

Ann-Cathrin Dorothea Erika Koschker

Dr. med.

## **Untersuchung der Aktivierung und Inhibition des Extraneuronalen Monoamin Transporters der Ratte**

Geboren am 21.12.1976 in Bad Mergentheim

Staatsexamen am 12.05.2003 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Pharmakologie

Doktorvater: Prof. Dr. med. Edgar Schömig

In der vorliegenden Arbeit wurde der Extraneuronale Monoamin Transporter der Ratte nach stabiler Transfektion von HEK-293-Zellen in Aufnahmeversuchen mit radioaktiv markiertem Substrat näher charakterisiert. Nachdem Vorversuche deutliche Unterschiede im Hinblick auf die Affinität des humanen EMT und des EMT der Ratte zu bekannten Substraten der beiden Transportproteine gezeigt hatten, ließ sich belegen, dass sie auch hinsichtlich ihrer Hemmbarkeit durch diverse Inhibitoren differieren. Es zeigte sich, dass die überwiegende Anzahl der getesteten Substanzen aus den Bereichen der alpha-Blocker, Pseudoisocyanine, Isocyanine, Steroide, Antihistaminika sowie diverse andere klassische Inhibitoren des EMTh um einen Faktor 10 bis 100 potenter auf EMTh als auf EMTr wirkten.

Alleine die Gruppe der Imidazolinrezeptorliganden mit den untersuchten BU-224, BU-226 und 2-BFI konnte EMTr und EMTh in gleicher Konzentration hemmen. Für den Einsatz als Hemmstoff in vivo an der Ratte als Modellorganismus erfolgte die Hemmung jedoch erst in Konzentrationen, die für die Verwendung am lebenden Tier ungeeignet sind. Letztendlich stellen die (Pseudo)isocyanine, allen voran Disprocynium<sup>24</sup>, auch für den EMTr weiterhin die wirksamsten Inhibitoren dar, auch wenn der ermittelte Ki-Wert von 2-3 µmol/l weit über dem für den menschlichen Orthologen liegt, der etwa 20-30 nmol/l beträgt.

Zusätzlich zeigte sich bei der Durchführung der Experimente ein bislang in der Literatur nicht beschriebener Effekt: Anstelle eines typischen sigmoidalen Kurvenverlaufes der verbleibenden Substrataufnahme bei Zugabe verschiedener Konzentrationen des jeweiligen Hemmstoffs, ließ sich ein initialer Anstieg der Substrataufnahme über das Ausgangsniveau beobachten, bevor bei höheren Inhibitorkonzentrationen schließlich die erwartete Hemmung

einsetzte. Dieses von uns Aktivierung genannte Phänomen zeigte sich nie bei Versuchen mit dem humanen EMT, auch wenn die Versuche stets gepaart durchgeführt wurden.

Die Vermutung, es könne sich um eine artifizielle Beobachtung handeln, ließ sich durch das identische Verhalten des entsprechenden Transporters der Maus widerlegen.

Erklärungsmodelle für diese Aktivierung wurden experimenteller Testung unterzogen. Faktoren, deren Einfluss auf die Aktivität des EMT bereits bekannt ist, konnten weitestgehend als Urheber dieser neuartigen Beobachtung ausgeschlossen werden. Darunter fallen beispielsweise *trans*-Stimulation oder ein Einfluss des Membranpotentials.

Ein in unserer Arbeitsgruppe neu entwickeltes Aktivierungsmodell postuliert hierfür zwei interagierende Transporter, am ehesten im Sinne einer Homodimerbildung, wobei die Bindung von Hemmstoff an eines der Moleküle den Stofftransport des Interaktionspartners beschleunigt. Erst bei hohen Konzentrationen, wodurch es zur Blockade beider Untereinheiten kommt, vermindert sich die Transportaktivität. Ansätze für Erklärungsversuche für die Interaktion von EMTr - bzw. EMTm-Molekülen bei fehlendem Äquivalent für den EMTh beziehen die Unterschiede der Aminosäuresequenzen des C-Terminus von EMTr und EMTm einerseits und EMTh andererseits ein. Sie weisen eine klassische AS-Sequenz für PDZ-Liganden auf, das heißt für Liganden an Proteininteraktionsdomänen, die große Proteinkomplexe zusammen führen und die Interaktion der Einzelkomponenten steuern.

Um diese Hypothese zu festigen bedarf es allerdings noch weiterer Erkenntnisse wie der tatsächlichen Identifizierung der mitwirkenden PDZ-Domäne bzw. des PDZ-haltigen Proteins.

