

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie  
der Universität Würzburg, Lehrstuhl I  
Vorstand: Prof. Dr. med. H. Koepsell

---

**INTERAKTION DER TRIPHENYLMETHANFARBSTOFFE  
GENTIANAVIOLETT UND BRILLANTGRÜN  
MIT ORGANISCHEN KATIONENTRANSPORTERN**

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von  
Florian Hellmut Zapf  
aus Münster

Würzburg, im Dezember 2008

**Referent:** Prof. Dr. Hermann Koepsell

**Koreferent:** Priv.-Doz. Dr. Frank Döring

**Dekan:** Prof. Dr. Matthias Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung:** 31. März 2009

**Der Promovend ist Arzt.**

# Inhaltsverzeichnis

## 1 Einleitung

1.1	Einführung	1
1.2	Die Triphenylmethanfarbstoffe Gentianaviolett und Brillantgrün	2
1.3	Die organischen Kationentransporter (OCT)	7
1.4	An der Wundheilung beteiligte Vorgänge	12
1.5	Fragestellungen dieser Arbeit	14

## 2 Material und Methode

2.1	Transportmessungen mit CHO-Zellen	15
2.2	Statistik und Versuchsauswertung der Transportmessungen	17
2.3	Elektrophysiologische Messungen mit <i>Xenopus laevis</i> Oozyten	18
2.3.1	cRNA-Synthese	19
2.3.2	Gewinnung der <i>Xenopus laevis</i> Oozyten	20
2.3.3	Mikroinjektion der cRNA und Expression des hOCT2	21
2.3.4	Elektrophysiologische Messungen nach der TEVC-Methode	23
2.4	Spektralphotometrische Messungen mit CHO-Zellen	25
2.5	Migrationsmessungen mit menschlichen Keratinozyten	28

## 3 Ergebnisse

3.1	Transportkinetiken: Hemmung von hOCT1, hOCT2 und hOCT3 durch Gentianaviolett und Brillantgrün	30
-----	---	----

3.2	Elektrophysiologie: Untersuchung eines Transportes von Gentianaviolett und Brillantgrün durch die hOCT	39
3.3	Spektral-Photometrie: Untersuchung auf intrazellulären Farbstoff	43
3.4	Migrationsmessungen: Effekte von hOCT-Inhibitoren auf menschliche Keratinozyten in vitro	46
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	
4.1	Die Interaktion von Gentianaviolett und Brillantgrün mit den hOCT	52
4.2	Klinische Relevanz	55
4.3	Vergleich der hemmenden Wirkung von Gentianaviolett und Brillantgrün mit bekannten Inhibitoren der hOCT	59
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	64
<b>6</b>	<b>Anhang</b>	
6.1	mathematische Herleitung der Formel zur Farbstoffberechnung in den Photometrieversuchen	66
6.2	verwendete Substanzen, Hilfsmittel und Geräte	68
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	71

# 1 Einleitung

## 1.1 Einführung

Eine wesentliche Aufgabe der modernen Medizin ist die Prävention und Behandlung von bakteriellen Infektionen.

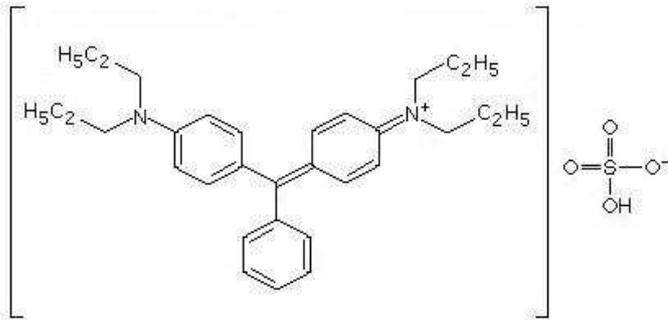
Wichtige Eintrittspforten, von denen aus sich Erreger im Körper septisch ausbreiten können, stellen Verletzungen der äußeren Haut und Schleimhäute dar. Daher wird neben einer systemischen Gabe von Antibiotika zur Prävention oder Bekämpfung einer Sepsis nach Möglichkeit immer auch eine Lokalbehandlung der Wunde zur Keimreduktion durchgeführt. Hierzu finden topisch aufgetragene Pharmazeutika wie Antibiotika-enthaltende Salben, desinfizierende Mittel auf Alkoholbasis oder andere antiinfektiös wirkenden Tinkturen ihre Anwendung. Zu den letzteren gehören auch Farbstoffe, die in diesem Rahmen die älteste dafür gebräuchliche Stoffgruppe darstellen und seit über einem Jahrhundert vor allem in der Dermatologie, Gynäkologie und Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde in Gebrauch sind. Trotz eines größeren Nebenwirkungsprofils, als man es bei modernen Lokalthérapeutika findet, haben bestimmte Farbstoffe auch heutzutage noch ihre Berechtigung und erweisen sich gerade in der Behandlung multiresistenter Keime als wirkungsvolle Alternative.

## 1.2 Die Triphenylmethanfarbstoffe Gentianaviolett und Brillantgrün

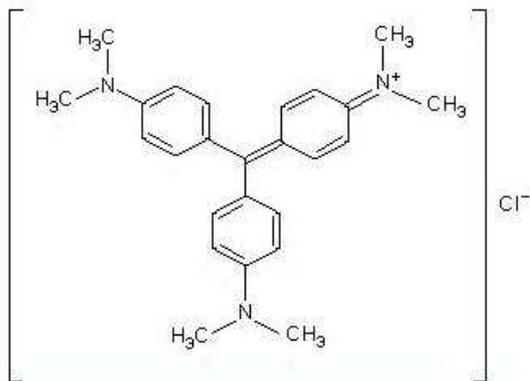
Gentianaviolett (Synonyme: Hexamethylpararosanilinium, Kristallviolett) und Brillantgrün (Synonyme: Malachitgrün G, Diamantgrün G, Smaragdgrün) gehören in die Gruppe der Triphenylmethanfarbstoffe. Charakteristisch für den formalchemischen Aufbau dieser Substanzen sind drei aromatische Systeme, die über ein zentrales C-Atom verbunden sind (Abb. 1.2.1). Die Farbstoffe liegen in wässriger Lösung als einfach positiv geladene Kationen vor.

Der antiinfektiöse Wirkmechanismus der Triphenylmethanfarbstoffe wurde in der Literatur häufig diskutiert, ist aber bis heute nicht restlos aufgeklärt. Paetzold begründet den bakteriziden Effekt mit der Störung des Fließgleichgewichtes in der Atmungskette der Bakterien (Paetzold, 1966a/1966b; Paetzold, 1972). Fry wies für Gentianaviolett und Brillantgrün eine Unterbrechung der Synthese von Glutamin-Vorläufern nach (Fry, 1957). Auf Grund eines erhöhten Anfallens von Uridindiphosphaten in Bakterienzellen unter Therapie mit Triphenylmethanfarbstoffen wird des Weiteren eine Blockade des Aufbaus der Zellwand vermutet (Park, 1954; Norrby et Mobacken, 1972). Nicht zuletzt wurde bei Gentianaviolett auch eine Bindung des Farbstoffes an die DNA von Bakterien nachgewiesen (Rostock, 1950; Noeske, 1966; Rosenkranz et Carr, 1971).

Auch wenn nicht sicher ist, welcher Mechanismus hier vorrangig eine Rolle spielt, so verleihen doch alle zusammen Gentianaviolett und Brillantgrün bakterio-statische, bakterizide und fungizide Eigenschaften, die konzentrations- und pH-abhängig sind (Bakker et Doorne, 1992).



**A**



**B**

Abb. 1.2.1: chemische Strukturformeln von Gentianaviolett und Brillantgrün:  
 Die Abbildung zeigt die beiden Farbstoffe Brillantgrün (A) und Gentianaviolett (B) in ihrem formalchemischen Aufbau als typische Vertreter der Triphenylmethanfarbstoffe. Charakteristisch sind drei aromatische Systeme, die über ein zentrales C-Atom verbunden sind

John W. Churchman war der Erste, der 1912 die Wirkung des Farbstoffes Gentianaviolett auf Mikroorganismen näher untersucht und beschrieben hat. Obwohl vorangegangene Experimente bereits auf eine antimikrobielle Wirkung von Gentianaviolett hindeuteten (Drigalski et Conradi, 1902), wurden erst von ihm bakteriostatische und bakterizide Effekte auf grampositive und gramnegative Bakterien nachgewiesen (Churchman, 1912). Zwei Jahre später zeigten weitere Versuche, dass mit Gentianaviolett inkubierte Gewebezellen von Tieren *in vitro* bei Farbstoffkonzentrationen wachsen konnten, die für Bakterien tödlich waren (Russel, 1914). Die Erkenntnis, dass lebendes Gewebe eine größere Widerstandskraft gegen den Farbstoff besitzt als die für das Gewebe pathogenen Keime, führte während des letzten Jahrhunderts zu einer

breiten Anwendung von Farbstoffen wie Gentianaviolett und Brillantgrün in der lokalen Infektionsbehandlung (Baumann, 1923; Castellani, 1929; Aldrich, 1933; Ryrie, 1933; Florance, 1936; Schönfeld, 1950; Sykes, 1965; Korting, 1981).

Allerdings wurde die Behandlung mit Gentianaviolett von Beginn an auch kritisch betrachtet. Tierversuche zeigten, dass eine intravenöse Gabe von Gentianaviolett schon in geringen Dosen toxisch für den Organismus war, so dass von dieser Applikationsform am Menschen abgeraten wurde (Anderson et al., 1934). Auch bei Anwendung auf der äußeren Haut zeigten sich Nebenwirkungen. So traten bei in vitro und klinisch durchgeführten Versuchen an tierischen und menschlichen Zellen gelegentlich Wundheilungsstörungen, Kontaktallergien und in seltenen Fällen Nekrosen auf (Neufeld et al., 1920; Lambert et Meyer, 1925/26; German, 1929; Welch et Brewer, 1942; Bielicky et Novak, 1969; Björnberg et Mobacken, 1972; Niedner et Schöpf, 1986; Shehade et Foulds, 1986). Auch eine mögliche Kanzerogenität wurde untersucht (Kada et al., 1972; Au et al., 1978/1979; Thomas et MacPhee, 1984), wobei sich zeigte, dass Gentianaviolett zwar eine mutagene Wirkung auf das bakterielle Erbgut besitzt (Höger, 1998), seine kanzerogene Potenz beim Menschen jedoch wenig ausgeprägt zu sein scheint (Niedner et Pfister-Wartha, 1990).

Der Einsatz von Gentianaviolett wird daher bis heute kontrovers diskutiert. Neben den beschriebenen Nebenwirkungen kommt es bei der Verwendung des Farbstoffes auf Grund der unvermeidlichen Hautverfärbungen auch zu einer erschwerten Wundbeobachtung sowie zu hohen Reinigungskosten für verschmutzte Bettwäsche und Kleidung, die mit den Farbstoffen in Kontakt kommen. Auch wurde ein häufiges Austrocknen der Wunde von vielen als ein Verstoß gegen die, in der Pflege gelehrt, Grundsätze der feuchten Wundbehandlung gesehen (aus: „Wundmanagement“).

Heute sind besser verträgliche Antiseptika auf dem Markt, die Gentianaviolett aus den meisten Indikationen verdrängt haben. So wurde das ursprünglich weit reichende Einsatzgebiet bei allen möglichen Formen der Haut- und Schleimhauterkrankungen und -infektionen in Deutschland auf problematische

Pilzinfektionen (Mykosen) der Haut, nässende superinfizierte Ekzeme und oberflächliche Pyodermien beschränkt (Niedner et Pfister-Wartha, 1990; Höger, 1998; Gloor et Wolnicki, 2001).

Trotzdem gewinnt Gentianaviolett in jüngster Zeit wieder mehr an Bedeutung. So erweist es sich zum Beispiel in der Behandlung des atopischen Ekzems, bei dessen Pathophysiologie die Besiedelung mit *Staphylokokkus aureus* eine Rolle zu spielen scheint, dank seines grampositiven Wirkspektrums als äußerst effektiv (Brockow et al., 1999). In der Behandlung der irritativen Kontaktdermatitis konnte ein lindernder Effekt von Gentianaviolett auf die Symptomatik gezeigt werden (Gloor et Wolnicki, 2001). Auf Grund der billigen Anschaffungskosten, der leichten Herstellung und Handhabung sowie der physikalischen und chemischen Stabilität unter extremen Lagerungsbedingungen wird Gentianaviolett auch gerne in Entwicklungsländern bei der Behandlung chronisch entzündeter Wunden und der Prävention tropischer Ulzera verwendet (Bakker et Doorne, 1992; Schmeller, 1998).

Darüber hinaus zeigen viele der modernen Antibiotika in der topischen Behandlung von Wunden, die mit multiresistenten Erregern wie beispielsweise Methicillin-(Oxacillin-)resistenten-Staphylokokken (MRSA/ORSA) infiziert sind, keine Wirkung mehr. Da trotz der Anwendung von Gentianaviolett seit nunmehr rund 100 Jahren Resistenzen der Mikroorganismen gegen den Farbstoff nicht beschrieben wurden (Möhlenbeck, 1970; Gloor et Wolnicki, 2001), bietet sich Gentianaviolett als Alternative in der Lokalbehandlung an. Nach ersten Publikationen bereits in den 70er Jahren gab es in jüngster Zeit erneute Studien, in denen die Wirksamkeit dieses Farbstoffes bei der Behandlung von mit MRSA und multiresistenten Pseudomonaden besiedelten Wunden gezeigt wurde (Möhlenbeck, 1970; Saji et al., 1995; Okano et al., 2000).

Ein weiterer Vertreter der Triphenylmethanfarbstoffe ist das Brillantgrün. Brillantgrün wurde wie Gentianaviolett Jahrzehnte lang als topisches Antiseptikum eingesetzt und fand in der Chirurgie, Dermatologie und Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde seine Anwendung (Browning et al., 1917; Narat, 1931). Problematisch war die hohe Konzentration des Brillantgrüns, in der es

verwendet werden musste, um klinisch Wirksamkeit zu zeigen. So belegten Studien, dass es einer weitaus höheren Dosierung des Brillantgrüns im Vergleich zu Gentianaviolett bedurfte, um denselben antiinfektiösen Effekt zu erzielen (Fry, 1957). Damit war gleichzeitig eine größere Nebenwirkungsrate verbunden. So traten allergische Reaktionen und Wundheilungsstörungen häufiger und in einem klinisch stärkeren Ausmaß auf (Bielicky et Novak, 1969; Shehade et Foulds, 1986). Aus diesem Grund hat Brillantgrün heute keine klinische Relevanz mehr. Es wird aber weiterhin in der Labormedizin als beispielhafte antiinfektiöse Substanz zur Identifikation und Eradizierung von Keimen eingesetzt und spielt beispielsweise im Rahmen neuer therapeutischer Ansätze in der Krebsforschung eine wichtige Rolle (Poisson, 1992; Bufler et al., 2001; Perry et al., 2006; Ossadnik et al., 2007).

Die Sicherung der pharmazeutischen Qualität war ein großes Problem bei der Herstellung der Triphenylmethanfarbstoffe. Untersuchungen konnten zeigen, dass es synthesebedingt beispielsweise zu einer Verunreinigung mit Schwermetallen kommen kann (Ali et Albert, 1988). Viele der, bei der Anwendung am Menschen beobachteten, Nebenwirkungen können auf solche Verunreinigungen zurückgeführt werden. Deswegen muss heutzutage aus pharmazeutischer Sicht der Frage, ob die Anwendung eines Medikamentes pharmakologisch-toxikologisch vertretbar ist, primär die Bestätigung vorausgehen, dass das Medikament pharmazeutisch einwandfrei hergestellt werden kann. Anhand dieses Kriteriums werden in Deutschland vertriebene Arzneimittel ständig von der Bundesvereinigung Deutscher Apothekerverbände (ABDA) kontrolliert, und es werden an die Apotheken Empfehlungen zu Herstellung und Vertrieb in Form des Neuen Rezeptur-Formulariums (NRF) ausgegeben. Durch die Einhaltung dieser Empfehlungen weisen die heute hergestellten und verwendeten Gentianaviolett-Tinkturen höchste Reinheitsgrade auf. Brillantgrün wurde 1996 aus dem NRF gestrichen, da die Sicherung der pharmazeutischen Qualität bei der Herstellung des Farbstoffes nicht gewährleistet werden konnte.

Da toxische Effekte auch von der verwendeten Konzentration abhängig sind,

wird in dem NRF für Gentianaviolett (NRF 11.69.) eine Maximalkonzentration von 0,5% für kleine Wunden und 0,1% für größere Hautdefekte und Ulzera empfohlen.

### 1.3 Die organischen Kationentransporter (OCT)

Die Zellen des menschlichen Körpers müssen zur Aufrechterhaltung ihrer physiologischen Funktionen permanent organische und anorganische Substanzen aufnehmen und Zellprodukte und Abfallstoffe ausschleusen. Während lipophile Moleküle durch die Zellmembranen diffundieren können, sind positiv (Kationen) und negativ (Anionen) geladene und damit hydrophile Substanzen auf einen Transport durch diese Schranke angewiesen. Zu einem solchen Transport von Kationen sind beim Menschen zum Beispiel die organischen Kationentransporter (human organic cation transporter = hOCT) imstande.

Die Translokation eines Substrates durch Transportproteine erfolgt durch Bindung des Moleküls an den Transporter auf der einen Seite der Zellmembran und Lösen des Moleküls von dem Transporter auf der anderen. Einige der Transporter akzeptieren dabei nur ein Substrat bestimmter Spezifität oder Substratgruppen, die diesem sehr ähnlich sind (oligospezifische Transporter), andere transportieren eine Vielfalt strukturell unterschiedlicher Moleküle mit unterschiedlichen Spezifikationen (polyspezifische Transporter). Die hOCT gehören zu den polyspezifischen Transportern (Koepsell et Endou, 2004).

Obwohl schon 1947 erstmals ein organischer Kationentransporter (OCT) an der Niere in der Literatur genannt wurde (Sperber, 1947), wurde 1994 als erster OCT der rOCT1 der Ratte in der Arbeitsgruppe von H. Koepsell kloniert und beschrieben (Gründemann et al., 1994). Seitdem stieß man durch Homologie-Screening auf immer neue Transportproteine, zu denen auch die hOCT des Menschen gehören. Auf Basis dieser Sequenz-Homologie erhielten diese Transporter von dem Human Genome Nomenclature Committee (HGNC) ihren

offiziellen Namen „solute-carrier-22“ (SLC22). Der SLC22-Familie werden neben den OCT auch eine Vielzahl anderer Transportproteine zugeordnet, die Anionen (OAT) oder Zwitterionen wie das Carnitin (OCTN2, CT2) transportieren. Die große übergeordnete Familie wird als Major Facilitator Family (MFS) bezeichnet.

Als erste Vertreter der im Menschen exprimierten OCT wurden 1997 der hOCT1 und hOCT2 charakterisiert und kloniert (Gorboulev et al., 1997; Zhang et al., 1997). Ein Jahr später folgte die Erstbeschreibung des hOCT3, eines Transporters, der vor seiner Charakterisierung bereits als hEMT (human extraneuronal monoamine transporter) beziehungsweise als uptake<sub>2</sub>-Transporter bekannt war (Bönisch, 1980; Gründemann et al., 1998; Wu et al., 1998).

Seit der Entdeckung der OCT wurden viele grundlegende Studien zu ihrem molekularen Aufbau, ihrer Struktur oder ihrer physiologischen Rolle durchgeführt (Koepsell et al., 2003; Koepsell et al., 2007). Die wissenschaftlichen Erkenntnisse wurden dabei nicht nur aus Versuchen mit den menschlichen hOCT sondern auch mit den Transportern anderer Spezies wie beispielsweise denen der Ratte (rOCT) gewonnen.

So werden fortlaufend Medikamente und körpereigene (endogene) Substanzen in Transport- und Hemmstudien getestet. Dies führte zu der Charakterisierung von bisher über 70 Substraten und Inhibitoren der OCT (für eine tabellarische Auflistung aller Substanzen vgl. Koepsell et al., 2007).

Anhand der Ergebnisse aus diesen Versuchen stellte man fest, dass die grundlegenden Transportcharakteristika des OCT1, OCT2 und OCT3 trotz der molekularen Unterschiede der Transporter bei verschiedenen Spezies einander sehr ähnlich sind. Beispielsweise ist eine Molekülgröße von unter 4 Å und ein relatives Molekulargewicht von unter 500 bei den meisten der transportierten Substanzen zu finden. Der Transport ist elektrogener Natur, das heisst, dass positive Ladung transportiert wird, und er ist von einem Na<sup>+</sup>- beziehungsweise einem Protonen-Gradienten als unabhängig anzusehen. Die OCT sind in der

Lage, Substrate in beide Richtungen über die Zellmembran, also von extrazellulär intrazellulär und umgekehrt zu transportieren. Dabei sind die Affinitäten der Substrate und Hemmstoffe zu den einzelnen Transportern häufig sehr unterschiedlich und können sich auch in Abhängigkeit der Transportrichtung unterscheiden (Koepsell et al., 2003; Koepsell et al., 2007).

Untersuchungen zum Aufbau der OCT zeigten, dass allen Transportern der SLC22-Familie zwölf, die Zellmembran durchspannende,  $\alpha$ -Helices (Transmembrandomänen) gemeinsam sind. Auch besitzen alle einen intrazellulären C- und N-Terminus, eine große extrazelluläre Schleife zwischen der ersten und zweiten Transmembrandomäne (TMD) sowie eine weitere intrazelluläre Schleife zwischen TMD6 und TMD7 (Koepsell et al., 2007).

Aktuell beschäftigt sich die Forschung mit der Struktur der Substratbindungsstelle. Eine genaue Analyse dieser Oberflächenstrukturen würde nicht nur zu einem besseren Verständnis von Wirkungen und Nebenwirkungen einzelner Medikamente beitragen. Auch die Entwicklung von speziellen Arzneimitteln wäre denkbar, die spezifisch für die Interaktion mit den OCT geschaffen wären, beziehungsweise verwendet werden könnten, ohne OCT-spezifische Nebenwirkungen zu verursachen. In unserer Arbeitsgruppe wurden mehrere der an der Bindung beteiligten Aminosäuren identifiziert und ihre Anordnung und damit die dreidimensionale Darstellung der Oberfläche der Substratbindungsstelle diskutiert (Gorboulev et al., 2005; Popp et al., 2005; Sturm et al., 2007).

Für das Verständnis der Funktionsweise der OCT im Menschen ist die genaue Kenntnis ihrer Verteilung im Körper notwendig. So sind die Transporter bisher in einer Vielzahl von Organen und Gewebestrukturen in unterschiedlicher Expressionsstärke nachgewiesen worden.

Der hOCT1 wird besonders in der Leber exprimiert, jedoch findet man ihn auch in Neuronen oder einer Vielzahl von Organen wie Milz, Darm, Plazenta und Niere (Gorboulev et al., 1997; Koepsell, 1998; Zhang et al., 1997; Alcorn et al., 2002; Hayer-Zillgen et al., 2002; Lips et al., 2005; Müller et al., 2005; Lips et al., 2007). Der hOCT2 zeigt eine höhere Gewebsspezifität. Er ist im Vergleich zum

hOCT1 weitaus stärker in dem proximalen Tubulus der Niere präsent. Daneben findet man ihn auch in Plazentazellen, Neuronen sowie dem Plexus choroideus oder den epithelialen Zellen der Atemwege (Gorboulev et al., 1997; Busch et al., 1998; Sweet et al., 2001; Motohashi et al., 2002; Lips et al., 2005). Der hOCT3 weist dagegen eher eine ubiquitäre Verteilung im menschlichen Körper auf. Eine starke Expression dieses Transporters ist vor allem in Leber, Skelett- und Herzmuskel sowie Plazenta gegeben. Des Weiteren wird er aber auch in der Niere, Blutgefäßen und Hirn sowie in vielen anderen Organen exprimiert (Gründemann et al., 1998; Wu et al., 1998; Wu et al., 2000; Wessler et al., 2001; Kummer et al., 2006; Müller et al., 2005; Alcorn et al., 2002; Hayer-Zillgen et al., 2002; Sata et al., 2005).

Alle drei hOCT sind darüber hinaus auch in der menschlichen Haut zu finden. Jüngste Studien unserer Arbeitsgruppe (Lips et al., nicht publizierte Daten) lieferten den Nachweis der drei OCT-Subtypen in der Haut von Mensch und Ratte. Die Verteilung der Transporter in den einzelnen Hautschichten konnte an Hand von Immunofluoreszenz-Messungen gezeigt werden, in denen die OCT mit Hilfe von spezifischen Antikörpern markiert wurden. Während sich so in der Haut der Ratte die Epithelzellen aller Hautschichten mit den 3 anti-rOCT-Antikörpern in der Immunofluoreszenz in gleichem Maße anfärben ließen, zeigte sich beim Menschen bei Verwendung der 3 anti-hOCT-Antikörper eine differenziertere Verteilung: die Expression des hOCT1 war zwar ebenfalls in allen epidermalen Schichten gleich stark, hOCT2 und hOCT3 waren dagegen hauptsächlich in den Basalzellen der Oberhaut lokalisiert. Darüber hinaus konnte der hOCT3 auch in den glatten Muskelzellen der subkutanen Blutgefäße nachgewiesen werden.

Zu den physiologischen Aufgaben der Transporter gehören neben der Aufnahme und Verteilung von kationischen Medikamenten in die einzelnen Organe des Körpers auch die renale und biliäre Ausscheidung von Kationen oder die Vermittlung von Informationen zwischen den Zellen mit Hilfe des An- und Abtransportes von Neurotransmittern.

So ist beispielsweise der hOCT3 in der luminalen Membran der Enterozyten zu

finden und übernimmt dort die zelluläre Aufnahme von organischen Kationen aus der Nahrung oder aus Medikamenten aus dem Darmlumen. Der hOCT1, der in der basolateralen Zellmembran lokalisiert ist, schleust die aufgenommenen Kationen auf der gegenüberliegenden Seite der Enterozyten wieder aus und sorgt damit für die Aufnahme der Kationen in den Körper (Müller et al., 2005; Kim and Shim, 2006). Auch die Sezernierung von Kationen aus dem Körper kann über die Enterozyten erfolgen und nutzt dazu den umgekehrten Weg, wobei hier jedoch auch weitere Transporter der SLC22-Familie wie der OCTN1 und OCTN2 eine Rolle spielen (Koepsell et al., 2007).

Eine grosse Rolle spielen die hOCT bei der Ausscheidung von Kationen über die Niere. So ist zum Beispiel für das Antidiabetikum Metformin und das Chemotherapeutikum Cisplatin die renale Sekretion über den hOCT2 und hOCT3 an den proximalen Tubuluszellen der Niere nachgewiesen worden (Dresser et al., 2002; Ciarimboli et al., 2005). Takeda et al. beschreiben die renale Ausscheidung der Virustatika Aciclovir und Ganciclovir über den hOCT1 (Takeda et al., 2002).

Weiterhin vermitteln die hOCT aber auch den endogenen Transport von Monoamin-Neurotransmittern wie dem Cholin, Acetylcholin, Dopamin, Serotonin und Histamin (Busch et al., 1998; Koepsell, 1998; Gründemann et al., 1999; Gorboulev et al., 1997; Koepsell et al., 2003). Der Freisetzung von Acetylcholin (ACh) über den hOCT2 in den Atemwegen wird eine grosse Rolle bei der Zellproliferation und Regeneration des respiratorischen Epithels zugesprochen und sie soll die mukoziliäre Clearance unterstützen (Lips et al., 2005). Die Aufgabe der hOCT bei der para- und autokrinen Sezernierung von ACh in den Keratinozyten der Haut wurde ebenfalls untersucht (Lips et al., nicht publizierte Daten) und soll unter Anderem in dieser Arbeit diskutiert werden.

Daneben gibt es auch Arzneimittel, die die hOCT hemmen und es stellt sich die Frage, ob es nicht bedingt durch diese Hemmung zu Nebenwirkungen im Körper kommen kann. Beispielhaft genannt sei das beim Asthma bronchiale inhalativ verwendete Glukokortikoid Budesonid, dessen inhibitorische Wirkung auf die OCT und ihren ACh-Transport im Bronchialepithel nachgewiesen wurde und das deswegen unter Verdacht steht, die Regeneration der Epithelzellen zu

stören (Lips et al., 2005).

Daher soll in dieser Arbeit auch untersucht werden, ob Gentianaviolett und Brillantgrün eventuell einen hemmenden Einfluss auf die OCT haben könnten, der ihre Nebenwirkungen erklärt.

Somit lässt sich zusammenfassend feststellen, dass die hOCT in verschiedenen Organen des Körpers exprimiert werden und mit Kationen aus Medikamenten oder Nahrung genauso wie mit körpereigenen Substanzen interagieren. Diese Interaktion resultiert entweder in dem Transport der Kationen über die Zellmembran oder in der Hemmung der Transportfunktion der hOCT. Aus diese Art und Weise können kationische Substanzen sowohl ihre erwünschte Wirkung entfalten, als auch Nebenwirkungen bei ihrer Anwendung am Menschen hervorrufen.

Gerade in dem Kontext einer lokalen Anwendung von Gentianaviolett und Brillantgrün auf die menschliche Haut und der darin exprimierten hOCT soll deswegen im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob die in der Literatur beobachteten Nebenwirkungen auf eine Beeinflussung der hOCT durch die Farbstoffe zurückgeführt werden können.

#### 1.4 An der Wundheilung beteiligte Vorgänge

Werden bei einer Verletzung der Epidermis Zell-Zell-Kontakte zerstört („Wunde“), so ist der Körper bestrebt, einen möglichst schnellen Wundverschluss zu erreichen, um einen Blutverlust zu minimieren und das Eindringen von Keimen zu vermeiden. Zu diesem Ziel werden die der Wunde anliegenden Keratinozyten einem Aktivierungsprozess unterzogen. Es erfolgt eine Änderung des Genexpressionsprofils und eine Differenzierung der Zellen, so dass letztlich durch die Proliferation der Keratinozyten eine Reepithelialisierung der Haut ermöglicht wird (Storim et al., 2001). Bei diesen Vorgängen spielt autokrin und parakrin sezerniertes, nicht-neuronales,

epitheliales Acetylcholin eine große Rolle. Acetylcholin steuert unter anderem die Regulationsmechanismen bei der Differenzierung der Keratinozyten im Stratum basale (Grando et al., 1993a; Grando et al., 1993b; Grando et al., 1995; Grando et al., 1996; Klapproth et al., 1997; Wessler et al., 1998; Lips et al., 2005).

Pharmazeutische Massnahmen bei der Wundversorgung sollten darauf abzielen, den Körper in seinem Heilungsprozess zu unterstützen. Findet daher eine prophylaktische oder kurative Behandlung mit einem topischen Arzneimittel statt, so sollte die Reepithelialisierung der Wunde durch das Topikum nicht negativ beeinflusst werden. Diese Forderung wird bei Verwendung von Gentianaviolett offensichtlich nicht durchgehend erfüllt, da in der Literatur Wundheilungsstörungen bei dem Einsatz dieses Farbstoffes auf der Haut beschrieben wurden (Neufeld et al., 1920; Lambert et Meyer, 1925/26; German, 1929; Welch et Brewer, 1942; Bielicky et Novak, 1969; Björnberg et Mobacken, 1972; Niedner et Schöpf, 1986; Shehade et Foulds, 1986) und es stellt sich die Frage, worin die Ursache für diese Wundheilungsstörungen liegt.

Wie bereits erwähnt zeigten Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe, dass die Keratinozyten auch zu den Zellen gehören, in denen die hOCT exprimiert werden (Lips et al., nicht publizierte Daten). Des Weiteren ist bekannt, dass der hOCT1 und hOCT2 Acetylcholin transportieren (Lips et al., 2005). Wenn also die Farbstoffe Gentianaviolett und Brillantgrün einen Einfluss auf die Funktionsfähigkeit dieser Membrantransporter nehmen sollten (vgl. auch Abschnitt 1.3), so wäre zu überlegen, ob dies möglicherweise eine Störung des Acetylcholin-Transportes zur Folge haben kann und ob es dadurch zu den beobachteten Wundheilungsstörungen kommt.

## 1.5 Fragestellungen dieser Arbeit

Auf Basis des aktuellen Wissenstandes über die hOCT und den klinischen Beobachtungen bei Verwendung der Triphenylmethanfarbstoffe sollen deswegen folgende Fragestellungen in dieser Arbeit untersucht werden:

- 1.) Können Gentianaviolett und Brillantgrün die organischen Kationentransporter des Menschen (hOCT1-3) hemmen oder haben sie keinen Einfluss auf ihre Funktion?
- 2.) Findet ein Transport der Farbstoffe durch die hOCT statt, nehmen also mit Gentianaviolett und Brillantgrün inkubierte Zellen die Farbstoffe in ihr Zellinneres auf? Lässt sich eine mögliche Aufnahme der Farbstoffe durch evaluierte Inhibitoren der hOCT beeinflussen?
- 3.) Sind unter Einfluss von Gentianaviolett und Brillantgrün Effekte auf menschliche Keratinozyten in vitro zu beobachten und lassen sich daraus Rückschlüsse auf die beobachteten Wundheilungsstörungen der Haut bei Therapie mit diesen Farbstoffen ziehen? Stehen diese Wundheilungsstörungen in Zusammenhang mit einem Einfluss der Farbstoffe auf den Acetylcholin-Transport der hOCT der Keratinozyten oder spielen hier andere Vorgänge eine Rolle?

## 2 Material und Methode

### 2.1 Transportmessungen mit CHO-Zellen

Die folgende Versuchsanordnung diente der Messung des Transportes eines radioaktiv markierten Referenzstoffes durch die humanen organischen Kationentransportern (hOCT). Dabei wurden Zellen, die die hOCT exprimieren, dem Einfluss der beiden Farbstoffe Gentianaviolett und Brillantgrün ausgesetzt, um festzustellen, ob von den Farbstoffen eine Hemmwirkung auf die hOCT ausgeht.

Chinese hamster ovary (CHO) Zellen der Zelllinie CHO-K1 wurden von der American Tissue Culture Collection (ATCC) bezogen und sowohl mit dem hOCT1, hOCT2 und hOCT3, als auch mit dem Leervektor transfiziert (Lips et al., 2005).

Die Zellen wurden mit HAMs Medium (F-12 Nutrient Mixture + L-Glutamin), dem 10% fetales Kälber Serum (FCS) und 50mg/ml Hygromycin zugesetzt war, inkubiert, vermehrt und in Kulturflaschen ausgesät. Bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre im Brutschrank wurde die Entwicklung eines Monolayers (= konfluentes Wachstum) abgewartet. Dann wurden die aus der 10. bis 20. Passage stammenden Zellen mit Phosphat gepufferter Salzlösung (Phosphate Buffered Saline = PBS) gewaschen und mit einer PBS-Lösung, die 0,02% EDTA (Ethyldiamintetraacetat) 10mM HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-ethansulfonsäure) und 28mM NaHCO<sub>3</sub> (Natriumhydrogencarbonat) enthielt („Ablöse-PBS“), von dem Boden der Kulturflaschen abgelöst. Nach Zentrifugation bei 1.000g für 10 Minuten wurde das entstandene Zellen-Pellet in 37°C warmem PBS gelöst.

Anschließend erfolgte die Inkubation der Zellen mit den Kontroll- und Messlösungen. Mit 1mg/ml Albumin (BSA = bovines Serum Albumin) angereichertes PBS bildete dabei die Grundlage für die in den Versuchen

verwendeten Lösungen. Um die Transportlösung herzustellen, wurden zusätzlich 0,12µM [<sup>3</sup>H]1-methyl-4-phenylpyridinium ([<sup>3</sup>H]MPP) und 0,88µM nicht radioaktiv markiertes MPP zugesetzt. Die Messung mit dieser Lösung ergab die Positivkontrolle, also ein Maß für die Aufnahme von [<sup>3</sup>H]MPP über die organischen Kationentransporter in die Zellen (Gorboulev et al., 1997, Zhang et al., 1997, Zhang et al., 1998, Wu et al., 2000). Die Hemmlösungen mit Gentianaviolett und Brillantgrün bestanden aus der Transportlösung und dem, in destilliertem Wasser gelösten, Farbstoff. Für die Hemmkinetiken wurden jeweils 8 Lösungen mit aufsteigenden Farbstoffkonzentrationen von 0,00025µM – 25µM angesetzt (vgl. Tab. 2.1.1). Als Referenz für einen komplett blockierten Transport der hOCTs wurde eine Negativkontrolle verwendet. Diese bestand aus der Transportlösung, der zusätzlich 2mM MPP zugegeben war, um durch das damit überproportional höhere Angebot an nicht radioaktiv markiertem MPP die Aufnahme von [<sup>3</sup>H]MPP kompetitiv zu hemmen.

Gentianaviolett	10	5	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,03125
Brillantgrün	25	10	2,5	1	0,25	0,025	0,0025	0,00025

Tab. 2.1.1: Übersicht über die einzelnen, für die Hemmkinetiken verwendeten, Konzentrationen (in µM) der Farbstoffe Gentianaviolett und Brillantgrün.

Für die Versuchsdurchführung wurden zu 90µl Zellsuspension 10µl der zu untersuchenden Lösung gegeben und die Zellen eine Sekunde lang unter Schütteln mit dem radioaktiven MPP inkubiert. Die Aufnahme des [<sup>3</sup>H]MPP wurde mit 1ml eisgekühltem (0°C), 200µM Chinin und 100µM TPeA (Tetrapentylammonium) enthaltendem, PBS gestoppt („Stopp-Puffer“). TPeA hemmt den hOCT1 und hOCT2, Chinin ist ein etablierter Hemmstoff aller drei hOCT-Subtypen (Gorboulev et al., 1997; Zhang et al., 1998; Zhang et al., 1999; Sata et al., 2005; Suhre et al., 2005).

Anschließend wurden die Zellen dreimal im Wechsel mit Zentrifugationsschritten (1min, 8.000g) mit 1ml Stopp-Puffer gewaschen. Nach Lyse durch eine einstündige Inkubation mit 1ml 4M Guanidin-Thiocyanat (GTC)

auf einer Rüttelmaschine wurden die lysierten Zellen in Szintillationsgefäße überführt und 2ml Szintillationsflüssigkeit zugegeben. Ein Szintillationszähler maß dann die Menge des aufgenommenen radioaktivem MPP.

## 2.2 Statistik und Versuchsauswertung der Transportmessungen

Damit später die Hemmung der organischen Kationentransporter durch Gentianaviolett und Brillantgrün charakterisiert werden konnte, wurden zunächst Hemmkinetiken und halbmaximale Hemmwerte ( $IC_{50}$ -Werte) anhand der im Szintillationszähler registrierten radioaktiven Zerfälle pro Minute (counts per minute = cpm) berechnet. Die cpm-Werte sind direkt proportional zu der Menge des von den Zellen aufgenommenen [ $^3H$ ]MPP.

Aufgrund der von Versuch zu Versuch verschieden hohen Konzentration der Zellen in der Lösung fiel auch die Anzahl der gemessenen Zerfälle unterschiedlich hoch aus. Daher wurden die cpm-Werte für jede Messung in Prozent der Positivkontrolle umgerechnet. In jedem Versuch wurde der Mittelwert der cpm der Positivkontrolle als maximaler Transport (=100%) definiert. Die unter Einfluss von unterschiedlichen Farb- und Hemmstoffkonzentrationen gemessenen Werte konnten dann in Prozent dieses maximal erreichbaren Transportes ausgedrückt werden. Somit war eine Basis dafür geschaffen, verschiedene Zellkonzentrationen unterschiedlicher Zelllinien miteinander vergleichen zu können.

Da der Hemmmechanismus der Farbstoffe an den hOCT nicht bekannt war, konnte keine Berechnung nach Michaelis-Menten durchgeführt werden. Deshalb wurden die Hemmkinetiken nach der Hill-Gleichung gefittet. Die verwendete Funktion zur Kurvenanpassung lautete:

$$V_H = v_{max} - ([s]^n \times v_{max}) / (IC_{50}^n + [s]^n)$$

In dieser Gleichung bezeichnet  $V_H$  die Aufnahmegeschwindigkeit des

Substrates bei gehemmtem Transport,  $v_{\max}$  die maximal transportierte Substratmenge pro Zeiteinheit,  $[s]$  die Substratkonzentration und  $IC_{50}$  den Konzentrationswert des Farbstoffes, bei dem nur ein halbmaximaler Transport stattfindet, die hOCT also halbmaximal gehemmt sind. In der Enzymkinetik wird die Potenz  $n$  auch als Hill-Koeffizient bezeichnet. Ihr Wert steigt mit dem Ausmaß der Kooperativität eines Enzymes an und ist an ihrem Maximum der Anzahl der Bindungsstellen des Enzymes gleichzusetzen.

Durch Division der, aus der Hill-Gleichung gewonnenen,  $V_H$ -Werte durch die Aufnahmegeschwindigkeit  $V_0$  des ungehemmten Transportes erhielt man die Aufnahmeraten des  $[^3H]MPP$  in die CHO-Zellen. In einem partiell- oder halblogarithmischen Koordinatensystem wurden diese Aufnahmeraten gegen die steigende Farbstoffkonzentration graphisch aufgezeichnet. Die Abszisse wies dabei dezimallogarithmisch die Farbstoffkonzentrationen in  $\mu M$  aus, wohingegen auf der Ordinate die jeweils korrespondierende Rate an aufgenommenen  $[^3H]MPP$  verzeichnet wurde.

Aus der Hill-Gleichung konnten des Weiteren die  $IC_{50}$ -Werte abgeleitet werden, die die Affinität des Hemmstoffes zu jedem Transporter angeben. Die Ergebnisse mehrerer Experimente lieferten die Hemmkinetiken und die  $IC_{50}$ -Werte von Gentianaviolett und Brillantgrün und damit ein Maß für die Affinität der Farbstoffe zu den hOCT.

Für eine statistische Analyse wurden die in den Messungen erhobenen Mediane der Einzelwerte nach dem one-way-ANOVA-Testverfahren miteinander verglichen. Die Ergebnisse wurden als statistisch signifikant unterschiedlich betrachtet, wenn sie sich mindestens auf einem 95-prozentigem Konfidenzintervall ( $P < 0,05$ ) unterschieden.

### 2.3 Elektrophysiologische Messungen mit *Xenopus laevis* Oozyten

Die Eizellen des in Südafrika heimischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* werden seit Jahrzehnten für Experimente mit Proteinexpression verwendet

(Gurdon et al., 1971; Dumont, 1972; Dascal, 1987; Sigel, 1990; Wagner et al., 2000). Um einen möglichen Transport der Farbstoffe in das Zellinnere nachzuweisen, wurde in solchen Oozyten exemplarisch der hOCT2 durch Injektion der Zellen mit seiner cRNA zur Expression gebracht. Anschließend wurde mit der two-electrode voltage clamp (TEVC) Methode ein eventueller Kationeneinstrom untersucht.

### 2.3.1 cRNA-Synthese

Die DNA des humanen organischen Kationentransporter hOCT2 wurde von Dr. Valentin Gorboulev zur Verfügung gestellt (Gorboulev et al., 1997). 1-2µg der linearisierten DNA wurden von der RNA-Polymerase des Bakteriophagen T7 in cRNA transkribiert. Die Transkription erfolgte nach Anleitung des T7 mMESSAGE mMACHINE Kit, welches neben der RNA-Polymerase Transkriptionspuffer, Ribonukleotide (rUTP, rATP, rGTP, rCTP), 5'-Cap-Analoga, RNase-freie DNase und Nuklease-freies Wasser enthält. Die Durchführung erfolgte in einem 37°C warmen Wasserbad, um über einen Zeitraum von 2 Stunden optimale Bedingungen für die Transkription zu schaffen. Nach Spaltung der DNA mit 1µl RNase-freier DNase wurde die verbliebene RNA mit 30µl destilliertem Wasser und 25µl Lithiumchlorid für 30 Minuten bei -20°C inkubiert und zum Ausfällen gebracht. Ein anschließendes Zentrifugieren mit 15.800g bei 4°C für 15 Minuten und Abnahme des Überstandes ergaben ein RNA-Pellet. Die RNA wurde mit 70% Ethanol einmal gewaschen und unter gleichen Bedingungen erneut zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde die RNA in destilliertem Wasser gelöst. Die fertige Lösung wurde bei -20°C bis -70°C im Gefrierschrank aufbewahrt.

Eine Konzentrationsanalyse der hergestellten cRNA wurde mittels Gel-Elektrophorese durchgeführt. Hierzu wurde eine kleine Menge RNA zusammen mit einem Nukleotid-Standard nach der von Gründemann und Koepsell beschriebenen Methode auf ein denaturierendes RNA-Agarose-Gel mit 1,42M

Glyoxal und 71,4% DMSO aufgetragen (Gründemann und Koepsell, 1994). Nach 2 Stunden Elektrophorese bei 50-80V stellte sich die RNA unter UV-Licht als Bande dar. Die Lokalisation der Bande im Vergleich zum Standard identifizierte dabei die RNA an Hand ihrer Basenzahl, wohingegen Dicke und Leuchtkraft der Bande proportional zu der Menge der RNA waren.

### 2.3.2 Gewinnung der *Xenopus laevis* Oozyten

Die Oozyten, die später den hOCT2 exprimieren sollten, wurden mittels Laparotomie einem lebenden Krallenfrosch (*Xenopus laevis*) entnommen. Für Untersuchungen an den Oozyten sowie deren Lagerung wurde eine Oozyten-Ringer-Lösung (dest. Wasser, 100mM Natriumchlorid, 3mM Kaliumchlorid, 1mM Magnesiumchlorid, 2mM Kalziumchlorid und 5mM 3-(N-Morpholino-)Propansulfonsäure (MOPS)) verwendet. Durch Titration der Oozyten-Ringer-Lösung (ORI) mit Natriumhydroxid erhielt man einen pH von 7,4. Um einem Bakterienwachstum vorzubeugen, wurden 50mg/l Gentamycin zugegeben.

Vor der Entnahme der Oozyten wurde der Frosch mit dem Kurzzeitanästhetikum Tricain in Narkose versetzt und für die Operation in eine, mit Eiswasser gefüllte, Styroporschale eingebettet, um eine zusätzliche Kältestarre zu provozieren. Die Tiefe der Betäubung konnte mit dem Ausfall der motorischen Reflexe und insbesondere des Schluckreflexes des Frosches getestet werden. Mit Wasser getränkte Papiertücher hielten die Haut während der gesamten Operation feucht.

Nach lokaler Desinfektion wurde auf der Bauchseite des Frosches ungefähr 1,5cm kranial der Hüftfalte und parallel zu dieser ein 1cm langer Schnitt durch Haut, Muskelschicht und Peritoneum vorgenommen. Durch diesen Schnitt wurden dann, von kaudal beginnend, kleine Teile des Ovars entfernt und in ORI inkubiert. Nach erfolgreicher Entnahme wurde die Bauchdecke mit einem resorbierbaren Faden in mehreren Einzelnähten wieder verschlossen.

Durch Spülung mit handwarmem Leitungswasser wurde der Frosch

postoperativ aus seiner Narkose erweckt und bis zur vollständigen Rückkehr seiner Reflexe unter laufendem Wasser in einem flachen Becken gehalten. Anschließend musste er für 24 Stunden in einem Einzelbecken überwacht werden, bevor er wieder ins Aquarium ausgesetzt werden konnte.

Zur Lösung der Oozyten aus ihrem Verbund mit Follikelepithel, Theka, Blutgefäßen und Ovariepithel wurden die einzelnen Lobuli mit einer Pinzette vorsichtig auseinandergezogen und mehrmals mit ORI gespült. Anschließend wurde der Verbund durch Lagerung in ORI, dem 1mg/ml Kollagenase (Clostridiopeptidase A) zugesetzt war, getrennt. Durch diese Vorgehensweise lösten sich die Interzellularverbände und besonders die Gewebeverbindungen der Theka auf. Nach einer Einwirkzeit von rund 12 Stunden wurde die Kollagenase durch mehrmaliges Spülen mit ORI ausgewaschen. Oftmals waren die Oozyten noch von einer schlaffen Hülle aus Follikelepithelzellen umgeben. Diese konnte durch kurzzeitige Inkubation mit kalziumfreiem ORI gelöst werden. Anschließend wurden die Oozyten in ORI gelagert.

### 2.3.3 Mikroinjektion der cRNA und Expression des hOCT2

Die Oogenese in den weiblichen Krallenfröschen läuft asynchron ab, d.h. es liegen sämtliche Entwicklungsstadien zur gleichen Zeit vor. Nach Dumont werden dabei die Oozyten anhand ihrer Größe in sechs verschiedene Entwicklungsstadien (I-VI) eingeteilt (Abb. 2.3.1). Unter Idealbedingungen finden sich im Ovar eines erwachsenen Krallenfrosches vorwiegend die Stadien V und VI. Die Oozyten haben zwei unterschiedlich gefärbte Hemisphären. Während der helle, weiß bis gelblich gefärbte vegetative Pol den Eidotter enthält, befinden sich in dem durch Melaninpigment gefärbten animalen Pol besonders viele Mitochondrien und der Zellkern (Dumont, 1972).

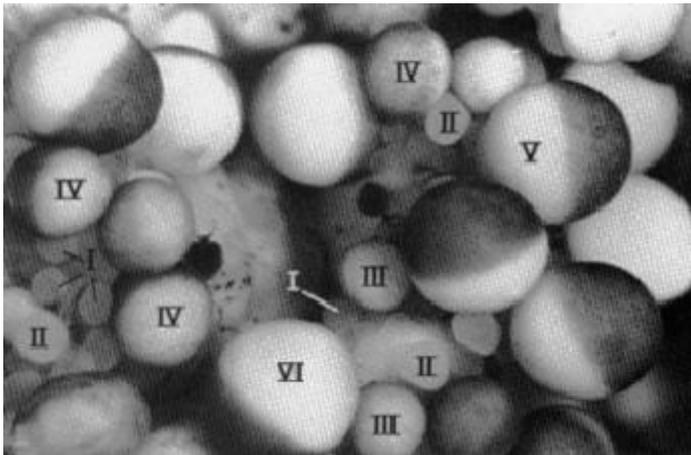


Abb. 2.3.1: Xenopus laevis Oozyten:  
 Das Bild zeigt Oozyten des Frosches *Xenopus laevis* in typischer Verteilung der verschiedenen Stadien I-VI nach Dumont. Gut zu erkennen ist die Färbung der Hemisphären und die Größenzunahme der Eizellen in den höheren Stadien.

Unter dem Mikroskop wurden große, kugelförmige und in der Farbe einheitliche Oozyten des Stadiums V oder VI nach Dumont ausgewählt. Dabei wurde darauf geachtet, für jeden Versuch nur Oozyten ein- und desselben Stadiums zu nehmen, da sich zwischen Stadium V und VI noch Unterschiede im metabolischen Entwicklungsstand finden, deren Einfluss die Messergebnisse hätte verfälschen können (Dumont, 1972; Wagner et al., 2000). Die Wahl des Stadiums V oder VI war insofern wichtig, da sich die Oozyten wegen ihrer Größe (Durchmesser von 1,1 – 1,3mm) gut handhaben ließen, diese reiferen Stadien relativ robust sind und injizierte RNA stärker exprimieren als Oozyten in weniger reife Stadien (Gurdon et al., 1971).

Die in destilliertem Wasser gelöste cRNA (Konzentration 0,2ng/nl) des hOCT2 wurde mittels einer, mit einem Glaskanülen-Puller ausgezogenen, Glaskapillare durch eine Mikroinjektionspumpe den einzelnen Oozyten injiziert. Angestrebt wurde ein Injektionsvolumen von 50nl, womit jede Eizelle etwa 10ng RNA erhielt. Als Negativkontrolle dienten Oozyten, denen 50nl destilliertes Wasser injiziert wurde. Der Einstich wurde am hellen Pol der Eizelle durchgeführt, um eine Injektion der RNA in den Zellkern zu vermeiden. Vor der Prozedur wurden die Oozyten für wenige Minuten in hyperosmolarem ORI (130mM

Natriumchlorid) inkubiert. Dies führte zu einer Volumenreduktion der Zellen, wodurch verhindert werden sollte, dass durch das zusätzlich eingebrachte Injektionsvolumen Teile des Eidotters oder die eingebrachte RNA herausgedrückt werden.

Die anschließende Lagerung erfolgte in mit ORI gefüllten 6-„well“-Kulturschalen bei 16°C im Kühlbrutschrank. Um eine ausreichende Translation der cRNA und des intramembranären Einbaus des Proteins zu gewährleisten, war eine Inkubationszeit von zwei bis drei Tagen nötig. Das Ausmaß der erreichten Proteinexpression war aber auch von der Qualität der cRNA, eventuellen Fehlern bei der Injektion und dem Überleben der Oozyten abhängig. Während in natura ihre Haltbarkeit mehrere Wochen betragen kann, unterliegen die Eizellen bei Laborbedingungen „unnatürlichen“ Einflüssen, wie zum Beispiel dem Zustand des Lagermediums oder Schwankungen der Umgebungstemperatur. Dadurch bedingt kann die Lebensdauer im Labor zwischen wenigen Stunden und einigen Tagen betragen und ist in großem Maße von der „Pflege“ der Zellen abhängig (Dascal, 1987). Um eine möglichst stabile Entwicklung zu begünstigen, war ein tägliches Erneuern der Oozyten-Ringer-Lösung und die Entfernung und Verwerfung beschädigter oder zu Grunde gegangener Eizellen nötig.

#### 2.3.4 Elektrophysiologische Messungen nach der TEVC-Methode

Nach Expression des hOCT2 in *Xenopus laevis* Oozyten wurde untersucht, ob die in wässriger Lösung positiv geladenen Farbstoffe Gentianaviolett und Brillantgrün in das Zellinnere transportiert werden und dabei eine Änderung des Membranpotentials hervorrufen. Zur Beantwortung dieser Frage wurden Messungen mit elektrischen Strömen an den Oozyten mit der two-electrode voltage clamp (TEVC) Methode durchgeführt.

Da *Xenopus* Oozyten in ihrem Eidotter bereits alle für das Wachstum notwendigen Nährstoffe besitzen, sind sie unabhängig von einer Versorgung

aus ihrer Umgebung. Dank dieser Autonomie exprimieren sie auch nur eine geringe Anzahl von eigenen Transmembran-Transportsystemen, was bei elektrophysiologischen Messungen mit künstlich eingebauten Transportproteinen zu nur geringen Hintergrundeffekten führt. Ein  $\text{Ca}^{2+}$ -regulierter  $\text{Cl}^-$ -Kanal hält das Ruhemembranpotential dieser Zellen bei ca.  $-40\text{mV}$  (Gurdon et. al, 1971; Sigel, 1990; Wagner et al., 2000).

In die Oozyte wurden an gegenüberliegenden Polen zwei Mikroelektroden eingestochen. Die eine Elektrode diente der Erfassung des Membranpotentials der Eizelle (Messelektrode), die andere der Anlage einer Spannung zur Aufrechterhaltung des Membranpotentials (Klemmelektrode). Zwei weitere Elektroden wurden in dem, die Oozyte umfließenden, ORI-Bad ( $19^\circ\text{C}$ ,  $2\text{ml}/\text{min}$ ) angebracht und dienten der Messung des Badpotentials dicht bei der Oozyte sowie der Klemmung des Badpotentials auf  $0\text{mV}$ .

Das Membranpotential wurde für die Messungen auf  $-50\text{mV}$  geklemmt. Das von der Messelektrode kommende Signal wurde elektronisch gefiltert und verstärkt und mit den gewünschten  $-50\text{mV}$  abgeglichen. Die Differenz wurde als Strom über die Klemmelektrode und Badelektroden geschickt und das Membranpotential somit konstant gehalten. Jeder Fluss von elektrisch geladenen Ionen oder Substraten über die Plasmamembran spiegelte sich in einer Veränderung dieses Erhaltungsstromes wider.

Der für die elektrophysiologischen Messungen verwendete ORI wurde ohne  $50\text{mg}/\text{l}$  Gentamycin hergestellt. Für die Mikroelektroden wurden Glaskapillaren mit einem Glaskanülen-Puller ausgezogen und mit  $3\text{M}$  KCl (Kaliumchlorid) gefüllt. Anschließend wurden sie auf  $\text{Ag}/\text{AgCl}_2$ -Elektroden aufgesetzt. Die ganze Apparatur stand zum Schutz vor extern induzierten Strömen in einem Faradayschen Käfig.

Für die Messung von Strömen, denen ein transmembranaler Substrattransport zu Grunde lag, wurden die Oozyten für mindestens 30 Sekunden mit dem in ORI gelösten Substrat überspült. Ausgewaschen wurde das Substrat anschließend durch erneutes Überspülen mit reinem ORI für mindestens eine Minute. Gemessen und graphisch aufgezeichnet wurde der Verlauf des

Erhaltungsstromes während dieses Vorgangs.

Für solche Elektrophysiologiemessungen wurden Oozyten benutzt, denen in dem oben beschriebenen Verfahren die cRNA des humanen organischen Kationentransporters 2 (hOCT2) injiziert worden war und die diesen Transporter über mindestens drei Tage in ihrer Zytoplasmamembran exprimiert hatten. Der Nachweis für eine ausreichende Proteinexpression konnte erbracht werden, indem die Oozyten mit 10mM Cholin (in ORI), einem Substrat des hOCT2, inkubiert wurden (Gorboulev et al., 1997). Wegen der in wässriger Lösung vorliegenden positiven Ladung von Cholin kann der Transport dieses Moleküls über die Membran der Oozyten als Veränderung des Erhaltungsstroms gemessen werden. Die Höhe dieser Änderung ist der Menge der transportierten Cholin-Ionen proportional.

Anschließend wurde der Transport von Gentianaviolett und Brillantgrün auf die gleiche Weise untersucht. Wie Cholin sind beide Stoffe nach Dissoziation in wässriger oder alkoholischer Lösung einfach positiv geladen. Für die Versuche wurde Gentianaviolett in einer Konzentration von 5 $\mu$ M und Brillantgrün in einer Konzentration von 20 $\mu$ M jeweils mit und ohne Zusatz von 100 $\mu$ M Tetrabutylammonium (TBuA) als Hemmstoff der hOCT (Dresser et al., 2002) in ORI gelöst. Als Negativkontrolle dienten bei allen Versuchen wasserinjizierte Oozyten.

## 2.4 Spektralphotometrische Messungen mit CHO-Zellen

Ergänzend zu den elektrophysiologischen Messungen wurde der Frage, ob nach Inkubation der Zellen mit Gentianaviolett und Brillantgrün die Farbstoffe auch intrazellulär nachweisbar sind, auch an Hand photometrischer Messungen nachgegangen. Dazu wurde die Eigenschaft der Farben genutzt, Licht bestimmter Wellenlänge zu absorbieren.

Ebenfalls repräsentativ für alle hOCT wurden diese Messungen mit hOCT2-CHO-Zellen durchgeführt sowie mit CHO-Zellen, die mit dem Leervektor transfiziert waren. Die Lösungen wurden analog den unter 2.1 genannten

Transport- und Hemmlösungen mit beiden Farbstoffen ohne Zugabe von [<sup>3</sup>H]MPP angesetzt.

Da die Menge des, aus den lysierten Zellen stammenden, Farbstoffes von der Anzahl der zuvor inkubierten Zellen abhing, wurde vor Beginn jeder Messung die Konzentration der Zellen in einer Zählkammer bestimmt. Das inkubierte Zellvolumen war mit 90µl bekannt (vgl. 2.1), so dass daraus die Anzahl der Zellen, die inkubiert wurden, berechnet werden konnte.

Die Konzentrationen der Farbstoffe in Lösung wurden mit 2µM und 20µM für Gentianaviolett und 1µM und 10µM für Brillantgrün gewählt. Alle Messungen erfolgten bei der Wellenlänge mit dem Absorptionsmaximum für den jeweiligen zu untersuchenden Farbstoff. Für Gentianaviolett war diese Wellenlänge  $\lambda_{GV}=590\text{nm}$ , für Brillantgrün  $\lambda_{BG}=623\text{nm}$  (Merck Index, 14<sup>th</sup> Edition).

Die Inkubation der Zellen mit den Farben erfolgte durch Schütteln und wurde nach einer Sekunde abgestoppt. Der Stopppuffer wurde wie unter 2.1 beschrieben angesetzt und 5mg/ml Albumin hinzugefügt. Durch das Albumin sollte einerseits freier Farbstoff in Lösung gebunden, andererseits in den Waschdurchgängen der unspezifisch an Zelloberfläche haftende Farbstoff abgelöst werden. Dies diente der Minimierung des Fehlers, der durch die Messung von extrazellulärem Farbstoff entstand und erhöhte die Genauigkeit in der Messung des intrazellulär angesammelten Farbstoffes. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und mit 1ml 4M GTC lysiert. Von dieser Zelllösung wurden 80µl in die Küvette transferiert.

Die photometrischen Untersuchungen mit den Zellen wurden in 80µl-Küvetten mit einem Längendurchmesser von  $d=1\text{cm}$  durchgeführt. Die Versuchsanordnung maß die Transmission  $T$ , also den Quotienten aus der gemessenen Stärke des Lichtstrahles vor und nach Durchtritt durch die Küvette. Mit Hilfe mathematischer Umformungen konnte aus den gemessenen Transmissionswerten die aufgenommene Farbstoffmenge pro Einzelzelle berechnet werden (siehe unten). An Hand dieser Werte wurde dann der Leervektor mit dem hOCT2 und der gehemmte mit dem ungehemmten Transport verglichen.

Die Transmission eines Lichtstrahles ist nicht direkt proportional zu der Konzentration des absorbierenden Stoffes, sondern verhält sich zu dieser logarithmisch. Somit konnten die Werte aus Messungen mit verschiedenen Zellkonzentrationen nicht untereinander verglichen werden. Dies wurde durch Umrechnung der Transmissionswerte in die Extinktion möglich, da diese direkt proportional zur Konzentration des absorbierenden Stoffes in der Lösung ist.

Die in den Versuchen gemessene Extinktion setzte sich zusammen aus dem Anteil der farbstoffabhängigen Extinktion sowie der Extinktion durch zelluläre Bestandteile in der Lösung. Daher wurden bei jeder Zelllinie parallele Messungen ohne Zugabe der Farbstoffe durchgeführt. Die hierbei gemessene Extinktion entsprach dem Einfluss der Zellularbestandteile und sie wurde von der gesamten Extinktion subtrahiert. Dadurch erhielt man die, der jeweiligen Farbstoffkonzentration eigenen, Extinktionswerte.

Mit diesen Werten konnte die Konzentration des Farbstoffes in der Zelllösung bestimmt werden. Da die Anzahl der Zellen zuvor bestimmt wurde und das Volumen der Lösung bekannt war, war es möglich, die Menge an Farbstoff pro Zelle an Hand folgender Gleichung zu berechnen (zur genauen mathematischen Herleitung der Gleichung zur Farbstoffmengenberechnung vgl. Anhang):

$$n_F = [\log (T_Z/T_G)] / [\epsilon_F \times d \times c \times 0,09] \quad (2.6.1)$$

Die Werte für die Extinktionskoeffizienten  $\epsilon$  von Gentianaviolett und Brillantgrün waren nicht bekannt und sind von diversen Faktoren wie dem Messgerät, der Raumtemperatur, der Wellenlänge des Lichtstrahles und der Farbstoffkonzentration abhängig. Daher wurde auf ihre Bestimmung verzichtet und Menge des Farbstoffes in Abhängigkeit von  $\epsilon$  bestimmt. Somit war zwar keine absolute Menge an Farbstoff pro Zelle bestimmbar, jedoch waren qualitative und quantitative Vergleiche innerhalb der Versuche mit einem Farbstoff möglich. Dazu wurde vorausgesetzt, dass sowohl Umgebungstemperatur, als auch die experimentelle Anordnung während des

Versuches keiner Änderung unterlagen und  $\epsilon$  somit eine Konstante darstellte. Auch zwischen den beiden Farbstoffen konnten keine quantitativen Vergleiche der intrazellulären Farbstoffkonzentrationen angestellt werden. Da aber das  $\epsilon$  sowohl von Gentianaviolett wie auch von Brillantgrün als konstant vorausgesetzt wurde, war ein qualitativer Vergleich der jeweils aufgenommenen Farbstoffmenge möglich.

## 2.5 Migrationsmessungen mit menschlichen Keratinozyten

Da die hOCT beim Menschen unter anderem in den Keratinozyten exprimiert werden (Lips et al., nicht publizierte Daten), befassten sich die folgenden Untersuchungen mit der Frage, ob eine Hemmung der hOCT durch die Farbstoffe Gentianaviolett und Brillantgrün ursächlich für Wundheilungsstörungen der Haut sein kann.

Die für die vorliegenden Untersuchungen aus dem Institut für Dermatologie der Universität Würzburg stammenden primären Keratinozyten wurden von der Arbeitsgruppe von Professor Friedl bei Biopsien der Haut von Patienten gewonnen und kultiviert (Storim et al., 2001) und für Migrationsversuche („Migrations-Assay“) freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Für die Migrationsmessungen wurden die Zellen in 250ml Kulturflaschen vermehrt und nach Waschen mit PBS und Ablösen durch 4ml Trypsin-EDTA mit 4ml Medium (50% Keratinozyten-Basalmedium, 50% Keratinozyten-SFM + EGF + BPE), dem 10% FCS zugegeben war, zentrifugiert (5min, 800g). Anschließend wurden sie in 24-„well“-Platten in einer Konzentration von 100.000Zellen/ml ausgesät. In die „wells“ wurden zur Anheftung der Zellen gläserne Plättchen (Durchmesser 15mm) gegeben. Nach 24 Stunden im Brutschrank war ein konfluentes Wachstum (Monolayer) auf den Glasplättchen erreicht. In diesen Monolayer wurde mit einer dünnen Plastik-Pipettenspitze ein Kratzer („Wunde“) gezogen. Dann wurden 2ml des in Medium gelösten Substrates auf die Zellen gegeben und jedes „well“ mit einem Deckgläschen und Paraffin abgedichtet, um ein Eindringen von Keimen zu verhindern.

In dem folgenden Migrations-Assay wurde das „Verheilen“ der „Wunde“, sprich die Migration der Keratinozyten vom Rand des Kratzers aus bis zu seinem vollständigen Verschluss, untersucht. Dazu wurden die Kulturschalen zur Langzeitbeobachtung unter Videokameras gestellt und das Bild so eingestellt, dass der Kratzer in seiner gesamten Breite gefilmt werden konnte. Die Kameras nahmen über einen Zeitraum von 24h alle 4min ein digitales Bild auf. Mit Hilfe der QuickTime Video-Software wurden anschließend die Bilder zu einem Film zusammengefügt (10 Bilder pro Sekunde), der dann die Bewegung der Keratinozyten im Zeitraffer zeigte. An Hand dieser Filme konnte die Zellmigration mit Hilfe eines Computer-assistierten Zelltracking-Verfahrens analysiert werden. In diesem Verfahren wurde die Bewegung von 20, am Rand des Monolayers lokalisierten, Zellen verfolgt und die in 24 Stunden zurückgelegte Wegstrecke aufgezeichnet. Unter Einbeziehung des Vergrößerungsfaktors der Kamera konnte mit diesen Daten die Durchschnittsgeschwindigkeit (in  $\mu\text{m}/\text{min}$ ) der einzelnen Zellen berechnet werden.

Um für die Zellen während des Filmens ein geeignetes Milieu zu schaffen, wurde die Temperatur in den Kulturschalen durch Bestrahlung mit Rotlicht auf konstant  $37^\circ\text{C}$  gehalten. Ein an den „well“-Platten befestigter Temperaturfühler steuerte dabei Intensität der Rotlichtlampen.

Untersucht wurde das Verhalten der Keratinozytenbewegung bei  $10\mu\text{M}$  Gentianaviolett und  $50\mu\text{M}$  Brillantgrün. Als Positivkontrolle diente ein normales Kultivierungs-Medium ohne Zusätze, als Negativkontrolle eines, dem  $100\mu\text{M}$  bzw.  $250\mu\text{M}$  TPeA als Inhibitor zugesetzt war. Als weitere Negativkontrollen wurden  $10\text{mM}$  Cholin,  $50\mu\text{M}$  Desipramin, und  $50\mu\text{M}$  MPP verwendet, die ebenfalls zur Inhibition der hOCT eingesetzt wurden. Im Falle des Cholins und des MPPs, die beide transportierbare Substrate der hOCT sind, geschah dies durch kompetitive Hemmung auf Grund eines Überangebotes des Substrates. Desipramin dagegen hemmt die hOCT, ohne transportiert zu werden (Gorboulev et al., 1997; Zhang et al., 1997; Zhang et al., 1998; Wu et al., 2000).

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Transportkinetiken: Hemmung von hOCT1, hOCT2 und hOCT3 durch Gentianaviolett und Brillantgrün

Zur Untersuchung der Frage, ob die Funktion der organischen Kationentransporter hOCT1, hOCT2 und hOCT3 durch die Farbstoffe Gentianaviolett und Brillantgrün beeinflusst wird, wurden Transportmessungen nach der unter 2.1 beschriebenen Methode durchgeführt. Es wurden CHO-Zellen verwendet, die stabil mit dem hOCT1, hOCT2 und hOCT3 und dem Leervektor transfiziert waren. Gemessen wurde die Aufnahme von [<sup>3</sup>H]MPP in die Zellen, ein Stoff, dessen transmembranärer Transport durch die hOCT vermittelt wird. Die Messungen erfolgten unter den Bedingungen eines ungehemmten Transportes, sowie unter Einfluss von 2mM nichtradioaktivem MPP beziehungsweise 10µM Gentianaviolett und 100µM Brillantgrün. Die Auswertung erfolgte anhand der im Szintillationszähler gemessenen Werte der radioaktiven Zerfälle des von den Zellen aufgenommenen [<sup>3</sup>H]MPPs. Das arithmetische Mittel der gemessene Zerfälle pro Minute (counts per minute = cpm) bei ungehemmter Transportfunktion eines jeden hOCT wurde für diesen Transporter als maximal möglicher Transport definiert. Die jeweiligen Messungen unter Einfluss der Farbstoffe wurden dann in Bruchteilen des Maximaltransportes ausgedrückt. In den Negativkontrollen waren die hOCT durch Zugabe von 2mM MPP kompetitiv gehemmt. Bei dem Leervektor wurde kein Transporter exprimiert.

Abbildung 3.1.1 veranschaulicht das Transportverhalten der CHO-Zelllinien bei der Aufnahme von [<sup>3</sup>H]MPP mit und ohne Zugabe der Farbstoffe sowie bei Hemmung mit 2mM MPP. Die x-Achse weist die unterschiedlichen Zelllinien beim ungehemmten Transport sowie bei Zugabe von 2mM MPP, 10µM Gentianaviolett und 100µM Brillantgrün aus, an der y-Achse ist die jeweils dazu gehörende relative Aufnahme von [<sup>3</sup>H]MPP aufgetragen.

Der Leervektor ist aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt, da die

Messungen zeigten, dass bei dieser Zelllinie erwartungsgemäß weder in An- noch in Abwesenheit von Brillantgrün und Gentianaviolett ein Transport des radioaktiven Substrates stattfand und lediglich die Hintergrundstrahlung im Szintillationszähler gemessenen wurde.

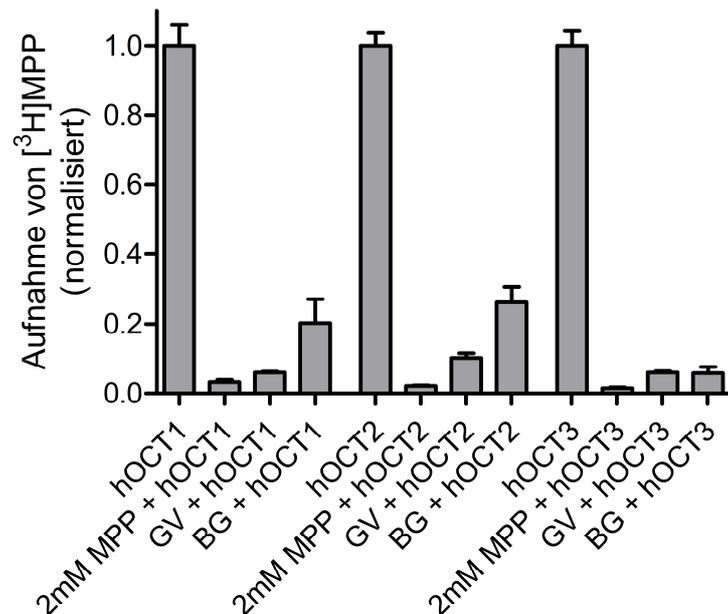


Abb. 3.1.1: Aufnahme von  $0.12\mu\text{M}$   $[^3\text{H}]\text{MPP}$  durch den hOCT1, hOCT2 und hOCT3. Das Balkendiagramm zeigt von links nach rechts für die einzelnen Zelllinien die Mediane der Einzelmessungen mit ihren Standardabweichungen in folgender Reihenfolge: ungehemmter Transport, 2mM MPP (Negativkontrolle),  $10\mu\text{M}$  Gentianaviolett,  $100\mu\text{M}$  Brillantgrün.

Anhand dieser Ergebnisse ist ersichtlich, dass die Funktion der hOCT, das  $[^3\text{H}]\text{MPP}$  zu transportieren, durch die Farbstoffe gehemmt wurde.

Der hOCT1 fiel bei Inkubation mit  $10\mu\text{M}$  Gentianaviolett in seiner Transportrate auf rund 5% des Ausgangswertes ab, bei Inkubation mit  $100\mu\text{M}$  Brillantgrün auf rund 20% Restaktivität. Der hOCT2 wurde durch das Brillantgrün auf annähernd 27% Restaktivität gehemmt, durch Gentianaviolett auf 9%. Im Falle des hOCT3 fiel der Transport bei Hemmung mit Gentianaviolett auf 5% und unter Einfluss von Brillantgrün auf 7% ab.

Somit liegt eine Hemmung der drei Transporter durch Gentianaviolett und Brillantgrün vor. Das Gentianaviolett hatte dabei einen stärkeren hemmenden

Einfluss auf die Transporterfunktion als das Brillantgrün, obwohl es in einer geringeren Konzentration angewendet wurde. Auch zeigt sich, dass Gentianaviolett die verschiedenen hOCT eher gleichmäßig stark auf 5-9% des Ausgangswertes hemmt, wohingegen bei Brillantgrün der hOCT3 einer weitaus stärkeren Hemmung unterliegt als der hOCT1 und hOCT2.

In den folgenden Messungen wurde die Hemmung der hOCT näher charakterisiert und eine Abhängigkeit der Hemmung von der Konzentration der Farbstoffe untersucht. Dazu wurden die Transportmessungen wiederholt und die Farbstofflösungen in einer Verdünnungsreihe mit verschiedenen Konzentrationen (vgl. Tab. 2.1.1) angesetzt.

Auch hier erfolgte die Auswertung der Messungen wieder in Form der vom Szintillationszähler registrierten cpm. Da der genaue Hemmmechanismus nicht bekannt war, wurden die Daten für die Hemmkinetiken nach Hill gefittet. Anschließend wurden die Hemmkinetiken graphisch dargestellt und es wurden die Konzentrationswerte bestimmt, bei denen die Farbstoffe eine halbmaximale Hemmung der Transporter ( $IC_{50}$ -Werte) erreichten. Tab 3.1.2 fasst diese  $IC_{50}$ -Werte von Brillantgrün und Gentianaviolett zusammen und veranschaulicht ihre signifikanten Unterschiede. Die Abbildungen 3.1.3 bis 3.1.8 zeigen die durchgeführten Messungen mit den gefitteten Kurven.

Farbstoff	Zelllinie	IC <sub>50</sub> -Wert ± SD	Signifikanz
Gentianaviolett	hOCT1	0,70 ± 0,11	(*)
	hOCT2	1,73 ± 0,55	
	hOCT3	1,40 ± 0,41	
Brillantgrün	hOCT1	0,32 ± 0,24	(***)
	hOCT2	8,80 ± 2,30	(**)
	hOCT3	2,48 ± 1,78	(***)

Tab 3.1.2: Hemmung des [<sup>3</sup>H]MPP-Transportes der hOCT durch Brillantgrün (BG) und Gentianaviolett (GV):

Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung (SD) der halbmaximalen Hemmkonzentrationen (IC<sub>50</sub>-Werte) in µM. Die Daten wurden aus Einzelanpassungen von acht bis neun Konzentrationswerten aus drei bis vier unabhängigen Messungen gewonnen. Die Fittung erfolgte nach Hill.

Ein Vergleich wurde zwischen den einzelnen Transportern innerhalb einer Farbstoffgruppe beziehungsweise zwischen den gleichen hOCT-Subtypen unter Einfluss der verschiedenen Farbstoffe gezogen. Die geklammerten Sternchen weisen die sich jeweils signifikant unterscheidenden Werte aus und zeigen die Höhe des Signifikanzniveaus an:

(\*) = Unterschied zu der Messung mit dem hOCT2 und GV auf P<0,05;

(\*\*) = Unterschied zu der Messung mit dem hOCT2 und GV auf P<0,001;

(\*\*\*) = Unterschied zu der Messung mit dem hOCT2 und BG auf P<0,001;

Die Testung der IC<sub>50</sub>-Werte nach ANOVA zeigte, dass sich die Hemmung des hOCT1 und hOCT2 durch Gentianaviolett auf einem Signifikanzniveau von P<0,05 unterscheidet, wobei der Farbstoff eine deutlich höhere Affinität für den hOCT1 aufweist. hOCT2 und hOCT3 haben eine ähnliche Affinität für Gentianaviolett. Die IC<sub>50</sub>-Werte von hOCT1 und hOCT3 waren statistisch nicht signifikant unterschiedlich.

Brillantgrün weist sowohl in einer Gegenüberstellung der Transporter hOCT1 und hOCT2 auf einem Signifikanzniveau von P<0,001, sowie auch im Vergleich des hOCT2 mit dem hOCT3 mit P<0,001 unterschiedliche Affinitätswerte für diese Transporter auf, wobei auch hier die höchste Affinität für den hOCT1 zu finden ist. In einem Vergleich des hOCT1 mit dem hOCT3 unterscheidet sich

der Farbstoff nicht signifikant in seiner Affinität zu den Transportern, was jedoch auch an der ziemlich großen Standardabweichung des hOCT3 liegt. Auffallend ist die vergleichsweise niedrige Affinität für den hOCT2.

Ein Vergleich der beiden Farbstoffe zeigt, dass sich die Affinitäten von Gentianaviolett und Brillantgrün sowohl für den hOCT1 als auch für den hOCT3 soweit ähneln, dass kein statistisch relevanter Unterschied feststellbar ist. Lediglich in der niedrigen Affinität des Brillantgrüns zu dem hOCT2 unterscheidet sich dieser Farbstoff signifikant deutlich mit  $P < 0,001$  von Gentianaviolett.

Die graphische Auswertung der Transportmessungen ist in den folgenden Abbildungen wiedergegeben. Die Kurven zeigen die Hemmkinetiken des hOCT1, hOCT2 und hOCT3 unter dem Einfluss von Gentianaviolett und Brillantgrün. Auf der x-Achse (Abszisse) ist die Konzentration des Farbstoffes dezimallogarithmisch aufgetragen, die Ordinate weist die, im Szintillationszähler gemessene, Aufnahme von [ $^3\text{H}$ ]MPP als Bruchteil der Maximalaufnahme (Positivkontrolle) aus (Abb. 3.1.3 bis 3.1.8).

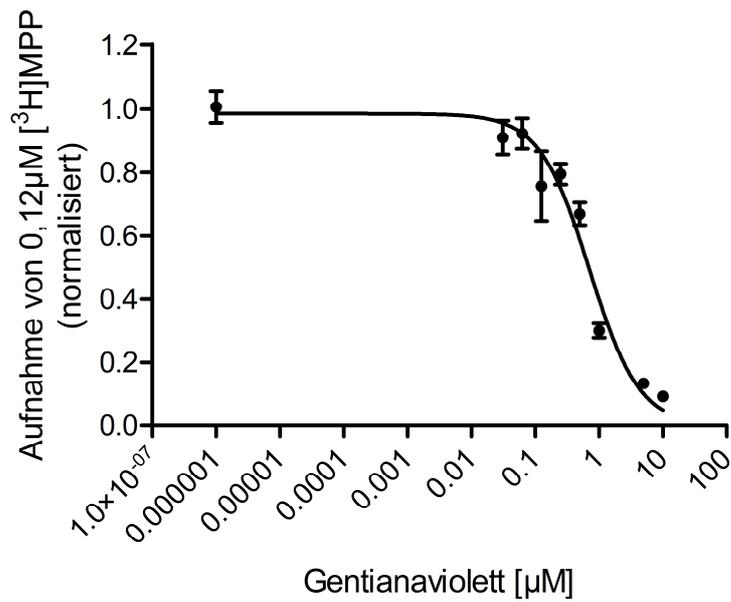


Abb. 3.1.3: Hemmkinetik des hOCT1 unter Gentianaviolett:  
 Aufnahme von 0,12µM [³H]MPP in Abhängigkeit zur Hemmstoffkonzentration von Gentianaviolett für den hOCT1. Dargestellt sind die Mediane der 9 Konzentrationen aus 4 Transportmessungen mit Standardabweichung (SD).

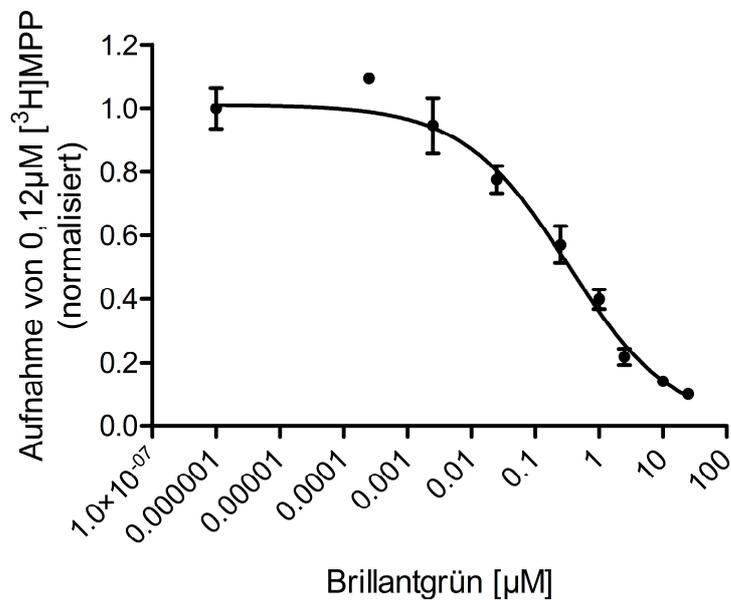


Abb. 3.1.4: Hemmkinetik des hOCT1 unter Brillantgrün:  
 Aufnahme von 0,12µM [³H]MPP in Abhängigkeit zur Hemmstoffkonzentration von Brillantgrün für den hOCT1. Dargestellt sind die Mediane der 9 Konzentrationen aus 3 Transportmessungen mit Standardabweichung (SD).

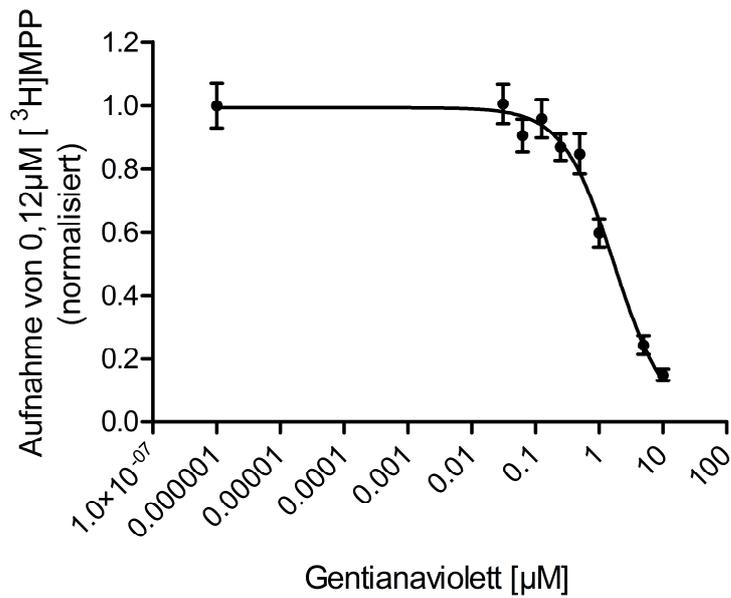


Abb. 3.1.5: Hemmkinetik des hOCT2 unter Gentianaviolett:  
 Aufnahme von 0,12µM [<sup>3</sup>H]MPP in Abhängigkeit zur Hemmstoffkonzentration von Gentianaviolett für den hOCT2. Dargestellt sind die Mediane der 9 Konzentrationen aus 3 Transportmessungen mit Standardabweichung (SD).

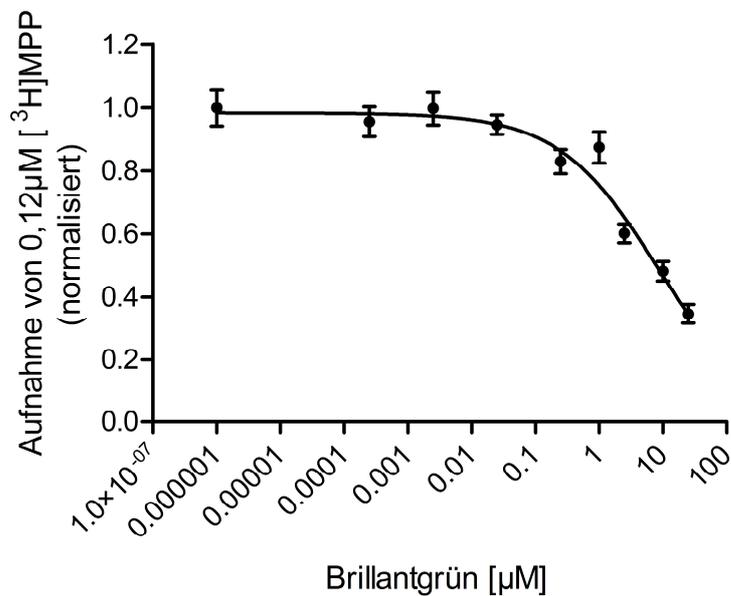


Abb. 3.1.6: Hemmkinetik des hOCT2 unter Brillantgrün:  
 Aufnahme von 0,12µM [<sup>3</sup>H]MPP in Abhängigkeit zur Hemmstoffkonzentration von Brillantgrün für den hOCT2. Dargestellt sind die Mediane der 9 Konzentrationen aus 3 Transportmessungen mit Standardabweichung (SD).

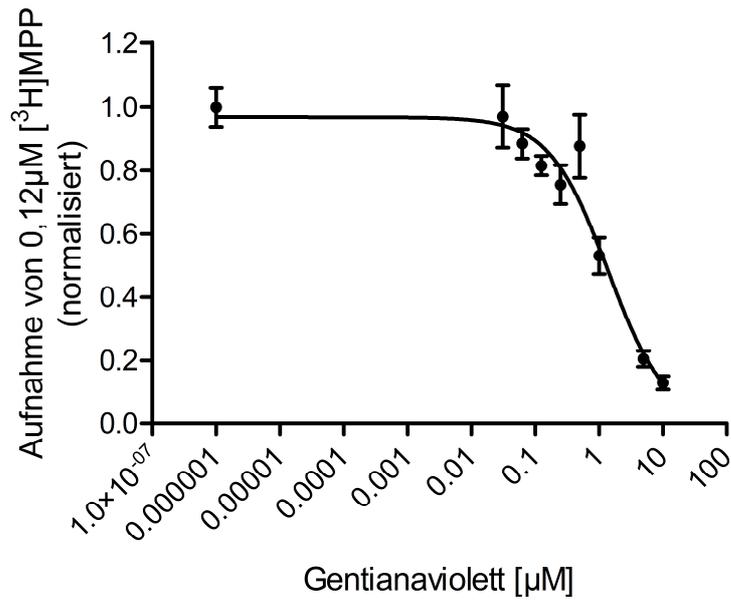


Abb. 3.1.7: Hemmkinetik des hOCT3 unter Gentianaviolett: Aufnahme von 0,12µM [³H]MPP in Abhängigkeit zur Hemmstoffkonzentration von Gentianaviolett für den hOCT3. Dargestellt sind die Mediane der 9 Konzentrationen aus 4 Transportmessungen mit Standardabweichung (SD).

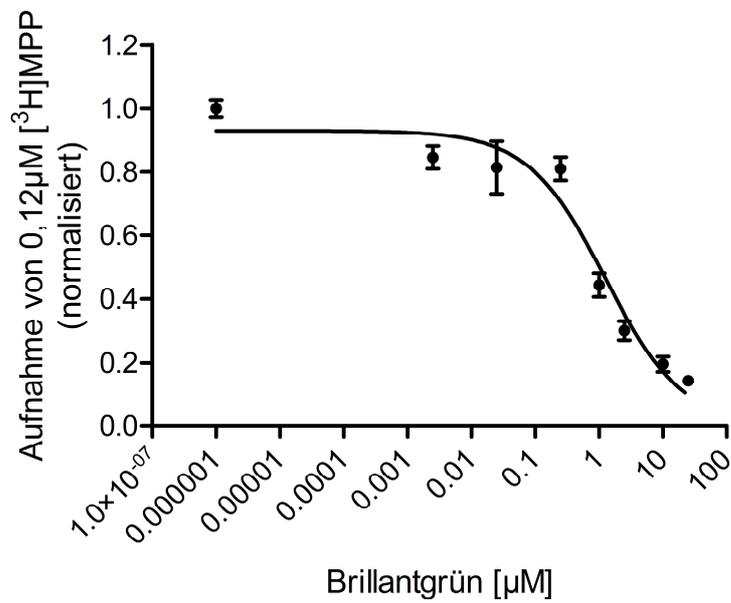
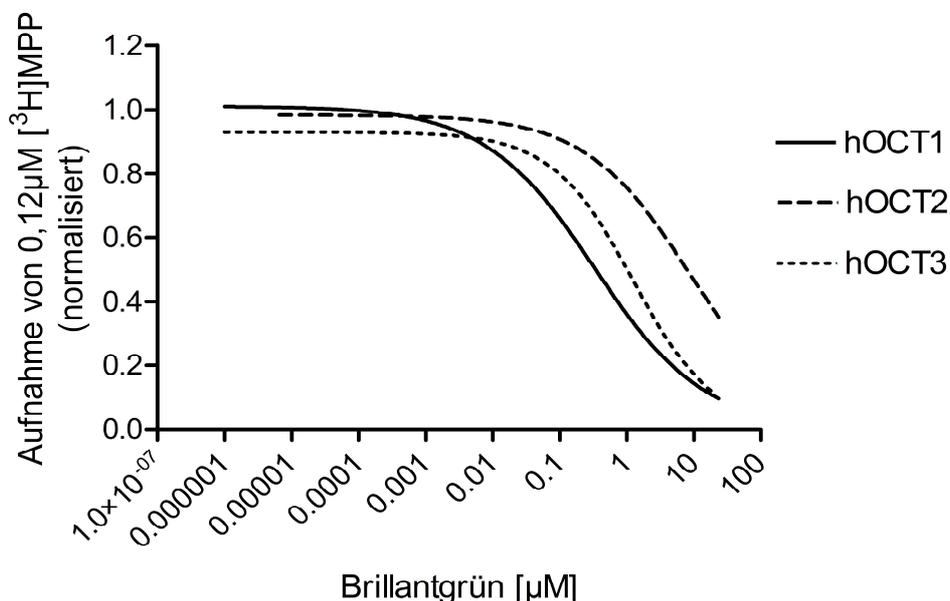


Abb. 3.1.8: Hemmkinetik des hOCT3 unter Brillantgrün: Aufnahme von 0,12µM [³H]MPP in Abhängigkeit zur Hemmstoffkonzentration von Brillantgrün für den hOCT3. Dargestellt sind die Mediane der 8 Konzentrationen aus 3 Transportmessungen mit Standardabweichung (SD).

Die Daten zeigen, dass bei der Hemmung durch Gentianaviolett der Unterschied im Verhalten der hOCT zueinander nur gering ausfällt. Dies ist sowohl aus dem Vergleich der einzelnen Hemmkurven ersichtlich, die in allen drei Fällen einen annähernd gleichen Verlauf nehmen (Abb. 3.1.3, 3.1.5 und 3.1.7), als auch aus den  $IC_{50}$ -Werten, die für das Gentianaviolett dicht nebeneinander liegen und einen signifikanten Unterschied nur zwischen dem hOCT1 und hOCT2 zeigen (Tab. 3.1.2).

Im Gegensatz dazu wurden unter Einfluss von Brillantgrün Hemmkinetiken gewonnen, die sich deutlicher unterscheiden. Dies ist sowohl graphisch, als auch in den Werten der halbmaximalen Hemmung (Tab. 3.1.2) sichtbar. Die Hemmung setzt bei dem hOCT2 (Abb. 3.1.6) im Vergleich zu dem hOCT1 (Abb. 3.1.4) und hOCT3 (Abb. 3.1.8) erst bei höheren Konzentrationen des Farbstoffs ein, was sich in einer Rechtsverschiebung der sigmaförmigen Kurve niederschlägt. Abbildung 3.1.9 fasst zur besseren Veranschaulichung dieser Rechtsverschiebung die drei Kurvenverläufe in einem gemeinsamen Graph zusammen.



**Abb. 3.1.9:** Hemmkinetiken des Brillantgrüns im Vergleich: Aufnahme von 0,12µM  $[^3H]$ MPP in Abhängigkeit zur Hemmstoffkonzentration von Brillantgrün für die hOCT1-3. Die Abbildung fasst die Kurvenverläufe aus den Abbildungen 3.1.4, 3.1.6 und 3.1.8 zusammen. Es ist eine Rechtsverschiebung der hOCT2-Kurve im Vergleich zu der von hOCT1 und hOCT3 erkennbar, was dafür spricht, dass für eine vergleichbare Hemmung des hOCT2 höhere Konzentrationen benötigt werden als bei hOCT1 und hOCT3.

So ist für die halbmaximale Hemmung des hOCT2 eine Brillantgrün-Konzentration nötig, die mehr als eine Zehnerpotenz höher ist als beim hOCT1 und die ungefähr 4mal so hoch ist wie die, die den hOCT3 halbmaximal blockiert. Mit dieser niedrigen Affinität des Brillantgrüns unterscheidet sich der hOCT2 von den beiden anderen hOCT-Subtypen deutlich.

### 3.2 Elektrophysiologie: Untersuchung eines Transportes von Gentianaviolett und Brillantgrün durch die hOCT

Xenopus Oozyten haben die Fähigkeit, mit einer Mikronadel injizierte genetische Informationen in RNA-Form effektiv zu translatieren und die dabei entstehenden Proteine in die eigene Plasmamembran einzubauen. Damit eignen sie sich sehr gut für die Expression von Transportern und Kanälen, die für elektrophysiologische Messungen mit Ionenströmen verwendet werden können.

Nachdem die ersten Ergebnisse zeigen konnten, dass Gentianaviolett und Brillantgrün mit den hOCT eine Bindung eingehen und diese hemmen, wurden weitere Untersuchungen angestrebt, die Aussagen darüber treffen sollten, ob die Farbstoffe zusätzlich auch transportiert werden.

Hierzu wurden elektrophysiologische Messungen mit *Xenopus laevis* Oozyten, die den hOCT2 über mehrere Tage stabil exprimiert hatten, angesetzt. Als Negativkontrolle dienten wasserinjizierte Oozyten.

Die Messungen erfolgten nach dem, unter 2.3.4 beschriebenen, TEVC-Verfahren. Dazu wurden in einem ORI-Bad in hOCT2- und Wasseroozyten zwei Mikroelektroden eingestochen und zwischen diesen und zwei weiteren, im ORI-Bad liegenden, Elektroden eine Klemmspannung aufgebaut. Nach Klemmung der Oozyten auf  $-50\text{mV}$  wurden sie mit  $10\text{mM}$  Cholin inkubiert. Anschließend erfolgten Messungen mit  $5\mu\text{M}$  Gentianaviolett (Abb. 3.2.1) und  $20\mu\text{M}$  Brillantgrün (Abb. 3.2.2), zuerst ohne und dann mit  $100\mu\text{M}$  Tetrabutylammonium (TBuA) als Hemmstoff. Während der Durchführung jedes Versuches wurde der

Verlauf und die Änderung des zur Erhaltung des geklemmten Membranpotentials nötigen Stromes graphisch aufgezeichnet.

Die im Folgenden präsentierten Kurven dieses Stromverlaufes (Abb. 3.2.1 und 3.2.2; gemessen in nano Ampere [nA]) zeigen beispielhafte Messungen mit Cholin, Gentianaviolett, Brillantgrün und TBuA. Die Messungen wurden jeweils am selben Tag unter gleichen Umgebungsbedingungen mit Oozyten desselben Frosches durchgeführt. Alle hier gezeigten Ergebnisse wurden durch weitere (nicht gezeigt) bestätigt.

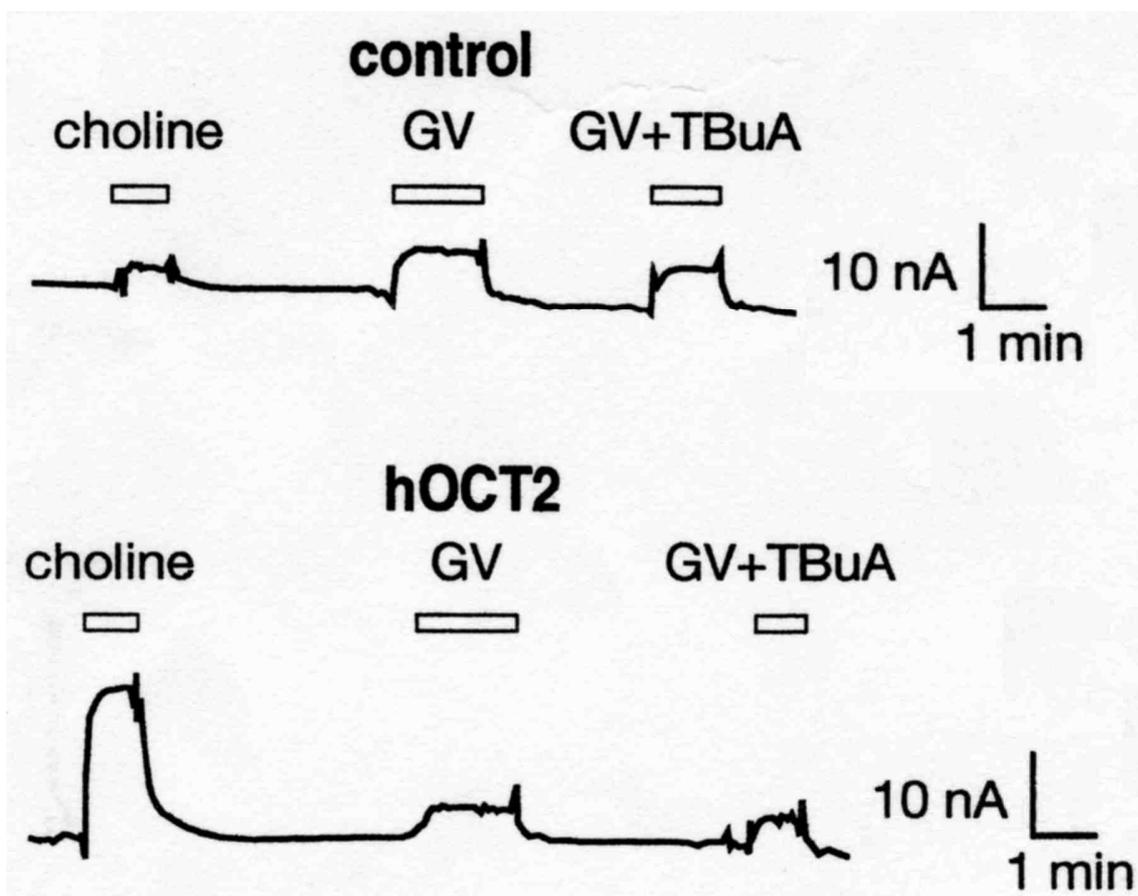


Abb. 3.2.1: Verlauf des Erhaltungstromes bei Inkubation einer Kontrolloozyte (a) und einer mit dem hOCT2 injizierten Oozyte (b) mit 10mM Cholin, 5 $\mu$ M Gentianaviolett (GV) und 5 $\mu$ M Gentianaviolett und 100 $\mu$ M Tetrabutylammonium (GV+TBuA). Die Klemmspannung beträgt  $-50$ mV. Aufgetragen ist die betragsmäßige Änderung des Stromes [nA], der zur Aufrechterhaltung der Klemmspannung nötig ist. Die Balken über der Stromkurve geben die zeitliche Länge der Inkubation mit einem Stoff an. Die Skalierung auf der rechten Seite spiegelt die Größenordnung der Einheiten wider.

Eine Auswertung der Kurven zeigt eine starke Zunahme des Erhaltungsstromes um 15nA bei Inkubation der hOCT2-Oozyte mit 10mM Cholin. Diese Zunahme begründete sich auf den Fluss der positiv geladenen Cholin-Ionen von extrazellulär nach intrazellulär, so dass durch diese Ladungsverschiebung das negative Membranpotential abgeschwächt wurde. Da die wasserinjizierte Kontrolloozyte bei Inkubation mit Cholin nur einen geringen Ausschlag aufwies, zeigte dies auch, dass die Ladungsverschiebung bei der hOCT2-Oozyte tatsächlich auf den exprimierten Transporter zurückzuführen war. Somit konnte von einer ausreichenden Expression des hOCT2 ausgegangen werden.

Die Inkubation mit Gentianaviolett zeigte bei der hOCT2- wie auch der Wasseroozyte mit ca. 3-5nA einen vergleichsweise nur geringen Ausschlag. Dieser änderte sich auch nicht unter zusätzlicher Gabe von 100µM Tetrabutylammonium. Die Höhe der Stromflussänderung lag mit TBuA auch in einem Bereich um ca. 4nA und es war kein Unterschied zwischen hOCT2- und Kontrolloozyte erkennbar.

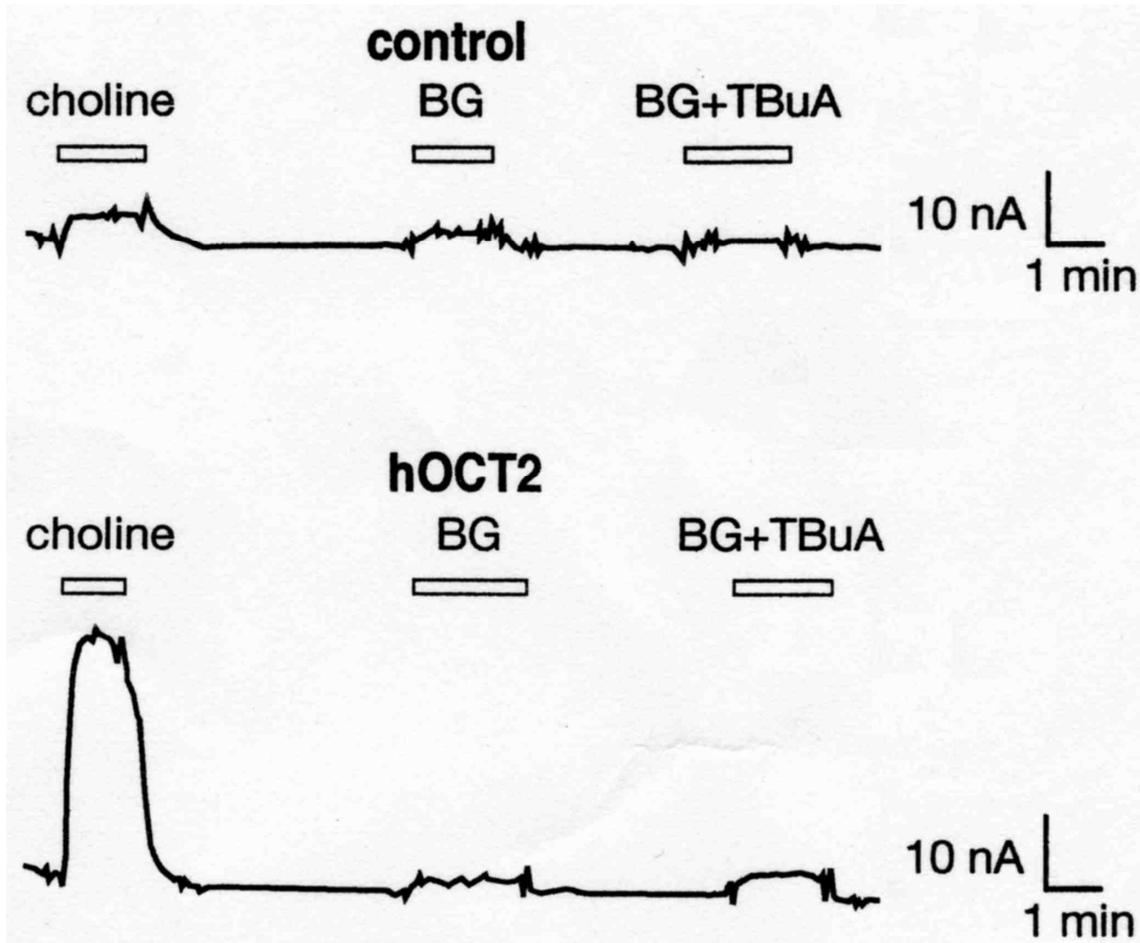


Abb. 3.2.2: Verlauf des Erhaltungstromes bei Inkubation einer Kontrolloozyte (a) und einer mit dem hOCT2 injizierten Oozyte (b) mit 10mM Cholin, 20 $\mu$ M Brillantgrün (BG) und 20 $\mu$ M Brillantgrün und 100 $\mu$ M Tetrabutylammonium (BG+TBuA). Die Klemmspannung beträgt  $-50$ mV. Aufgetragen ist die betragsmäßige Änderung des Stromes [nA], der zur Aufrechterhaltung der Klemmspannung nötig ist. Die Balken über der Stromkurve geben die zeitliche Länge der Inkubation mit einem Stoff an. Die Skalierung auf der rechten Seite spiegelt die Größenordnung der Einheiten wider.

Für die Versuche mit Brillantgrün wurde die Oozyte gewechselt. Während der Inkubation mit Cholin zeigte sich bei der hOCT2-injizierten Oozyte eine Zunahme des Erhaltungstromes um ca. 30nA. Somit konnte auch hier von einer ausreichenden Expression des hOCT2 ausgegangen werden. Die Messungen der Kontrolloozyte ergaben dagegen nur eine geringe Zunahme (2-4nA), was zeigte, dass unspezifische Transportmechanismen der Oozyte für den Transport des Cholins eine untergeordnete Rolle spielten. Unter Inkubation

mit Brillantgrün kam es bei der hOCT2-Oozyte zu einem Anstieg um ca. 2nA und damit zu einer Veränderung, die in der Größenordnung der wasserinjizierten Oozyte lag. Die gleichzeitige Zugabe des Hemmstoffes TBUA änderte nichts an diesem Ergebnis.

So zeigten sich in mehreren Experimenten die gleichen Resultate für Brillantgrün wie für Gentianaviolett. In beiden Fällen fand während der Inkubation der Oozyten mit den Farbstoffen ein Fluss von Kationen nach intrazellulär statt, der allerdings unabhängig von einer Expression des hOCT2 oder Hemmung des Transporters war.

### 3.3 Spektral-Photometrie: Untersuchung auf intrazellulären Farbstoff

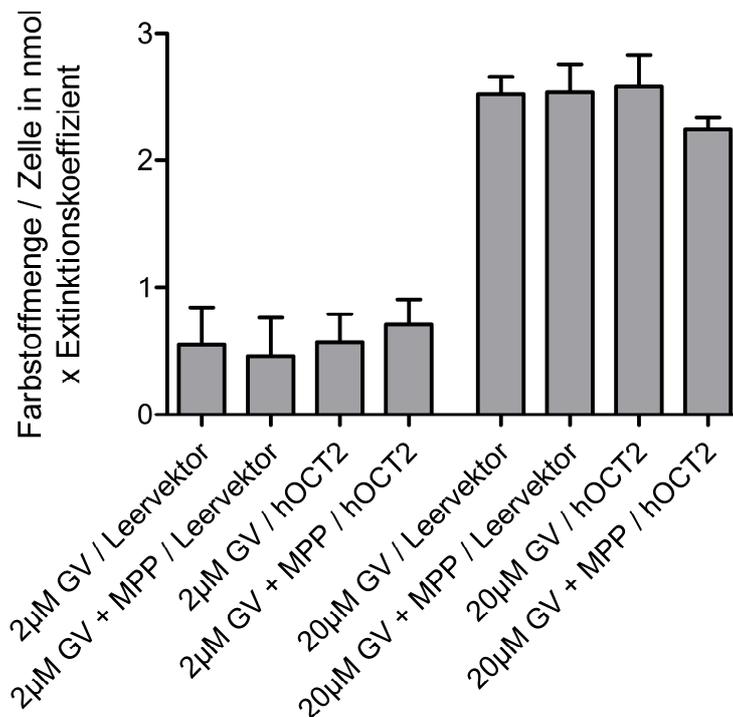
Kontrollierend und ergänzend zu den elektrophysiologischen Messungen wurden auch photometrische Versuche angesetzt, die einen Aufschluss darüber geben sollten, ob hOCT-exprimierende Zellen die Farbstoffe Gentianaviolett und Brillantgrün aufnehmen und ob dies auf einem Transport durch die organischen Kationentransporter beruht. Für die Photometrie wurden statt Oozyten Zellen der CHO-Zelllinie verwendet, die den hOCT2 stabil exprimierten, sowie Leervektor-transfizierte Zellen als Negativkontrolle.

Die Konzentration der CHO-Zellen in der Zelllösung wurde zuerst mittels einer Zählkammer bestimmt. Dann erfolgte die Inkubation der Zellen mit den Farbstoffen, ihre Lyse, und anschließend die Messung der Transmission des Lichtstrahles in Farbstoff-spezifischer Wellenlänge bei Durchtritt durch die gefärbte Zelllösung. Parallel dazu erfolgte auch eine Transmissionskontrolle der Zellen ohne Zugabe der Farben. Aus diesen Werten konnte mit Hilfe der unter 2.6 genannten mathematischen Gleichung die Menge des Farbstoffs in den einzelnen Zellen in Abhängigkeit von dem Extinktionskoeffizienten  $\epsilon$  bestimmt werden. Nachdem von stabilen Umgebungsbedingungen ausgegangen wurde,

konnte  $\epsilon$  als Konstante angesehen werden. Somit war es möglich, die gewonnenen Ergebnisse innerhalb eines Farbstoffes quantitativ miteinander zu vergleichen, sowie die beiden Farbstoffe in einem qualitativen Vergleich gegenüber zu stellen.

Die gewonnenen Farbstoffmengen pro Zelle wurden sowohl graphisch (Abb. 3.3.1 und 3.3.2), als auch mit dem ANOVA-Testverfahren ausgewertet und auf signifikante Unterschiede untersucht.

Die verwendeten Konzentrationen der Farbstoffe waren für Gentianaviolett  $2\mu\text{M}$  und  $20\mu\text{M}$  und für Brillantgrün  $1\mu\text{M}$ ,  $10\mu\text{M}$ . Pro Konzentration erfolgten acht Messungen.



**Abb. 3.3.1:** Aufnahme des Farbstoffes Gentianaviolett in CHO-Zellen:  
 Das Balkendiagramm zeigt die aufgenommenen Menge des Farbstoffes Gentianaviolett in CHO-Zellen in nmol/Zelle in Abhängigkeit von dem Extinktionskoeffizienten  $\epsilon$ . Von links nach rechts erfolgt die graphische Darstellung der Mediane aus den Einzelmessungen mit ihrer Standardabweichung für Gentianaviolett-Konzentrationen von  $2\mu\text{M}$  und  $20\mu\text{M}$  jeweils für den Leervektor und hOCT2-transfizierte CHO-Zellen in An- und Abwesenheit von 2mM MPP als Hemmstoff

Aus Abbildung 3.3.1 ist ersichtlich, dass die Menge an intrazellulär aufgenommenem Farbstoff mit steigender Konzentration des Gentianavioletts in der Inkubationslösung zunimmt. So ist graphisch bei einer Verzehnfachung der äußeren Konzentration eine ca. 5-fach größere Menge an Farbstoff in den Zellen nachweisbar. Dabei gilt diese Vervielfachung in gleichem Maße für die hOCT2-Zellen wie auch für die, mit dem Leervektor transfizierten, CHO-Zellen. Auch die Hemmung des hOCT2 mit 2mM MPP führt zu keiner Veränderung der aufgenommenen Farbstoffmenge in die Zellen. Eine Testung dieser Ergebnisse nach dem one-way-ANOVA-Verfahren zeigte wie erwartet keine statistisch relevanten Unterschiede auf.

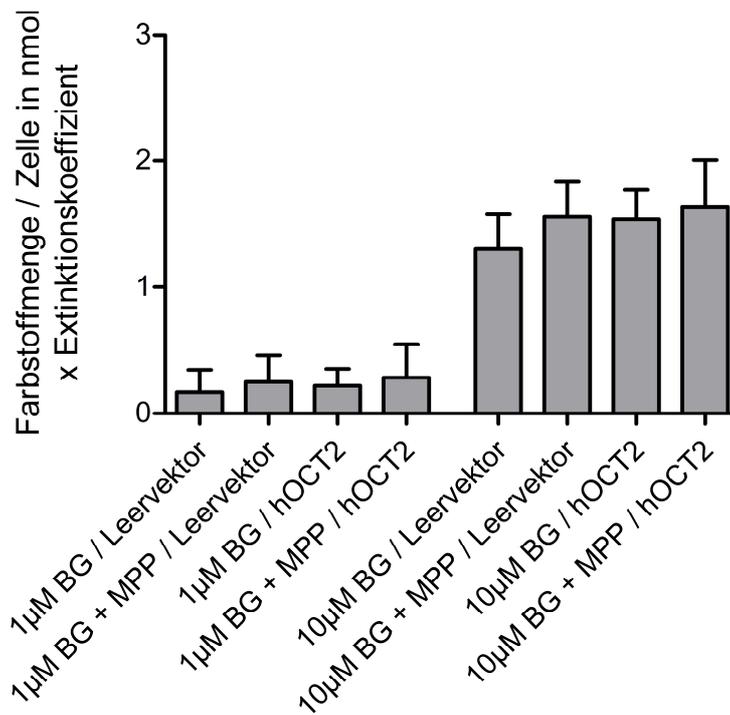


Abb. 3.3.2:

Aufnahme des Farbstoffes Brilliantgrün in CHO-Zellen:

Das Balkendiagramm zeigt die aufgenommene Menge des Farbstoffes Brilliantgrün in CHO-Zellen in nmol/Zelle in Abhängigkeit von dem Extinktionskoeffizienten  $\epsilon$ . Von links nach rechts erfolgt die graphische Darstellung der Mediane aus den Einzelmessungen mit ihrer Standardabweichung für Brilliantgrün-Konzentrationen von 1µM und 10µM jeweils für den Leervektor und hOCT2-transfizierte CHO-Zellen in An- und Abwesenheit von 2mM MPP als Hemmstoff

Die an Abb. 3.3.2 gezeigten Ergebnisse liefern für Brillantgrün ein ähnliches Resultat wie für Gentianaviolett. Auch hier zeigt sich mit steigender Farbkonzentration in der Inkubationslösung eine vermehrte Farbstoffaufnahme in die CHO-Zellen. Eine Verzehnfachung der Brillantgrünkonzentration führte ebenfalls zu einer ca. 5-fach erhöhten intrazellulären Farbstoffmenge. Analog zu der Photometrie mit Gentianaviolett ist aber auch hier bei konstanter Konzentration der Inkubationslösung graphisch kein Unterschied zwischen hOCT2- und Leervektor-transfizierten Zellen feststellbar. Die Hemmung des hOCT2 mit 2mM MPP zeigte ebenfalls keinen Effekt auf die Farbstoffaufnahme. In der direkten Gegenüberstellung und Testung der Ergebnisse nach ANOVA zeigte sich innerhalb einer Konzentration kein signifikanter Unterschied der intrazellulären Farbstoffmengen. Somit bestätigte dieser Test die zuvor an Hand der graphischen Auswertung vermutete Schlussfolgerung in Analogie zu den Ergebnissen mit Gentianaviolett. Es erfolgte zwar eine Aufnahme beider Farbstoffe in das Zellinnere, diese ist aber nicht auf die Anwesenheit eines Kationentransporters zurückzuführen.

#### 3.4 Migrationsmessungen: Effekte von hOCT-Inhibitoren auf menschliche Keratinozyten in vitro

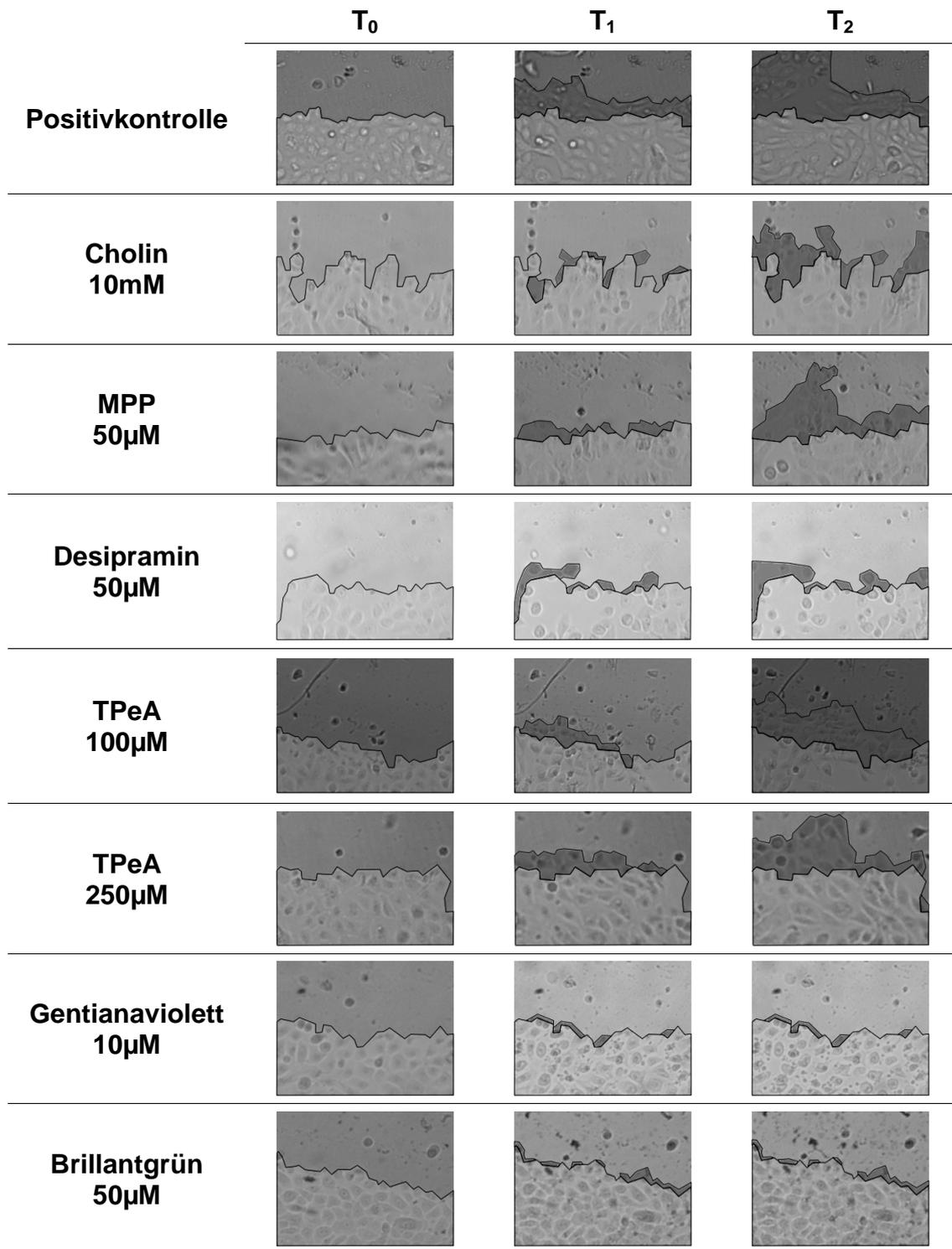
Nachdem die Hemmung der hOCT durch Gentianaviolett und Brillantgrün experimentell nachgewiesen werden konnte und sich zeigte, dass die Farbstoffe von den Zellen unabhängig vom Vorhandensein eines Kationentransporters aufgenommen werden, wurde der Einfluss dieser beiden Beobachtungen auf Hautzellen in vitro untersucht. Für diesen Zweck wurde ein Experimentalmodell genutzt, das die Bewegung und Proliferation primärer Keratinozyten unter Einfluss verschiedener Hemmstoffe der hOCT festhalten und messen konnte.

Für diese Migrationsversuche wurde in einen konfluenten Keratinozyten-Monolayer mit einer Plastikpipettenspitze eine „Wunde“ gesetzt. Die Bewegung der Keratinozyten am Rand dieses Kratzers wurde beobachtet und mit

Videokameras im Zeitraffer dokumentiert.

Untersucht wurde der Einfluss von 10 $\mu$ M Gentianaviolett, 50 $\mu$ M Brillantgrün, 100 $\mu$ M bzw. 250 $\mu$ M TPeA, 10mM Cholin, 50 $\mu$ M MPP und 50 $\mu$ M Desipramin auf die Migration. Dabei sollte festgestellt werden, ob eine Hemmung der hOCT durch die genannten Stoffe die Geschwindigkeit der Migration beeinflusst. Die Ergebnisse wurden mit Keratinozyten verglichen, deren Bewegung in normalem Kultivierungsmedium ohne Hemmstoffe gemessen wurde (Positivkontrolle).

Abb. 3.4.1 zeigt den Keratinozyten-Monolayer zu Beginn des Experiments ( $T_0$ ), sowie vier ( $T_1$ ) und acht ( $T_2$ ) Stunden später. Abb. 3.4.2 veranschaulicht die ermittelten Durchschnittsgeschwindigkeiten der Zellen unter Einfluss der Substrate:



**Abb. 3.4.1:** Effekt einzelner Hemmstoffe der hOCT auf Keratinozyten-Migration in vitro:  
 Die Abbildung zeigt Ausschnitte aus der Videodokumentation zu Beginn der Messung (T<sub>0</sub>), sowie vier (T<sub>1</sub>) und acht (T<sub>2</sub>) Stunden später. Die, mit einer schwarzen Grenze versehene, helle Schattierung markiert den bereits zu Beginn der Messung mit Keratinozyten bewachsenen Bereich am Rand des Kratzers. Die reepithelisierten Areale sind durch eine dunklere Schattierung gekennzeichnet.

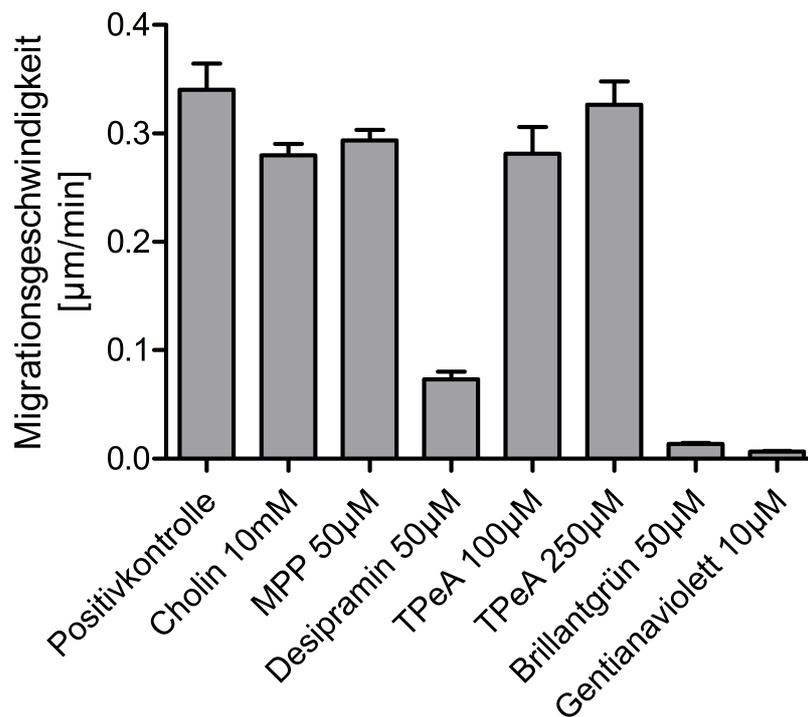


Abb. 3.4.2: Effekt von Hemmstoffen der hOCT auf die Keratinozyten-Migration:  
 Die Videoaufzeichnungen wurden mit Hilfe eines Computer-assistierte Zelltracking-Verfahrens ausgewertet und die Migration einzelner Keratinozyten am Rand des Monolayers gemessen. Graphisch aufgetragen ist die durchschnittliche Geschwindigkeit und ihre Standardabweichung von jeweils 20 Keratinozyten über 24 Stunden in µm pro Minute.

Aus den Abbildungen 3.4.1 und 3.4.2 ist ersichtlich, dass die Inkubation der Zellen mit Gentianaviolett und Brillantgrün mit einer signifikanten Abnahme der Migrationsbewegung unter dem Mikroskop einhergeht. Die Flächen der Reepithelisierung (in 3.4.1 durch dunkle Areale gekennzeichnet) sind unter Einfluss der Farbstoffe deutlich kleiner als bei der Positivkontrolle in dem gleichen Zeitraum. Die gemessene Geschwindigkeit der Keratinozyten (Abb. 3.4.2) geht annähernd gegen Null.

Graphisch nicht ersichtlich ist, dass die Keratinozyten nach anfänglicher Bewegung innerhalb von wenigen Stunden in einen Zustand völliger Bewegungslosigkeit übergehen. Ebenfalls nur unter dem Mikroskop erkennbar ist ein Verlust der Zell-Zell-Kontakte und eine Abkuglung der Zellen (Abb. 3.4.3). Dies spricht für einen Zelltod der Keratinozyten. Abb. 3.4.3 lässt des

Weiteren exemplarisch die intrazelluläre Aufnahme der Farbstoffe vermuten. So sind zum Einen eine schärfere Darstellung der Zellwand sowie aber auch eine Hervorhebung des Nukleus und kleine Feststoffpartikel im Zytoplasma nach Inkubation mit den Farbstoffen erkennbar.

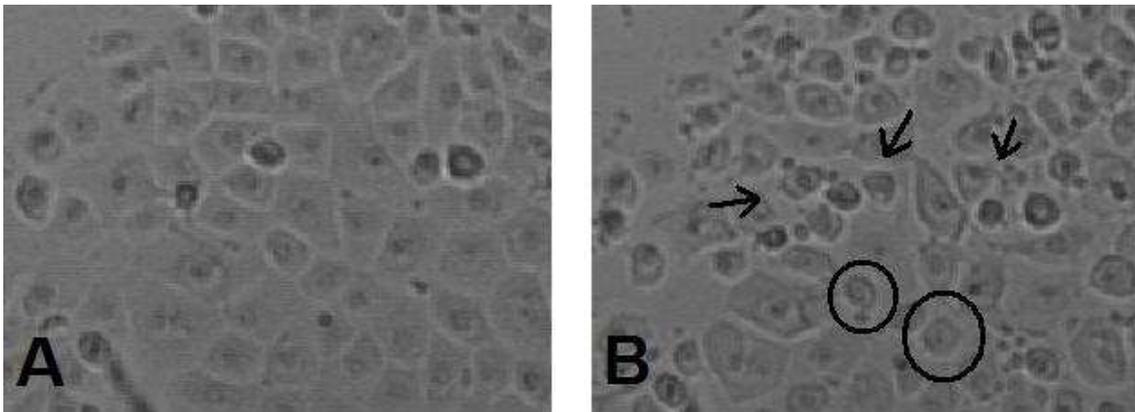


Abb. 3.4.3: Toxizität des Farbstoffes Gentianaviolett:  
Die Fotos zeigen einen Ausschnitt des Keratinozyten-Monolayers zu Beginn der Aufzeichnung (A) und 6 Stunden später (B). Im Vergleich zu dem geschlossenen Zellverband in A sind unter Einfluss von 10 $\mu$ M Gentianaviolett nach 6 Stunden Lösungen der Zell-Zell-Kontakte (Pfeile) und eine Abkuglung der Zellen (Kreise) sichtbar. Auch fällt in B im Bereich der Zellwand und des Nukleus eine Kontrastierung der Strukturen auf.

Auf Grund der Zytotoxizität konnte nicht beurteilt werden, ob die Inhibition der hOCT durch die Farbstoffe eine eigenständige Auswirkung auf die Keratinozyten hatte oder nicht. Daher wurden weitere Untersuchungen mit Cholin, MPP und TPcA, also mit Substanzen aus der Gruppe der etablierten Inhibitoren der hOCT, angesetzt, um eine Hemmung der Transporter zu erreichen, ohne die Keratinozyten dabei zu schädigen. Unter dem Einfluss dieser Substanzen zeigte sich, vom Rand des Kratzers ausgehend, ein deutliches Wachstum des Monolayers. Die Fläche der wieder bewachsenen Areale war dabei in ihrer Größe in etwa vergleichbar mit der der Positivkontrolle. Auch die Geschwindigkeit der Migration unterschied sich nicht signifikant von der ungehemmter Keratinozyten. Somit war davon auszugehen, dass die Hemmung der organischen Kationentransporter keinen Einfluss auf das Migrationsverhalten der Keratinozyten hatte.

Das ebenfalls getestete Desipramin erwies sich als gleichfalls toxisch für die Zellen wie die Farbstoffe. Da die Toxizität offensichtlich nicht so groß war wie die der Farben, starben die Keratinozyten erst nach einem längeren Zeitraum ab. Somit konnten sich die Zellen zu anfangs noch eine Zeitlang bewegen, was erklärt, warum die über 24 Stunden gemittelte Durchschnittsgeschwindigkeit größer ist als bei Gentianaviolett und Brillantgrün und sich hier auch größere Areale der Reepithelisierung finden.

## 4 Diskussion

### 4.1 Die Interaktion von Gentianaviolett und Brillantgrün mit den hOCT

In dieser Arbeit wurde der Effekt der Triphenylmethanfarbstoffe Gentianaviolett und Brillantgrün auf die hOCT untersucht. Zum Einen wurde ein hemmender Einfluss dieser Farbstoffe auf die Transporter nachgewiesen. Zum Anderen sollte untersucht werden, ob ein Transport in das Zellinnere stattfindet. Ein dritter Teil beschäftigte sich mit den Effekten der hOCT-Hemmung auf menschliche Keratinozyten.

In den Transportkinetiken zeigte sich, dass die hOCT durch die Farbstoffe hochaffin gehemmt wurden.

Aus den, in Tabelle 3.1.2 genannten,  $IC_{50}$ -Werten ist jedoch auch erkennbar, dass trotz der chemischen Verwandtschaft der Farbstoffe und ihrer strukturellen Ähnlichkeit im molekularen Aufbau ihre Affinität zu den einzelnen hOCT nicht durchgehend miteinander vergleichbar ist.

So bedarf es zwar bei beiden Farbstoffen nur einer geringen Konzentration, um den hOCT1 halbmaximal zu hemmen und einer höheren, um den gleichen Effekt für den hOCT2 zu erzielen, womit man postulieren kann, dass beide Farbstoffe ein ähnliches Verhalten in ihrer Affinität zu den Transportern zeigen: sie sind am stärksten affin zu dem hOCT1 und am wenigsten zu dem hOCT2, ihre Affinität zu dem hOCT3 liegt zwischen der für hOCT1 und hOCT2.

Auffällig ist auf der anderen Seite aber, dass die Affinitätsunterschiede hinsichtlich der drei hOCT für Gentianaviolett ein relativ moderates Maß haben, wohingegen sie bei Brillantgrün deutlich ausgeprägt sind. So ist Brillantgrün für den hOCT1 rund 20-30 mal so affin wie für den hOCT2, wohingegen die Affinität des Gentianavioletts zum hOCT1 gerade einmal das Doppelte der zum hOCT2 beträgt.

Aus diesem Ergebnis könnte sich eine Möglichkeit zur Nutzung des Brillantgrüns in der Forschung ableiten lassen. So wäre durch die ausgeprägte

Affinität zu dem hOCT1 verglichen mit dem hOCT2 und hOCT3 eine Verwendung dieses Farbstoffes als spezifischer hOCT1-Blocker denkbar.

Während der Erstellung der Hemmkinetiken fiel in den Versuchen eine Anfärbung der CHO-Zellen mit den Farbstoffen auf. Auch in den elektrophysiologischen TEVC-Messungen zeigte sich, dass sich *Xenopus laevis* Oozyten durch die Inkubation mit Gentianaviolett und Brillantgrün verfärbten. Des Weiteren war hier auch eine elektrische Potentialänderung geringer Stärke über die Zellmembran nachweisbar. Zusammen mit der nachgewiesenen Hemmung und der Bindung der Farbstoffe an die hOCT legte dies nahe, eine Aufnahme von Gentianaviolett und Brillantgrün in die Zellen zu vermuten. Die Überlegung, ob die Farbstoffe eventuell von den hOCT transportiert werden könnten, wurde von Ergebnissen früherer Untersuchungen gestützt, in denen gezeigt werden konnte, dass das relative Molekulargewicht der meisten Moleküle, die von den hOCT transportiert werden, unter 500 liegt (Koepsell et al., 2007). Gentianaviolett mit einem Molekulargewicht von 407,98 und Brillantgrün mit 482,63 (Merck Index, 14<sup>th</sup> Edition) liegen unter dieser Grenze und fallen damit in die Kategorie möglicherweise transportierter Substanzen.

Bei An- und Abwesenheit von TBuA, eines etablierten Inhibitors des hOCT2 (Dresser et al., 2002), kam es jedoch zu keiner Veränderung der Ergebnisse in den elektrophysiologischen Messungen. Somit musste eine Hemmung des hOCT2 für die mögliche Farbstoffaufnahme ohne Belang sein. Außerdem wurde auch bei Inkubation der Wasseroozyten ein Strom gemessen, der in seiner Stärke vergleichbar mit dem der hOCT2-Oozyten war, was ebenfalls dafür sprach, dass eine eventuelle Farbstoffaufnahme unabhängig von der Expression des hOCT2 stattfand.

Daher können die Anfärbung der Oozyten sowie die gemessene Potentialänderung zwar sehr gut als Effekte einer Aufnahme positiv geladener Farbstoffmoleküle in die Oozyten interpretiert werden, allerdings wäre eine Anfärbung auch bei einer Anlagerung der Farbstoffe an die Membran der

Oozyte zu sehen und die Potentialänderung durch die externe Hemmung von Membrankanälen erklärbar.

Um in dieser Frage Klarheit zu erhalten, wurden photometrische Versuche angesetzt, in denen sich nach Inkubation der CHO-Zellen mit Gentianaviolett und Brillantgrün intrazellulärer Farbstoff nachweisen ließ.

Auch hier wurde kein durch den hOCT2 bedingter Zuwachs dieser Farbstoffmenge verzeichnet. Stattdessen zeigte sich eine, mit steigender äußerer Farbstoffkonzentration zunehmende, Ansammlung der Farben in den CHO-Zellen. Diese war in gleichem Maße bei der Leervektorzelllinie und der hOCT2-exprimierenden Zellreihe zu finden und war wie in der Elektrophysiologie ebensowenig durch eine Hemmung des hOCT2 beeinflussbar.

Als Ergänzung zeigten auch die Migrationsversuche mit menschlichen Keratinozyten eine intrazelluläre Ansammlung der Farben. Dies führte zwar zu einem Untergang der mit den Farbstoffen inkubierten Zellreihen, so dass keine Aussagen zu dem Migrationsverhalten der Zellen mehr gemacht werden konnten, jedoch wurde dadurch auch Raum für Diskussionen eröffnet, welchen Einfluss die Farbstoffe auf den Zellstoffwechsel haben könnten (vgl. 4.2).

Zusammenfassend lässt sich also aus den Ergebnissen dieser Messungen ableiten, dass Gentianaviolett und Brillantgrün zwar anscheinend die Zellwand überwinden und sich intrazellulär ansammeln können, dies jedoch nicht auf die Funktion des hOCT2 zurückgeführt werden kann.

Nachdem die Aufnahme sowohl bei den CHO-Zellen, wie auch den menschlichen Keratinozyten beobachtet wurde und bei den *Xenopus laevis* Oozyten zumindest als wahrscheinlich angesehen werden darf, ist eine Diffusion der Farben durch die Zellwand hindurch zu diskutieren. Zwar besitzen sie eine positive Ladung und damit einen hydrophilen Anteil, der große Rest des Moleküls ist jedoch bei beiden Farbstoffen unpolar und somit fähig, die lipophile Zellmembran zu überwinden.

Denkbar sind auch weitere Transporter oder Kanäle, die sowohl in CHO-Zellen, wie auch in *Xenopus laevis* Oozyten und menschlichen Keratinozyten vorhanden sind und diese Aufgabe übernehmen.

Letztlich ist aber auch ein Transport durch die hOCT auf Grund der Ergebnisse nicht völlig auszuschließen. Von der chemischen Struktur und Beschaffenheit, ihrer positiven Ladung und ihrem Molekulargewicht ausgehend, sind beide Farbstoffe durchaus als Substrate der hOCT denkbar. In diesem Fall würden dann aber die Daten nahelegen, dass andere Mechanismen den größten Teil der Transportleistung übernehmen und der Anteil des hOCT2 in den Experimenten so gering an dem gesamten Transport war, dass er mit den, in dieser Arbeit verwendeten, Versuchsanordnungen nicht nachgewiesen werden konnte.

#### 4.2 Klinische Relevanz

Die lokale Anwendung des Gentianavioletts und Brillantgrüns auf der Haut wurde in der Literatur immer wieder mit Wundheilungsstörungen in Verbindung gebracht (Neufeld et al., 1920; Baumann, 1923; Norrby et Mobacken, 1972). Mittlerweile konnte festgestellt werden, dass solche Nebenwirkungen auftreten, wenn Gentianaviolett in Konzentrationen verwendet wird, die höher sind als im Neuen Rezepturformularium (NRF) mit 0,5% für kleine und 0,1% für größere Hautdefekte empfohlen (Brockow et al, 1999; Gloor et Wolnicki, 2001). Die Vorgänge, die diesen Wundheilungsstörungen zu Grunde liegen, sind in der Vergangenheit kontrovers diskutiert worden.

So sind beispielsweise mikrovaskuläre Veränderungen in mit Gentianaviolett behandelten Arealen tierischer Haut beschrieben worden (Eriksson et Mobacken, 1977). Auch die Bildung von Kollagen in den Zellen und die RNA-Synthese werden durch Triphenylmethanfarbstoffe auf Transkriptions- und Translationsebene gestört (Mobacken et al., 1973; Mobacken et al., 1974; Niedner et Schöpf, 1986). Hier sollen sowohl diese wie auch weitere Aspekte der Farbstoff-Nebenwirkungen betrachtet werden.

Die Wundheilung basiert auf basaler Zellteilung, Proliferation und Differenzierung der Keratinozyten. Diese Vorgänge werden unter Anderem von nicht-neuronalem Acetylcholin gesteuert, welches von den Keratinozyten synthetisiert und ausgeschüttet wird (Grando et al., 1993a; Grando et al., 1993b; Grando et al., 1995; Grando et al., 1996; Klapproth et al., 1997; Wessler et al., 1998). Da gezeigt wurde, dass sich die hOCT sowohl in der Haut, sowie in den glatten Muskelzellen der subkutanen Blutgefäßen (hOCT3) befinden (Lips et al., nicht publizierte Daten) und sie Cholin und Acetylcholin transportieren (Lips et al., 2005), kann man annehmen, dass sie diese Rolle auch in der Haut übernehmen und damit an dem Vorgang der Wundheilung beteiligt sind.

Bei einer Hemmung der hOCT durch Gentianaviolett könnten somit die von Acetylcholin gesteuerten Proliferationsmechanismen der Keratinozyten und die damit verbundenen Wundheilungsvorgänge der Haut unterbunden oder zumindest gestört werden. Durch die Blockade seines Transportes könnte in Folge das Acetylcholin seine Funktion als para- und autokriner Botenstoff der Keratinozyten (Grando, 1997; Wessler et al., 1998, Grando, 2006) verlieren. Außerdem wird auch die Aufnahme von Cholin gehemmt, das essentiell für die Synthese von Acetylcholin ist. Dies würde zu einer Reduktion in der Zellteilungsrate der Keratinozyten und in Folge zu einer Verzögerung der Proliferation der basalen Zellschicht und damit auch der Regeneration der Haut führen.

Die Hemmung des hOCT3 in den subkutanen Blutgefäßen könnte diesen Effekt noch verstärken. Da bekannt ist, dass dieser Transporter unter Anderem die zelluläre Aufnahme von Noradrenalin vermittelt (Koepsell et al., 2007), welches im Interstitium nach Ausschüttung aus den sympathischen Nervenenden an  $\alpha_1$ - und  $\alpha_2$ -Adrenozeptoren bindet (Borbujo et al., 1989; Bao, 1993) und damit die Vasokonstriktion stimuliert, würde eine Hemmung des hOCT3 eine Ansammlung von Noradrenalin im Zellzwischenraum mit sich ziehen. Bedingt durch die fehlende zelluläre Aufnahme und den Abbau des Neurotransmitters würde die dadurch anhaltende Vasokonstriktion längerfristig zu einer Hypoxie

der darüber liegenden Hautpartie führen. Die Regeneration wäre eingeschränkt und es könnten bei einer prolongierten Anwendung der Farbstoffe auch Nekrosen folgen. Den von Mobacken und seinen Mitarbeitern berichteten Beobachtungen der mikrovaskulären Veränderungen (Eriksson et Mobacken, 1977) könnte nach dieser Theorie eine Hemmung des hOCT3 in den subkutanen Blutgefäßen zu Grunde liegen.

Nimmt man an, dass eine beim Auftragen wässrige 0,5%ige Gentianaviolett-Tinktur sich beim Eindringen in die tiefen Regionen der Haut bis hin zu den subkutanen Hautgefäßen um einen geschätzten Faktor 1000 verdünnt, dann würde der Farbstoff noch immer den hOCT1 zu >90% hemmen und den hOCT2 und hOCT3 zu >70%, womit die Voraussetzungen gegeben wären, mit denen sich, auf einer Blockade der hOCT beruhende, Nebenwirkungen durchaus erklären lassen.

Um festzustellen, wie sich bei Anwendung von Gentianaviolett und Brillantgrün sowohl die Hemmung der hOCT, als auch die Farbstoffaufnahme in die Zellen auf menschliche Hautzellen auswirkt, wurden in-vitro-Migrations-Assays mit Keratinozyten durchgeführt. In diesen wurde der Einfluss der Farbstoffe und etablierter hOCT-Blocker auf die Bewegung der Zellen als Einzelnes und die Proliferation des Keratinozyten-Monolayers als Ganzes untersucht.

Dabei wurden die Farbstoffe in Konzentrationen verwendet, bei denen von einer starken Einschränkung der hOCT-Funktion der Keratinozyten ausgegangen werden konnte. So hemmen die verwendeten 10µM Gentianaviolett den hOCT1 mit >95%, den hOCT2 mit >85% und den hOCT3 mit >85%. Bei 50µM Brillantgrün war von einer Hemmung von >90% beim hOCT1, >70% im Falle des hOCT2 und >90% beim hOCT3 auszugehen.

In den Messungen zeigte sich ein deutlich vermindertes Wachstum des Monolayers in Verbindung mit einer Reduzierung der Migrationsgeschwindigkeit auf annähernd Null. Zurückzuführen war dies allerdings nicht auf eine Blockade der hOCT, sondern auf die Toxizität der Farbstoffe in den verwendeten Konzentrationen. Bei Verwendung der hOCT-Inhibitoren TPcA, Cholin und

MPP, die keinen Zelluntergang zu Folge hatten, wurde weder die Migration der Keratinozyten, noch das Wachstum des Monolayers eingeschränkt. Daraus musste der Schluss gezogen werden, dass eine Hemmung der hOCT keinen Einfluss auf Wachstum und Proliferation der Keratinozyten hat. Verfolgt man diesen Gedanken weiter, so muss man annehmen, dass eine Hemmung des Acetylcholintransportes durch die hOCT entweder in der Physiologie der Wundheilung doch keine so große Rolle spielt wie ursprünglich gedacht oder dass dieser Transportweg durch andere Mechanismen kompensiert wird.

Eine weitere Schlussfolgerung konnte hier ebenfalls gezogen werden und zwar, dass auch der Untergang der Zellen bei Inkubation mit Gentianaviolett und Brillantgrün nicht mit einer Blockade der hOCT erklärt werden kann, sondern auf anderen Mechanismen beruhen muss.

So sind mögliche Erklärungen für die Zytotoxizität in intrazellulären Abläufen zu suchen. Im Einklang mit den elektrophysiologischen und photometrischen Beobachtungen wurde auch in den Keratinozyten von den Zellen aufgenommener Farbstoff an Hand lichtmikroskopisch erkennbarer Partikel sowie einer Anfärbung der Zellorganellen und des Nukleus gezeigt (vgl. Abb. 3.4.3). Analog zu der Aufnahme des Farbstoffs in die CHO-Zellen und die *Xenopus* Oozyten lässt sich somit die Schlussfolgerung ziehen, dass die Keratinozyten die Farben auch über unspezifische Transportmechanismen aufnehmen (vgl. auch 4.1). Da alle Zellen mit Nachweis intrazellulärer bzw. intranukleärer Farbeinschlüsse innerhalb einiger Stunden Zeichen der Autolyse aufwiesen, liegt es nahe, einen ursächlichen Zusammenhang zwischen der Farbstoffaufnahme und dem Zelltod zu vermuten.

Noeske, Rosenkranz und Rostock berichteten über die Bindung von Gentianaviolett an DNA (Rostock, 1950; Noeske, 1966; Rosenkranz et Carr, 1971). Noeske stellte fest, dass bei Färbung von Zellen mit Gentianaviolett der Grad der Färbung direkt proportional zu dem DNA-Gehalt der Zellen ist und nahm deshalb eine Anlagerung des Farbstoffes an die DNA an. Rosenkranz beobachtete, dass Zellen, denen das DNA-Reparaturenzym DNA-Polymerase fehlt, wesentlich empfindlicher auf Gentianaviolett reagieren als gesunde Zellen.

Daraus folgte er, dass Gentianaviolett durch einen schädlichen Einfluss auf die DNA Zellen während der Synthesephase hemmt. Norrby und Mobacken konnten 1971 zeigen, dass der Farbstoff auch auf Zellen in der G<sub>0</sub>- oder G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus wirkt, was somit auch für die Haut bedeutsam ist, bei der sich die Mehrzahl der Keratinozyten in einer der beiden Phasen befindet (Norrby et Mobacken, 1972).

Die Bindung des Farbstoffes an die DNA war bisher Teil der Erklärung der antiinfektiösen Wirksamkeit der Farbstoffe auf Mikroorganismen (Niedner et Pfister-Wartha, 1990). Es ist noch nicht untersucht, ob dies auch die toxischen Effekte auf die Keratinozyten und damit die Nebenwirkungen der Farbstoffe auf die Haut erklärt. An Hand der in dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse könnte aber ein solcher Vorgang durchaus als Ursache denkbar sein.

#### 4.3 Vergleich der hemmenden Wirkung von Gentianaviolett und Brillantgrün mit bekannten Inhibitoren der hOCT

Seit der Entdeckung und Erstbeschreibung der hOCT sind bereits über 70 Substrate auf ihre Wechselwirkungen mit den Transportern untersucht worden. In der Gruppe bereits getesteter Substanzen finden sich nicht nur Modellsubstrate oder –hemmstoffe wie das MPP oder das TPeA, sondern auch humane Stoffwechselprodukte wie Hormone, Metaboliten oder Neurotransmitter sowie systemisch wirkende Medikamente. Je nach Zugehörigkeit eines Stoffes zu der Gruppe der Substrate oder der Inhibitoren, wurden Transport- und Hemmkinetiken erstellt und die halbmaximalen Transport- ( $K_m$ ) oder Hemmwerte ( $IC_{50}$ ) bestimmt. Mit der Charakterisierung der Wechselwirkungen von Gentianaviolett und Brillantgrün wird die Gruppe der Inhibitoren um zwei Substrate ergänzt, deren Stellenwert im Vergleich mit den anderen Inhibitoren im Folgenden diskutiert werden soll.

So zeigt Tabelle 4.3.1 beispielhaft Substrate, deren Affinitäten zu dem hOCT2 ähnlich der Affinitäten der Triphenylmethanfarbstoffe sind. Hierunter fallen

Chemotherapeutika wie das Cisplatin, Psychostimulantien wie das 3,4-Methyldioxymetamphetamin und das D-Amphetamin oder die Antihistaminika Budesonid und Astemizol (Ciarimboli et al., 2005; Lips et al., 2005; Ampoux et al., 2006; Lips et al., unpublished data). Auch einer der am häufigsten verwendeten Inhibitoren der hOCT, das TPeA, das auch in den Experimenten dieser Arbeit zur Hemmung verwendet wurde, kann hier mit angeführt werden (Zhang et al., 1998).

	IC <sub>50</sub> -Werte [ $\mu$ M] bezüglich hOCT2
Gentianaviolett	1,73 $\pm$ 0,55
Cisplatin	1,5
3,4-Methyldioxymetamphetamin	1,6
TPeA	1,5
Brillantgrün	8,80 $\pm$ 2,30
Budesonid	7,3
Astemizol	12,2
D-Amphetamin	11

Tab. 4.3.1: Vergleichende Gegenüberstellung einzelner ausgewählter Inhibitoren des hOCT2 mit den Triphenylmethanfarbstoffen Gentianaviolett und Brillantgrün:  
Die angeführten Werte geben die Konzentration des Inhibitors in  $\mu$ M an, die nötig ist, um den hOCT2 halbmaximal zu hemmen (IC<sub>50</sub>-Werte).

Der Vergleich zeigt, dass Gentianaviolett mit seinem halbmaximalen Hemmwert für den hOCT2 auf einer Höhe mit Cisplatin, 3,4-Methyldioxymetamphetamin und TPeA liegt. Somit ist die Affinität des Farbstoffes für den hOCT2 ungefähr die gleiche wie die der drei anderen Inhibitoren. Für Brillantgrün gilt Ähnliches: Budesonid, Astemizol und D-Amphetamin liegen mit ihren IC<sub>50</sub>-Werten für den hOCT2 ebenfalls in einer Größenordnung wie Brillantgrün und weisen daher eine vergleichbare Affinität auf.

Eine Gegenüberstellung der Farbstoffe und weiterer Beispiele der bisher erforschten Inhibitoren wie zum Beispiel des Prazosins und des Phenoxybenzamins aus der Gruppe  $\alpha$ -Adrenozeptor-Antagonisten (Heyer-Zillgen et al., 2002), der NMDA-Rezeptor-Antagonisten Ketamin oder Amantadin (Busch et al., 1998; Suhre et al., 2005) oder des Anti-Malaria-Mittels Quinine (Zhang et al., 1998; Sata et al., 2005) zeigt Tabelle 4.3.2. Es fällt auf, dass die Farbstoffe niedrigere IC<sub>50</sub>-Werte aufweisen, also affiner zu den hOCT sind, als die übrigen genannten Inhibitoren. So sind zum Beispiel die halbmaximalen Hemmwerte von Prazosin in Bereichen des zwei- bis dreifachen (hOCT1) bis hin zum zehnfachen (hOCT2) der Werte der Farbstoffe. Amantadin hat eine Affinität für den hOCT3, die im Promille-Bereich der Affinität von Gentianaviolett und Brillantgrün anzusiedeln ist. Dabei stellen die hier genannten Substanzen nur eine Auswahl dar. Für die komplette tabellarische Auflistung aller bisher getesteten Hemmstoffe sei noch einmal auf Koepsell et al., 2007 verwiesen. Betrachtet man sämtliche in dieser Auflistung genannten Inhibitoren mit den Farbstoffen, so stellt man fest, dass Gentianaviolett und Brillantgrün im Vergleich mit wenigen Ausnahmen die höchsten Affinitäten für die drei hOCT besitzen.

	IC <sub>50</sub> -Werte [ $\mu$ M] bezüglich		
	hOCT1	hOCT2	hOCT3
Gentianaviolett	0,70 $\pm$ 0,11	1,73 $\pm$ 0,55	1,40 $\pm$ 0,41
Brillantgrün	0,32 $\pm$ 0,24	8,80 $\pm$ 2,30	2,48 $\pm$ 1,78
Prazosin	1,8	>100	13
Phenoxybenzamin	2,7	4,9	6,1
Ketamin	115	23	226
Amantadin	236	28	>1000
Quinin	13/23	23/34	37

Tab. 4.3.2: Vergleichende Gegenüberstellung etablierter Inhibitoren der hOCT mit den Triphenylmethanfarbstoffen Gentianaviolett und Brillantgrün:  
Die angeführten Werte geben die Konzentration des Inhibitors in  $\mu$ M an, die nötig ist, um die hOCT halbmaximal zu hemmen (IC<sub>50</sub>-Werte).

Mit der Entdeckung der hOCT in der Haut ergab sich die Notwendigkeit, auch topisch applizierbare Medikamente auf ihre Wechselwirkung mit diesen Transportern zu untersuchen. Zu diesen gehören neben Gentianaviolett und Brillantgrün auch H<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonisten wie das Doxepin oder Kortikosteroide wie das Betamethason und das Prednicarbat (Lips et al., unpublished data).

Sämtliche dieser lokal applizierbaren Stoffe erwiesen sich als Inhibitoren der hOCT, die sich jedoch in der Stärke ihrer Hemmung unterschieden (Tab. 4.3.3).

	IC <sub>50</sub> -Werte [µM] bezüglich		
	hOCT1	hOCT2	hOCT3
Gentianaviolett	0,70 ± 0,11	1,73 ± 0,55	1,40 ± 0,41
Brillantgrün	0,32 ± 0,24	8,80 ± 2,30	2,48 ± 1,78
Doxepin	10,8	1,7	19,3
Betamethason	>1000	>1000	137
Prednicarbat	24,6	10,8	16,4

Tab. 4.3.3: Vergleichende Gegenüberstellung topisch angewandter Inhibitoren der hOCT mit den Triphenylmethanfarbstoffen Gentianaviolett und Brillantgrün:

Die angeführten Werte geben die Konzentration des Inhibitors in µM an, die nötig ist, um die hOCT halbmaximal zu hemmen (IC<sub>50</sub>-Werte).

Im Vergleich besaß das Doxepin für den hOCT1 und hOCT3 eine 10- bis 20fach kleinere Affinität als Gentianaviolett und Brillantgrün. Im Falle des hOCT2 war der Wert der halbmaximalen Hemmung dem des Gentianavioletts annähernd vergleichbar. Prednicarbat war fast genauso affin für diesen Transporter wie das Brillantgrün, wohingegen für den hOCT1 und hOCT3 die Affinitäten in Bereichen lagen, die 10- bis 30-fach niedriger waren als die der Farbstoffe. Bethametason wies IC<sub>50</sub>-Werte auf, die von 137µM (hOCT3) bis zu über 1000µM (hOCT1 und hOCT2) reichten und zeigte damit eine Affinität, die mehr als zwei Zehnerpotenzen unter der der Farbstoffe anzusiedeln war. Somit stellen Gentianaviolett und Brillantgrün auch hier die beiden Substanzen dar, die die höchste Affinität zu den hOCT besitzen.

Substanzen mit höheren Affinitäten zu den hOCT als Gentianaviolett und Brillantgrün wurden bisher nur wenige entdeckt. Die Modellsubstrate Decynium 22 (IC<sub>50</sub>-Werte: 0,1µM für den hOCT2; 0,09µM für den hOCT3) (Gorboulev et al., 1997; Hayer-Zillgen et al., 2002) und Disprocynium 24 (IC<sub>50</sub>-Werte: 0,015µM für den hOCT3) (Gründemann et al., 1998) sind die Einzigen, für die bisher höhere Affinitäten beschrieben wurden als für die Farbstoffe.

## 5 Zusammenfassung

Die humanen organischen Kationentransporter hOCT1-3 spielen eine große Rolle in der Aufnahme, Verteilung und Metabolisierung von organischen Kationen im menschlichen Körper. Sie sind in den unterschiedlichsten Organen zu finden, und ihre Expression konnte auch in den epidermalen Keratinozyten und den glatten Muskelzellen der subkutanen Blutgefäße nachgewiesen werden.

Seit der Entdeckung und Erstbeschreibung der hOCT sind für jeden der drei Transporter Studien erstellt worden, wonach verschiedene unterschiedliche organische Kationen von den polyspezifischen hOCT als Substrate oder Hemmstoffe akzeptiert werden. Die Wechselwirkungen zwischen den Kationen und den Transportern laufen dabei auf eine kompetitive oder irreversible Hemmung, auf einen Transport über die Zellmembran oder auf Beides hinaus.

Diese Arbeit zeigt den Effekt der dermatologischen Antiinfektiva Gentianaviolett und Brillantgrün auf die hOCT. Es wurden Transportmessungen mit [<sup>3</sup>H]MPP durchgeführt und an Hand der Ergebnisse Hemmkinetiken der Farbstoffe aufgestellt. Aus diesen konnten die Affinitäten von Gentianaviolett und Brillantgrün auf die hOCT abgeleitet und mit bereits bekannten Inhibitoren verglichen werden. Des Weiteren wurde untersucht, ob die Farben von den hOCT transportiert werden. Ein drittes Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, ob ein Zusammenhang zwischen dem Effekt von Gentianaviolett und Brillantgrün auf die hOCT der Keratinozyten und den beobachteten Nebenwirkungen bei der topischen Applikation der Farbstoffe auf die Haut besteht.

Bei den Transportmessungen wurde die hoch affine, konzentrationsabhängige Hemmung der hOCT durch die Farbstoffe nachgewiesen. Im Vergleich zu etablierten Inhibitoren der hOCT zeigte sich, dass Gentianaviolett und

Brillantgrün zu den Substanzen mit den größten bekannten Affinitätswerten gehören.

In Photometrie- und elektrophysiologischen Versuchen konnte kein Transport der Farbstoffe durch die hOCT nachgewiesen werden, jedoch zeigte sich eine intrazelluläre Anfärbung, die auf unspezifische Transportmechanismen zurückgeführt wurde.

Eine Ansammlung der Farben zeigte sich auch in Migrationsversuchen mit menschlichen Keratinozyten und es wurde untersucht, welchen Einfluss dies auf die Keratinozyten hat. Die Ergebnisse zeigten in vitro einen pathogenen Effekt auf die Hautzellen, der mit den klinisch beobachteten Wundheilungsstörungen bei Anwendung der Farbstoffe in vivo korrelierte. So war nicht nur eine starke Einschränkung in Proliferation und Teilung der Hautzellen zu sehen, sondern auch eine starke Zytotoxizität der Farbstoffe auf die Keratinozyten. Eine genaue Betrachtung der Ergebnisse lässt jedoch als Ursache für diese Beobachtung die Hemmung der Keratinozyten-hOCT als unwahrscheinlich erscheinen. Stattdessen ist hier eine Wechselwirkung auf Transkriptions- oder Translationsebene zu vermuten.

## 6 Anhang

### 6.1 mathematische Herleitung der Formel zur Farbstoffberechnung in den Photometrieversuchen

Die Extinktion  $E_F$  eines Absorptionsmittels (in diesem Fall die Farbstoffe Gentianaviolett und Brillantgrün) ist nach Umformung des Lambert-Beer'schen Gesetzes durch folgende Formel definiert:

$$E_F = \varepsilon_F \times c_F \times d \quad (6.1.1)$$

$\varepsilon_F$  bezeichnet dabei den Extinktionskoeffizienten des Farbstoffes,  $c_F$  die Konzentration desselben in der Küvette und  $d$  die Länge der Strecke, die der Lichtstrahl durch die Absorptionslösung zurücklegen muss.

Diese Extinktion ist direkt proportional zur Konzentration des absorbierenden Stoffes in der Lösung. Da in den Versuchen die Transmission gemessene wurde, musste die Extinktion aus dieser berechnet werden:

$$E = \log (1/T) \quad (6.1.2)$$

Die gesamte gemessene Extinktion  $E_G$  setzt sich aus der Extinktion des Farbstoffes  $E_F$  und der der Zellularbestandteile  $E_Z$  zusammen. Folglich gilt:

$$E_F = E_G - E_Z \quad (6.1.3)$$

Setzt man nun (6.1.2) in (6.1.3) ein, dann erhält man:

$$E_F = \log (1/T_G) - \log (1/T_Z)$$

beziehungsweise nach Umformung:

$$E_F = \log (T_Z/T_G) \quad (6.1.4)$$

Fügt man in diesen Term linksseitig die Formel (6.1.1) ein, so erhält man folgende Gleichung:

$$\epsilon_F \times c_F \times d = \log (T_Z/T_G) \quad (6.1.5)$$

Von Interesse für die photometrischen Messungen war nun die Menge des intrazellulären Farbstoffes pro Einzelzelle  $n_F$ . Diese Stoffmenge konnte bei bekannter Zellzahl  $n_Z$ , bekanntem Volumen  $V$  und bekannter Farbstoffkonzentration  $c_F$  in der Küvette berechnet werden:

$$n_F = c_F \times V / n_Z$$

Da der Quotient aus Volumen und Zellzahl auch durch die Konzentration der Zellen  $c_Z$  ausgedrückt werden kann, ist folgende Umformung möglich:

$$n_F = c_F / c_Z \quad (6.1.6)$$

Nun löst man (6.1.5) nach  $c_F$  auf und setzt diese in (6.1.6) ein:

$$n_F = [\log (T_Z/T_G)] / [\epsilon_F \times d \times c_Z] \quad (6.1.7)$$

Da zu Anfang die Konzentration der Zellen  $c$  in der Zellslösung bestimmt wurde und diese durch die Lyse mit 1ml 4M GTC verdünnt wurde, errechnet sich die Zellkonzentration  $c_Z$  der Zellen in der Küvette nach:

$$c_Z = c \times 90\mu\text{l} / 1000\mu\text{l} = c \times 0,09$$

Somit erhält man aus (6.1.7) zur Berechnung der Farbstoffmenge die Formel:

$$n_F = [\log (T_Z/T_G)] / [\epsilon_F \times d \times c \times 0,09]$$

## 6.2 verwendete Substanzen, Hilfsmittel und Geräte

### RNA-Synthese:

T7 mMESSAGE mMACHINE™ Kit	Ambion Inc, Austin, USA
Agarose	Serva, Heidelberg, D
RNA-Kilobasentreppe	Sigma, Deisenhofen, D

### Materialien für Lagerung und Injektion der Oozyten, sowie Elektrophysiologie:

Kaliumchlorid	A35821000, AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Kalziumchlorid	A18730500, AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Magnesiumchlorid	A36181000, AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Natriumchlorid	A35975000, AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Cholin	C7527, Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, D
Gentamycin	G1264, Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, D
Clostridiopeptidase A	C9891, Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, D
MOPS	A10760500, AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Glaskanülen-Puller	PIP5, Heka Elektronik GmbH, D
Glaskanülen	GB150F-8P, Science Products GmbH, Hofheim, D
Nanoliter-Injektor	A203XVZ, World Precision Instruments, USA
Brutschrank (Oozyten)	IPP400, Hemmert GmbH&CoKG, Schwabach, D
6-„well“-Kulturschalen	657160, Greiner bio-one GmbH, D
Signal-Filter	LPF 30-A, World Precision Instruments, USA
Signal-Verstärker	OC 725 B, Warner Instrument Corp, USA
Schreiber	L6512B, Linseis, Frankreich

Die *Xenopus laevis* Frösche bezog man von Kähler in Hamburg beziehungsweise direkt von African Xenopus Facilities, Südafrika. Zur Ergänzung lieferte das Botanische Institut der Biologischen Fakultät der Universität Würzburg gelegentlich Oozyten. Die Frösche wurden zweimal pro Woche mit vitaminsubstituiertem Rinderherz gefüttert. Ihre Haltung erfolgte gemäß den Tierschutzbestimmungen in großen Wasserbecken im Anatomischen Institut Würzburg.

Chemikalien und Geräte für die Transportmessungen in den Laboratorien des Anatomischen Institutes Würzburg:

Gentianaviolett	G2039, Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, D
Brillantgrün	B6756, Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, D
CHO-K1 Zelllinie	ATCC, Manassas, USA
F-12 Nutrient Mixture (Ham) + L-Glutamin	21765, Invitrogen, UK
FCS	F0804, Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, D
Hygromycin	400053, Calbiochem EMD Biosciences Inc, USA
Kulturflaschen	660160, Greiner bio-one GmbH, D
Brutschrank (Zellen)	HeraCell240, ThermoElectron Co, Langenselbold, D
PBS	D8537, Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, D
EDTA	A35531000, AppliChem GmbH, Darmstadt, D
HEPES	A10691000, AppliChem GmbH, Darmstadt, D
NaHCO <sub>3</sub>	106329, Merck KGaA, Darmstadt, D
Zentrifuge	5415C, Eppendorf GmbH, Engelsdorf, D
BSA, Albumin V	A13910100, AppliChem GmbH, Darmstadt, D
[ <sup>3</sup> H]MPP	ART 0150, ARC Inc, USA
MPP	D048, Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, D
Chinin	Q1250, Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, D
TPeA	25896-2, Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, D
GTC	493-84-0, AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Szintillationszähler	LS6500, Beckman Coulter Inc, USA
Szintillationsgefäße	73680, Sarstedt AG&Co, Nümbrecht, D
Szintillationsflüssigkeit	3097, Lumac LSC B.V, Niederlande
Rüttelmaschine	Typ 4020, Kötterman KG, Hänigsen, D

Photometrie:

Spektralphotometer	Ultraspec III, Pharmacia LKB Biochrom, Schweden
Küvetten (80µl)	67742, Sarstedt AG&Co, Nümbrecht, D

Zusätzliche Materialien für die Migrationsmessungen am Institut für Dermatologie Würzburg:

Keratinocyten	Dermatologisches Institut, Universität Würzburg, D
Desipramin	D3900, Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, D
Trypsin-EDTA	C-41000, PromoCell GmbH, Heidelberg, D
24-, „well“-Kulturschalen	662160, Greiner bio-one GmbH, D
Paraffin	D06-151, Apotheke Uni-Klinik Würzburg, D
Videokameras	TP-505D, Topica Inc, Taiwan
Rotlichtlampen	Infraphil R95E 100Watt, Philips, D
Steuergerät Rotlichtlampen	STATOP-4849, ChauvinArnoux Group, Frankreich
Keratinocyten- Basalmedium	CC3101, CambrexBioScience Walkersville Inc, USA
Keratinocyten-SFM- Medium + EGF + BPE	17005-042, Invitrogen Co, UK
Kulturflaschen	658170, Greiner bio-one GmbH, D
Brutschrank	FormaSeries II, Thermo Electron Co, Dreieich, D

Software für Video- und Foto-Aufzeichnung und -Bearbeitung, schriftliche und graphische Auswertung, sowie Tabellenkalkulation:

GraphPad Prism	GraphPad Software Inc, USA
QuickTime	Apple Computer Inc, USA
Corel PhotoPaint	Corel Co, USA
HyperCard	Apple Computer Inc, USA
Excel	Microsoft Co, USA
Word	Microsoft Co, USA
OpenOffice	SunMicrosystems Inc, USA
Videokamera-Software	16channel Recorder, SVS-Vistek GmbH, D

## 7 Literaturverzeichnis

**Alcorn J., Lu X., Moscow J.A. and McNamara P.J.**

„Transporter gene expression in lactating and non-lactating human mammary epithel cells using real-time reverse transcription-polymerase chain reaction“  
J. Pharmacol. Exp. Ther., 303, pp. 487-496, 2002

**Ali S.L. and Albert K.**

„Schwermetalle in antimyzetischen Farbstoffen“  
Pharmazeutische Zeitung, 33, pp. 28-29, 1988

**Aldrich R.H.**

„The role of infection in burns“  
New Engl. J. Med., 208, pp. 299-309, 1933

**Amphoux A., Vialou V., Drescher E., Brüss M., La Cour C.M., Rochat C., Millan M.J., Giros B., Bönisch H. and Gautron S.**

„Differential pharmacological in vitro properties of organic cation transporters and regional distribution in rat brain“  
Neuropharmacology, 50, pp. 941-952, 2006

**Anderson H.H., Emerson G.A. and Fisher B.H.**

„Acute toxicity of Trypan Blue, Gentian Violet and Brilliant Green“  
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 34, pp. 825-828, 1934

**Au W., Pathak S., Collie D.J. and Hsu T.C.**

„Cytogenetic toxicity of Gentian Violet and Crystal Violet on mammarian cells in vitro“  
Mutation Res., 58, pp. 269-276, 1978

**Bakker P. and van Doorne H.**

„Activity of Gentian Violet and Brilliant Green against some microorganisms associated with skin infections“

Int. J. Dermatol., 31 (3), pp. 210-213, 1992

**Bao J.X.**

„Sympathetic neuromuscular transmission in rat tail artery: a study based on electrochemical, electrophysiological and mechanical recording“

Acta Physiol. Scand. Suppl., 610, pp. 1-58, 1993

**Baumann E.**

„Zur Frage der Antiseptik mit Farbstoffen“

Münch. Med. Wschr., 23, pp. 731-734, 1923

**Bielicky T. and Novák M.**

„Contact-group sensitization to triphenylmethane dyes“

Arch. Derm., 100, pp. 540-543, 1969

**Björnberg A. and Mobacken H.**

„Necrotic skin reactions caused by 1% Gentian Violet and Brilliant Green“

Acta Dermatovener., 52, pp. 55-60, 1972

**Bönisch H.**

„Extraneuronal transport of catecholamines“

Pharmacology, 21(2), pp. 93-108, 1980

**Brockow K., Grabenhorst P., Abeck D., Traupe B., Ring J., Hoppe U. and Wolf F.**

„Effect of Gentian Violet, Corticosteroid and tar preparations in Staphylococcus-aureus-colonized Atopic Eczema“

Dermatology, 199, pp. 231-236, 1999

**Browning C.H., Gulbransen R., Kennaway E.L. and Thornton L.H.D.**

„Flavine and Brilliant Green – powerful antiseptics with low toxicity to the tissues: their use in the treatment of infected wounds“

Brit. Med. J., I., pp. 73-79, 1917

**Bufler J., Cordes A., Heineke W., Dengler R. and Krampfl K.**

„Pentobarbital and Brilliant Green modulate the current response of recombinant rat kainate-type GluR6 receptor channels differentially“

Neuroscience Letters, 312, pp. 91-94, 2001

**Borbujo J., Garcia-Villalon A.L., Valle J., Gomez B. and Diequez G.**

„Postjunctional alpha1- and alpha2-adrenoceptors in human skin arteries. An in vitro study“

J. Pharmacol. Exp. Ther., 249, pp. 284-287, 1989

**Busch A.E., Karbach U., Miska D., Gorboulev V., Akhoundova A., Volk C., Arndt P., Ulzheimer J.C., Sonders M.S., Baumann C., Waldegger S., Lang F. and Koepsell H.**

„Human neurons express the polyspecific cation transporter hOCT2, which translocates monoamine neurotransmitters, Amantadine and Memantine“

Mol. Pharmacol., 54, pp. 342-352, 1998

**Busch A.E., Quester S., Ulzheimer J.C., Waldegger S., Gorboulev V., Arndt P., Lang F. and Koepsell H.**

„Electrogenic properties and substrate specificity of the polyspecific rat cation transporter rOCT1“

J. Biol. Chem., 271, pp. 32599-32604, 1996

**Castellani A.**

„The treatment of certain types of epidermophytosis by means of a carbolfuchsin paint“

N. Orlean. Med. J., 80, p. 833, 1929

**Churchman J.W.**

„The selective bactericidal action of Gentian Violet“

J. Exp. Med., 16, pp. 221-247, 1912

**Ciarimboli G., Ludwig T., Lang D., Pavenstädt H., Koepsell H., Piechota H-J., Haier J., Jeahde U., Zisowsky J. and Schlatter E.**

„Cisplatin nephrotoxicity is critically mediated via the human organic cation transporter 2“

Am. J. Pathol., 167, pp. 1477-1484, 2005

**Dascal N.**

„The use of *Xenopus* oocytes for the study of ion channels“

CRC Crit. Rev. Biochem., 22 (4), pp. 317-387, 1987

**Dresser M.J., Xiao G., Leabman M.K., Gray A.T. and Giacomini K.M.**

„Interactions of n-tetraalkylammonium compounds and biguanides with a human renal organic cation transporter (hOCT2)“

Pharm. Res., 19 (8), pp. 1244-1247, 2002

**Drigalski V. and Conradi H.**

„Über ein Verfahren zum Nachweis von Typhusbacillen“

Ztschr. f. Hyg., 39, pp. 283-300, 1902

**Dumont J.N.**

„Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin)“

J. Morphol., 136, pp. 153-180, 1972

**Eriksson E. and Mobacken H.**

„Microvascular effects of a topically applied cationic triphenylmethane dye (Crystal Violet)“

Acta Dermatovener., 57, pp. 45-49, 1977

**Florance F.C.**

„The use of Gentian Violet (aqueous solution) in skin diseases“

Med. J. Aus., 1, pp. 466-467, 1936

**Fry B.A.**

„Basic triphenylmethane dyes and the inhibition of glutamine synthesis by Staphylococcus aureus“

J. Gen. Microbiol., 16, pp. 341-349, 1957

**German W.J.**

„The effect of some antiseptics on tissues in vitro“

AMA Arch. Surg., 18 (2), pp. 1920-1926, 1929

**Gloor M. and Wolnicki D.**

„Anti-irritative effect of Methylrosaniline Chloride (Gentian Violet)“

Dermatology, 203, pp. 325-328, 2001

**Gorboulev V., Ulzheimer J.C., Akhoundova A., Ulzheimer-Teuber I.,  
Karbach U., Quester S., Baumann C., Lang F., Busch A.E. and Koepsell H.**

„Cloning and characterization of two human polyspecific organic cation transporters“

DNA Cell Biol., 16 (7), pp. 871-881, 1997

**Grando S.A., Kist D.A., Qi M. and Dahl M.V.**

„Human keratinocytes synthesize, secrete and degrade acetylcholin“

Soc. Invest. Dermatol., 101, pp. 32-36, 1993a

**Grando S.A., Crosby A.M., Zelickson B.D. and Dahl M.V.**

„Agarose gel keratinocyte outgrowth system as a model of skin re-epithelization: requirement of endogenous acetylcholin for outgrowth initiation“

Soc. Invest. Dermatol., 101, pp. 804-810, 1993b

**Grando S.A., Zelickson B.D., Kist D.A., Weinshenker D., Bigliardi P.L., Wendelschafer-Crabb G., Kennedy W.R. and Dahl M.V.**

„Keratinocyte muscarinic acetylcholin receptors: immunolocalization and partial characterization“

Soc. Invest. Dermatol., 104, pp. 95-100, 1995

**Grando S.A., Horton R.M., Mauro T.M., Kist D.A., Lee T.X. and Dahl M.V.**

„Activation of keratinocyte nicotinic cholinergic receptors stimulates calcium influx and enhances cell differentiation“

Soc. Invest. Dermatol., 107, pp. 412-418, 1996

**Grando S.A.**

„Biological functions of keratinocyte cholinergic receptors“

J. Invest. Dermatol. Symp. Proc., 2, pp. 41-48, 1997

**Grando S.A.**

„Cholinergic control of epidermal cohesion“

Exp. Dermatol., 15, pp. 265-282, 2006

**Gründemann D. and Koepsell H.**

„Ethidium bromide staining during denaturation with Glyoxal for sensitive detection of RNA in agarose gel electrophoresis“

Analytical Biochemistry, 216, pp. 459-461, 1993

**Gründemann D., Gorboulev V., Gambaryan S., Veyhl M. and Koepsell H.**

„Drug excretion mediated by a new prototype of polyspecific transporter“

Nature, 372, pp. 549-552, 1994

**Gründemann D., Schechinger B., Rappold G.A. and Schömig E.**

„Molecular identification of the corticosterone-sensitive extraneuronal catecholamine transporter“

Nature Neuroscience, 1 (5), pp. 349-351, 1998

**Gründemann D., Liebich G., Kiefer N., Köster S. and Schömig E.**

„Selective substrates for non-neuronal monoamine transporters“

Mol. Pharmacol., 56, pp. 1-10, 1999

**Gurdon J.B., Lane C.D. and Woodland H.R.**

„Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells“

Nature, 233, pp. 177-182, 1971

**Hayer-Zillgen M., Brüß M. and Bönisch H.**

„Expression and pharmacological profile of the human organic cation transporters hOCT1, hOCT2 and hOCT3“

Brit. J. Pharmacol., 136, pp. 829-836, 2002

**Höger P.H.**

„Topische Antibiotika und Antiseptika – Agentien, Spektren, Nebenwirkungen“

Hautarzt, 49, pp. 331-347, 1998

**Kada T., Tutikawa K. and Sadaie Y.**

„In vitro and hostmediated 'rec-assay' procedure for screening chemical mutagens; and phloxine, a mutagenic red dye detected“

Mutation Res., 16, pp. 165-174, 1972

**Kekuda R., Prasad P.D., Wu X., Wang H., Fei Y.-J., Leibach F.H. and Ganapathy V.**

„Cloning and functional characterization of a potential-sensitive, polyspecific cation transporter (OCT3) most abundantly expressed in placenta“

J. Biol. Chem., 273, pp. 15971-15979, 1998

**Keller T., Elfeber M., Gorboulev V., Reiländer H. and Koepsell H.**

„Purification and functional reconstitution of the rat organic cation transporter rOCT1“

Biochemistry, 44 (36), pp. 12253-12263, 2005

**Kim M.K. and Shim C.-K.**

„The transport of organic cations in the small intestine: current knowledge and emerging concepts“

Arch. Pharm. Res., 29, pp. 605-616, 2006

**Klapproth H., Reinheimer T., Metzen J., Münch M., Bittinger F., Kirkpatrick C.J., Höhle K-D., Schemann M., Racké K. and Wessler I.**

„Non-neuronal acetylcholin, a signalling molecule synthesized by surface cells of rat and man“

Arch. Pharmacol., 355, pp. 515-523, 1997

**Koepsell H., Busch A., Gorboulev V. and Arndt P.**

„Structure and function of renal organic cation transporters“

News Physiol. Sci., 13, pp. 11-16, 1998

**Koepsell H. and Endou H.**

„The SLC22 drug transporter family“

Eur. J. Physiol., 447, pp. 666-676, 2004

**Koepsell H., Schmitt B.M. and Gorboulev V.**

„Organic cation transporters“

Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol., 150, pp. 36-90, 2003

**Koepsell H., Lips K.S. and Volk C.**

„Polyspecific organic cation transporters: structure, function, physiological roles and biopharmaceutical implications“

Pharmaceutical Research, 24 (7), pp. 1227-1251, 2007

**Korting G.W.**

„Anwendung der Farbstoffe in der Dermatologie“

Hautarzt, 32, pp. 44-46, 1981

**Kummer W., Wiegand S., Akinci S., Wessler I., Schinkel A.H., Wess J., Koepsell H., Haberberger R.V. and Lips K.S.**

„Role of Acetylcholine and polyspecific cation transporters in Serotonin-induced bronchoconstriction in the mouse“

Respir. Res., 7, pp. 65-77, 2006

**Lambert R.A. and Meyer R.**

„Comparative study of action of antiseptics on staphylococci and body cells by tissue culture method“

Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 23, pp. 429-430, 1925/1926

**Lips K.S., Volk C., Schmitt B.M., Pfeil U., Arndt P., Miska D., Ermert L., Kummer W. and Koepsell H.**

„Polyspecific cation transporters mediate luminal release of Acetylcholine from bronchial epithelium“

Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol., 33, pp. 79-88, 2005

**Lips K.S., Wunsch J., Zarghooni S., Bschleipfer T., Schukowski K., Weidner W., Wessler I., Schwantes U., Koepsell H. and Kummer W.**

„Acetylcholine and molecular compounds of its synthesis and release machinery in the urothelium“

Europ. Urol., 51, pp. 1042-1053, 2007

**Lips K.S., Zapf F., Förster J., Brandsch M., Volk C., Utner S. and Koepsell H.**

„Polyspecific cation transporters are expressed in the skin and inhibited by topically applied drugs“

nicht publizierte Daten

**Merck Index, 14<sup>th</sup> Ed.**

Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, New Jersey, USA

**Mobacken H., Zederfeldt B. and Ahren C.**

„Effects of two cationic triphenylmethane dyes on the healing of skin incisions“

Acta Dermatovener., 53, pp. 161-166, 1973

**Mobacken H., Ahonen J. and Zederfeldt B.**

„The effect of a cationic triphenylmethane dye (Crystal Violet) on a rabbit granulation tissue“

Acta Dermatovener., 54, pp. 343-347, 1974

**Möhlenbeck F.**

„Antibiotika, Triphenylmethanfarbstoffe und Borsäure bei zunehmender Häufigkeit von Pseudomonas aeruginosa“

Z. Haut-Geschl.Kr., 45 (8), pp. 329-332, 1970

**Motohashi H., Sakurai Y., Saito H., Masuda S., Urakami Y., Goto M., Fukatsu A., Ogawa O. and Inui K-I.**

„Gene expression levels and immunolocalization of organic ion transporters in the human kidney“

J. Am. Soc. Nephrol., 13, pp. 866-874, 2002

**Müller J., Lips K.S., Metzner L., Neubert R.H., Koepsell H. and Brandsch M.**

„Drug specificity and intestinal membrane localization of human organic cation transporters (OCT)“

Biochem. Pharmacol., 70, pp. 1851-1860, 2005

**Nagel G., Volk C., Friedrich T., Ulzheimer J.C., Bamberg E. and Koepsell H.**

„A reevaluation of substrate specificity of the rat organic cation transporter rOCT1“

J. Biol. Chem., 272, pp. 31953-31956, 1997

**Narat J.K.**

„Brilliant Green – a clinical study of its value as a local antiseptic“

Ann. Surg., 94 (6), pp. 1007-1012, 1931

**Neues Rezeptur-Formularium**

Stand 27.02.2007

GOVI-Verlag, Eschborn, 2007

**Neufeld F., Schiemann O. and Baumgarten**

„Über die chemotherapeutische Wirkung einiger Farbstoffe im Tierversuch gegenüber bakteriellen Infektionen“

Dt. Med. Wschr., 46, pp. 1013-1015, 1920

**Niedner R. and Pfister-Wartha A.**

„Farbstoffe in der Dermatologie“

Akt. Dermatol., 16, pp. 225-261, 1990

**Niedner R. and Schöpf E.**

„Inhibition of wound healing by antiseptics“

Brit. J. Dermatol., 115, Spp. 31, pp. 41-44, 1986

**Noeske N.**

„Die Bindung von Kristallviolett an Desoxyribonukleinsäure – cytophotometrische Untersuchungen an normalen und Tumorzellen“

Histochemie, 7, pp. 273-287, 1966

**Norrby K. and Mobacken H.**

„Effect of triphenylmethane dyes (Brilliant Green, Crystal Violet, Methyl Violet) on proliferation in human normal fibroblast-like and established epithelial-like cell lines“

Acta Dermatovener., 52, pp. 476-483, 1972

**Okano M., Noguchi S., Tabata K. and Matsumoto Y.**

„Topical Gentian Violet for cutaneous infection and nasal carriage with MRSA“  
Int. J. Dermatol., 39, pp. 942-944, 2000

**Ossadnik M., Czaika V., Teichmann A., Sterry W., Tietz H.-J., Lademann J. and Koch S.**

„Differential stripping: introduction of a method to show the penetration of topically applied antifungal substances into the hair follicles“  
Mycosis, 50(6), pp. 457-462, 2007

**Paetzold O.H.**

„Experimentelle Untersuchungen zur Frage des Wirkungsmechanismus von Brillantgrün auf Staphylokokken – Teil I: Die Wirkung des Farbstoffes auf die Bakterienatmung“  
Arch. Derm. Forsch., 224, pp. 90-103, 1966

**Paetzold O.H.**

„Experimentelle Untersuchungen zur Frage des Wirkungsmechanismus von Brillantgrün auf Staphylokokken – Teil II: Die Abhängigkeit der antibakteriellen Wirkung des Farbstoffes von seiner chemischen Konstitution“  
Arch. Derm. Forsch., 224, pp. 104-116, 1966

**Paetzold O.H.**

„Experimentelle Untersuchungen zur Frage des Wirkungsmechanismus von Brillantgrün auf Staphylokokken“  
Arch. Derm. Forsch., 234 (1), pp. 1-9, 1972

**Park J.T.**

„Uridinediphosphate derivatives in Staphylococcus aureus treated with Crystal Violet or various antibiotics“  
Fed. Proc., 13, p. 271, 1954

**Perry B.N., Govindarajan B., Bhandarkar S.S., Knaus U.G., Valo M., Sturk C., Carrillo C.O., Sohn A., Cerimele F., Dumont D., Losken A., Williams J., Brown L.F., Tan X., Ioffe E., Yancopoulos G.D. and Arbiser J.L.**

„Pharmacologic blockade of Angiopoietin-2 is efficacious against model hemangiomas in mice“

J. Invest. Dermatol., 126, pp. 2316-2322, 2006

**Poisson D.M.**

„Novobiocin, Brilliant Green, Glycerol, Lactose Agar: a new medium for the isolation of Salmonella strains“

Res. Microbiol., 143, pp. 211-216, 1992

**Rosenkranz H.S. and Carr H.S.**

„Possible hazard use of Gentian Violet“

Brit. Med. J., 3, pp. 702-703, 1971

**Rostock P.**

„Die Wunde“

Walter de Gruyter, Berlin, 1950

**Russel D.G.**

„The effect of Gentian Violet on protozoa and on tissues growing in vitro, with especial reference to the nucleus“

J. Exper. Med., 20, pp. 545-553, 1914

**Ryrie G.A.**

„A preliminary report on the action of certain dyes in leprosy“

Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 17 (1), pp. 85-92, 1933

**Saji M., Taguchi S., Uchiyama K., Osono E., Hayama N. and Ohkuni H.**

„Efficacy of Gentian Violet in the eradication of methicillin-resistant Staphylococcus aureus from skin lesions“

J. Hosp. Infect., 31, pp. 225-228, 1995

**Sata R., Ohtani H., Tsujimoto M., Murakami H., Koyabu N., Nakamura T., Uchiumi T., Kuwano M., Nagata H., Tsukimori K., Nakano H. and Sawada Y.**

„Functional analysis of organic cation transporter 3 expressed in human placenta“

J. Pharmacol. Exp. Ther., 315, pp. 888-895, 2005

**Schmeller W.**

„Community health workers reduce skin diseases in East African children“

Int. J. Dermatol., 37, pp. 370-377, 1998

**Schmitt B.M. and Koepsell H.**

„Alkali cation binding and permeation in the rat organic cation transporter rOCT2“

J. Biol. Chem., 280 (26), pp. 24481-24490, 2005

**Schönfeld W.**

„Entwicklung, Klinisches und Experimentelles über die Behandlung mit Anilinfarbstoffen in der Dermatologie“

Med. Klin., 45, pp. 385-388, 1950

**Shehade S.A. and Foulds I.S.**

„Allergic contact dermatitis to Brilliant Green“

Contact Dermatitis, 14 (3), pp. 186-187, 1986

**Sigel E.**

„Use of *Xenopus* oocytes for the functional expression of plasma membrane proteins“

J. Membrane Biol., 117, pp. 201-221, 1990

**Sperber I.**

„The mechanism of renal excretion of some detoxikation products in the chicken“

Proc. Int. Congr. Physiol., 17, pp. 217-218, 1947

**Storim J., Friedl P., Schaefer B.M., Bechtel M., Wallich R., Kramer M.D. and Reinartz J.**

„Molecular and functional characterization of the four-transmembrane molecule L6 in epidermal keratinocytes“

Exp. Cell Res., 267, pp. 233-242, 2001

**Suhre W. M., Ekins S., Chang C., Swaan P. W. and Wright S. H.**

„Molecular determinants of substrate/inhibitor binding to the human and rabbit renal organic cation transporters hOCT2 und rbOCT2“

Mol. Pharmacol., 67, pp. 1067-1077, 2005

**Sweet D.H., Miller D.S. and Pritchard J.B.**

„Ventricular choline transport – a role for organic cation transporter 2 expressed in choroid plexus“

J. Biol. Chem., 276 (45), pp. 41611-41619, 2001

**Sykes G.**

„Desinfection and sterilisation“

2<sup>nd</sup> Ed. Spon. Ltd., London, 1965

**Takeda M., Khamdang S., Narikawa S., Kimura H., Kobayashi Y., Yamamoto T., Cha S.H., Sekine T. and Endou H.**

„Human organic anion transporters and human organic cation transporters mediate renal antiviral transport“

J. Pharmacol. Exp. Ther., 300 (3), pp. 918-924, 2002

**Thomas S.M. and McPhee D.G.**

„Crystal Violet: a direct acting frameshift mutagen whose mutagenicity is enhanced by mammalian metabolism“

Mutation Res., 140, pp. 165-167, 1984

**Wagner C.A., Friedrich B., Setiawan I., Lang F. and Bröer S.**

„The use of *Xenopus laevis* oocytes for the functional characterization of heterologously expressed membrane proteins“

Cellular Physiol. Biochem., 10, pp. 1-12, 2000

**Welch H. and Brewer C.M.**

„The toxicity-indices of some basic antiseptic substances“

J. Immunol., 43, pp. 25-30, 1942

**Wessler I., Kirkpatrick C.J. and Racke K.**

„Non-neuronal acetylcholin, a locally acting molecule, widely distributed in biological systems: expression and function in humans“

Pharmacol. Ther., 77 (1), pp. 59-79, 1998

**Wessler I., Roth E., Deutsch C., Brockerhoff P., Bittinger F., Kirkpatrick C.J. and Kilbinger H.**

„Release of non-neuronal Acetylcholine from the isolated human placenta is mediated by organic cation transporters“

Brit. J. Pharmacol., 134, pp. 951-956, 2001

**Wu X., Kekuda R., Huang W., Fei Y-J., Leibach F.H., Chen J., Conway S.J. and Ganapathy V.**

„Identity of the organic cation transporter OCT3 as the extraneuronal monoamine transporter (uptake<sub>2</sub>) and the evidence for the expression of the transporter in the brain“

J. Biol. Chem., 273 (49), pp. 32776-32786, 1998

**Wu X., Huang W., Ganapathy M.E., Wang H., Kekuda R., Conway S.J., Leibach F.H. and Ganapathy V.**

„Structure, function and regional distribution of the organic cation transporter hOCT3 in the kidney“

Am. J. Physiol. Renal Physiol, 279, pp. 449-458, 2000

**Probst W. and Vasel-Biergans A.**

„Wundmanagement“

1. Auflage, 2004

Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 2004

**Zhang L., Dresser M.J., Gray A.T., Yost S., Terashita S. and Giacomini K.M.**

„Cloning and functional characterization of a human liver organic cation transporter“

Mol. Pharmacol., 51, pp. 913-921, 1997

**Zhang L., Schaner M.E. and Giacomini K.M.**

„Functional characterization of an organic cation transporter (hOCT1) in a transiently transfected human cell line (HeLa)“

J. Pharmacol. Exp. Ther., 286 (1), pp. 354-361, 1998

**Zhang L., Gorset W., Dresser J. and Giacomini K.M.**

„The interaction of n-tetraalkylammonium compounds with a human organic cation transporter, hOCT1“

J. Pharmacol. Exp. Ther., 288, pp. 1192-1198, 1999



## **Danksagung**

Zum Abschluss dieser Dissertation möchte ich mich gerne bei den Menschen bedanken, die mich bei meiner Arbeit unterstützt haben und mir mit Rat und Vorschlägen zur Seite standen.

In erster Linie danke ich meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Koepsell, für die Einführung in das mir bis dato unvertraute Fachgebiet der organischen Kationentransporter, für seine Motivation und Unterstützung bei Problemen im gedanklichen Konstrukt oder technischen Hindernissen und seine Anregungen, die dafür sorgten, dass ich meinen Geist anstrengte.

Aus der gesamten Arbeitsgruppe möchte ich mich namentlich vor allem bei Herrn Dr. Volk bedanken, der mir alles Notwendige über Oozyten, von ihrer Gewinnung bis hin zu den elektrophysiologischen Messungen, beibrachte. Des Weiteren danke ich auch Frau Roth und Frau Schatz, die mich bei meinen ersten unbeholfenen Schritten im Labor führten, mir die Zellkultur und die Techniken zur DNA- und RNA-Gewinnung nahe brachten und auf deren beständige Hilfe ich während meiner gesamten weiteren Zeit im Labor jederzeit zählen konnte.

Dem gesamten Forschungsteam der Anatomie sowie dem des dermatologischen Institutes von Herrn Prof. Dr. Friedl danke ich für die Einblicke, die mir in das wissenschaftliche Arbeiten gewährt wurden, und für den ermutigenden Zuspruch in Zeiten, in denen nicht alles so klappte, wie es sollte. Mein Dank gilt auch Herrn Priv.-Doz. Dr. Döring, der sich bereit erklärt hat, das Koreferat dieser Arbeit zu übernehmen.

Abschliessend darf ich mich aufs Herzlichste bei meinen Eltern bedanken, die mich von Kindesbeinen an unterstützt und mich zu dieser Doktorarbeit ermutigt haben und ohne die weder diese Arbeit noch mein Medizinstudium möglich gewesen wären.

