T., Liu, J.W., Thalmann, R.H., Wu, J.Y. (1986) Taurine in hippocampus: localization and postsynaptic action. *Brain Res.* 386, 113-121
- Tahiliani, A.G., Beinlich, C.J. (1991) Pantothenic acid in health and disease. *Vitam. Horm.* 46, 165-228
- Tamai, I., Senmaru, M., Terasaki, T., Tsuji, A. (1995) Na<sup>+</sup>- and Cl<sup>-</sup>-dependent transport of taurine at the blood-brain barrier. *Biochem. Pharmacol.* 50, 1783-1793
- Tchoumkeu-Nzouessa, G.C., Rebel, G. (1996) Characterization of taurine transport in human glioma GL15 cell line: regulation by protein kinase C. *Neuropharmacology* 35, 37-44
- Thurston, J.H., Hauhart, R.E., Dirgo, J.A. (1980) Taurine: a role in osmotic regulation of mammalian brain and possible clinical significance. *Life Sci.* 26, 1561-1568
- Timbrell, J.A., Seabra, V., Waterfield, C.J. (1995) The in vivo and in vitro protective properties of taurine. *Gen. Pharmacol.* 26, 453-462
- Tsuji, A., Tamai, I. (1996) Carrier-mediated intestinal transport of drugs. *Pharm. Res.* 13, 963-977
- Uchida, S., Nakanishi, T., Kwon, H.M., Preston, A.S., Handler, J.S. (1991) Taurine behaves as an osmolyte in Madin-Darby canine kidney cells. Protection by polarized, regulated transport of taurine. *J. Clin. Invest.* 88, 656-662
- Uhde, T.W., Stein, M.B., Vittone, B.J., Siever, L.J., Boulenger, J.P., Klein, E., Mellman, T.A. (1989) Behavioral and physiologic effects of short-term and long-term administration of clonidine in panic disorder. *Arch. Gen. Psychiatry* 46, 170-177
- van der Aa, E.M., Wouterse, A.C., Peereboom-Stegeman, J.H., Russel, F.G. (1994) Uptake of choline into syncytial microvillus membrane vesicles of human term placenta. *Biochem. Pharmacol.* 47, 453-456
- Villalobos, A.R., Parmelee, J.T., Renfro, J.L. (1999) Choline uptake across the ventricular membrane of neonate rat choroid plexus. *Am. J. Physiol.* 276, C1288-C1296
- Warskulat, U., Wettstein, M., Häussinger, D. (1997) Osmoregulated taurine transport in H4IIE hepatoma cells and perfused rat liver. *Biochem. J.* 321, 683-690

- Watanabe, T. (1983) Teratogenic effects of biotin deficiency in mice. *J. Nutr.* 113, 574-581
- Weingarden, S.I., Belen, J.G. (1992) Clonidine transdermal system for treatment of spasticity in spinal cord injury. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 73, 876-877
- Wertz, P.W., Downing, D.T. (1982) Glycolipids in mammalian epidermis. structure and function in the water barrier. *Science* 217, 1261-1262
- Wertz, P.W., Madison, K.C., Downing, D.T. (1989a) Covalently bound lipids of human stratum corneum. *J. Invest. Dermatol.* 92, 109-111
- Wertz, P.W., Swartzendruber, D.C., Kitko, D.J., Madison, K.C., Downing, D.T. (1989b) The role of the corneocyte lipid envelopes in cohesion of the stratum corneum. *J. Invest. Dermatol.* 93, 169-172
- White, M.J., Heckler, F.R. (1990) Oxygen free radicals and wound healing. *Clin. Plast. Surg.* 17, 473-484
- Willems, E.W., Valdivia, L.F., Villalón, C.M., Saxena, P.R. (2003) Possible role of  $\alpha$ -adrenoceptor subtypes in acute migraine therapy. *Cephalalgia* 23, 245-257
- Williams, M.L., Elias, P.M. (1987) The extracellular matrix of stratum corneum: role of lipids in normal and pathological function. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 3, 95-122
- Wokalek, H. (1992) Die Haut. In: Niedner, R. (Hrsg.), Ziegenmeyer, J. (Hrsg.) *Dermatika*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart
- Wright, C.E., Tallan, H.H., Lin, Y.Y., Gaull, G.E. (1986) Taurine: biological update. *Ann. Rev. Biochem.* 55, 427-453
- Yang, C.Y., Dantzig, A.H., Pidgeon, C. (1999) Intestinal peptide transport systems and oral drug availability. *Pharm. Res.* 16, 1331-1343
- Zackheim, H.S. (1982) Taurine and diet in psoriasis. *Arch. Dermatol.* 118, 961
- Zeisel, S.H. (1992) Choline: an important nutrient in brain development, liver function and carcinogenesis. *J. Am. Coll. Nutr.* 11, 473-481
- Zeisel, S.H. (2000) Choline: an essential nutrient for humans. *Nutrition* 16, 669-671
- Zeisel, S.H., Blusztajn, J.K. (1994) Choline and human nutrition. *Annu. Rev. Nutr.* 14, 269-296
- Zempleni, J., Mock, D.M. (1998) Uptake and metabolism of biotin by human peripheral blood mononuclear cells. *Am. J. Physiol.* 275, C382-C388
- Zempleni, J., Mock, D.M. (1999) Mitogen-induced proliferation increases biotin uptake into human peripheral blood mononuclear cells. *Am. J. Physiol.* 276, C1079-C1084

## 10 Veröffentlichte Originalarbeiten

### 10.1 Transport of biotin in human keratinocytes

**Grafe, F.**, Wohlrab, W., Neubert, R.H., Brandsch, M.

*Journal of Investigative Dermatology* 120, 428-433, 2003

### 10.2 Functional characterization of sodium- and chloride-dependent taurine transport in human keratinocytes

**Grafe, F.**, Wohlrab, W., Neubert, R.H., Brandsch, M.

*European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 57, 337-341, 2004

### 10.3 Carrier-mediated transport of clonidine in human keratinocytes

**Grafe, F.**, Wohlrab, W., Neubert, R., Brandsch, M.

*European Journal of Pharmaceutical Sciences* 21, 309-312, 2004

### 10.4 Functional characterization of a high-affinity choline transport system in human keratinocytes

Hoffmann, K., **Grafe, F.**, Wohlrab, W., Neubert, R.H., Brandsch M.

*Journal of Investigative Dermatology* 119, 118-121, 2002

**DANKSAGUNG**

An dieser Stelle möchte ich Personen danken, die wesentlich zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt dabei Herrn PD Dr. habil. Matthias Brandsch für die Überlassung des interessanten Themas, seine ständige Hilfsbereitschaft und Ansprechbarkeit bei technischen und fachlichen Problemen.

Herrn Prof. Dr. habil. Reinhard Neubert und Herrn Prof. Dr. habil. Wolfgang Wohlrab danke ich für die zahlreichen Anregungen zum Thema sowie das stete Interesse am Fortgang der Arbeit.

Des weiteren möchte ich mich bei Frau Karin Hölsken, Frau Ilka Runkel und Frau Ingelore Hamann für die freundliche Unterstützung bei der Zellkultivierung bedanken.

Weiterhin möchte ich mich bei den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Membrantransport des Biozentrums und den Mitarbeitern der Arbeitsgruppen Biopharmazie und Technologie des Institutes für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie für die angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken.

Ich danke des weiteren der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des Graduiertenkollegs 134.

**LEBENS LAUF**

<b>Name</b>	Grafe
<b>Vorname</b>	Franziska
<b>Geburtsdatum, -ort</b>	16.08.1975, Halberstadt
<b>Eltern</b>	Dr. Reinhard Grafe; Claudia Grafe, geb. Rückwardt
<b>Familienstand</b>	ledig
<b>Anschrift</b>	Grüner Weg 42a, 06120 Halle/Saale
<b>Bildungsgang</b>	
<i>Schulbildung</i>	
September 1982 – Juli 1990	Marx-Engels-Oberschule Halberstadt
September 1990 – Juni 1994	Erweiterte Oberschule „Bertolt Brecht“ in Halberstadt und Käthe-Kollwitz-Gymnasium in Halberstadt
<i>Hochschulausbildung</i>	
Oktober 1994 – Oktober 1998	Studium der Pharmazie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (1. und 2. Pharmazeutisches Staatsexamen)
November 1998 – September 1999	Diplomarbeit „Entwicklung und Optimierung von Mikroemulsionen zur dermalen Applikation von Lokalanästhetika“
Oktober 1999 – März 2000	Praktikum in der „Lilien-Apotheke“ in Halle
April 2000	Hochschulabschluss
Mai 2000	Approbation als Apothekerin
<b>Berufliche Tätigkeiten</b>	
Juli 2000 – September 2003	Doktorandin am Biozentrum der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg und am Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie, Fachbereich Pharmazie, Stipendiatin des Graduiertenkollegs „Transport von Wirkstoffen in biologischen Systemen“ an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Betreuer: PD Dr. M. Brandsch und Prof. Dr. R. Neubert
Seit Oktober 2003	<b>Apothekerin in der „Apotheke am Gimritzer Damm“ Halle</b>
Halle, den 15. März 2004	

**EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literaturquellen angefertigt habe.

Die aus anderen Quellen übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Die vorliegende Arbeit wurde noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Halle, den 15. März 2004

Franziska Grafe