

**In vitro– und in vivo–Untersuchungen zur Bedeutung des  
intestinalen Arzneimittelmetabolismus und –transportes  
beim Menschen**

Von der Fakultät für Geo- und Biowissenschaften der Universität Stuttgart zur  
Erlangung der Würde eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
genehmigte Abhandlung

Vorgelegt von  
Hartmut Gläser  
aus Güstrow

Hauptberichter:	Prof. Dr. D. H. Wolf
Mitberichter:	Prof. Dr. P. Scheurich
Mitberichter:	Prof. Dr. M. Eichelbaum
Tag der mündlichen Prüfung:	11. März 2003

Institut für Biochemie der Universität Stuttgart

Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institut für Klinische Pharmakologie Stuttgart

2003

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und unter ausschließlicher Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und der Ratschläge von jeweils namentlich aufgeführten Personen angefertigt habe.

Stuttgart, den 11.März 2003

Hartmut Gläser

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	3
Abkürzungen.....	7
1 Zusammenfassung .....	8
2 Abstract .....	11
3 Einleitung.....	17
3.1 Phase I- und Phase II-Arzneimittelmetabolismus .....	17
3.2 Intestinaler Arzneimittelmetabolismus .....	18
3.3 Arzneimitteltransporter.....	19
3.3.1 P-Glykoprotein .....	19
3.3.2 MRP2 .....	21
3.3.3 BCRP .....	22
3.4 Probleme und Fragen bei der Untersuchung des intestinalen Arzneimittelmetabolismus und –transportes beim Menschen .....	23
3.5 Fragestellungen und Ziele dieser Arbeit.....	24
4 Material und Methoden.....	25
4.1 Material .....	25
4.1.1 Chemikalien und Reagenzien .....	25
4.1.1.1 Antikörper.....	27
4.1.1.1.1 Primärantikörper .....	27
4.1.1.1.2 Sekundärantikörper.....	28
4.1.1.2 Rekombinante Enzyme .....	28
4.1.1.3 Zelllinien.....	28
4.1.1.4 Puffer und Lösungen für die Verwendung des multiluminalen Perfusionskatheters .....	28
4.1.1.5 Puffer und Lösungen für die FACS-Analyse .....	29
4.1.1.6 Puffer und Lösungen zur Gewebeaufarbeitung .....	30
4.1.1.7 Reagenzien und Lösungen zur RNA-Isolierung und Analytik .....	31
4.1.1.7.1 Primer und Sonden für quantitative Real Time-PCR .....	32
4.1.1.8 Puffer und Lösungen für SDS-PAGE und Western Blot .....	33
4.1.1.9 Puffer und Lösungen zur Enzymaktivitätsbestimmung und Analytik .....	35
4.1.1.10 Zellkulturmedien .....	36
4.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien .....	36
4.2 Methoden.....	39
4.2.1 Multiluminaler Perfusionskatheter .....	39

4.2.1.1 Gewinnung von abgeschilferten Enterozyten und deren Proteinpräparation .....	40
4.2.1.2 RNA-Isolierung aus abgeschilferten Enterozyten .....	41
4.2.1.3 Klinische Studie IKP 114.....	41
4.2.1.4 Klinische Studie IKP 164.....	41
4.2.1.4.1 Bestimmung von Digoxin und Chinidin .....	43
4.2.2 Charakterisierung abgeschilfterter Enterozyten mittels FACS-Analyse .....	44
4.2.2.1 Nachweis von CD45 <sup>+</sup> - und Villin-positiven Zellen .....	44
4.2.2.2 Zellzyklusanalyse.....	45
4.2.2.3 Annexin V-Färbung .....	45
4.2.3 Gewebesammlung .....	46
4.2.3.1 Gewebeaufarbeitung.....	49
4.2.3.1.1 Enterozytenpräparation aus chirurgisch gewonnenen Darmproben.....	49
4.2.3.1.2 Aufarbeitung der Leberbiopsien.....	50
4.2.3.1.3 Gewinnung von Proteinfractionen.....	50
4.2.3.1.4 RNA-Isolierung aus chirurgisch gewonnenem Dünndarm- und Lebergewebe .....	51
4.2.4 Methoden der RNA-Analytik.....	51
4.2.4.1 Quantifizierung der RNA .....	51
4.2.4.2 Kontrolle der RNA-Qualität .....	51
4.2.4.3 Synthese von cDNA (complementary DNA) .....	52
4.2.4.4 Quantitative RT-PCR .....	52
4.2.4.5 Kalibrierproben für quantitative RT-PCR .....	53
4.2.5 Methoden der Proteinanalytik .....	54
4.2.5.1 Quantifizierung des Proteingehaltes.....	54
4.2.5.2 Vorbehandlung der Proben zur SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese .....	55
4.2.5.3 Herstellung von Kalibrierproben aus rekombinanten Enzymen.....	55
4.2.5.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese .....	57
4.2.5.5 Proteinquantifizierung durch Immunoblotanalyse .....	57
4.2.5.6 Entfernen von Antikörpern-„Stripping“ .....	60
4.2.5.7 Densitometrische Auswertung und Proteinquantifizierung .....	60
4.2.6 Inkubationen zur Bestimmung der Cytochrom P450 Enzymaktivität .....	61
4.2.6.1 Cytochrom P450 2C8.....	61
4.2.6.2 Cytochrom P450 2C9.....	61
4.2.6.3 Cytochrom P450 3A4.....	62

4.2.7	Bestimmung der Verapamilmetaboliten D-620, D-617, D-702, D-703 und Norverapamil aus Inkubationsansätzen .....	62
4.2.8	Bestimmung des Diclofenacmetaboliten 4'-Hydroxydiclofenac aus Inkubationslösungen .....	65
4.2.9	Statistische Auswertung .....	67
5	Ergebnisse.....	68
5.1	Intestinaler Arzneimittelmetabolismus .....	68
5.1.1	Charakterisierung von abgeschilferten, humanen Enterozyten .....	68
5.1.2	Expression von Cytochrom P450 Enzymen in abgeschilferten Enterozyten ..	71
5.1.3	Aktivität von Cytochrom P450 Enzymen in abgeschilferten Enterozyten.....	74
5.1.4	Einfluss von Rifampicin auf den intestinalen Arzneimittelmetabolismus.....	77
5.1.4.1	Cytochrom P450 2C8.....	77
5.1.4.2	Cytochrom P450 2C9.....	79
5.1.4.3	Cytochrom P450 3A4.....	79
5.1.4.4	Cytochrom P450 2D6.....	83
5.1.4.5	Vergleich des Ausmaßes der Induktion der untersuchten Cytochrom P450 Enzyme .....	85
5.1.4.6	Villin und Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase.....	85
5.2	Intestinaler Arzneimitteltransport .....	85
5.2.1	Expression von P-Glykoprotein in abgeschilferten Enterozyten .....	85
5.2.2	Expression von MRP2 in intestinalelem Gewebe .....	85
5.2.3	Expression von BCRP in abgeschilferten Enterozyten .....	87
5.2.4	Einfluss von Rifampicin auf den intestinalen Arzneimitteltransport.....	89
5.2.4.1	P-Glykoprotein .....	89
5.2.4.2	BCRP .....	90
5.2.5	Vergleich der MRP2-Expression in intestinalelem und hepatischem Gewebe ..	93
5.2.5.1	MRP2 mRNA-Expression in intestinalelem und hepatischem Gewebe....	93
5.2.5.2	MRP2 Proteinexpression in intestinalelem und hepatischem Gewebe ....	94
5.2.5.3	Korrelation der MRP2 mRNA-Expression und der MRP2 Proteinexpression .....	94
6	Diskussion .....	97
6.1	Intestinaler Arzneimittelmetabolismus .....	97
6.1.1	Charakterisierung von humanen abgeschilferten Enterozyten .....	97
6.1.2	Expression von Cytochrom P450 Enzymen in abgeschilferten Enterozyten ..	97
6.1.3	Aktivität von Cytochrom P450 Enzymen in abgeschilferten Enterozyten.....	99
6.1.4	Einfluss von Rifampicin auf den intestinalen Arzneimittelmetabolismus.....	100
6.2	Intestinaler Arzneimitteltransport .....	104

6.2.1	Expression von P-Glykoprotein in abgeschilferten Enterozyten .....	104
6.2.2	Expression von MRP2 in intestinalelem Gewebe .....	104
6.2.3	Expression von BCRP in abgeschilferten Enterozyten .....	105
6.2.4	Einfluss von Rifampicin auf den intestinalen Arzneimitteltransport.....	105
6.2.5	Vergleich der MRP2-Expression in intestinalelem und hepatischem Gewebe .....	106
7	Literaturverzeichnis .....	108
8	Lebenslauf .....	119
8.1	Beruflicher Werdegang .....	119
8.2	Abstracts und Preise.....	119
8.3	Originalarbeiten .....	120
8.4	Wissenschaftliche Vorträge .....	121
9	Danksagung .....	122

## Abkürzungen

ABC	ATP-binding cassette
AUC	area under the curve
BCRP	breast cancer resistance protein
CAR-RE	constitutive androstane receptor-responsive element
cMOAT	canalicular multispecific organic anion transporter
C <sub>T</sub>	threshold cycle
EMSA	electrophoretic mobility shift assay
FABP	fatty acid binding protein
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FAM	6-Carboxyfluorescein
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FXR	farnesoid X-activated receptor
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase
GRE	glucocorticoid-responsive element
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathiondisulfid
HPLC	high performance liquid chromatography
MDR	multidrug resistance
MLPC	multilumen perfusion catheter
MRP2	multidrug resistance protein 2
OD	optische Dichte
POD	Peroxidase
PVDF	Polyvinylidendifluorid
PXR	pregnane X receptor
SDS	Sodiumdodecylsulfate (Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SNP	single nucleotide polymorphism
TAMRA	6-Carboxytetramethylrhodamin
TMPD	transmukosale Potentialdifferenz

## 1 Zusammenfassung

Mit dem Nachweis arzneimittelmetabolisierender Enzyme und Arzneimitteltransporter im Dünndarm des Menschen wurde die Bedeutung des prähepatischen Metabolismus für die Bioverfügbarkeit oral applizierter Arzneimittel in den letzten Jahren zunehmend erkannt. So wurde die Existenz des prähepatischen Arzneimittelmetabolismus in Studien, die im Rahmen von Lebertransplantationen durchgeführt wurden, erstmals nachgewiesen (Kolars et al., 1991; Mahon et al., 1977). Mittlerweile konnte auch bei einer Vielzahl von klinischen Interaktionen zwischen oral applizierten Arzneimitteln die Beteiligung des intestinalen Arzneimittelmetabolismus und -transportes nachgewiesen werden (Barbarash, 1985; Fromm et al., 1999). Deshalb ist das Verständnis über den intestinalen Arzneimittelmetabolismus und -transport essentiell für die Abschätzung, Vorhersage und Vermeidung von Arzneimittelinteraktionen und -wechselwirkungen.

Die mangelnde Verfügbarkeit von humanen Enterozyten stellt bei der Untersuchung von Fragestellungen hinsichtlich des intestinalen Arzneimittelmetabolismus und –transportes ein wesentliches Problem dar. Bei Dünndarmbiopsien ist die Menge an gewonnenen Enterozyten sehr limitiert und ermöglicht meist nur einige wenige Untersuchungen zur Expression von arzneimittelmetabolisierenden Enzymen und Arzneimitteltransportern. Bei chirurgisch gewonnenen Gewebeproben ist die Enterozytenausbeute meistens sehr hoch, so dass genügend Material für Expressionsanalysen von arzneimittelmetabolisierenden Enzymen und Arzneimitteltransportern und *in vitro* Enzymaktivitätsbestimmungen zur Verfügung steht. Durch die Operation bedingt gibt es jedoch Phasen, in denen das resektierte Gewebe warmer und kalter Ischämie ausgesetzt ist. Da diese Ischämiephasen die Degradation von mRNA und Proteinen beschleunigen, können Untersuchungen zur Expression bzw. Aktivität von arzneimittelmetabolisierenden Enzymen und Arzneimitteltransportern in ihrer Aussagekraft eingeschränkt sein. Zur Expression und *ex vivo* Funktion von Cytochrom P450 Enzymen sowie zur Modifikation der Expression und *ex vivo* Funktion durch Rifampicin in humanen Enterozyten existieren bisher keine systematischen Untersuchungen. Ebenso sind Fragestellungen zur Expression und *in vivo* Funktion von intestinalen Arzneimitteltransportern sowie deren Beeinflussung durch Rifampicin nur unzureichend beantwortet. Die Untersuchung von humanen intestinalen arzneimittelmetabolisierenden Enzymen und Arzneimitteltransportern könnte deshalb zum besseren Verständnis von Interaktionen, welche durch die entsprechenden Enzyme und Transporter vermittelt werden, beitragen.

Aufgrund der genannten Probleme wurde mit Hilfe eines multiluminalen Perfusionskatheters (Glaeser et al., 2002; von Richter et al., 2001) und einer Gewebesammlung von Dünndarm- und Leberproben von jeweils demselben Patienten



versucht, den momentanen Kenntnisstand über den intestinalen Arzneimittelmetabolismus und –transport zu erweitern. Die Charakterisierung der mit dem multiluminalen Perfusionskatheter gewonnenen Zellen zeigte, dass vitale, humane, abgeschilferte Enterozyten gewonnen werden können. Diese Zellen können zur Untersuchung der Expression arzneimittelmetabolisierender Enzyme und Transporter und zur *ex vivo* Analyse des intestinalen Metabolismus verwendet werden. Auch die Funktion von Arzneimitteltransportern konnte *in vivo* durch Verwendung des multiluminalen Perfusionskatheters untersucht werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit dem multiluminalen Perfusionskatheter der Einfluss des Tuberkulostatikums Rifampicin auf die Expression und Funktion intestinaler arzneimittelmetabolisierender Enzyme untersucht. Der Nachweis der Induktion von Cytochrom P450 2C8, 2C9 und 3A4 durch Rifampicin zeigte, dass auch der intestinale Arzneimittelmetabolismus bei Wechselwirkungen zwischen oral applizierten Arzneimitteln, welche Substrate für Cytochrom P450 2C8, 2C9 und 3A4 sind, und Rifampicin, beteiligt ist. Zusätzlich zum Arzneimittelstoffwechsel wurde durch den Einsatz des multiluminalen Perfusionskatheters auch die Funktion und Expression des Arzneimitteltransporters P-Glykoprotein untersucht. Die Untersuchung des Einflusses von Rifampicin auf die Funktion und Expression von P-Glykoprotein war ein weiterer Bestandteil dieser Studie. Für die funktionelle *in vivo* Analyse wurde die „orale“ Gabe von Chinidin an die Probanden über den Katheter simuliert, sowie das P-Glykoproteinsubstrat Digoxin intravenös appliziert. Damit wurde die Bedeutung des intestinal exprimierten P-Glykoproteins für die systemische Elimination des iv. applizierten Digoxins bzw. für die Resorption des „oral“ verabreichten Chinidins im Menschen nachgewiesen. Weiterhin konnte die Zunahme der Elimination von Digoxin bzw. Abnahme der Chinidinresorption nach Gabe von Rifampicin gezeigt werden. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der Einsatz des multiluminalen Perfusionskatheters eine geeignete Methode ist, welche erstmals direkte Untersuchungen zum intestinalen Arzneimittelmetabolismus und –transport beim Menschen ermöglicht.

Mit der Gewebesammlung wurde die Expression des ABC-Transporters MRP2 in Dünndarm und Leber untersucht. Es konnte kein Unterschied im Ausmaß der Expression von MRP2 in den beiden Geweben beobachtet werden. Weiterhin konnte im Gegensatz zur Leber im Dünndarm eine Korrelation zwischen MRP2 mRNA und MRP2 Protein nachgewiesen werden. Das weist möglicherweise auf unterschiedliche Regulationsmechanismen von MRP2 in den beiden Geweben hin.

Mit dieser Arbeit konnte belegt werden, dass der intestinale Arzneimittelmetabolismus und –transport einen entscheidenden Einfluss auf die Pharmakokinetik einiger oral applizierter Arzneimittel haben kann. Durch Berücksichtigung dieser Erkenntnisse bei der Entwicklung von oral zu verabreichenden Arzneimitteln bzw. bei der Therapie mit oral

einzunehmenden Arzneimitteln könnte in Zukunft die Arzneimittelsicherheit erhöht werden.

## 2 Abstract

*Introduction:* Most orally administered drugs are subject to first-pass metabolism which limits the bioavailability of these drugs. Drug metabolism reactions are classified as oxidative reactions (phase I), conjugation reactions (phase II) and transport out of cells. Cytochrome P450 enzymes (CYP) are the most relevant enzymes for drug disposition. Approximately 40 different CYPs are known in humans and animals (Nelson et al., 1993). The classification system for the cytochrome P450 superfamily is based on the amino acid sequence similarity of the individual proteins. Cytochrome P450 enzymes that have > 40 % amino acid identity are grouped into a family. A cytochrome P450 family is further divided into subfamilies such that amino acid sequences within the same subfamily are > 55 % identical. Phase II reactions, which involve conjugation of parental drug or its phase I metabolite with an endogenous substrate such as glucuronic acid, glutathione, amino acids, acetate and sulfate are mediated by specific enzymes e.g. glucuronosyltransferases, glutathionetransferases and sulfotransferases. It is well known that the liver, which contains a large number of drug-metabolizing enzymes, is responsible for wide spectrum of biotransformations. During the last years, several studies have revealed that intestinal drug metabolism plays an important role for the limitation of the bioavailability of orally administered drugs (Fromm et al., 1996; Kolars et al., 1991).

In addition, ABC-transporters in liver and intestine transport the parental drugs and / or their metabolites out of the cells into the bile or the gut lumen. The export pump P-glycoprotein limits for example the bioavailability of digoxin, cyclosporin and HIV-protease inhibitors (Greiner et al., 1999; Kim et al., 1998; Lown et al., 1997) whereas MRP2 transports glucuronides, glutathiones and e.g. pravastatin (König et al., 1999; Yamazaki et al., 1997).

For a better understanding of intestinal drug metabolism and transport, the following aims and questions were formulated:

- Characterization of human shed cells obtained with a multilumen perfusion catheter (mlpc).
- Can shed enterocytes be used for studying expression and ex vivo function of drug metabolising enzymes?
- Investigation of the influence of rifampin on intestinal drug metabolism.
- Can shed enterocytes be used for studying expression of intestinal drug transporters?
- Influence of rifampin on intestinal drug transport.
- Comparison of MRP2 expression in small intestine and liver.

*Methods:* Using a multilumen perfusion catheter (Glaeser et al., 2002; von Richter et al., 2001) shed human cells from small intestine were obtained. Two studies were conducted

with 6 healthy volunteers participating in the first study, and 8 healthy volunteers in the second. All subjects gave written informed consent. The protocols of both studies were approved by the local ethics committee (Ethikkommission der Medizinischen Fakultät, Universität Tübingen, Germany, and Landesärztekammer Baden-Württemberg, Stuttgart, Germany).

On the basis of limited availability of human intestinal tissue, in the first study (Glaeser et al., 2002) shed human cells were collected and characterized for cell cycle and apoptosis by FACS. In addition, the content of villin-positive and CD45-positive cells was analyzed by FACS. The cells were analyzed for expression of cytochrome P450 enzymes and P-glycoprotein by Western Blot and RT-PCR. The ex vivo CYP3A4 activity was investigated by in vitro incubations using the CYP3A4 substrate verapamil. The different metabolites were separated and quantified by an LC/MS method as previously described (von Richter et al., 2000). In the second study using the mlpc, the influence of rifampin on drug metabolism and transport were investigated. On day 1, the mlpc was orally introduced and placed into the small intestine. Then, two segments of 20 cm length were generated by inflating 3 balloons with air. At time point:0 h either the distal or the proximal segment was perfused with perfusion buffer containing 60  $\mu\text{M}$  (subject 7, 8) or 442  $\mu\text{M}$  (subject 8-14) quinidine. Simultaneously 1 mg of the P-glycoprotein substrate digoxin was administered intravenously over 30 minutes. Perfusates and enterocytes were collected as described by Glaeser et al. and von Richter et al. (Glaeser et al., 2002; von Richter et al., 2001). After the last time point of blood sampling (96 h, day 5) the subjects took 600 mg rifampin once daily orally until day 18. On day 15, the study protocol with catheter placement and intravenous digoxin administration was repeated in the same manner as described above. The analysis of mRNA and protein expression of cytochrome P450 enzymes was performed by quantitative real time PCR and Western blot before and during rifampin administration. The ex vivo activities of CYP2C9 and CYP3A4 were analyzed with the substrates diclofenac and verapamil, respectively. In addition, the P-glycoprotein protein expression in the shed enterocytes and the P-glycoprotein function were investigated before and during rifampin.

The third study was focused on the comparison of MRP2 mRNA and protein expression in small intestine and liver obtained from the same patient. Patients undergoing a duodenopancreatectomie were included in this study and an additional liver biopsy was performed. The tissue samples from small intestine and liver were used for expression analysis by quantitative RT-PCR and Western blot.

*Results:* Within two hours of perfusion  $56.23 \pm 31.37$  million cells and  $4.83 \pm 1.96$  mg protein, were recovered on average from a 20 cm isolated segment. There was a positive correlation between the mean protein content in the perfusates and the number of cells

per milliliter of perfusate obtained from the respective segment ( $r = 0.62$ ,  $p = 0.009$ ). The FACS analysis showed that  $84.15 \pm 6.36$  % of the cells were positive for enterocyte-specific villin. Only  $1.60 \pm 0.49$  % of the cells were positive for the leukocyte-specific antigen CD45. Only a minority ( $27.76 \pm 6.83$  % of shed intestinal enterocytes had a subdiploid DNA content indicative of DNA fragmentation and cell death. It could be shown that the majority of these collected cells were in early apoptosis (Annexin V positive, propidium iodide negative:  $30.70 \pm 7.91$  %). Only  $4.43 \pm 1.69$  % of the cells were in late apoptosis (Annexin V positive, propidium iodide positive). As expected, there was a positive correlation between the number of shed intestinal cells with a subdiploid DNA content and the number of Annexin V positive cells ( $r = 0.74$ ,  $p = 0.006$ ). Furthermore, the mRNA and protein expression of cytochrome P450 enzymes and P-glycoprotein was analyzed. CYP3A4 mRNA could be detected by semiquantitative RT-PCR. The protein expression of CYP2C8, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4 and P-glycoprotein was determined with Western blot analysis. The enterocyte-specific villin and GAPDH were detected by Western blot. The analysis of ex vivo function of CYP3A4 in shed enterocytes was performed by incubations with verapamil. The major metabolites D-617 and norverapamil, which are formed primarily by CYP3A4 in human liver (Kroemer et al., 1993) correlated with the CYP3A4 protein content in shed enterocytes. The metabolites D-702/D-703 which are formed primarily by CYP2C enzymes in human liver (Busse et al., 1995) were also detectable in incubations with homogenates of shed enterocytes. The administration of rifampin resulted in a significant induction of cytochrome CYP2C8, CYP2C9, CYP3A4 protein and P-glycoprotein in human shed enterocytes. In addition, a 2.29-fold ( $\pm 1.58$ ) induction of CYP3A4 mRNA was detected. After rifampin treatment, a significantly increased formation of the verapamil metabolites D-617 and norverapamil (catalyzed by CYP3A4) and of the diclofenac metabolite 4'-hydroxydiclofenac (catalyzed by CYP2C9) was found. The in vivo function of P-glycoprotein was investigated with the substrates digoxin (Mayer et al., 1996) and quinidine (Fromm et al., 1999). The existence of a significant correlation between the plasma  $AUC_{iv}$  of digoxin and P-glycoprotein expression in shed enterocytes could be shown.  $0.45 \pm 0.24$  % of the i.v. dose was directly eliminated into the small intestine. During rifampin administration, digoxin elimination into the small intestine (20 cm segment) was increased 2.2-fold. Furthermore, administration of rifampin resulted in significantly increased, dose-corrected luminal quinidine concentrations in comparison to the data without rifampin ( $1.56 \pm 0.76$  vs  $2.64 \pm 1.00 \mu\text{g} \times \text{h} \times \text{ml}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ ,  $p < 0.05$ ). Induction of intestinal P-glycoprotein in addition to induction of CYP3A4 resulted subsequently in significantly lower quinidine plasma concentrations ( $3.58 \pm 1.98$  vs  $0.66 \pm 0.37 \text{ ng} \times \text{h} \times \text{ml}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ ,  $p < 0.01$ ). The correlation between dose-corrected intraluminal quinidine concentrations (0-3 h) and P-glycoprotein content of simultaneously collected

shed enterocytes ( $r_s = 0.55$ ,  $p < 0.05$ ) points out the importance of intestinal P-glycoprotein for intraluminal as well as plasma concentrations of quinidine. Moreover, intestinal P-glycoprotein content was negatively correlated with dose-corrected plasma quinidine  $AUC_{0-3h}$  ( $r_s = -0.67$ ,  $p < 0.01$ ).

In the third study, the expression of MRP2 mRNA and protein in liver and small intestine was compared. The relative quantitation of MRP2 mRNA showed no indication for a coregulation of MRP2 between these two tissues. Moreover, no differences in MRP2 protein expression between liver and small intestine was found. In contrast to liver, a significant correlation between MRP2 mRNA and MRP2 protein was observed in small intestine.

*Conclusion:* The preparation of shed intestinal cells with a mlpc almost exclusively contained viable enterocytes, with the total amount of protein homogenate substantially exceeding the amount of protein, which is obtained per biopsy specimen. mRNA and protein of important drug-metabolizing enzymes and transporters were easily detectable. High catalytic activity (e.g. for CYP3A4) correlated well with the respective expression data. In accordance with previous data (Ahrenstedt et al., 1991), only a minor population of CD45-positive leukocytes was found in the perfusates. The finding that the majority of shed enterocytes was non-apoptotic is in contrast to the previous assumption that shed epithelial cells from the small intestine are apoptotic (Shibahara et al., 1995). These data are the first to report on the percentage of all shed enterocytes that are found in the gut lumen in early or late apoptosis.

Shed human enterocytes contained CYP3A4 mRNA which has been found previously in human small intestine (Kivistö et al., 1996; Lown et al., 1994). CYP3A4 protein could be detected in enterocytes of all subjects. A relatively constant immunodetectable CYP3A4 protein amount was recovered in four perfusates collected at different time points during the entire course of perfusion. This indicates the good quality of the collected shed enterocytes. CYP2C8 and CYP2C9 protein could be detected in homogenates of the shed enterocytes. This is in agreement with the formation of the verapamil metabolites D-702 and D-703, which are primarily formed by members of the CYP2C family in human liver (Busse et al., 1995). The lack of correlation between CYP2C8 and the formation of D-703 indicates that other enzymes contribute to the formation of D-703 in small intestine.

As expected, the induction of CYP3A4 mRNA and CYP3A4 protein by rifampin could be shown in shed enterocytes. Kolars et al. showed the induction of CYP3A4 mRNA and protein with Northern blot and immunohistochemistry. In this study, a 5- to 8-fold induction of CYP3A4 was found. The extent of CYP3A4 induction in shed enterocytes detected by Western Blot is in good agreement to the data of Greiner et al. (Greiner et al., 1999), which were obtained from intestinal biopsies. The *ex vivo* functional characterization of

CYP3A4 by detection of verapamil metabolites D-617 and norverapamil showed the expected result. The lack of correlation between CYP3A4 protein induction and induction of formation of D-617, in contrast to norverapamil, can be explained by the additional contribution of CYP1A2 to the D-617 formation.

So far, no systematic investigations existed about the induction of other cytochrome P450 enzymes in human enterocytes. The induction of CYP2C8 and CYP2C9 by rifampin and the correlation between CYP2C9 and CYP3A4 induction factors suggest a PXR-mediated mechanism of induction. A report from Gerbal-Chaloin has given the first indication of involvement of PXR on CYP2C8 and CYP2C9 induction. After primary hepatocytes were treated with 10  $\mu$ M rifampin, the induction of CYP2C8 and CYP2C9 mRNA showed the same time and concentration dependence like CYP3A4 mRNA. This indicates, that PXR is probably involved in induction of CYP2C8 and CYP2C9 (Goodwin et al., 1999). In further studies using in primary human hepatocytes, the induction of CYP2C8 and CYP2C9 was shown (Drocourt et al., 2001; Rae et al., 2001). In different investigations on the CYP2C9 promotor, two CAR-RE containing a DR-4 and DR-5 motif were identified, respectively. With EMSAs the binding of PXR to these two elements could be detected, whereas only a moderate induction mediated by PXR was detectable with the DR-4 element (Gerbal-Chaloin et al., 2002). At the moment no PXR consensus sequence in the CYP2C9 promotor is known, therefore in further investigations the binding site has to be identified. The increase of formation of the diclofenac metabolite 4'-hydroxydiclofenac in homogenates of shed enterocytes after rifampin administration was in agreement with the induction of CYP2C9 protein in shed enterocytes. In summary, rifampin induced the expression of CYP2C8 and CYP2C9 in the small intestine. In addition to the discussed data, several clinical studies showed an influence of rifampin on typical CYP2C9 substrates. Zilly et al. could show, that half-life and clearance of tolbutamide and hexobarbital were decreased and increased, respectively. Further studies with other CYP2C9 substrates and rifampin confirmed these results.

The not significant change of CYP2D6 protein is in accordance with the pharmacokinetic data of spartein after rifampin treatment previously published by Eichelbaum et al. (Eichelbaum et al., 1986). No influence of rifampin on the expression of the enterocyte-specific protein villin and GAPDH was observed. Greiner et al. obtained a similar result for villin from intestinal biopsies (Greiner et al., 1999). Geick et al. showed that rifampin does not influence GAPDH mRNA in cell culture experiments (Geick et al., 2001).

The expected detection of P-glycoprotein in shed enterocytes confirmed the results of earlier studies, were it could be shown that P-glycoprotein is expressed in the apical membrane of enterocytes (Cordon-Cardo et al., 1990; Thiebaut et al., 1987).

The detection of BCRP protein in shed enterocytes confirmed the importance of BCRP for defence against and elimination of several drugs in humans, which was already shown in mice models (Jonker et al., 2000).

The induction of P-glycoprotein in shed enterocytes is in agreement with the findings of Greiner et al. (Greiner et al., 1999) obtained with intestinal biopsies. The increased direct digoxin secretion into the gut lumen after rifampin administration and the negative correlation between P-glycoprotein expression in shed enterocytes and the plasma AUC of digoxin are evidence for the involvement of P-glycoprotein in digoxin elimination in humans. These data are in agreement with the finding of direct intestinal excretion of digoxin in bile duct ligated mice (Mayer et al., 1996). In addition, the influence of rifampin on the function of P-glycoprotein was investigated with the substrate quinidine. A significantly increased intraluminal quinidine concentration could be measured after rifampin administration. The correlations between the P-glycoprotein expression in shed enterocytes and the dose corrected plasma and perfusate AUC confirm the influence of P-glycoprotein on the absorption and elimination of quinidine.

Furthermore the marginal change of BCRP expression in shed enterocytes after rifampin administration indicates that the transcription factor PXR is not involved in the regulation of BCRP because PXR mediates the induction of CYP3A4 and P-glycoprotein by rifampin (Geick et al., 2001; Goodwin et al., 1999).

The similar mean expression of MRP2 protein in human small intestine and liver from the same individuals indicates that both tissues can contribute to the elimination of drugs and different phase I or phase II metabolites. The analysis of mRNA in both tissues showed no coregulation of MRP2 between these tissues. The correlation between MRP2 mRNA and protein in small intestine in contrast to liver proves that MRP2 is differently regulated in these two tissues.

Taken together, the findings of this work improved the understanding on the importance of intestinal drug metabolism and transport and might therefore contribute to a safer therapy with orally administered drugs in future.

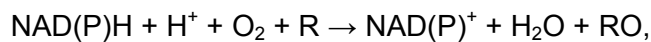


## 3 Einleitung

### 3.1 Phase I- und Phase II-Arzneimittelmetabolismus

Die Biotransformation ist ein entscheidender Schritt für die Elimination lipophiler Arzneimittel. Die Pharmakokinetik von Arzneimitteln hängt in hohem Maße davon ab, wie schnell und in welchem Ausmaß die Pharmaka in wasserlösliche Verbindungen metabolisiert werden. Die Biotransformation von Arzneimitteln wird in zwei Phasen eingeteilt.

In der Phase I des Arzneimittelmetabolismus werden durch Oxidation, Reduktion und Hydrolyse polare Gruppen in die Moleküle eingefügt bzw. freigelegt. Diese Reaktionen werden hauptsächlich von Enzymen der Cytochrom P450 Superfamilie katalysiert. Sie sind Bestandteile des mischfunktionellen Monooxygenasesystems und katalysieren Reaktionen mit der folgenden stöchiometrischen Nettoreaktionsgleichung:



wobei R für ein organisches Substrat, z.B. ein Arzneimittel, steht. Etwa mehr als 50 verschiedene Cytochrom P450 Enzyme sind jeweils beim Menschen und anderen Säugern beschrieben (Nelson et al., 1993). Cytochrom P450 Enzyme, die für den Arzneimittelstoffwechsel von Bedeutung sind, sind in der Leber, aber auch in extrahepatischen Geweben wie z.B. dem Dünndarm exprimiert. Die Bezeichnung einzelner Cytochrom P450 Enzyme beginnt jeweils mit dem Präfix CYP für Cytochrom P450. Die Genfamilie wird durch eine arabische Zahl repräsentiert. So steht zum Beispiel CYP3A4 für das vierte Mitglied der Subfamilie A in der Familie 3. Cytochrom P450 Enzyme, deren Aminosäuresequenz zu mehr als 40 % übereinstimmt, werden einer Familie zugeordnet (z.B. CYP2). Innerhalb einer Subfamilie bestehen bei höheren Organismen Homologien der einzelnen Isoformen von über 55 % (z.B. CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19).

In der Phase II des Arzneimittelmetabolismus werden die mit polaren, funktionellen Gruppen versehenen Metabolite der Phase I bzw. die Arzneistoffe selbst mit meist energiereichen Verbindungen konjugiert, damit die gebildeten Konjugate dann aufgrund ihrer erhöhten Wasserlöslichkeit renal eliminiert werden können. Diese Reaktionen werden durch spezifische Transferasen katalysiert. Die Konjugation mit aktivierter Glucuronsäure (Uridin-5'-diphosphat-Glucuronsäure) wird durch Uridin-5'-diphosphat-Glucuronosyltransferasen katalysiert. In Analogie zu den Cytochrom P450 Enzymen gibt es eine Reihe von Enzymen der Glucuronyltransferasen, die sich hinsichtlich ihrer Substratspezifität und ihres Expressionsortes unterscheiden. Die verschiedenen Enzyme werden in gleicher Weise wie die Cytochrom P450 Enzyme klassifiziert. Die Konjugationen mit Schwefelsäure, Glycin, Glutathion und Essigsäure werden durch

Sulfotransferasen, Transacylase, Glutathion-S-Transferasen bzw. N-Acetyltransferasen katalysiert. Von den Sulfotransferasen, Glutathion-S-Transferasen bzw. Acetyltransferasen existieren ebenfalls verschiedene Enzyme.

Zusätzlich zum Arzneimittelmetabolismus werden die konjugierten Metaboliten sowie auch nicht konjugierte Substanzen durch spezielle Transportproteine aus den Zellen transportiert. Im Abschnitt 3.3 erfolgt eine detaillierte Beschreibung dieser Transportproteine.

Die zwei Phasen der Biotransformation sowie der Arzneimitteltransport sind die Ursache für den oft ausgeprägten First-pass Effekt oral applizierter Arzneimittel, und beeinflussen die Bioverfügbarkeit bestimmter Arzneimittel zum Teil erheblich. Der First-pass Effekt charakterisiert das Ausmaß mit dem ein oral applizierter Arzneistoff nach der Resorption von Dünndarm und Leber metabolisiert bzw. extrahiert und somit aus dem systemischen Kreislauf entfernt wird.

### **3.2 Intestinaler Arzneimittelmetabolismus**

Die Bedeutung der Leber für die First-pass Elimination von Arzneimitteln ist gut verstanden. Dagegen wurde die Bedeutung des intestinalen Arzneimittelmetabolismus für die Bioverfügbarkeit von Arzneimitteln erst in den letzten Jahren erkannt (Lin et al., 1999). Diese soll an Hand eines Fallberichtes verdeutlicht werden (Barbarash, 1985). Ein 67jähriger Patient mit paroxysmalen supraventrikulären Tachykardien wurde erfolgreich mit Verapamil behandelt. Nach der Diagnose einer Tuberkulose wurde unter anderem eine Therapie mit dem Tuberkulostatikum Rifampicin begonnen. Es kam zu einem Wiederauftreten der Arrhythmien trotz einer Steigerung der Verapamildosis auf das Vierfache ( $4 \times 480$  mg / Tag) der empfohlenen Tageshöchstdosis. Die für diese Dosierung sehr niedrigen Verapamilkonzentrationen im Serum stiegen nach Absetzen von Rifampicin wieder auf das Vierfache an. In weiteren Untersuchungen konnte ermittelt werden, dass neben der Induktion des hepatischen Verapamilmetabolismus eine Induktion des intestinalen Verapamilmetabolismus durch Rifampicin erheblich zu dieser ausgeprägten Arzneimittelinteraktion beitrug (Fromm et al., 1996). Heute ist bekannt, dass das Tuberkulostatikum Rifampicin durch Induktion des Arzneimittelmetabolismus bzw. -transportes für eine Vielzahl von Arzneimittelinteraktionen verantwortlich ist (Strayhorn et al., 1997). In der Mukosa des Intestinaltraktes werden eine Reihe von Phase I- und Phase II-Enzymen (siehe 3.1) exprimiert. Die Cytochrom P450 Enzyme CYP1A1, CYP2C, CYP2D6 und CYP3A5 wurden in der Darmmukosa nachgewiesen (Watkins et al., 1987), wobei die meisten Daten zur Expression und Funktion von Cytochrom P450 3A4 vorliegen. Die Expression von CYP3A4 ist dabei am höchsten im Duodenum und nimmt zum distalen Ileum hin ab (Shen et al., 1997). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die CYP3A4 Expression entlang der Villi von der Kryptenregion bis zur Villusspitze

zunimmt (Kolars et al., 1994). Neben den Enzymen für den Phase I-Metabolismus konnten auch die für den Phase II-Metabolismus wichtigen UDP-Glucuronosyltransferasen und Sulfotransferasen im Dünndarm nachgewiesen werden (Krishna et al., 1994). Der Expressionsnachweis dieser Enzyme in der Darmmukosa war die Basis für eine Reihe von Untersuchungen zur Funktion dieser Proteine. Eine aus naheliegenden Gründen für systematische Untersuchungen nicht geeignete Methode ist die intraduodenale Applikation eines Arzneimittels mit anschließender intraoperativer Entnahme von Pfortaderblut zur Bestimmung der auftretenden Arzneimittelmetabolite in der anhepatischen Phase im Rahmen von Lebertransplantationen. Durch diese Technik konnte erstmals die Bedeutung des intestinalen Arzneimittelstoffwechsels für Ciclosporin und Flurazepam direkt gezeigt werden (Kolars et al., 1991; Mahon et al., 1977). Nach Gabe von Ciclosporin in den Dünndarm fand sich ein Konzentrationsverhältnis von Ciclosporin und seinen Metaboliten von bis zu 1:1 im Pfortaderblut (Kolars et al., 1991). Weiterhin wurde nach intraduodenaler Gabe von 2 mg Midazolam eine Extraktion des Arzneimittels in der Darmmukosa von 43 % gemessen (Paine et al., 1996). Diese Tatsache macht deutlich, dass ein erheblicher Anteil der oral gegebenen Midazolamdosierung bereits vor der ersten Leberpassage verstoffwechselt wurde und verdeutlicht die Beteiligung des intestinalen Arzneimittelstoffwechsels an der First-pass Elimination oral applizierter Arzneimittel.

### **3.3 Arzneimitteltransporter**

Die orale Bioverfügbarkeit wird nicht nur durch die Verstoffwechslung der Arzneimittel limitiert, sondern unter anderem auch durch Transportproteine, welche die Arzneistoffe bzw. deren Metaboliten unter Verbrauch von ATP aus der Zelle transportieren. Solche Transporter sind physiologisch in Geweben mit Ausscheidungsfunktion wie Darm, Leber und Niere, aber auch in der Blut-Hirnschranke exprimiert. Im Folgenden werden drei Vertreter dieser Transportproteine genauer charakterisiert.

#### **3.3.1 P-Glykoprotein**

Das ABC (ATP-binding cassette) Transportprotein P-Glykoprotein (*ABCB1*) wurde zuerst in Tumorzellen entdeckt (Gottesman et al., 1996; Juliano et al., 1976). Es ist das Produkt des *MDR1*-Gens und ist für einen Teil der bei der Chemotherapie von Tumoren auftretenden Multidrug Resistenz (MDR) verantwortlich. Unter Verbrauch von ATP werden die Chemotherapeutika durch das in der Zellmembran der Tumorzellen überexprimierte P-Glykoprotein aus der Zelle transportiert. Der protektive Effekt wird durch die Erniedrigung der intrazellulären Konzentration der Chemotherapeutika erreicht. Dies wurde z.B. für Anthrazykline, Vinca-Alkaloide, Etoposid und Paclitaxel beobachtet (Schinkel, 1997). P-Glykoprotein besteht aus zwei homologen Domänen, die aus jeweils sechs

transmembranären Segmenten und einer „nucleotide-binding domain“, die ATP bindet und hydrolysiert, zusammengesetzt sind.

P-Glykoprotein wird nicht nur in Tumorzellen exprimiert, sondern auch in gesunden Geweben wie Leber (kanalikuläre Membran der Hepatozyten), Niere (apikale Membran der proximalen Tubuluszellen), Darmmukosa (apikale Membran der Enterozyten), Gehirn (luminale Membran der Endothelzellen der Gehirnkapillaren), Pankreas (apikale Membranen der sekretorischen Pankreasgänge), Plazenta (Mikrovilli des Syncytiotrophoblasten), Testis (luminale Membran der Endothelzellen der Blutkapillaren) und Lymphocyten (Cordon-Cardo et al., 1989; Cordon-Cardo et al., 1990; Klimecki et al., 1994; MacFarland et al., 1994; Thiebaut et al., 1987). Schinkel et al. gelang es, P-Glykoprotein Knock-out Mäuse zu generieren, in denen die in der Funktion dem menschlichen *MDR1* Genprodukt entsprechenden *mdr1a* und *mdr1b* P-Glykoproteine ausgeschaltet wurden (Schinkel et al., 1995; Schinkel et al., 1997). In der Maus ist das *mdr1a* Genprodukt das entscheidende P-Glykoprotein für die Arzneimittel elimination. Mittels intravenöser und oraler Gabe des P-Glykoproteinsubstrates Digoxin konnte die Bedeutung von P-Glykoprotein für die Pharmakokinetik von Digoxin nachgewiesen werden. Bei P-Glykoprotein Knock-out Mäusen lagen die Plasmakonzentrationen von Digoxin zwei- bis viermal höher als bei den P-Glykoprotein exprimierenden Kontrollmäusen, im zentralen Nervensystem waren die Unterschiede zwischen P-Glykoprotein Knock-out Mäusen und P-Glykoprotein exprimierenden Kontrollmäusen sogar 30 bis 50-fach (Mayer et al., 1996; Schinkel et al., 1995). In weiteren Tierexperimenten wurde bei P-Glykoprotein Knock-out Mäusen und entsprechenden P-Glykoprotein exprimierenden Kontrolltieren der Gallengang ligiert, um die Digoxinausscheidung über die Galle zu unterbrechen. 90 Minuten nach einer intravenösen Gabe von Digoxin waren bei den Kontrolltieren etwa 16 % der Digoxindosis direkt von der Mukosa des Gastrointestinaltraktes in das Darmlumen sezerniert worden, während im gleichen Zeitraum bei den P-Glykoprotein Knock-out Mäusen lediglich 2 % der Dosis im Lumen des Gastrointestinaltraktes wiedergefunden wurden (Mayer et al., 1996). Desweiteren wurde gezeigt, dass die orale Gabe des potenten P-Glykoprotein hemmstoffes PSC-833 an P-Glykoprotein exprimierende Mäuse die direkte Sekretion von Digoxin in das Darmlumen nahezu vollständig hemmen kann (Mayer et al., 1997). Diese Daten zeigen die besondere Rolle von P-Glykoprotein für die Arzneimittel elimination. Aufgrund dieser bedeutenden Funktion ist P-Glykoprotein auch an einigen Arzneimittelinteraktionen beteiligt. Doering beobachtete, dass in Patienten die mit Digoxin und Chinidin behandelt wurden, die Serumkonzentrationen von Digoxin signifikant anstiegen (Doering, 1979). So konnte gezeigt werden, dass das Antiarrhythmikum Chinidin die Plasmakonzentration des Herzglykosids Digoxin in Wildtypmäusen, im

Gegensatz zu den P-Glykoprotein Knock-out Mäusen, deutlich erhöht (Fromm et al., 1999). Auch die Absenkung der Plasmakonzentration von Digoxin durch Rifampicin wird durch P-Glykoprotein vermittelt (Greiner et al., 1999). Die Erniedrigung der Plasmakonzentration resultiert aus der Induktion des intestinalen P-Glykoproteins durch Rifampicin. Diese Induktion wird wie bei Cytochrom P450 3A4 über den Transkriptionsfaktor PXR (pregnane X receptor) vermittelt (Geick et al., 2001).

### 3.3.2 MRP2

MRP2 (multidrug resistance protein 2) ist ein Mitglied der Subfamilie C der ABC-Transporter welches auch als cMOAT (multispecific organic anion transporter) bezeichnet wird und zuerst aus der Ratte kloniert wurde (Büchler et al., 1996; Ito et al., 1997; Paulusma et al., 1996). Dieser Transporter ist das Genprodukt des auf dem menschlichen Chromosom 10 lokalisierten *ABCC2*-Genes und ist für den ATP-abhängigen, unidirektionalen Transport von endogenen und exogenen Glutathion-, Glucuronat-, und Sulfatkonjugaten lipophiler Substanzen, aber auch unkonjugierter lipophiler Substanzen aus der Zelle verantwortlich (König et al., 1999). Die Struktur von MRP2 ist durch zwei charakteristische ATP-Bindungsdomänen, wie beim P-Glykoprotein, und durch eine zusätzlich N-proximale transmembranäre Domäne mit einem extrazellulären N-Terminus charakterisiert (Tusnady et al., 1997). Die Expression von MRP2 konnte, wie bei P-Glykoprotein, in der kanalikulären Membran von Hepatozyten und in den apikalen Membranen von Nierentubuluszellen und Enterozyten nachgewiesen werden (Fromm et al., 2000; Schaub et al., 1999; Tsujii et al., 1999). Aus diesen Befunden wurde deutlich, dass MRP2 eine bedeutende Funktion bei der Entgiftung endogener sowie exogener Substrate einnimmt. Erste Erkenntnisse über die physiologische Bedeutung von MRP2 wurden durch Ratten, die kein MRP2 in ihren Hepatozyten exprimierten, gewonnen. In diesen Tieren fand kein Transport von Bilirubinglucuroniden sowie vom Glutathionkonjugat Leukotrien C<sub>4</sub> von den Hepatozyten in den Gallengang statt (Guhlmann et al., 1995; Huber et al., 1987). Weitere endogene und exogene Substrate konnten durch Experimente mit Transportvesikeln aus MRP2 exprimierenden bzw. defizienten Ratten und aus MRP2 überexprimierenden Zellen identifiziert werden. Dabei war festzustellen, dass MRP2 in polarisierten Zellen immer an der apikalen Membran exprimiert war. Bilirubinglucuronide konnten als gute endogene Substrate von MRP2 identifiziert werden (Jedlitschky et al., 1997; Kamisako et al., 1999). Desweiteren konnte eine Korrelation zwischen der MRP2 Expression und der Resistenz gegenüber Cisplatin in einigen Krebszelllinien gezeigt werden (Kool et al., 1997). Aber auch Resistenzen gegenüber Doxorubicin und Vincristin waren in MRP2 überexprimierenden Zellen zu finden (Koike et al., 1997). Die mögliche Beteiligung von MRP2 an einigen Zytostatikaresistenzen wird auch durch den Nachweis der MRP2 Expression in Epithelien

von Magen-, Kolorektal- und hepatozellulären Karzinomen bekräftigt. MRP2 transportiert neben Glutathionkonjugaten auch Glutathiondisulfid (GSSG) und ist somit vor allem bei oxidativem Stress an der Regulation des GSSG / GSH-Verhältnisses in der Zelle beteiligt. Desweiteren wird auch diskutiert, dass Glutathion (GSH) Cosubstrat beim Transport von Arzneimitteln ist. Bei niedrigen Arzneimittelkonzentrationen in der Zelle wird GSH zusammen mit den Arzneimitteln aus der Zelle transportiert, wogegen bei hohen Arzneimittelkonzentrationen nur die Arzneimittel aus der Zelle transportiert werden (Borst et al., 1999). Die Substratspezifitäten der verschiedenen Vertreter der MRP-Familie sind überlappend, wobei sich jedoch unterschiedliche kinetische Eigenschaften für die unterschiedlichen Substrate bei den Transportern zeigen. In Ratten mit ligiertem Gallengang, in MRP2 defizienten GY / TR<sup>-</sup> Ratten, sowie in EHBR Mutanten konnte eine höhere MRP3 mRNA-Expression in Hepatozyten, d.h. unter Bedingungen in denen die biliäre Sekretion von Bilirubinglucuroniden beeinträchtigt war, nachgewiesen werden (Hirohashi et al., 1999). Diese erhöhte Expression von MRP3 wurde auch in humanen Lebern von Patienten mit Dubin-Johnson-Syndrom bzw. in Lebern von Patienten mit primärer biliärer Zirrhose beobachtet (König et al., 1999). In diesem Fall transportiert das im Hepatozyten basolateral exprimierte MRP3 die MRP2 Substrate, wie z.B. Bilirubinglucuronide, ins Blut und senkt somit die intrazelluläre Konzentration dieser Metabolite. Diese klinischen Beispiele zeigen das Zusammenspiel und die Bedeutung der überlappenden Substratspezifitäten der verschiedenen MRP Transporter. Für das Auftreten des Dubin-Johnson-Syndromes, das mit einer Hyperbilirubinämie einhergeht, sind eine Vielzahl verschiedener Mutationen im MRP2 Gen verantwortlich (Licinio et al., 2002). Dazu gehören Punktmutationen und Deletionen von Basen, welche zu missense Mutationen, nonsense Mutationen und fehlerhaftem RNA Spleißen führen. Bei Patienten mit diesem Syndrom kommt es zum kompletten Verlust des immunochemisch nachweisbaren MRP2 (Kartenbeck et al., 1996; Paulusma et al., 1997; Tsujii et al., 1999). Abschließend kann zusammengefasst werden, dass der ABC-Transporter MRP2 bei der Elimination endogener Abbauprodukten und Arzneimitteln eine entscheidende Rolle einnimmt.

### 3.3.3 BCRP

Das BCRP (**b**reast **c**ancer **r**esistance **p**rotein) wurde zuerst aus mitoxantron- und anthrazyklinresistenten Brustkrebs- und Kolonkrebszellen kloniert (Doyle et al., 1998; Miyake et al., 1999). Weitere gängige Bezeichnungen für dieses Protein sind MXR oder ABCP. BCRP ist das Genprodukt des auf dem Chromosom 4 lokalisierten *ABCG2*-Gens und ist ebenfalls ein ABC-Transporter, d.h. es transportiert ATP-abhängig Substanzen aus der Zelle und ist wahrscheinlich als Homo- oder Heterodimer funktionell aktiv. Eine BCRP vermittelte Resistenz wurde bei den Topoisomerasehemmstoffen der

Camptothecine (Brangi et al., 1999; Maliepaard et al., 1999) und Dolocarbazol (Komatani et al., 2001) beobachtet. Physiologisch wird BCRP im Syncytiotrophoblasten der Plazenta, in Hepatozyten (kanalikuläre Membran), in Enterozyten (apikale Membran) sowie in Endothelien der Blutgefäße exprimiert (Maliepaard et al., 2001). Die Bedeutung von BCRP für die Elimination von Arzneimitteln wird am Beispiel des Zytostatikums Topotecan deutlich (Jonker et al., 2000). In Mäusen erhöhte sich die Bioverfügbarkeit sowie die Anreicherung von Topotecan im Fetus bei gleichzeitiger oraler Gabe eines BCRP Inhibitors. Dagegen war die biliäre Sekretion bzw. die Plasmaclearance bei gleichzeitiger Gabe des BCRP-Inhibitors gesenkt. Da die Substratspezifität und die Gewebe, in denen BCRP exprimiert wird, mit den Transportern der MRP-Familie und P-Glykoprotein überlappen, sind weitere Untersuchungen notwendig, um die Bedeutung von BCRP für die Elimination endogener Metabolite und Arzneimittel zu klären. Ob Polymorphismen im BCRP-Gen für die variable Pharmakokinetik bestimmter Arzneimittel verantwortlich sind, wird ebenfalls Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein, da kürzlich 34 SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) im BCRP-Gen bei Untersuchungen verschiedener ethnischer Gruppen identifiziert wurden.

### ***3.4 Probleme und Fragen bei der Untersuchung des intestinalen Arzneimittelmetabolismus und –transportes beim Menschen***

Ein entscheidendes Problem bei der Untersuchung des humanen intestinalen Arzneimittelstoffwechsels und –transportes ist die mangelnde Verfügbarkeit von intestinalem Gewebe. Die durch Endoskopie gewonnenen Dünndarmbiopsien ermöglichen aufgrund des geringen Gesamtproteingehaltes (5-10 mg pro Biopsie) einer Biopsie nur eine limitierte Anzahl an Experimenten hinsichtlich der Expression von arzneimittelmetabolisierenden Enzymen und Arzneimitteltransportern. Weiterhin weisen unterschiedliche Biopsien einen unterschiedlichen Gehalt an Enterozyten auf, wodurch die Ergebnisse einer größeren Variabilität unterliegen können. Bei chirurgisch gewonnenen Dünndarmproben können meist ausreichend Enterozyten für Expressionsuntersuchungen von arzneimittelmetabolisierenden Enzymen und Arzneimitteltransportern bzw. für *ex vivo* Funktionsuntersuchungen von Enzymen isoliert werden. Durch die Operation bedingt, treten bei dem zu resektierendem Gewebe sowohl Phasen kalter als auch warmer Ischämie auf, welche die Degradation von mRNA und Proteinen begünstigen, und somit die Aussagekraft der Untersuchungen beeinträchtigen können. Untersuchungen hinsichtlich der Regulation bzw. Beeinflussung von arzneimittelmetabolisierenden Enzymen und Arzneimitteltransportern durch Arzneimittel oder ernährungsbedingte Faktoren sind bei chirurgisch gewonnenen Proben nicht möglich, da kein Gewebe vor und während einer Behandlung mit den entsprechenden Substanzen gewonnen werden kann.

Um die Arzneimittelsicherheit oral applizierter Arzneimittel zu verbessern, ist es essentiell, dass der momentane Kenntnisstand über den intestinalen Arzneimittelmetabolismus und –transport verbessert wird. Es existierten bis zum jetzigen Zeitpunkt keine systematischen Untersuchungen über die Expression und Funktion von Cytochrom P450 Enzymen und verschiedenen Arzneimitteltransportern im Dünndarm des Menschen. Auch der Einfluss von Rifampicin auf die Expression und Funktion dieser Enzyme und Transporter beim Menschen wurde bis jetzt noch nicht ausreichend untersucht.

### **3.5 Fragestellungen und Ziele dieser Arbeit**

Zur Klärung dieser offenen Fragen (siehe Abschnitt: 3.4) bezüglich des intestinalen Arzneimittelmetabolismus und –transportes wurden folgende Aspekte untersucht:

- Charakterisierung abgeschilfter Zellen aus dem Dünndarm des Menschen, die mit einem multiluminalen Perfusionskatheter gewonnen wurden, hinsichtlich des Gehaltes an Enterozyten und des Ausmaßes an Apoptose.
- Untersuchungen zur Expression von Cytochrom P450 Enzymen in den abgeschilferten Zellen.
- Untersuchungen zur *ex vivo* Enzymaktivität in den gesammelten, abgeschilferten Zellen.
- Systematische Untersuchung zur Induzierbarkeit der Expression und Funktion verschiedener Cytochrom P450 Enzyme durch Rifampicin im Dünndarm des Menschen.
- Nachweis der Expression verschiedener Arzneimitteltransporter in den Zellen, die mit dem multiluminalen Perfusionskatheter gesammelt wurden.
- Bestimmung der Funktion und Expression verschiedener Arzneimitteltransporter im Dünndarm des Menschen vor und während Rifampicinbehandlung.
- Vergleichende Untersuchungen zur Expression von MRP2 in intestinalem und hepatischem Gewebe.



## 4 Material und Methoden

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Chemikalien und Reagenzien

- Acetonitril, J. T. Baker (Deventer-Holland)
- 30 % Acrylamid / Bis Solution 37,5:1 (2,6%C), Biorad (München)
- Agarose, GibcoBRL (Karlsruhe)
- Ammoniumacetat, Fluka (Deisenhofen)
- Ammoniumperoxodisulfat, Merck (Darmstadt)
- Aprotinin (Antagosan<sup>®</sup> 500000), Aventis (Frankfurt am Main)
- Bicinchoninsäure, Sigma (Deisenhofen)
- Brilliant BlauR-Konzentrat, Roth (Karlsruhe)
- BSA (bovine serum albumine), Sigma (Deisenhofen)
- Chinidin (Quinidine) Gluconate Injection, Eli Lilly (Indianapolis, IN, USA)
- D-617 HCl, Knoll (Ludwigshafen)
- D-620 HCl, Knoll (Ludwigshafen)
- D-702 HCl, Knoll (Ludwigshafen)
- D-703 HCl, Knoll (Ludwigshafen)
- D-832 HCl, Knoll (Ludwigshafen)
- Diclofenac, Sigma (Deisenhofen)
- Diflunisal, Sigma (Deisenhofen)
- Digoxin Lanicor<sup>®</sup>, Teofarma srl, (Valle Salimbene, Italien)
- Dithiothreitol, Sigma (Deisenhofen)
- Erythrozytenlysepuffer, Qiagen (Hilden)
- Ethanol absolut p.a., J. T. Baker (Deventer-Holland)
- Ethidiumbromid, Sigma (Deisenhofen)
- Ethylendiamintetraessigsäure, Sigma (Deisenhofen)
- Ficoll, Sigma (Deisenhofen)
- Fluoreszenzpolarisationsimmunoassay TDx/TdxFLx, Abbott Laboratories (North Chicago, IL, USA)
- Formaldehyd, Sigma (Deisenhofen)
- Formamid, Roth (Karlsruhe)
- Glucose, Merck (Darmstadt)
- Glycerin, Roth (Karlsruhe)

- Glycin, Serva (Heidelberg)
- Hyaluronidase, Calbiochem-Novabiochem (Bad Solden)
- 4'-Hydroxydiclofenac, Knoll (Ludwigshafen)
- Isoamylalkohol, Sigma (Deisenhofen)
- Kaliumchlorid, Merck (Darmstadt)
- Kaliumdihydrogenphosphat, Merck (Darmstadt)
- konzentrierte Salzsäure, Merck (Darmstadt)
- konzentrierte Essigsäure, Merck (Darmstadt)
- 4 % Kupfer(II)sulfat, Sigma (Deisenhofen)
- Leupeptin, Sigma (Deisenhofen)
- Magermilchpulver, Fluka (Deisenhofen)
- Magnesiumchlorid, Merck (Darmstadt)
- Mannitol, Aldrich (Deisenhofen)
- 2-Mercaptoethanol, Sigma (Deisenhofen)
- 3-[N-Morpholino]propansulfonsäure, Roth (Karlsruhe)
- Natriumacetat, Fluka (Deisenhofen)
- Natriumchlorid, Merck (Darmstadt)
- Dinatriumhydrogenphosphat, Merck (Darmstadt)
- Natriumdodecylsulfat, Sigma (Deisenhofen)
- Nicotinsäureamidadenindinukleotidphosphat, Sigma (Deisenhofen)
- Natriumphosphat, Merck (Darmstadt)
- Norverapamil-HCl, Knoll (Ludwigshafen)
- [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-Norverapamiloxalat, Knoll (Ludwigshafen)
- PBS (phosphate buffered saline), Biochrom AG (Berlin)
- Pefa Bloc, Roth (Karlsruhe)
- Pepstatin, Sigma (Deisenhofen)
- Phosphorsäure 85 %, Merck (Darmstadt)
- Ponceau S Lösung, Sigma (Deisenhofen)
- 2-Propanol 70%, Fischar (Saarbrücken)
- 2-Propanol, J. T. Baker (Deventer-Holland)
- Propidiumjodid, Sigma (Deisenhofen)
- Rifampicin Rifa<sup>®</sup>, Grünenthal GmbH (Stolberg)
- RNA<sup>later</sup>, Qiagen (Hilden)
- RNeasy<sup>®</sup> RNA-Isolierungskit, Qiagen (Hilden)
- RLT-Puffer, Qiagen (Hilden)
- Tetramethylethylendiamin, GibcoBRL (Karlsruhe)

- 2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol, Roth (Karlsruhe)
- Tween20, Merck (Darmstadt)
- Super Signal<sup>®</sup> West Dura Extended Duration Substrate, Pierce (St. Augustin)
- Restore<sup>™</sup> Western Blot Stripping Buffer, Pierce (St. Augustin)
- Verapamil-HCl, Knoll (Ludwigshafen)

#### 4.1.1.1 Antikörper

##### 4.1.1.1.1 Primärantikörper

- Inhibitorischer monoklonaler Antikörper gegen humanes CYP2B6, Gentest (Woburn, MA, USA)
- Polyklonaler Antikörper (IgG) gegen humanes CYP2C8, Research Diagnostics (Flanders, NJ, USA)
- Polyklonaler Antikörper (IgG) gegen humanes CYP2C9, Research Diagnostics (Flanders, NJ, USA)
- Polyklonaler Antikörper (IgG) gegen humanes CYP2C19, Research Diagnostics (Flanders, NJ, USA)
- Monoklonaler Antikörper gegen humanes CYP2D6 mab 114 (Dr. U. M. Zanger, IKP Stuttgart)
- Human CYP3A4 Western Blotting Kit, Gentest (Woburn, MA, USA)
- Human CYP3A5 Western Blotting Kit, Gentest (Woburn, MA, USA)
- Monoklonaler Antikörper gegen humanes P-Glykoprotein (MDR), Sigma (Deisenhofen)
- Monoklonaler Antikörper gegen humanen cMOAT [MRP2], Alexis, (Grünberg)
- Monoklonaler Antikörper gegen humanes Villin, Chemicon International INC (Temecula, CA, USA)
- Monoklonaler Antikörper gegen humanes BCRP (Breast Cancer Resistance Protein), Alexis, (Grünberg)
- Monoklonaler Antikörper gegen humanes  $\beta$ -Actin Clone AC-15, Sigma (Deisenhofen)
- Monoklonaler Antikörper gegen humane Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase, Biotrend (Saco, Maine USA)
- Monoklonaler FITC-gekoppelter Antikörper gegen humanes CD45, Immunotech, Beckman Coulter (Krefeld)
- Monoklonales FITC-gekoppeltes IgG zur Isotypkontrolle, Immunotech, Beckman Coulter (Krefeld)

#### 4.1.1.1.2 Sekundärantikörper

- Peroxidasegekoppelte Ziege-gegen-Kaninchen IgG F(ab')<sub>2</sub> Fragmente, Jackson ImmunoResearch (Dianova, Hamburg)
- Peroxidasegekoppelter Ziege-gegen-Maus IgG Antikörper, Oncogene (Cambridge, MA, USA)
- FITC-gekoppelter Ziege-gegen-Maus IgG, Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA, USA)

#### 4.1.1.2 Rekombinante Enzyme

- Humane CYP2B6 Mikrosomen, Gentest (Woburn, MA, USA)
- Humane CYP2C8 + P450 Reduktase Mikrosomen, Gentest (Woburn, MA, USA)
- Humane CYP2C9\*1 (Arg) + P450 Reduktase Mikrosomen, Gentest (Woburn, MA, USA)
- Humane CYP2C18 + P450 Reduktase Supersomes™, Gentest (Woburn, MA, USA)
- Humane CYP2C19 + P450 Reduktase Supersomes™, Gentest (Woburn, MA, USA)
- Humane CYP2D6\*1 (Val) + P450 Reduktase Mikrosomen, Gentest (Woburn, MA, USA)
- Humane CYP3A4 + P450 Reduktase Mikrosomen, Gentest (Woburn, MA, USA)
- Humane CYP3A4 + P450 Reduktase + Cytochrom b<sub>5</sub> Supersomes™, Gentest (Woburn, MA, USA)

#### 4.1.1.3 Zelllinien

- Caco-2 Zellen, American Type Culture Collection (Manassas VA, USA)
- TN5B1-4 Zellen, Invitrogen (San Diego CA, USA)
- MDCK II Zellen Subklon 217, Prof. Richard B. Kim, Division of Clinical Pharmacology Vanderbilt University School of Medicine (Nashville TN, USA)
- L-MDR1 Zellen, Prof. Alfred Schinkel, Netherlands Cancer Institute (Amsterdam, Niederlande)

#### 4.1.1.4 Puffer und Lösungen für die Verwendung des multiluminalen Perfusionskatheters

Proteinsammelpuffer	EDTA	10 mM
	Pefa-Bloc	10 mM
	Leupeptin	10 µg / ml
	Pepstatin (Stammlösung in Methanol)	10 µg / ml

Standardpuffer	Glucose	10 mM
	Kaliumchlorid	5,4 mM
	Natriumchlorid	120 mM
	Dinatriumhydrogenphosphat	2 mM
	Mannitol	35 mM
	Aprotinin	100 KIE / ml
	pH 7,4	
Proteinwaschpuffer	EDTA	1 mM
	Kaliumchlorid	0,27 mM
	Natriumchlorid	13,7 mM
	Dinatriumhydrogenphosphat	0,43 mM
	Kaliumdihydrogenphosphat	0,14 mM
	Pefa-Bloc	1 mM
	Leupeptin	1 µg / ml
	Pepstatin (Stammlösung in Methanol)	1 µg / ml
10× RNA-Waschpuffer	Kaliumchlorid	2,7 mM
	Natriumchlorid	137 mM
	Dinatriumhydrogenphosphat	4,3 mM
	Kaliumdihydrogenphosphat	1,4 mM
RNA-Aufbewahrungspuffer	RLT-Puffer	
	2-Mercaptoethanol	1 % (v/v)

#### 4.1.1.5 Puffer und Lösungen für die FACS-Analyse

Waschpuffer	PBS	
	BSA	1 % (w/v)
RNase-Lösung	PBS	
	RNase A	50 µg / ml
Propidiumjodidlösung	PBS	
	Propidiumjodid	50 µg / ml

Annexin V-Bindungspuffer	HEPES	10 mM
	Natriumchlorid	140 mM
	Calciumchlorid	25 mM
	pH 7,4 mit konz. HCl einstellen	
Annexin V-Inkubationspuffer	Annexin V-Bindungspuffer	
	Annexin V	5 % (v/v)
	Propidiumjodid	0,0001 % (w/v)

#### 4.1.1.6 Puffer und Lösungen zur Gewebeaufarbeitung

Isotonische Darmspüllösung	Dikaliumhydrogenphosphat	34 mM
	Kaliumdihydrogenphosphat	9 mM
	Natriumchlorid	90 mM
	Hyaluronidase	5220 Units
	pH 7,4 mit konz. Salzsäure einstellen	
	mit Helium begast	
	Lagerung bei -20°C	

Puffer zum Lösen der Hyaluronidase	Natriumphosphat	20 mM
	Natriumchlorid	77 mM
	BSA	0,01 % (w/v)
	mit Helium begast	
	pH 6,9 mit konz. Salzsäure einstellen	

Enterozytenisolierungspuffer	Natriumchlorid	90 mM
	Tris-HCl	10 mM
	EDTA	1 mM
	Pefa Bloc	1 mM
	pH 7,4 mit konz. Salzsäure einstellen	
	mit Helium begast	

Homogenisierungspuffer	EDTA	1 mM
	Dithiothreitol	1 mM
	Pefa Bloc	0,2 mM
	HEPES	10 mM
	Kaliumchlorid	0,15 mM
	pH 7,4 mit konz. Salzsäure einstellen	
Mikrosomenwaschlösung	EDTA	1 mM
	Natriumpyrophosphat	0,1 M
	pH 7,4 mit 85 % Phosphorsäure einstellen	
Mikrosomenpuffer (steril)	Natriumpyrophosphat	0,1 M
	pH 7,4 mit 85 % Phosphorsäure einstellen	
Proteinlagerungspuffer	Tris-HCl	100 mM
	EDTA	1 mM
	Pefa Bloc	1 mM
	Leupeptin	1 µg / ml
	Pepstatin	1 µg / ml
	pH 7,4 mit konz. Salzsäure einstellen	
	mit Helium begast	
	Lagerung -20°C	

#### 4.1.1.7 Reagenzien und Lösungen zur RNA-Isolierung und Analytik

10× Formaldehydgelpuffer	MOPS	200 mM
	Natriumacetat	50 mM
	EDTA	10 mM
	pH 7,0 mit Eisessig einstellen	

RNA-Probenpuffer	10× Formaldehydgelpuffer	10 % (v/v)
	Formamid	50 % (v/v)
	Formaldehyd (37 %)	17,8 % (v/v)
	Rnase-freies Wasser	
Ethidiumbromidstammlösung	Ethidiumbromid	0,5 µg / µl
	Rnase-freies Wasser	

- Erythrozytenlysepuffer
- RLT-Puffer
- *RNAlater*
- RNeasy® RNA-Isolierungskit
- TaqMan® Reverse Transcription Reagents, Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)
- TaqMan® Universal PCR Master Mix, Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)
- TaqMan® Pre-Developed Assay Reagent für humanes β-Actin, Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) Die Sonde ist an den 5'- bzw. 3'-Termini mit den Fluoreszenzfarbstoffen VIC und 6-Carboxytetramethylrhodamin (TAMRA) markiert.

#### 4.1.1.7.1 Primer und Sonden für quantitative Real Time-PCR

CYP3A4	Forward Primer	5'-TGTCCTACCATAAGGGCTTTTGTAT-3'
	Reverse Primer	5'-TTCAGTACTGACTGTTTTGATCATGTC-3'
	Sonde	5'-CTTTTATGATGGTCAACAGCCTGTGCTG-3'
MRP2	Forward Primer	5'-CTGGGAACATGATTCGGAAGC-3'
	Reverse Primer	5'-GAGGATTTCCCAGAGCCGAC-3'
	Sonde	5'-CAGTCCGAGATGTGAACCTGGACAT-3'
Villin	Forward Primer	5'-CTGGCAACCTTAGGGACTGG-3'
	Reverse Primer	5'-GTTAGCATTGAACACGTCCACTTT-3'
	Sonde	5'-CCAGATCACTGCTGAGGTCACAAGC-3'



Die Sonden sind bei CYP3A4, MRP2 und Villin am 5'-Terminus mit 6-Carboxyfluorescein (FAM) und am 3'-Terminus mit 6-Carboxytetramethylrhodamin (TAMRA) markiert. Die 3'-terminale Hydroxylgruppe des Desoxyribosylrestes der Sonde ist durch Veresterung mit einem Phosphatrest blockiert.

#### 4.1.1.8 Puffer und Lösungen für SDS-PAGE und Western Blot

Ammoniumperoxodisulfat 10% (v/v)	Ammoniumperoxodisulfat	1 g
	Millipore Wasser	ad 10 ml
5× Auftragepuffer für SDS-PAGE	SDS	10 % (w/v)
	Tris-HCl, pH 6,8	360 mM
	Glycerin	25 % (v/v)
	2-Mercaptoethanol	25 % (v/v)
	Bromphenolblau	0,1 % (w/v)
Entfärbelösung für SDS-Gele	Ethanol absolut	45 % (v/v)
	konzentrierte Essigsäure	10 % (v/v)
	Wasser	45 % (v/v)
Färbelösung für SDS-Gele	Brilliant BlauR Konzentrat	50 % (v/v)
	Millipore Wasser	50 % (v/v)
Natriumdodecylsulfat 10 %	SDS	10 % (w/v)
10× SDS-PAGE Elektrophoresepuffer	Tris	0,25 M
	Glycin	2 M
	SDS	35 mM
Transferpuffer (Proteine < 100 kDa) (Cytochrom P450 Enzyme)	Tris	25 mM
	Glycin	192 mM
	Methanol	20 % (v/v)
Transferpuffer (Proteine > 100 kDa) (P-Glykoprotein)	Tris	48 mM
	Glycin	39 mM
	Methanol	20 % (v/v)

Transferpuffer (Proteine > 100 kDa) (MRP2 Protein)	Tris	25 mM
	Glycin	189 mM
	Methanol	10 % (v/v)
Transferpuffer für Semidry-Transfer	Tris	50 mM
	Glycin	40 mM
	SDS	0,004 % (w/v)
	Methanol	20 % (v/v)
1,5 M Tris-HCl	Tris-HCl	1,5 M
	Millipore Wasser	
	pH 8,8 mit konz. Salzsäure einstellen	
0,5 M Tris-HCl	Tris	0,5 M
	Millipore Wasser	
	pH 6,8 mit konz. Salzsäure einstellen	
10× Waschpuffer TBS	Tris	0,25 M
	Natriumchlorid	1,4 M
	Kaliumchlorid	27 mM
	pH 7,4 mit konz. Salzsäure einstellen	
Waschpuffer TBST	10× Waschpuffer TBS	10 % (v/v)
	Tween 20	0,1 % (v/v)
Blockpuffer	Waschpuffer TBST	
	Magermilchpulver	5 % (w/v)

#### 4.1.1.9 Puffer und Lösungen zur Enzymaktivitätsbestimmung und Analytik

Inkubationspuffer 1	Kaliumdihydrogenphosphat pH 7,4 mit 85 % Phosphorsäure einstellen	500 mM
Inkubationspuffer 2	MgCl <sub>2</sub>	300 mM
Inkubationspuffer 3	Tris-HCl pH 7,4 mit konz. Salzsäure einstellen	500 mM
Inkubationspuffer 4	MgCl <sub>2</sub>	330 mM
Interner Standard für Verapamilanalytik mittels LC/MS	[ <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ]-Norverapamiloxalat	2 pmol / µl
	D-832	2 pmol / µl
Interner Standard für 4'-Hydroxydiclofenacanalytik	Diflunisal	2 pmol / µl
Ammoniumacetatpuffer	Ammoniumacetat mit Essigsäure auf pH 4,2 einstellen	5 mM
Mobile Phase für Verapamilanalytik / 4'-Hydroxydiclofenacanalytik mittels LC/MS	Acetonitril	30 %
	Ammoniumacetatpuffer pH 4,2	70 %

## 4.1.1.10 Zellkulturmedien

Zelllinie	Medium und Inkubationsbedingungen
Caco-2 Zellen	DMEM 25mM HEPES + 10 % fötales Kälberserum (v/v) + 1 % Penizillin / Streptomycin (v/v) + 1 % nicht essentielle Aminosäuren (v/v) + 1 % Natriumpyruvat (v/v) + 1 % Glutamat (v/v) Inkubation bei 37 °C und 5 % CO <sub>2</sub>
MDCK II Zellen	DMEM 25mM HEPES + 10 % fötales Kälberserum (v/v) + 1 % Penizillin / Streptomycin (v/v) Inkubation bei 37 °C und 5 % CO <sub>2</sub>
L-MDR1 Zellen	Medium 199 + 10 % fötales Kälberserum (v/v) + 1 % Penizillin / Streptomycin (v/v) + 640 nM Vincristin Inkubation bei 37 °C und 5 % CO <sub>2</sub>
TN5B1-4 Zellen	SF 900 II serumfreies Insektenmedium + 0,5 % Gentamicin (5 µg/ml) Inkubation bei 27°C

Alle verwendeten Zellkulturmedien und Zusätze wurden von GibcoBRL (Karlsruhe) bezogen.

#### 4.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

- ABI PRISM™ 7700 Sequence Detection System, Applied Biosystems
- Analysenwaage HK 60, Mettler
- Autosampler SIL 9A, Shimadzu
- Blotkammer Trans-Blot® Cell, Biorad
- Blotkammer Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell, Biorad
- Chemolumineszenzkamera CCD LAS-1000, Fuji

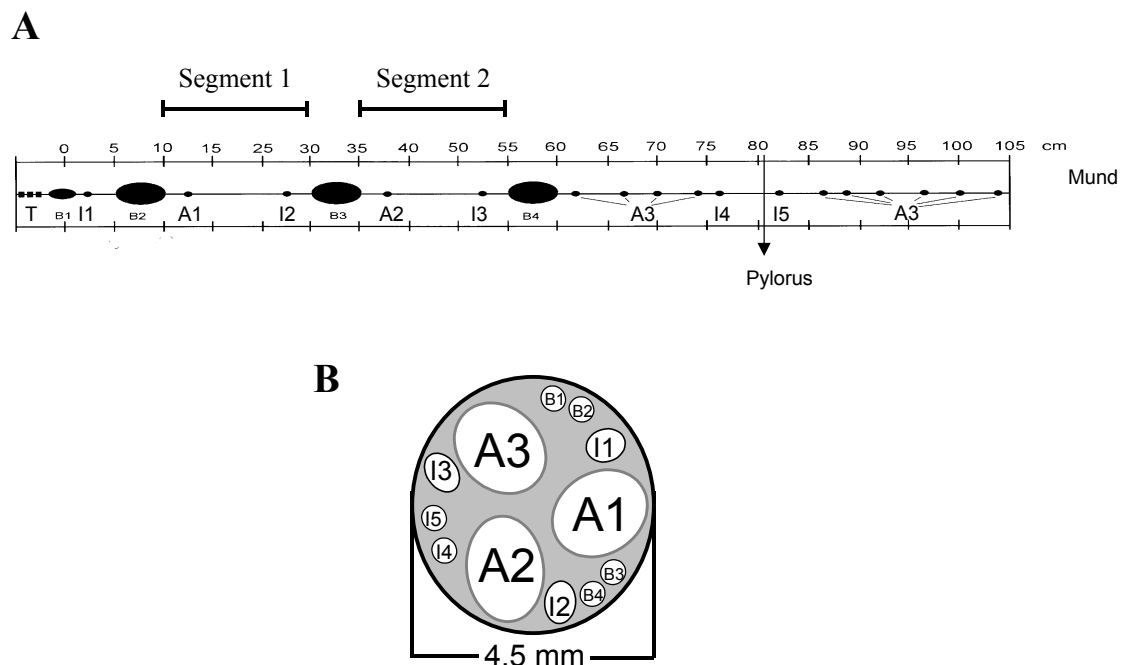
- Dispergiersysteme ULTRA-TURRAX<sup>®</sup> und Dispergierwerkzeug 10 N, IKA-Laborsysteme
- Durchflusszytometer FACScan, Becton Dickinson
- Elektrophoresekammer PROTEAN<sup>®</sup> II xi, Biorad
- Festwinkelrotor für Ultrazentrifuge MLA 80, Beckmann
- Festwinkelrotor für Ultrazentrifuge TLA 55, Beckmann
- Filterpapier gel blotting paper 003, Schleicher & Schuell
- Fluoreszenzdetektor FP-920, Jasco
- Heizblock, Reacti Therm III, Pierce
- Homogenisator Potter S, Homogenisatorzylinder (2 ml, 5 ml), Teflonkolben, Braun Biotech
- HPLC-Pumpe SD-200, Dynamax
- HPLC-System HP1100 (Entgaser, binäre Pumpe, Autosampler, Säulenofen, mit Säulenschaltventil), Hewlett Packard
- HPLC-Säule Luna C8 (150x2 mm, 5 µm), LiChrospher RP C18 endcapped, Phenomenex
- HPLC-Säule Lichrospher 100 RP-18 endcapped 5 µm 150 \* 3 mm, Phenomenex
- HPLC-Vorsäule Eclipse XDB-C8 (2,1 x 12,5 mm, 5 µm), Agilent Technologies
- HPLC-Säulenofen Jetstream, Bischoff
- UV-Emissionstisch und Kamera zur Geldokumentation (Cybertech, Berlin)
- Kühlzentrifuge für Falcongefäße Rotina 48 R, Hettich
- Laborschüttler Modell 3014, GFL
- Laborwaage P 1210, Mettler
- Laborwaage AC 100, Mettler
- Massenspektrometer HP1100 (1 Quadropol Massenspektrometer mit LC-Kopplung und ESI), Hewlett Packard
- Mikro-Dismembrator S, Braun Biotech
- Nitrocellulosemembran Protran<sup>®</sup>, Schleicher & Schuell
- Perfusor IVAC P7000 Mk II; ALARIS<sup>™</sup> Medical Systems
- Photometer für 96-well Platten Victor<sup>™</sup> 1420 multilabel Counter, Wallac
- Photometer GeneQuant, Amersham Pharmacia
- pH Meter Model 420A, Orion
- PVDF-Membran, Roche
- Spannungsquelle Power Pac<sup>®</sup> Power Supply, Biorad
- Spannungsquelle Modell 200/2.0 Power Supply, Biorad
- Ultraschall Desintegrator Sonoplus HD200 mit Spitze MS 72, Bandelin

- Ultrazentrifuge Optima™ Max-E, Beckmann
- Vibrationsschüttler Vibramax 100, Heidolph
- Wasserbad HAAKE E P4 + Thermostat HAAKE D1, Julabo
- Wasserbad und Thermostat Multi Temp III, Pharmacia Biotech
- Zentrifuge für Eppendorfreaktionsgefäße Biofuge 13, Heraeus

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Multiluminaler Perfusionskatheter

Der multiluminale Perfusionskatheter (MLPC) wurde in klinischen Studien (IKP 114, IKP 164 und IKP 176), welche am Dr. Margarete Fischer-Bosch Institut für Klinische Pharmakologie durchgeführt wurden, zur Gewinnung abgeschilfter humaner Enterozyten eingesetzt. Der Katheter wird von der Firma DENTSLEEVE Pty Ltd. (Adelaide, Australien) hergestellt. Eine schematische Darstellung des Katheters ist in Abbildung 1 gezeigt.



**Abbildung 1** A) Der multiluminale Perfusionskatheter hat eine Gesamtlänge von 280 cm und besteht aus wiederverwendbarem Silikon. Durch das Füllen der Polypropylenballons B2, B3, B4 mit  $45 \pm 15$  ml Luft werden zwei Segmente (Segment 1 und 2) mit einem Volumen von jeweils ca. 100 ml isoliert. B1 ist ein Führungsballon mit einem Volumen von 10 ml. Dieser Ballon soll die peristaltikbedingte Migration des Katheters fördern. Über die Kanäle I2 und I3 wird der Perfusionspuffer infundiert und über die Kanäle A1 und A2 aspiriert. Die Öffnungen des Kanals A3 dienen zur Aspiration der Gallen-/ Dünndarm-/ Magenflüssigkeit. Alle Kanäle werden für die Bestimmung der transmukosalen Potentialdifferenz (TMPD) genutzt. T ist eine Spitze aus Wolframplättchen. B) Querschnitt durch den multiluminalen Perfusionskatheter.

Der multiluminale Perfusionskatheter kann zudem zur Untersuchung der Resorption, des intestinalen Metabolismus und Transportes von Arzneimitteln verwendet werden (von Richter et al., 2001). Mit drei aufblasbaren Ballons können zwei isolierte Dünndarmsegmente generiert werden. Der Katheter wurde den Probanden unter Rachenlokalanästhesie mit Lidocain über den Mund eingeführt. Die weitere

Pyloruspassage und die Migration des Katheters im Dünndarm ist ein peristaltikabhängiger Prozess. Eine genaue Positionskontrolle des Katheters erfolgte mit der Bestimmung der transmukosalen Potentialdifferenz (TMPD) (Edelbroek et al., 1994). Bei dieser Messung wurde der physiologische Unterschied des pH-Wertes zwischen Magen (sauer) und Duodenum (basisch) genutzt. Die aufgrund des unterschiedlichen pH-Wertes resultierende Potentialdifferenz wurde gegen die Haut als Referenz gemessen. Nachdem die Kanäle I4 und I5 den Pylorus passiert hatten, d. h. der proximale Ballon befand sich etwa 20 cm distal der Papilla Vateri, wurden die drei Ballons B2, B3 und B4 mit jeweils zirka 45 ml Luft gefüllt und dadurch zwei Dünndarmsegmente mit einem Volumen von jeweils etwa 100 ml isoliert. Abhängig vom Studiendesign wurden die beiden Segmente dann 30 bis 60 Minuten mit Standardpuffer bei einer Fließgeschwindigkeit von 2,5 ml / min infundiert und die zurückfließende Darmflüssigkeit aspiriert. In dieser Phase wurde der Hauptteil der physiologisch vorhandenen Darmflüssigkeit, welche sich in den Segmenten befindet, entfernt. Nach der Spülphase wurde der Standardpuffer mit einer Fließgeschwindigkeit von 2,0 ml / min infundiert. Die Sammelperiode für die aspirierten Perfusate betrug jeweils 15 Minuten. Parallel dazu wurde aus dem proximalen Kanal A3 Gallenflüssigkeit aspiriert und für weitere Analysen bei -20 °C gelagert. Die Sammeldauer betrug zwei Stunden in der Studie IKP 114, drei Stunden in der Studie IKP 164 und fünf Stunden in der Studie IKP 176. Die Perfusate wurden zur Arzneimittelanalyse und Sammlung von abgeschilferten Enterozyten mit anschließender RNA- und Proteinanalyse verwendet.

#### 4.2.1.1 Gewinnung von abgeschilferten Enterozyten und deren Proteinpräparation

Wie im Abschnitt „Multiluminaler Perfusionskatheter“ beschrieben, wurden die Perfusate und die darin enthaltenen abgeschilferten Enterozyten im Abstand von 15 Minuten gesammelt. Perfusate, welche für die Proteinpräparation vorgesehen waren, wurden direkt in 3 ml Proteinsammelpuffer aspiriert. Die Zellsuspension wurde 5 Minuten mit 400×g bei 4 °C zentrifugiert. Zur Bestimmung von Arzneimitteln im Perfusat wurde der Überstand dekantiert und bei -20 °C gelagert. Das Zellpellet wurde in 12,5 ml Proteinwaschpuffer resuspendiert und wiederum 5 Minuten mit 400×g bei 4 °C zentrifugiert. Nach diesem Zentrifugationsschritt wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 250 µl Proteinlagerungspuffer aufgenommen und direkt in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Enterozytensuspensionen bei -80 °C gelagert. Die weitere Aufarbeitung der Enterozyten erfolgte bei 4 °C im Kühllabor. Die Zellsuspensionen wurden auf Eis bei 4 °C aufgetaut und in Dounce Homogenisatoren S (2 ml) für 2 Minuten mit 1000 upm homogenisiert. Darauf folgte eine Ultraschallbehandlung mit der Sonotrode für 30 Sekunden mit 12 W (50 % Pulsierung).



Die Enterozytenhomogenate wurden in 50 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

#### 4.2.1.2 RNA-Isolierung aus abgeschilferten Enterozyten

Die Aspiration der Perfusate erfolgte wie im Abschnitt „Multiluminaler Perfusionskatheter“ beschrieben. Die Perfusate wurden 5 Minuten mit 400×g bei 4 °C zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das erhaltene Zellpellet in 1 ml RNA-Waschpuffer resuspendiert, in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt und bei höchster Drehzahl für 1 Minute mit einer Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum verworfen und das Enterozytenpellet in 600 µl RNA-Aufbewahrungspuffer aufgenommen. Die Suspension wurde dann 4 bis 5 mal mit Hilfe einer 1 ml Spritze durch eine dünne Kanüle gezogen, um die in den Zellen enthaltene RNA freizusetzen. Die Proben wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Die weitere Isolierung der Gesamt-RNA wurde mit dem RNeasy® Mini Kit der Firma Qiagen gemäß der Anleitung des Herstellers (QIAGEN, 2001) durchgeführt.

#### 4.2.1.3 Klinische Studie IKP 114

In dieser Studie wurden mit dem MLPC im Abstand von 15 Minuten über zwei Stunden abgeschilferte Enterozyten gesammelt, um diese mit den beschriebenen Methoden aufzuarbeiten und hinsichtlich der Expression und Funktion arzneimittelmetabolisierender Enzyme und Transporter zu charakterisieren. Dazu wurden zwei weibliche und vier männliche Probanden in diese Studie eingeschlossen. Alle Probanden gaben dafür eine schriftliche Einverständniserklärung ab. Für die Studie lag ein positives Votum der Ethikkommission der Landesärztekammer Stuttgart vor. Für die Charakterisierung der Enterozyten wurden vier Sammelfraktionen zur Proteingewinnung und vier weitere Fraktionen zur RNA-Isolierung verwendet. Die Probanden wurden mit den Nummern 1 bis 6 kodiert. Die Enterozytensammlung erfolgte wie im Abschnitt 4.2.1.1 beschrieben, wobei in dieser Studie nur ein 20 cm Dünndarmsegment isoliert wurde.

#### 4.2.1.4 Klinische Studie IKP 164

In dieser Studie sollte mit Hilfe des MLPC der Einfluss von Rifampicin bzw. Chinidin auf die intestinale Sekretion von zuvor intravenös appliziertem Digoxin untersucht werden. Dazu wurden acht männliche Probanden in diese Studie eingeschlossen. Alle Probanden gaben dafür eine schriftliche Einverständniserklärung ab. Für die Studie lag ein positives Votum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Tübingen vor. Die Probanden wurden mit den Nummern 7 bis 14 kodiert. Wie in Abschnitt 4.2.1.1 beschrieben, wurden vor Beginn der Digoxingabe die beiden isolierten Dünndarmsegmente zunächst 30 Minuten mit Standardpuffer gespült. Danach wurde

entweder das proximale oder das distale Segment (für jeden Probanden randomisiert) mit Standardpuffer, in welchem Chinidin in einer Konzentration von 60 µM (Probanden 7, 8) bzw. 442 µM vorlag, für weitere 30 Minuten mit 2,5 ml / min gespült. Die beiden Dünndarmsegmente wurden ab dem Zeitpunkt t= 0 h mit Standardpuffer allein oder mit Standardpuffer + Chinidin für drei Stunden perfundiert. Simultan zum Beginn der Perfusionsphase wurde den Probanden mittels eines Perfusors intravenös 1 mg Digoxin (in 30 ml 0.9% NaCl; Lanicor®) über 30 Minuten verabreicht. Während der gesamten Perfusionsphase wurden neun Perfusate für die Proteinpräparation, zwei Perfusate für die RNA-Isolierung und ein Perfusat für FACS-Analysen (Fluorescence-activated cell sorting) aus je beiden Segmenten verwendet. Über den proximalen Kanal A3 wurde die Gallenflüssigkeit im Zeitraum von 15 Minuten aspiriert und bis zur Arzneimittelanalyse bei -20 °C gelagert. Venöse Blutproben wurden vor sowie 0,17; 0,33; 0,5; 0,58; 0,67; 0,75; 1; 1,25; 1,5; 2; 3; 5; 7; 9; 12; 24; 48; 72 und 96 Stunden nach der iv. Digoxinapplikation gesammelt. Urinproben wurden in 24 Stundenfraktionen bis 96 Stunden nach Digoxinapplikation gesammelt. Nach der letzten Blutentnahme (96 Stunden, Tag 5) folgte eine tägliche orale Rifampicineinnahme (Rifa®, Grünenthal GmbH) von 600 mg bis zum Studientag 18. Am Studientag 15 wurden die beschriebene Katheterintubation sowie die Blutentnahmen und Urinsammlung wiederholt. Das Studiendesign ist schematisch in Tabelle 1 dargestellt.

**Tabelle 1 Studiendesign für Katheterintubation, Blutentnahmen, Urinsammlung und intravenöse Applikation von 1 mg Digoxin über 30 Minuten vor und während Rifampicineinnahme (IKP 164).**

Tag	1	2	3	4	5	6	7	//	13	14	15	16	17	18	19
Katheterintubation	x										x				
1 mg Digoxin i.v. über 30 min	x										x				
Chinidin im Segment															
n=2 60 µM															
n=6 442 µM															
Segment A	x										x				
Segment B	---										---				
Perfusataspiration (0-3h)	x										x				
Gallenflüssigkeitsaspiration (0-3h)	x										x				
Blutentnahmen	x	x	x	x	x						x	x	x	x	x
Urinsammlung	x	x	x	x	x						x	x	x	x	x
Rifampicin (600 mg / Tag p.o.)						x	x	x	//	x	x	x	x	x	x

#### 4.2.1.4.1 Bestimmung von Digoxin und Chinidin

Die Messungen von Digoxin und Chinidin im Perfusat und Plasma wurden in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Ute Hofmann und Herrn Dr. Thomas Mürdter (IKP Stuttgart) durchgeführt. Die Digoxinkonzentrationen im Plasma, Perfusat und Galle wurden mit einem automatischen Fluoreszenzpolarisationsimmunoassay gemessen (TDx/TdxFLx; Abbott Laboratories). Die Bestimmungsgrenze lag bei 0,2 ng / ml. Die Variation der Präzision und Richtigkeit waren bei 1,75 ng / ml < 10 %.

Chinidin im Perfusat und Plasma wurde mit einer isokratischen HPLC-Methode quantifiziert.

#### **HPLC-Bedingungen**

Mobile Phase:	Milliporewasser / ACN 90 : 10 (v/v) + 1 % Triethylamin (mit Phosphorsäure auf pH 2,5 eingestellt)
Flussrate:	0,5 ml / min
Säule:	Lichrospher 100 RP-18 endcapped 5 µm 150 * 3 mm
Säulenofentemperatur:	30 °C
Autosampler:	SIL 9A Shimadzu
HPLC-Pumpe:	SD-200 Dynamax
Säulenofen:	Jetstream Bischoff

#### **Detektorbedingungen**

Detektor:	Fluoreszenzdetektor FP-920 Jasco
Anregungswellenlänge:	350 nm
Emissionswellenlänge:	440 nm
Band width:	18 nm
Attenuation:	64
Gain:	100
Response:	10 s

Um das Chinidin aus dem Plasma zu extrahieren wurde eine Flüssig / Flüssig-Extraktion durchgeführt. Zu einem Volumen von 250 µl Plasma wurden 250 µl gesättigte Natriumchloridlösung, 10 µl interner Standard (1 µg / ml Chinin) und 25 µl 2,5 N Natriumhydroxidlösung dazugegeben. Die Extraktion wurde mit 5 ml Dichlormethan durchgeführt. Die organische Phase wurde im Stickstoffstrom bei 37 °C eingedampft und der Rückstand in 100 µl mobiler Phase aufgenommen und 10 µl ins HPLC-System injiziert. Perfusate wurden nach Zugabe des internen Standards ohne Extraktion injiziert. Perfusate mit hohen Chinidinkonzentrationen wurden 1:100 verdünnt. Für die Quantifizierung von Chinidin im Plasma wurden mit Blankplasma folgende Kalibrierproben angesetzt:

Kalibrierprobe 1	0,5 ng /ml
Kalibrierprobe 2	1 ng /ml
Kalibrierprobe 3	5 ng /ml
Kalibrierprobe 4	25 ng /ml
Kalibrierprobe 5	100 ng /ml

Für die Quantifizierung von Chinidin im Perfusat wurden mit Blankperfusat folgende Kalibrierproben angesetzt:

Kalibrierprobe 1	5 ng /ml
Kalibrierprobe 2	10 ng /ml
Kalibrierprobe 3	50 ng /ml
Kalibrierprobe 4	250 ng /ml
Kalibrierprobe 5	1000 ng /ml

Die Qualitätskontrollen wurden unabhängig von den Kalibrierproben mit Chinidinkonzentrationen von 0,5 ng / ml, 5 ng / ml und 100 ng / ml für Plasmabestimmungen bzw. 5 ng / ml, 50 ng / ml und 1000 ng / ml für Bestimmungen im Perfusat angesetzt. Die Variationen der Präzision und Richtigkeit waren für die Plasmabestimmung < 5 % und für die Perfusatbestimmung < 10 %.

#### 4.2.2 Charakterisierung abgeschilfter Enterozyten mittels FACS-Analyse

Die mit dem multiluminalen Perfusionskatheter gewonnenen Zellen (siehe 4.2.1.1) wurden mit FACS-Analyse (Fluorescence-activated cell sorting) hinsichtlich ihrer Zusammensetzung aus verschiedenen Zelltypen und dem Ausmaß der Apoptose charakterisiert. Die folgenden Versuche wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Heiko van der Kuip (IKP Stuttgart) durchgeführt. Für diese Untersuchungen wurden die Perfusate der Probanden 7 bis 12 der klinische Studie IKP 164 verwendet.

##### 4.2.2.1 Nachweis von CD45<sup>+</sup>- und Villin-positiven Zellen

Um den Anteil an Enterozyten und Leukozyten in der gesammelten Zellpopulation zu bestimmen, wurde das enterozytenspezifische Protein Villin, welches am Aufbau des Bürstensaumes beteiligt ist (West et al., 1988), bzw. das leukozytenspezifische Oberflächenantigen CD45 nachgewiesen. Die Perfusate einer Sammelperiode von 15 Minuten wurden 5 Minuten mit 400×g bei 4 °C zentrifugiert und mit Waschpuffer gewaschen. Zum Nachweis von CD45 wurden die Zellen mit einem FITC-markierten (Fluoreszeinisothiocyanat) Antikörper gegen CD45 bzw. mit einem FITC-markierten Isotypkontrollantikörper für 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen zweimal mit Waschpuffer gewaschen. Die Messung und Analyse erfolgte mit einem Durchflusszytometer bzw. der CELLQuest Software (Becton Dickinson). Zum Nachweis des intrazellulären Villins musste zunächst die Permeabilität der Zellmembranen erhöht werden. Die Fixierung und Permeabilisierung wurde mit dem Fix & Perm Kit (Bio

Research GmbH) nach Vorgabe des Herstellers durchgeführt. Nach der Fixierung der Zellen mit Lösung A folgte eine 30minütige Inkubation mit 100 µl Lösung B und 4 µg eines Antikörpers gegen humanes Villin (Chemicon) bzw. einem Isotypkontrollantikörper (Immunotech) bei 4 °C. Nach zwei weiteren Waschschritten mit Waschpuffer wurden die Zellen mit einem FITC-markierten Sekundärantikörper 30 Minuten bei 4 °C in Dunkelheit inkubiert. Danach erfolgte ein weiterer Waschschriff mit Waschpuffer. Die Messung erfolgte mit dem Durchflusszytometer. Die Analyse wurde mit der CELLQuest Software (Becton Dickinson) durchgeführt.

#### 4.2.2.2 Zellzyklusanalyse

Eine Zellzyklusanalyse der gesammelten Zellen wurde durch DNA-Gehaltsbestimmung mit Hilfe des in die DNA interkalierenden Propidiumjodids durchgeführt. Es wurden die Fraktionen von Zellen mit einem DNA-Gehalt von weniger als 2 N, 2 N (diploider Chromosomensatz) und 2 N bis 4 N bestimmt. Zellen, welche sich in der SubG1-Phase befinden, weisen einen DNA-Gehalt  $< 2 N$  auf. Diese Zellen sind durch DNA-Fragmentierung und Zelltod charakterisiert. Zellen mit einem DNA-Gehalt von 2 N sind im Zyklus in der G0 / G1-Phase. Ein DNA-Gehalt von 2 N-4 N charakterisiert proliferationsaktive Zellen, d.h. diese Zellen sind in der S bzw. G2 / M-Phase. Die mit dem MLPC gesammelten Zellen wurden mit PBS gewaschen und in 70 % Ethanol (-20 °C) über Nacht bei 4 °C fixiert. Danach wurden die Zellen in eiskaltem PBS rehydriert und mit RNase A-Lösung und Propidiumjodidlösung 15 Minuten bei Raumtemperatur behandelt. Die Messung und die Auswertung wurden mit dem Durchflusszytometer bzw. der Modfit 2.0 Software (Becton Dickinson) durchgeführt.

#### 4.2.2.3 Annexin V-Färbung

Um nachzuweisen, ob der Zelltod durch Apoptose verursacht wurde, wurde mittels des Apoptosemarkers Annexin V eine weitere Untersuchung durchgeführt. Das Prinzip dieser Messung beruht auf der Tatsache, dass Zellen in der frühen Apoptosephase ihre Membransymmetrie verlieren. Das Membranphospholipid Phosphatidylserin (PS) wird hierbei von der Membraninnenseite nach außen transloziert, wodurch PS an der Zelloberfläche zugänglich wird. Annexin V ist ein phospholipidbindendes Protein mit einer hohen Affinität für PS. Durch den gleichzeitigen Einsatz von Propidiumjodid kann zusätzlich zwischen früher und später Apoptose bzw. Nekrose unterschieden werden. Viable Zellen mit intakter Membran (gesunde Zellen, Zellen in früher Apoptose) sind undurchlässig für Propidiumjodid, während spät-apoptotische oder nekrotische Zellen für Propidiumjodid durchlässig sind. Somit sind Zellen, die Annexin V-positiv sind aber Propidiumjodid-negativ, in der frühen Apoptose (Homburg et al., 1995; Martin et al., 1995; Vermes et al., 1995). FITC-markiertes Annexin V (Pharmingen) wurde entsprechend den

Vorgaben des Herstellers verwendet. Nachdem die gesammelten Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen wurden, folgte ein weiterer Waschschrift mit Annexin V Bindungspuffer. Das erhaltene Zellpellet wurde dann in 100 µl Annexin V-Inkubationspuffer resuspendiert. Nach vorsichtigem Vortexen wurde die Suspension 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Vor der Messung wurden noch 400 µl Annexin V Bindungspuffer zu der Suspension pipettiert. Die Messung und Analyse wurde mit dem Durchflusszytometer bzw. der CELLQuest Software (Becton Dickinson) durchgeführt.

#### 4.2.3 Gewebesammlung

Zur Sammlung von Dünndarm- und Leberproben, die von demselben Patienten stammen, wurde eine klinische Studie am Dr. Margarete Fischer-Bosch Institut für Klinische Pharmakologie in Kooperation mit dem Zentrum für operative Medizin des Robert Bosch Krankenhauses durchgeführt (Studiencode IKP 113). In die Studie eingeschlossen wurden Patienten, bei denen eine Duodenopankreatektomie (Operation nach Whipple) bzw. eine Magenresektion durchgeführt wurde. Für diese Studie liegt ein positives Votum der Landesärztekammer in Stuttgart vor. Das bei der Operation anfallende duodenale Gewebe wurde nach Begutachtung durch den Pathologen für weitere Untersuchungen bei -80 °C gelagert. Der vom Chirurgen resektierte Darmschlauch wurde der Länge nach eröffnet und mit 200 bis 500 ml eiskalter 0,9 %iger Natriumchloridlösung gespült. Gewebeproben für die Proteinanalytik wurden in einem Schraubdeckelgefäß mit großer Grundfläche mit der Mukosaseite nach oben sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Für die RNA-Analyse wurden die Proben in der RNA-stabilisierenden Lösung *RNA/later* 24 Stunden bei 4 °C zwischengelagert. Nach 24 Stunden wurde das Gewebe aus der Lösung entfernt und bei -80 °C gelagert. Für immunhistologische Untersuchungen wurde weiterhin duodenales Gewebe zur Herstellung eines Paraffinblockes verwendet. Die Patienten wurden um eine zusätzliche Leberbiopsie und Hautprobe gebeten. Die Gewebeproben wurden für die Proteinanalyse in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80° C gelagert. Für die RNA-Analyse wurden die Proben in der RNA-stabilisierenden Lösung *RNA/later* 24 Stunden bei 4 °C zwischengelagert. Nach 24 Stunden wurde das Gewebe aus der Lösung entfernt und bei -80 °C gelagert. Zur DNA-Isolierung wurden 7,5 ml Blut in ein EDTA-Röhrchen entnommen. Zur Analyse der Expression von Genen in peripheren Leukozyten auf transkriptioneller Ebene wurden ebenfalls 7,5 ml Blut in ein EDTA-Röhrchen entnommen. Im Zeitraum von 2000 bis 2002 wurden zusätzlich zu den vorhandenen Proben (Läpple, 1999; von Richter, 2000) entsprechende Gewebeproben von neun Patienten gesammelt.

Tabelle 2 Daten der in die Gewebesammlung aufgenommenen Patienten.

Pat. Nr.	Alter/ Geschlecht	Diagnose	Zigaretten pro Tag / Alkohol	Diabetes	Dauermedikation	Präoperative Medikation
A	51 ♀	chron. Pankreatitis (alkoholinduziert)	20	Typ I	ASS Insulin	Flunitrazepam Ranitidin
B	81 ♂	Duodenalulcus		Typ II	Acarbose Enalapril Furosemid Glibenclamid Nifedipin	Oxazepam
C	59 ♀	Pankreaskarzinom			Terfenadin	Dimetinden Metronidazol Ofloxacin
D	78 ♂	Pankreas- pseudozyste (alkoholinduziert)	40		Metoprolol Nifedipin Omeprazol	
E	54 ♀	Pankreaskarzinom			Amitriptylin Enalapril Nifedipin	Flunitrazepam
F	78 ♂	Pankreaskarzinom			Amlodipin Enoxazin Metoclopramid Nifedipin Ranitidin	Acetyldigoxin
G	74 ♂	Pankreaskarzinom			Metoprolol Oxazepam Oxazepam	Isosorbtdinitrat Nifedipin Omeprazol
H	62 ♂	Magenkarzinom			Digitoxin Isosorbtdinitrat Fosinopril Furosemid	Amoxicillin Gentamicin
I	64 ♂	Adenokarzinom	10-20		Cyanocobalamin	Ampicillin Flunitrazepam Gentamicin
K	63 ♂	Magenkarzinom		Typ II	Glibenclamid	Flunitrazepam Ranitidin
L	37 ♂	Pankreatitis (alkoholinduziert)	50	Typ II	Glibenclamid Insulin	Flunitrazepam Piperacillin Ranitidin Vit K1
M	67 ♀	Pankreaskarzinom	20	Typ I	Amlodipin ASS Paracetamol	Butylscopolamin Ceftriaxon Metronidazol Midazolam
N	59 ♀	Magenkarzinom			Estradiol Midazolam Norethisteron Omeprazol	Butylscopolamin Ceftriaxon Flunitrazepam

O	73 ♀	Magenkarzinom			Hydrochlorothiazid Johanniskrautextr. Triamteren	Flunitrazepam Furosemid Gentamycin L-Thyroxin Vancomycin
P	60 ♀	Magenkarzinom			Metoclopramid	Flunitrazepam Gentamycin Vancomycin
R	64 ♂	Pankreaskarzinom			ASS Brennseleextrakt Metoprolol Molsidomin Pravastatin	Flucloxacillin Flunitrazepam Ranitidin
S	74 ♀	Duodenalkarzinom			ASS Bisoprolol Isosorbidmono- nitrat Nitroglycerin Piretanid Zopiclon	Flucloxacillin Flunitrazepam Omeprazol
T	31 ♀					Butylscopolamin Midazolam Omeprazol
U	72 ♂	Pankreaskarzinom	regelmäßig Alkohol	Typ II	Bisoprolol	Bisoprolol Levofloxacin Butylscopolamin Midazolam
W	83 ♂	Pankreaskarzinom	regelmäßig Alkohol		Budesonid Ipratropiumbromid Theophyllin	Acetyldigoxin Amitriptylin ACC Clonidin Diazepam Flunitrazepam Piritramid Ranitidin
Z	88 ♂	Pankreaskarzinom		Typ II	ASS Glimepirid Insulin Metformin	ACC Baldrian-Dragees Dihydrocodein Omeprazol Vitamine
AA	69 ♂	Pankreaskarzinom			Diclofenac	Cilastatin Imipenem
AC	70 ♂	Pankreaskarzinom			Allopurinol Bisoprolol Enalapril Phenprocoumon Triamteren	Butylscopolamin Enoxaparin Levofloxacin Metamizol Tramadol Vitamin K1
AF	86 ♂	Magenkarzinom	Raucher		Felodipin Thyroxin Xipamid	Paracetamol Piritramid



AH	64 ♂	Magenkarzinom	taglich Alkohol	Captopril Domperidon Triamteren	Butylscopolamin Lorazepam Metoclopramid Midazolam Oxazepam Pantoprazol Propofol
AI	58 ♀	Magenkarzinom	20	Estradiol Thyroxin Magentabletten (unbekannt)	ACC Fentanyl Metamizol Omeprazol Pantoprazol Promethazin Ranitidin
AJ	79 ♂	Magenkarzinom		Finasterid Tamsulosin	
AK	65 ♂	Pankreaskarzinom	1/2 l Wein pro Tag	Pankreaspulver aus Schweinepankreas	Butylscopolamin Colestyramin Diazepam Dimetinden Midazolam Propofol

#### 4.2.3.1 Gewebeaufarbeitung

##### 4.2.3.1.1 Enterozytenpreparation aus chirurgisch gewonnenen Darmproben

Die Préparation der Enterozyten erfolgte mit einem Protokoll, das auf die Arbeiten von Herrn Dr. von Richter basierte (von Richter, 2000). Die folgenden Arbeitsschritte wurden im Kuhllabor bei einer Raumtemperatur von 4 °C durchgeführt. Nachdem die Masse der gefrorenen Darmstücke bestimmt worden war, wurden diese durch 10 bis 20minutige Inkubation in isotonischer Darmspullosung aufgetaut. Die Massen der Darmstücke lagen im Bereich von 0,7 bis 20 Gramm. Wenn die Gewebestücke eine zähe Konsistenz bzw. eine Temperatur von -10 °C erreichten hatten, wurden diese mit der Mukosaseite nach oben in einem speziellen Gefäß mit Posternadeln fixiert. Das Gefäß bestand aus Plastik und war zuvor mit einem halbelastischen Material (handelsübliches Mousepad) am Boden verklebt worden. Vor der Fixierung wurde das Gefäß mit 100 bis 150 ml eiskaltem Enterozytenisolierungspuffer gefüllt. Das Gefäß wurde dann auf dem Vibrationsschuttler (Vibramax 100) befestigt und 5-7 Minuten bei Stufe 7 geschüttelt, um die oberste Enterozytenschicht abzulösen. Die erhaltene Zellsuspension wurde mit einer 25 ml Pipette in ein 50 ml Falcongefa pipettiert. Je nach Größe des Gewebestückes wurden zusätzliche Zellen durch Spülen mit weiteren 25 ml Enterozytenisolierungspuffer abgelöst. Die Zellsuspension wurde 10 Minuten mit 400×g bei 4 °C zentrifugiert. Mit 25 ml Proteinlagerungspuffer wurde das erhaltene Zellpellet gewaschen und mit 400×g für 10

Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde dann in Proteinlagerungspuffer resuspendiert (2ml pro Gramm Trockenmasse) und im Homogenisator S (5 ml) für 2 Minuten mit einer Geschwindigkeit von 1000 upm homogenisiert. Danach erfolgte eine Behandlung mit der Sonotrode MS 72 für 30 Sekunden mit 12 W (50 % Pulsierung). Ein Drittel des Homogenatvolumens wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Das restliche Homogenat wurde zur Gewinnung verschiedener Proteinfractionen verwendet.

#### 4.2.3.1.2 Aufarbeitung der Leberbiopsien

Von den Leberbiopsien wurde die Trockenmasse bestimmt. Die Massen der Leberbiopsien schwankten zwischen 0,08 und 1,4 g. Die Leberproben wurden in sterile 10 ml Plastikröhrchen überführt und 1 ml Homogenisierungspuffer je 0,1 g Leber dazugegeben. Darauffolgend wurden die Leberstücke mit dem Dispergiersystem ULTRA-TURRAX® und dem Dispergierwerkzeug 10 N bei einer Geschwindigkeit von 9500 upm 10 bis 20 Sekunden homogenisiert. Die erhaltene Suspension wurde darauf im Homogenisator S (5 ml) 10-20 Sekunden mit einer Geschwindigkeit von 1000 upm homogenisiert. Ein Fünftel des Homogenatvolumens wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Die verbleibende Suspension wurde zur Gewinnung verschiedener Proteinfractionen verwendet.

#### 4.2.3.1.3 Gewinnung von Proteinfractionen

Die Präparation der verschiedenen Proteinfractionen wurde nach einer Methode von Lang et al. (Lang et al., 2001) durchgeführt. Das Homogenat wurde im Festwinkelrotor MLA 80 30 Minuten mit 15000×g bei 4 °C ultrazentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert. Das Pellet wurde in 1 bis 2 ml Homogenisierungspuffer resuspendiert und nochmals 30 Minuten mit 15000×g bei 4 °C ultrazentrifugiert und die Überstände aus den beiden Zentrifugationsschritten anschließend vereinigt. Das erhaltene Pellet wurde in 1 bis 2 ml Proteinlagerungspuffer resuspendiert und 2 Minuten im Homogenisator S (5 ml) bei einer Geschwindigkeit von 1000 upm homogenisiert. Nach dem Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff wurde die Suspension bei -80 °C gelagert. Die bei 15000×g präparierte Suspension enthält nukleäre und mitochondriale Membran und Proteinbestandteile (Ozols, 1990). Die weitere Aufarbeitung der vereinigten Überstände erfolgte für 60 Minuten mittels Ultrazentrifugation im Festwinkelrotor MLA 80 mit 105000×g bei 4 °C. Der Überstand war das Cytosol (Lin et al., 1982), welches aliquotiert in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert wurde. Das Pellet wurde mit 1 bis 2 ml Mikrosomenwaschlösung resuspendiert und 60 Minuten mit 105000×g bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und

das Mikrosomenpellet in 250 µl Mikrosomenlagerungspuffer aufgenommen und kurz sonifiziert, um eine homogene Suspension zu erzeugen (Ozols, 1990). Abschließend wurden die Mikrosomen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

#### 4.2.3.1.4 RNA-Isolierung aus chirurgisch gewonnenem Dünndarm- und Lebergewebe

Die Darm- und Leberproben für die RNA-Analyse wurden wie im Abschnitt „Gewebesammlung“ beschrieben gesammelt. Für die weitere Aufarbeitung wurden unter RNase-freien Bedingungen 10 bis 30 mg des Gewebes in 600 µl RLT-Puffer (+ 1 % 2-Mercaptoethanol) überführt und durch Behandlung mit der Sonotrode grob zerkleinert. Die weitere Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte wie im Abschnitt „RNA-Isolierung aus abgeschilferten Enterozyten“ beschrieben.

### 4.2.4 Methoden der RNA-Analytik

#### 4.2.4.1 Quantifizierung der RNA

Die Quantifizierung der RNA erfolgte mit einem Photometer (GeneQuant, Amersham Pharmacia). Grundlage für diese Quantifizierung ist die Tatsache, dass Nukleinsäuren UV-Licht bei einer Wellenlänge von 260 nm stark absorbieren. Durch das Lambert-Beer-Gesetz besteht ein direkter Zusammenhang zwischen RNA-Konzentration und Extinktion der RNA-Lösung. Die optische Dichte ( $OD_{260}$ ) von 1 bei einer Wellenlänge von 260 nm entspricht einer Konzentration von 38 µg / µl RNA oder einzelsträngiger DNA (Sambrook et al., 2001). Weiterhin wurde bei dieser Messung das Verhältnis  $OD_{260} / OD_{280}$  bestimmt. Für RNA-Quantifizierungen sollte das Verhältnis möglichst den Wert 2,0 haben. Falls geringere Werte für den Quotienten vorlagen, war das ein Hinweis auf Kontamination mit Protein (Glasel, 1995; Warburg et al., 1942). Die RNA-Präparationen wurden verwendet, wenn das  $OD_{260} / OD_{280}$ -Verhältnis Werte zwischen 1,8 und 2,0 aufwies.

#### 4.2.4.2 Kontrolle der RNA-Qualität

Um die isolierte Gesamt-RNA (siehe Abschnitte „RNA-Isolierung aus abgeschilferten Enterozyten“, „RNA-Isolierung aus chirurgisch gewonnenem Dünndarm- und Lebergewebe“) zu analysieren, wurde zuvor die Qualität der RNA untersucht. Dies erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese. Dazu wurde ein 1 %iges Agarosegel aus 1/10 Volumen 10× Formaldehydgelpuffer, 3 % Formaldehyd (37 %) (v/v), RNase freiem Wasser und Agarose 1 % (w/v) gegossen. Das 200 ng Gesamt-RNA entsprechende Volumen wurde mit RNA-Probenpuffer auf 16 µl aufgefüllt. Danach wurden 0,8 µl der Ethidiumbromidstammlösung (0,5 µg / µl) zur Probe zugegeben. Nach 10minütiger Inkubation bei 60 °C wurden zur Denaturierung von Sekundärstrukturen der RNA die Proben sofort auf Eis gelagert. Abschließend wurden noch 4 µl Farbmaler zur Probe

pipettiert. Die Proben wurden auf das Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch 1 Stunde bei 100 V getrennt. Die aufgetrennte RNA wurde im Gel unter UV-Lichteinstrahlung visualisiert und mittels einer Kamera (Cybertech, Berlin) fotografiert. Nicht degradierte RNA-Proben zeigen zwei kräftige Signalbanden. Die stärkere Signalbande, welche auch die kürzere Migrationsstrecke aufwies, stellte die 28 S rRNA dar. Die zweite schwächere Signalbande mit der größeren Migrationsstrecke stellte die 18 S rRNA dar. Wenn keine Degradation der RNA im Gel zu erkennen war, wurde die RNA weiterverwendet. Im Falle von Degradation musste erneut RNA isoliert werden (siehe „RNA-Isolierung aus abgeschilferten Enterozyten“, „RNA-Isolierung aus chirurgisch gewonnenem Dünndarm- und Lebergewebe“).

#### 4.2.4.3 Synthese von cDNA (complementary DNA)

Die cDNA Synthese aus isolierter RNA wurde mit dem kommerziell bezogenem Kit TaqMan<sup>®</sup> Reverse Transcription Reagents der Firma Applied Biosystems (USA) durchgeführt. Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Es wurde eine finale RNA-Konzentration von 20 ng / µl bei einem maximalen Reaktionsvolumen von 100 µl eingestellt. Der Reaktionsansatz wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um eine optimale Hybridisierung der eingesetzten Randomhexameroligonukleotidprimer an die RNA und eine präliminäre Extension der Primer zu gewährleisten. Danach erfolgte eine Inkubation von 30 Minuten bei 48 °C im Heizblock. Die Inaktivierung der Reaktion erfolgte 5 Minuten bei 95 °C. Die cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

#### 4.2.4.4 Quantitative RT-PCR

Die quantitative Real Time TaqMan PCR wurde mit dem ABI PRISM<sup>™</sup> 7700 Sequence Detection System der Firma Applied Biosystems durchgeführt. Für die Quantifizierung von mRNA wurde aus dieser wie zuvor beschrieben [siehe „Synthese von cDNA (complementary DNA)“] cDNA synthetisiert. Die cDNA wurde dann für die quantitative RT-PCR eingesetzt. Grundlage für die Quantifizierung von mRNA ist die Nutzung sequenzspezifischer Primer und Sonden für ein bestimmtes Gen. Die sequenzspezifische Sonde ist an ihrem 5'-Terminus und 3'-Terminus mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Der Farbstoff am 3'-Terminus (TAMRA) absorbiert die Fluoreszenz des 5'-Farbstoffes nach Anregung mit einer Wellenlänge von 488 nm, solange beide Farbstoffe an die Sonde gebunden sind. Die zur Kettenelongation verwendete Taq-Polymerase besitzt neben ihrer Polymeraseaktivität (5'→3') noch eine 5'→3' Exonucleaseaktivität. Durch diese 5'→3' Exonucleaseaktivität kann während der Extensionsphase der PCR die spezifisch gebundene Sonde hydrolysiert werden. Dadurch wird der Farbstoff vom 5'-Terminus freigesetzt und die Fluoreszenz kann nach Anregung mit einer Wellenlänge von 488 nm

gemessen werden. Mit jedem neusynthetisierten DNA-Strang wird ein fluoreszierender Farbstoff freigesetzt und das daraus resultierende Fluoreszenzsignal ist der synthetisierten DNA-Menge proportional. Für jede Probe wurde dann ein  $C_T$ -Wert (Cycle Threshold) berechnet. Der  $C_T$ -Wert ist die gebrochene Zykluszahl, bei der das normalisierte Reporterfluoreszenzsignal eine benutzerdefinierte Schwelle durchbricht.

Für die PCR wurde aus TaqMan<sup>®</sup> Universal PCR Master Mix, Forward Primern und Reverse Primern mit einer finalen Konzentration von 400 nM und der Sonde mit einer finalen Konzentration von 200 nM der PCR-Reaktionsmix auf Eis hergestellt. Die verwendeten Sonden und Primer sind im Abschnitt „Primer und Sonden für quantitative Real Time-PCR“ aufgeführt. Der TaqMan<sup>®</sup> Universal PCR Master Mix enthält PCR-Puffer, dNTPs, und die AmpliTaqGold<sup>®</sup> (TaqPolymerase ohne 3' → 5' Exonucleaseaktivität). Vom PCR-Universal Master Mix wurden 20 µl für jede Probe in eine Kavität einer 96-Lochplatte pipettiert. Danach wurden die 5 µl der zu quantifizierenden cDNA dazu pipettiert. Für beide Pipettierschritte wurden Pipettenspitzen mit positivem Verdrängungsmechanismus verwendet, um einer möglichen Aerosolbildung beim Pipettieren vorzubeugen. Die 96-Lochplatte wurde für 20 Sekunden bei 280×g zentrifugiert. Es wurde folgendes PCR-Programm verwendet. Zuerst wurden die PCR-Ansätze 2 Minuten bei 50 °C inkubiert. Danach erfolgte die Aktivierung der AmpliTaqGold<sup>®</sup> bei 95 °C für 10 Minuten. Die Amplifikation erfolgte in 40 Zyklen von 15 Sekunden bei 95 °C und 1 Minute bei 60 °C. Die RT-PCR von β-Actin erfolgte bei den gleichen Bedingungen. Der PCR-Reaktionsmix setzte sich aus 1× TaqMan<sup>®</sup> Universal PCR Master Mix und 1× TaqMan<sup>®</sup> Pre-Developed Assay Reagent für humanes β-Actin zusammen. Zur Bestimmung des  $C_T$ -Wertes wurde ABI PRISM™ Sequence Detection Software (Version 1.6) verwendet.

#### 4.2.4.5 Kalibrierproben für quantitative RT-PCR

Da zur absoluten Quantifizierung von MRP2 mRNA keine in-vitro-transkribierte RNA zur Verfügung stand, wurde folgendes Kalibriermaterial zur relativen Quantifizierung verwendet. Die MRP2 mRNA Expression in Darm und Leber (siehe „Gewebesammlung“) wurde relativ auf die MRP2 mRNA Expression einer Leber bezogen. Die Villin mRNA Expression im Dünndarmgewebe wurde mittels Villin mRNA Expression in Caco-2 Zellen relativ quantifiziert. Die β-Actin mRNA Expression im untersuchten Lebergewebe wurde relativ zur β-Actin mRNA Expression in HepG2 Zellen quantifiziert. Die Kalibrierproben geben die bei der cDNA-Synthese eingesetzte RNA-Menge an. Folgende RNA-Konzentrationen wurden für alle zu untersuchenden mRNA-Spezies verwendet:

Kalibrierprobe 1: 100 ng / 5 µl

Kalibrierprobe 2: 10 ng / 5 µl

Kalibrierprobe 3: 1 ng / 5 µl

Kalibrierprobe 4: 0,1 ng / 5  $\mu$ l

Kalibrierprobe 5: 0,01 ng / 5  $\mu$ l

Kalibrierprobe 6: 0,001 ng / 5  $\mu$ l

Kalibrierprobe 7: 0,0001 ng / 5  $\mu$ l

Die Kalibrierprobe 1 stellte die der cDNA-Probe nach der Synthese dar. Die weiteren Kalibrierproben wurden durch Verdünnung mit DEPC-behandeltem Milliporewasser hergestellt. Die relative Quantifizierung erfolgte mit linearer Regressionsanalyse bezogen auf die beschriebenen Kalibrierproben. Für die Quantifizierung von CYP3A4 mRNA wurde von Dr. Frank J. Gonzalez (Bethesda MD, USA) ein Plasmid mit der cDNA Sequenz von CYP3A4 zur Verfügung gestellt (Buters et al., 1994). Das Plasmid wurde in den oben genannten Verdünnungen zur Kalibrierung eingesetzt. Die lineare Regressionsanalyse wurde mit der Software GraphPad Prism<sup>®</sup> (Version 3.02) und Excel 97 durchgeführt.

#### 4.2.5 Methoden der Proteinanalytik

##### 4.2.5.1 Quantifizierung des Proteingehaltes

Die Bestimmung des Proteingehaltes erfolgte nach einer von Smith et al (Smith et al., 1985) beschriebenen Methode. Grundlage dieser Proteinbestimmungsmethode ist, dass Proteine  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$  reduzieren. Das  $\text{Cu}^+$  bildet mit Bicinchoninsäure (BCA) einen wasserlöslichen purpurfarbenen Salzkomplex, dessen Extinktion bei 570 nm gemessen wird. Die zu untersuchenden Proben wurden mit Milliporewasser 1:2 bis 1:20 verdünnt. Von den Verdünnungen wurden jeweils 10  $\mu$ l als Doppelbestimmung in eine 96-Mikrotiterplatte pipettiert. Im nächsten Schritt wurden 200  $\mu$ l der Reaktionslösung [BCA + 4 %  $\text{CuSO}_4$  2 % (v/v)] zu den Verdünnungen pipettiert. Die Platte wurde kurz geschüttelt und 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Extinktion wurde mit einem Photometer für Mikrotiterplatten (Victor<sup>™</sup> 1420 multilabel Counter, Wallac) bei 570 nm in den Kavitäten gemessen. Zur Quantifizierung des Proteingehaltes wurden Kalibrierproben mit Rinderserumalbumin (BSA) mit den Konzentrationen 0,2 mg / ml, 0,4 mg / ml, 0,6 mg / ml, 0,8 mg / ml und 1,0 mg / ml angesetzt und als Doppelbestimmung in jedem Experiment mitgeführt. Weiterhin wurden Qualitätskontrollen mit den Konzentrationen 0,2 mg / ml und 0,8 mg / ml bei jedem Experiment als Doppelbestimmung in die Mikrotiterplatte pipettiert. Zum Pipettieren der Qualitätskontrollen wurden die entsprechenden Kalibrierproben verwendet. Die Quantifizierung des Proteingehaltes der Messprobe erfolgte durch lineare Regressionsanalyse mittels der durch die Kalibrierproben berechneten Kalibriergerade, wobei der Verdünnungsfaktor berücksichtigt wurde. Die Messung wurde als valide angesehen, wenn die beiden Qualitätskontrollen eine Richtigkeit von  $\pm 10$  % aufwiesen. Die Präzision der Methode, berechnet als Variationskoeffizient der einzelnen Messwerte

musste < 15 % sein. Zur Auswertung wurde mindestens eine Verdünnung herangezogen, deren Messwerte im Kalibrierbereich (0,2-1,0 mg / ml) lagen.

#### 4.2.5.2 Vorbehandlung der Proben zur SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Um Proteine mittels der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) zu analysieren, werden die Proben vorher einer proteindenaturierenden Behandlung unterzogen. Durch Behandlung mit 2-Mercaptoethanol werden Disulfidbindungen der Proteine zu freien Sulfhydrylgruppen reduziert. Weiterhin denaturiert Natriumdodecylsulfat (SDS) die Proteine. SDS lagert sich in einem konstanten Verhältnis an die Proteine an (1,4 g SDS pro 1 g Protein) (Westermeier, 1993), damit erhalten alle Proteine eine konstante negative Ladung im Verhältnis zu ihrem Molekulargewicht. Zur Denaturierung der Tertiär- und Quartärstruktur der Proteine wurden die Proben, die zum Nachweis von Cytochrom P450 Enzymen verwendet wurden, 5 Minuten bei 95 °C in einem Heizblock (Reacti Therm III, Pierce) inkubiert. Diese Behandlung wurde für den Nachweis von Transportproteinen nicht durchgeführt, da diese bei höheren Temperaturen einer Degradation unterlagen. Mit 5× Auftragepuffer wurden die Proteinauftragelösungen jeweils frisch angesetzt. Eine definierte Menge Protein (20-200 µg) wurde mit 1/5 Volumen des 5× Auftragepuffers versetzt und mit Milliporewasser auf die gewünschte Konzentration eingestellt. Die Konzentration der Proteinauftragelösung wurde abhängig von der aufzutragenden Gesamtproteinmenge eingestellt. Die hergestellten Lösungen wurden bei -80 °C gelagert.

#### 4.2.5.3 Herstellung von Kalibrierproben aus rekombinanten Enzymen

Zur absoluten Quantifizierung von Cytochrom P450 Enzymen durch Immunoblotanalyse wurden Kalibrierproben aus rekombinanten hergestellten Cytochrom P450 Enzymen angesetzt. Die rekombinanten hergestellten Enzyme wurden von der Firma Gentest (Woburn, USA) bezogen. Es handelte sich dabei um mikrosomale Fraktionen mit einem definierten Enzymgehalt. Zur Herstellung der Kalibrierprobe mit der höchsten Enzymkonzentration wurde die entsprechende Proteinmenge mit 1/5 Volumen des 5× Auftragepuffers, Milliporewasser und TN5 Mikrosomen versetzt und auf eine Proteinkonzentration von 1 µg / µl bzw. 2 µg / µl eingestellt. TN5 Mikrosomen sind eine mikrosomale Proteinpräparation aus einer Insektenzelllinie welche keine Cytochrom P450 Enzyme synthetisiert. Die TN5 Mikrosomen fungierten als Trägerprotein, um der Adhäsion an Glas und Kunststoffgefäßen vorzubeugen. Weiterhin konnte durch den Einsatz von TN5 Mikrosomen die Transfereffizienz vom SDS-Gel auf die Membran überprüft werden, da auf jeder Gelspur eine identische Proteinmenge geladen wurde. Die Membran wurde dazu einer unspezifischen Proteinfärbung mit Ponceau S unterzogen. Kalibrierproben mit

geringeren Konzentrationen wurden durch Verdünnung der jeweils höher-konzentrierten Kalibrierprobe mit 1× Auftragslösung, die bereits auf eine TN5 Mikrosomenkonzentration von 1 µg / µl bzw. 2 µg / µl eingestellt war, hergestellt. Für die Quantifizierung wurden Kalibrierproben mit folgenden Konzentrationen verwendet:

CYP2C8 (CYP2C8 Mikrosomen, Gentest M112r, Lot: 33)

CYP2C9 (CYP2C9 Mikrosomen, Gentest M118r, Lot: 50)

Kalibrierprobe 1: 25 fmol / 25 µl

Kalibrierprobe 2: 50 fmol / 25 µl

Kalibrierprobe 3: 125 fmol / 25 µl

Kalibrierprobe 4: 250 fmol / 25 µl

Kalibrierprobe 5: 500 fmol / 25 µl

Kalibrierprobe 6: 1000 fmol / 25 µl

CYP2D6 (CYP2D6 Mikrosomen, Gentest M117r, Lot: 43)

Kalibrierprobe 1: 1,0 fmol / 25 µl

Kalibrierprobe 2: 2,5 fmol / 25 µl

Kalibrierprobe 3: 5,0 fmol / 25 µl

Kalibrierprobe 4: 10 fmol / 25 µl

Kalibrierprobe 5: 25 fmol / 25 µl

Kalibrierprobe 6: 30 fmol / 25 µl

Kalibrierprobe 7: 50 fmol / 25 µl

Kalibrierprobe 8: 100 fmol / 25 µl

Kalibrierprobe 9: 125 fmol / 25 µl

CYP3A4 (CYP3A4 Mikrosomen, Gentest M107r, Lot: 73)

Kalibrierprobe 1: 50 fmol / 25 µl

Kalibrierprobe 2: 125 fmol / 25 µl

Kalibrierprobe 3: 250 fmol / 25 µl

Kalibrierprobe 4: 500 fmol / 25 µl

Kalibrierprobe 5: 1000 fmol / 25 µl

Da für die Quantifizierung von P-Glykoprotein und MRP2 kein rekombinant produziertes Protein zur Verfügung stand, war eine absolute Quantifizierung von P-Glykoprotein und MRP2 nicht möglich. Zur relativen Quantifizierung von P-Glykoprotein wurde Zellhomogenat der Zelllinie L-MDR1 als Kalibriermaterial verwendet. L-MDR1 Zellen sind Schweinenierenepithelzellen (LLC-PK1), welche humanes P-Glykoprotein überexprimieren (Schinkel et al., 1995). Für die P-Glykoproteindetektion wurde eine Auftragslösung mit einer Proteinkonzentration von 5 µg / 20µl aus 5× Auftragspuffer und Milliporewasser hergestellt. Weitere Verdünnungen welche mit 1× Auftragspuffer hergestellt wurden, waren 2,5 µg / 20 µl, 1,0 µg / 20 µl und 0,5 µg / 20 µl. Zur relativen



Quantifizierung von MRP2 wurde das Zellhomogenat von MRP2-überexprimierenden MDCKII Zellen verwendet (Evers et al., 1998). Die Herstellung der Kalibrierproben aus MDCKII Zellhomogenat erfolgte in gleicher Weise. Folgende Konzentrationen wurden verwendet: 7,5 µg / 15 µl, 5,0 µg / 15 µl, 2,5 µg / 15 µl, 1,0 µg / 15 µl, 0,5 µg / 15 µl.

#### 4.2.5.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Wie im Abschnitt „Vorbehandlung der Proben zur SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese“ beschrieben, werden die Proteine denaturiert und bekommen im Verhältnis zu ihrem Molekulargewicht eine konstante negative Ladung. Die Proteine können in einem Polyacrylamidgel mit einer geeigneten Konzentration an Polyacrylamid elektrophoretisch nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden, da nach Anlegen einer Spannung Proteine mit geringerem Molekulargewicht schneller zur Anode migrieren als Proteine mit höherem Molekulargewicht. Die Proteinhomogenate wurden nach der Methode von Lämmli (Laemmli, 1970) aufgetrennt. Zum Nachweis von Cytochrom P450 Enzymen wurden 10 %ige Polyacrylamidgele mit einer Dicke von 1 mm verwendet. Für die Analyse von P-Glykoprotein und MRP2 wurden 8 %ige Polyacrylamidgele mit einer Dicke von 1 mm verwendet. Das Trenngel und das Sammelgel wurden in einer Größe von 16 x 10 cm bzw. 16 x 6 cm nach folgender Vorschrift gegossen.

**Tabelle 3 Herstellung von SDS-Polyacrylamidgelen (Volumenangaben für jeweils 1 Gel)**

Chemikalien	Trenngel 8 %	Trenngel 10 %	Sammelgel 4 %
Acrylamid 30 % / Bis 37, 5:1 [ml]	8,0	10,0	2,03
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 [ml]	7,5	7,5	-
0,5 M Tris-HCl pH 6,8 [ml]	-	-	3,75
SDS 10 % [µl]	300	300	150
Tetramethylethyldiamin [µl]	18,0	12,0	15,0
Milliporewasser [ml]	13,9	11,9	9,15
Ammoniumperoxodisulfat 10 % [µl]	300	300	150

Die Auftragelösungen wurden dann in die Probenaschen des Gels pipettiert. Durch Anlegen einer konstanten Spannung im Bereich von 35 V bis 200 V erfolgte die Elektrophorese in einer vertikalen Elektrophoresekammer (Elektrophoresekammer PROTEAN® II xi, Biorad).

#### 4.2.5.5 Proteinquantifizierung durch Immunoblotanalyse

Als „Blotten“ wird der Transfer von Proteinen von einem SDS-Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulose- oder Polyvinylidendifluorid (PVDF)- Membran unter Anlegen einer

Spannung oder einer Stromstärke bezeichnet. Aufgrund der besseren Detektionseigenschaften wurden für den Nachweis von Cytochrom P450 Enzymen und P-Glykoprotein PVDF-Membranen verwendet. Zum Nachweis von MRP2 wurden Nitrocellulosemembranen verwendet. Der Transfer wurde mit einer modifizierten Methode (Towbin et al., 1979) durchgeführt. Die SDS-Polyacrylamidgele, in denen die zu transferierenden Proteine aufgetrennt worden waren, wurden im entsprechenden Transferpuffer 15 Minuten äquilibriert. Für den qualitativen Nachweis von Proteinen wurde aufgrund des geringeren Zeitaufwandes die Semidry-Transfermethode (Biorad, 1989) verwendet. Die Gele wurden im Transferpuffer für Semidry-Transfer 15 Minuten inkubiert. Der Transfer erfolgte in der Blotkammer (Trans-Blot® SD Semi-Dry transfer Cell, Biorad) 1 Stunde bei 150 mA pro Gel. Für die Quantifizierung von Cytochrom P450 Enzymen, P-Glykoprotein und MRP2 erfolgte der Proteintransfer in einer Tankblotkammer (Blotkammer Trans-Blot® Cell, Biorad). Der Transfer von Cytochrom P450 Enzymen erfolgte für 1,5 Stunden mit 100 V bei 10 °C, von P-Glykoprotein für 20 Stunden mit 5 W bei 4 °C und von MRP2 und BCRP für 1,5 Stunden mit 370 mA pro Gel bei 4 °C. Nach dem Proteintransfer wurden die Membranen 10 Minuten mit Ponceau S Lösung inkubiert, um die Proteine unspezifisch anzufärben. Dies diente zur Kontrolle der Transfereffizienz. Die Membranen wurden dann mit Milliporewasser wieder entfärbt, und 1 Stunde mit 50 ml Blockpuffer zur Absättigung von unspezifischen Bindungsstellen für die Antikörper inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation der Membranen mit mindestens 10 ml Primärantikörperlösung für 1 Stunde. Die Membranen wurden dann einem Waschschrift von 2 mal 10 Minuten mit Waschpuffer unterzogen. Darauf erfolgte die Inkubation mit einem Meerrettichperoxidase (POD)-konjugiertem Sekundärantikörper für 30 Minuten. Abschließend wurde noch ein Waschschrift von 2 mal 10 Minuten mit Waschpuffer durchgeführt. Alle Inkubationen und Waschschriffe der Membranen wurden auf einem Schüttler bei einer Geschwindigkeit von 24 / min bis 30 / min durchgeführt. Die bei der SDS-PAGE aufgetragenen Proteinmengen und Inkubationsbedingungen beim Immunoblotting sind für die einzelnen Proteine im Folgenden aufgeführt.

CYP2C8                    Aufgetragene Proteinmenge: 40 µg  
Primärantikörper: Polyklonaler Antikörper (IgG) gegen humanes CYP2C8 (RDI-CYP2C8abr, Research Diagnostics), 1:400 in Blockpuffer  
Sekundärantikörper: Peroxidasegekoppelte Ziege gegen Kaninchen IgG F(ab')<sub>2</sub> Fragmente (Katalog Nr: 111-035-006, Dianova), 1:5000 in Blockpuffer

CYP2C9	<p>Aufgetragene Proteinmenge: 30 µg</p> <p>Primärantikörper: Polyklonaler Antikörper (IgG) gegen humanes CYP2C9 (RDI-CYP2C9abr, Research Diagnostics), 1:400 in Blockpuffer</p> <p>Sekundärantikörper: Peroxidasegekoppelte Ziege gegen Kaninchen IgG F(ab')<sub>2</sub> Fragmente (Katalog Nr: 111-035-006, Dianova), 1:5000 in Blockpuffer</p>
CYP2D6	<p>Aufgetragene Proteinmenge: 50 µg</p> <p>Primärantikörper: Monoklonaler Antikörper gegen CYP2D6 mab 114 (Dr. U. M. Zanger IKP Stuttgart), 1:1000 in Blockpuffer</p> <p>Sekundärantikörper: Peroxidasegekoppelter Ziege gegen Maus IgG Antikörper (Katalog Nr: DCO2L, Oncogene), 1:1500 in Blockpuffer</p>
CYP3A4	<p>Aufgetragene Proteinmenge: 7 µg</p> <p>Primärantikörper: Polyklonaler Antikörper gegen humanes CYP3A4 (Katalog Nr: A234, Gentest), 1:500 in Blockpuffer</p> <p>Sekundärantikörper: Peroxidasegekoppelte Ziege gegen Kaninchen IgG F(ab')<sub>2</sub> Fragmente (Katalog Nr: 111-035-006, Dianova), 1:20000 in Blockpuffer</p>
P-Glykoprotein	<p>Aufgetragene Proteinmenge: 25 µg</p> <p>Primärantikörper: Monoklonaler Antikörper gegen humanes P-Glykoprotein (Katalog Nr: P7965, Sigma), 1:4000 in Blockpuffer</p> <p>Sekundärantikörper: Peroxidasegekoppelter Ziege gegen Maus IgG Antikörper (Katalog Nr: DCO2L, Oncogene), 1:1500 in Blockpuffer</p>
MRP2	<p>Aufgetragene Proteinmenge: 100 µg</p> <p>Primärantikörper: Monoklonaler Antikörper gegen humanen cMOAT [MRP2] (Katalog Nr: M<sub>2</sub>III-6, Alexis), 1:100 in 1 %igem Blockpuffer</p> <p>Sekundärantikörper: Peroxidasegekoppelter Ziege gegen Maus IgG Antikörper (Katalog Nr: DCO2L, Oncogene), 1:1500 in Blockpuffer</p>
BCRP	<p>Aufgetragene Proteinmenge: 50 µg</p> <p>Primärantikörper: Monoklonaler Antikörper gegen humanes BCRP (Breast Cancer Resistance Protein) (Katalog Nr: 801-029-C250, Alexis), 1:50 in 1 % Blockpuffer [1 % Magermilchpulver (w/v) in TBST]</p> <p>Sekundärantikörper: Peroxidasegekoppelter Ziege gegen Maus IgG Antikörper (Katalog Nr: DCO2L, Oncogene), 1:1500 in 1 % Blockpuffer [1 % Magermilchpulver (w/v) in TBST]</p>

GAPDH	<p>Aufgetragene Proteinmenge: 7-100 µg</p> <p>Primärantikörper: Monoklonaler Antikörper gegen humane Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (Katalog Nr: H86504M, Biodesign), 1:2000 in Blockpuffer</p> <p>Sekundärantikörper: Peroxidasegekoppelter Ziege gegen Maus IgG Antikörper (Katalog Nr: DCO2L, Oncogene), 1:1500 in Blockpuffer</p>
β-Actin	<p>Aufgetragene Proteinmenge: 7-100 µg</p> <p>Primärantikörper: Monoklonaler Antikörper gegen humanes β-Actin Clone AC-15 (Katalog Nr: A5441, Sigma), 1:50000 in 1 %igem Blockpuffer</p> <p>Sekundärantikörper: Peroxidasegekoppelter Ziege gegen Maus IgG Antikörper (Katalog Nr: DCO2L, Oncogene), 1:1500 in Blockpuffer</p>
Villin	<p>Aufgetragene Proteinmenge: 7-100 µg</p> <p>Primärantikörper: Monoklonaler Antikörper gegen humanes Villin (Katalog Nr: MAB1639Chemicon), 1:2000 in Blockpuffer</p> <p>Sekundärantikörper: Peroxidasegekoppelter Ziege gegen Maus IgG Antikörper (Katalog Nr: DCO2L, Oncogene), 1:1500 in Blockpuffer</p>

Nach der Antikörperinkubation wurden die Membranen mit dem Peroxidasesubstrat Super Signal® West Dura Extended Duration Substrate (Pierce) für 5 Minuten inkubiert. Das in der Substratlösung enthaltene Luminol wurde in einer Reaktion umgesetzt, bei der ein Lichtsignal erzeugt wurde. Das entstandene Chemolumineszenzsignal, dessen Wellenlänge im Bereich von 431 nm bis 448 nm (Arnhold et al., 1991; Lin et al., 2001) liegt, wurde mittels einer Chemolumineszenzkamera (CCD Camera LAS-1000, Fuji) detektiert und elektronisch abgespeichert.

#### 4.2.5.6 Entfernen von Antikörpern – „Stripping“

Um ein zweites Protein auf einer Membran nachzuweisen, müssen die gebundenen Primär- und Sekundärantikörper der vorausgegangenen Proteindetektion entfernt werden. Für diesen auch als „Stripping“ bezeichneten Vorgang wurde eine kommerziell erhältliche Lösung benutzt (Restore™ Western Blot Stripping Buffer, Pierce). Die Membranen wurden 10 Minuten bei Raumtemperatur mit der Lösung inkubiert.

#### 4.2.5.7 Densitometrische Auswertung und Proteinquantifizierung

Die Auswertung der Chemolumineszenzsignale erfolgte mit der Software AIDA 2.1 (Raytest, Straubenhardt). Je nach Form wurde um die Signalbanden ein rechteckiges oder elliptisches Messfeld gelegt. Bei gleichmäßiger Färbung des Hintergrundes wurde für alle auszuwertenden Signalbanden das gleiche Messfeld für den Hintergrundabgleich definiert. Im Falle ungleichmäßiger Hintergrundsignale wurden den verschiedenen

Signalbanden unterschiedliche Messfelder für die Hintergrundberechnung zugeordnet. Bei sehr starken Schwankungen der Hintergrundsignale wurde den Signalbanden ein lokaler Hintergrund zum Hintergrundabgleich zugeordnet. Die Quantifizierung der Proteine erfolgte über lineare Regressionsanalyse mittels der auf jedem Gel mitaufgetragenen Kalibrierproben. Die lineare Regressionsanalyse wurde mit der AIDA 2.1 Software durchgeführt.

#### **4.2.6 Inkubationen zur Bestimmung der Cytochrom P450 Enzymaktivität**

##### **4.2.6.1 Cytochrom P450 2C8**

Die Enzymaktivität von CYP2C8 wurde mit dem Substrat Verapamil bestimmt. Der vorwiegend durch CYP2C8 gebildete Metabolit ist D-703 (von Richter, 2000). Die genauen Inkubationsbedingungen sind im Abschnitt „Cytochrom P450 3A4“ beschrieben, da Verapamil zu einem sehr großen Anteil über CYP3A4 metabolisiert wird (Kroemer et al., 1993).

##### **4.2.6.2 Cytochrom P450 2C9**

Die Enzymaktivität von CYP2C9 wurde mit dem Substrat Diclofenac bestimmt. CYP2C9 katalysiert die Bildung von 4'-Hydroxydiclofenac, 5-Hydroxydiclofenac und 3'-Hydroxydiclofenac (Bort et al., 1999). Der Inkubationsansatz wurde in 2 ml Eppendorf-Gefäßen auf Eis zusammenpipettiert. Vom Homogenat der abgeschilferten Enterozyten wurden 25 µg Protein für die Inkubation verwendet. Da mit der in Abschnitt „Bestimmung des Diclofenacmetaboliten 4'-Hydroxydiclofenac aus Inkubationslösungen“ beschriebenen analytischen Methode eine vollständige chromatographische Trennung von 4'-Hydroxydiclofenac und 5-Hydroxydiclofenac nicht möglich war, wurde Diclofenac mit einer finalen Konzentration von 10 µM eingesetzt. Protein sowie 25 µl Diclofenac (100 µM), 25 µl Magnesiumchlorid (33 mM), 25 µl Trispuffer (500 mM, pH 7,4) und Milliporewasser wurden auf ein Volumen von 225 µl eingestellt. Nach zweiminütiger Vorinkubation der Proben bei 37 °C wurde die Enzymreaktion mit 25 µl 48 mM NADPH gestartet. Die Proben wurden für weitere 20 Minuten bei 37 °C inkubiert. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte mit 1,7 ml eiskaltem absolutem Ethanol. Im nächsten Schritt wurden 25 µl des Internen Standards Diflunisal (50 pmol) zugegeben. Darauffolgend wurden die Proben bei 10000×g für 10 Minuten zentrifugiert. Der gewonnene Überstand wurde bei 37 °C unter Stickstoffbegasung eingedampft. Der Rückstand wurde in 150 µl mobiler Phase [5 mM Ammoniumacetat (pH 4,2) / Acetonitril (70:30)] wiederaufgenommen.

#### 4.2.6.3 Cytochrom P450 3A4

Zur Bestimmung der Enzymaktivität von CYP3A4 wurde Verapamil als Substrat gewählt. CYP3A4 katalysiert die Umsetzung von Verapamil zu den Hauptmetaboliten D-617 und Norverapamil (Kroemer et al., 1992; Kroemer et al., 1993). Der Inkubationsansatz wurde in 2 ml Eppendorf-Gefäßen auf Eis hergestellt. Vom Homogenat der abgeschilferten Enterozyten wurden 50 µg Protein, von den humanen CYP3A4 + P450 Reduktase + Cytochrom b<sub>5</sub> Supersomes™ (Katalog Nr: P202 Gentest) wurden 25 pmol CYP3A4 für die Inkubationen verwendet. Protein sowie 25 µl Verapamil-HCl (Knoll), (1000 µM oder 2500 µM), 25 µl Magnesiumchlorid (300 mM), 25 µl Kaliumdihydrogenphosphatpuffer (500 mM, pH 7,4) und Milliporewasser wurden auf ein Volumen von 225 µl eingestellt. Nach zweiminütiger Vorinkubation der Proben bei 37 °C wurde die Enzymreaktion mit 48 mM NADPH gestartet. Die Proben wurden für 5 bzw. 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte mit 1,7 ml eiskaltem absolutem Ethanol. Im nächsten Schritt wurden 25 µl des internen Standards, bestehend aus D-832 (50 pmol) und [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-Norverapamiloxalat (50 pmol), zugegeben. Darauffolgend wurden die Proben bei 10000×g für 10 Minuten zentrifugiert. Der gewonnene Überstand wurde bei 37 °C unter Stickstoffbegasung eingedampft. Der Rückstand wurde in 150 µl mobiler Phase [5 mM Ammoniumacetat (pH 4,2) / Acetonitril (70:30)] wieder aufgenommen. In weiteren Inkubationen wurde die potentielle Hemmung der CYP3A4-Aktivität durch Norverapamil untersucht. In den beschriebenen Reaktionsansatz von 225 µl wurden 25 µl Norverapamillösung mit verschiedenen Konzentrationen (300 µM, 150 µM, 100 µM, 50 µM) zugegeben. Als Substrat bei diesen Inkubationen diente [<sup>2</sup>H<sub>7</sub>]-Verapamil-HCl. Nach 2 Minuten Vorinkubation der Proben bei 37 °C wurde die Enzymreaktion mit 48 mM NADPH gestartet. Nach 10 Minuten Inkubation wurde die Reaktion durch Zugabe von 1,7 ml eiskaltem absolutem Ethanol abgestoppt. Die Zugabe des internen Standards und die weitere Aufarbeitung erfolgten wie beschrieben.

#### 4.2.7 Bestimmung der Verapamilmetaboliten D-620, D-617, D-702, D-703 und Norverapamil aus Inkubationsansätzen

Die Detektion und Quantifizierung der Metabolite wurde mit einer modifizierten Methode nach von Richter et al. (von Richter et al., 2000) durchgeführt. Die Analyten wurden flüssigkeitschromatographisch (HPLC-System HP1100, Hewlett Packard) getrennt und mit einem Massenspektrometer (Massenspektrometer HP1100, Hewlett Packard) detektiert. Von den aufgearbeiteten Proben (siehe Abschnitt 4.2.6.3) wurden 5 µl in das HPLC-System injiziert. Im Folgenden werden die HPLC und MSD-Bedingungen beschrieben.

**HPLC-Bedingungen**

Gerät: HP1100 mit Entgaser, Binärer Pumpe, Säulenschaltung, Autosampler, UV-Detektor, Hewlett Packard

Gradient:

Zeit (min)	5mM Ammoniumacetat pH 4,2 (%)	Acetonitril (%)	Flussrate (ml / min)
0,0	70	30	0,25
7,0	70	30	0,25
9,0	90	10	0,25
11,5	90	10	0,25
12,5	50	50	0,50
13,9	50	50	0,50
14,0	30	70	0,25

Äquilibrierungszeit: 4 Minuten

Vorsäule: Eclipse XDB-C8, 2,1x12,5 mm, 5 µm Partikelgröße, (Agilent Technologies)

Säule: LUNA C8, 150 x 2 mm I.D., 5 µm Partikelgröße, (Phenomenex)

Säulentemperatur: 40 °C

Säulenschaltung: 0 Minuten Gradient wurde nicht über die Säule geleitet (Abfall)  
 2 Minuten Gradient wurde über die Säule geleitet  
 15 Minuten Gradient wurde nicht über die Säule geleitet (Abfall)

UV-Detektor: 254 nm

**MSD-Bedingungen**

Gerät: Massenspektrometer HP1100 (1 Quadropol Massenspektrometer mit LC-Kopplung und ESI), Hewlett Packard

Ionisation: Electronic Spray Ionisation (ESI), positiv

Gastemperatur: 350 °C

Sprühdruck: 50 psig

N<sub>2</sub>-Volumenstrom: 11 l / min

Kapillarspannung: 3500 V

Messmodus für nicht deuterierte Verapamilmetaboliten:

Single Ion Monitoring Mode (SIM)

Gain: 1

0 Minuten	Fragmentor: 80 V
m / z 277,2	D-620
m / z 291,2	D-617
m / z 321,2	D-832, Interner Standard
6,5 Minuten	Fragmentor: 120 V
m / z 441,6	D-702, D-703, Norverapamil
m / z 444,3	[ <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ]-Norverapamil, Interner Standard

Messmodus für deuterierte Verapamilmetaboliten:

Single Ion Monitoring Mode (SIM)

Gain: 1

0 Minuten	Fragmentor: 80 V
m / z 284,2	[ <sup>2</sup> H <sub>7</sub> ]-D-620
m / z 298,2	[ <sup>2</sup> H <sub>7</sub> ]-D-617
m / z 321,2	D-832, Interner Standard
6,5 Minuten	Fragmentor: 120 V
m / z 448,6	[ <sup>2</sup> H <sub>7</sub> ]-D-702, [ <sup>2</sup> H <sub>7</sub> ]-D-703, [ <sup>2</sup> H <sub>7</sub> ]-Norverapamil
m / z 444,3	[ <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ]-Norverapamil, Interner Standard,

Zur Kalibrierung wurde ein Gemisch aus allen Metaboliten hergestellt. Zuerst wurde von allen Reinsubstanzen der Metaboliten (bezogen von der Firma Knoll) eine Stammlösung mit der Konzentration 1 mg / ml in 2-Propanol hergestellt. Danach wurde aus den Stammlösungen der Metaboliten ein Gemisch hergestellt, welches mit Milliporewasser auf 5 ml aufgefüllt wurde. Die finale Konzentration jedes Metaboliten in der Lösung betrug 1000 pmol / 25 µl. Aus dieser Lösung wurden durch weitere Verdünnungsschritte folgende Kalibrierproben hergestellt:

Kalibrierprobe 6	500 pmol / 25 µl
Kalibrierprobe 5	250 pmol / 25 µl
Kalibrierprobe 4	100 pmol / 25 µl
Kalibrierprobe 3	50 pmol / 25 µl
Kalibrierprobe 2	10 pmol / 25 µl
Kalibrierprobe 1	1 pmol / 25 µl

Von diesen Kalibrierproben wurden 25 µl in 1,7 ml Ethanol (absolut), welcher zusätzlich mit der entsprechenden Menge an Protein und allen o.g. weiteren Inkubationszusätzen versetzt war, pipettiert. Diese Ansätze wurden bei 37 °C unter Stickstoffbegasung



getrocknet und in 150 µl mobiler Phase [5 mM Ammoniumacetat (pH 4,2) / Acetonitril (70:30)] aufgenommen. Entsprechend dieser Vorgehensweise wurden aus den Kalibrierproben für jede Messung zusätzlich Qualitätskontrollen mit den Metabolitenkonzentrationen von 10 pmol, 50 pmol und 250 pmol hergestellt. Die Quantifizierung erfolgte mittels linearer Regressionsanalyse mit Wichtung (1/x) des Peakflächenverhältnisses interner Standard / Analyt. Zur internen Standardisierung der N-Desalkylmetabolite D-620 und D-617 wurde der Gallopamilmetabolit D-832 genutzt. [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-Norverapamil wurde zur Standardisierung von D-703, D-702 und Norverapamil benutzt. Die Berechnung erfolgte durch die Software HP Chem 4.06. Da für die Quantifizierung der [<sup>2</sup>H<sub>7</sub>]-Metabolite keine Reinsubstanzen zu Verfügung standen, wurden die Kalibrierproben der nicht deuterierten Metabolite zur Kalibrierung und Quantifizierung herangezogen.

#### 4.2.8 Bestimmung des Diclofenacmetaboliten 4'-Hydroxydiclofenac aus Inkubationslösungen

Die Detektion und Quantifizierung der Metabolite wurde mit einer modifizierten Methode nach von Richter (von Richter, 2000) durchgeführt. Die Analyten wurden flüssigkeitschromatographisch (HPLC-System HP1100, Hewlett Packard) getrennt und mit einem Massenspektrometer (Massenspektrometer HP1100, Hewlett Packard) detektiert. Von den aufgearbeiteten Proben (siehe Abschnitt 4.2.6.2) wurden 40 µl in das HPLC-System injiziert. Im Folgenden werden die HPLC und MSD-Bedingungen beschrieben.

##### HPLC-Bedingungen

Gerät: HP1100 mit Entgaser, Binärer Pumpe, Säulenschaltung, Autosampler, UV-Detektor, Hewlett Packard

Gradient:

Zeit (min)	5mM Ammoniumacetat pH 4,2 (%)	Acetonitril (%)	Flussrate (ml / min)
0,0	70	30	0,50
5,0	70	30	0,60
9,0	40	60	0,60
9,1	70	30	0,50

Äquilibrationszeit: 2 Minuten

Vorsäule: Eclipse XDB-C8, 2,1x12,5 mm, 5 µm Partikelgröße, (Agilent Technologies)

Säule: LUNA C8, 150 x 2 mm I.D., 5 µm Partikelgröße, (Phenomenex)

Säulentemperatur: 45 °C

Säulenschaltung:	0 Minuten	Gradient wurde nicht über die Säule geleitet (Abfall)
	2 Minuten	Gradient wurde über die Säule geleitet
	9,1 Minuten	Gradient wurde nicht über die Säule geleitet (Abfall)

UV-Detektor: 280 nm

### MSD-Bedingungen

Gerät: Massenspektrometer HP1100 (1 Quadropol Massenspektrometer mit LC-Kopplung und ESI), Hewlett Packard

Ionisation: Electronic Spray Ionisation (ESI), negativ

Gastemperatur: 350 °C

Sprühdruck: 50 psig

N<sub>2</sub>-Volumenstrom: 10 l / min

Kapillarspannung: 3500 V

Messmodus für 4'-Hydroxydiclofenac:

Single Ion Monitoring Mode (SIM)

Fragmentor: 50 V

Gain: 1

m / z 249                      Diflunisal, Interner Standard

m / z 310                      4'-Hydroxydiclofenac

Zur Kalibrierung wurden Kalibrierproben aus 4'-Hydroxydiclofenac (Novartis) hergestellt. Zuerst wurde aus der Reinsubstanz eine Stammlösung mit der Konzentration 1 mg / ml in 2-Propanol hergestellt. Danach wurden aus der Stammlösung die Kalibrierproben durch Verdünnung mit Milliporewasser (1 % Eisessig, 1 % Isoamylalkohol) hergestellt:

Kalibrierprobe 7	1000 pmol / 25 µl
Kalibrierprobe 6	500 pmol / 25 µl
Kalibrierprobe 5	250 pmol / 25 µl
Kalibrierprobe 4	100 pmol / 25 µl
Kalibrierprobe 3	50 pmol / 25 µl
Kalibrierprobe 2	25 pmol / 25 µl
Kalibrierprobe 1	5 pmol / 25 µl

Von diesen Kalibrierproben wurden 25 µl in 1,7 ml Ethanol (absolut), welcher zusätzlich mit der entsprechenden Menge an Protein und allen o.g. weiteren Inkubationszusätzen versetzt war, pipettiert. Diese Ansätze wurden bei 37 °C unter Stickstoffbegasung getrocknet und in 150 µl mobiler Phase [5 mM Ammoniumacetat (pH 4,2) / Acetonitril (70:30)] aufgenommen. Entsprechend dieser Vorgehensweise wurden aus den Kalibrierproben für jede Messung zusätzlich Qualitätskontrollen mit einer

Metabolitenkonzentrationen von 25 pmol, 50 pmol und 250 pmol hergestellt. Die Quantifizierung erfolgte mittels linearer Regressionsanalyse mit Wichtung (1/x) des Peakflächenverhältnisses interner Standard / Analyt. Zur internen Standardisierung von 4'-Hydroxydiclofenac wurde Diflunisal genutzt. Die Berechnung erfolgte durch die Software HP Chem 4.06.

#### **4.2.9 Statistische Auswertung**

Zur statistischen Analyse nicht normalverteilter Daten wurde der gepaarte Wilcoxon Test und die Spearman Korrelation verwendet. Bei normalverteilten Daten erfolgte die statistische Analyse mit dem gepaarten t-Test und linearer Korrelation. Alle statistischen Auswertungen wurden mit der GraphPad Prism<sup>®</sup> Software (Version 3.02) bzw. der GraphPad InStat<sup>®</sup> Software (Version 3.05) durchgeführt.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Intestinaler Arzneimittelmetabolismus

#### 5.1.1 Charakterisierung von abgeschilfertem, humanen Enterozyten

Die mit dem multiluminalen Perfusionskatheter gesammelten Zellen wurden für Untersuchungen zum Arzneimittelmetabolismus und Transport verwendet. Dafür war es notwendig, die gesamte Zellpopulation hinsichtlich der Zusammensetzung aus verschiedenen Zelltypen und des Ausmaßes der Apoptose zu charakterisieren. Wie in Abschnitt 4.2.2 beschrieben wurde die gesamte Zellpopulation mittels FACS-Analyse (Fluorescence-activated cell sorting) auf ihren Gehalt an Enterozyten untersucht. Villin ist ein enterozytenspezifisches Protein, welches am Aufbau des Bürstensaumes beteiligt ist (West et al., 1988). In Abbildung 2A ist das repräsentative Ergebnis einer FACS-Analyse eines gewonnenen Perfusates gezeigt. Es ist ein deutlicher Unterschied in den Fluoreszenzintensitäten zwischen villinmarkierten Zellen und der Isotypkontrolle zu erkennen. Diese Tatsache zeigt, dass in der Zellpopulation vorwiegend Enterozyten enthalten waren. Bezogen auf die Gesamtzellzahl exprimierten  $84,15 \pm 6,36$  % der Zellen Villin. Um weitere Zellpopulationen zu identifizieren, wurden die gesammelten Zellen auf die Expression des leukozytenspezifischen Oberflächenantigens CD45 hin durch FACS-Analyse untersucht. Bezogen auf die Gesamtzellzahl waren  $1,60 \pm 0,49$  % CD45-positiv. Das Ergebnis der CD45-Untersuchung eines repräsentativen Perfusates ist in Abbildung 2B gezeigt. Die Untersuchungen bezüglich der Expression von Villin und CD45 in den gesammelten Zellen zeigen, dass eine nahezu reine Enterozytenpopulation gewonnen werden konnte.

Eine Zellzyklusanalyse der gesammelten Zellen wurde durch DNA-Gehaltsbestimmung mit Hilfe des in die DNA interkalierenden Propidiumjodids durchgeführt. Es wurden die Fraktionen von Zellen mit einem DNA-Gehalt von weniger als 2 N, 2 N (diploider Chromosomensatz) und 2 N bis 4 N bestimmt. Die Abbildung 3 zeigt eine repräsentative Zellzyklusanalyse eines gesammelten Perfusates. In der Untersuchung zeigte sich, dass  $27,76 \pm 6,83$  % der gesamten Zellen einen DNA-Gehalt  $< 2 N$  hatten. In den restlichen Zellen wurde ein DNA-Gehalt von 2 N bzw. 2 N bis 4 N nachgewiesen. Der Hauptteil dieser Zellen wies einen diploiden Chromosomensatz auf. Zellen mit einem DNA-Gehalt von 2 N-4 N konnten auch in geringen Mengen nachgewiesen werden.

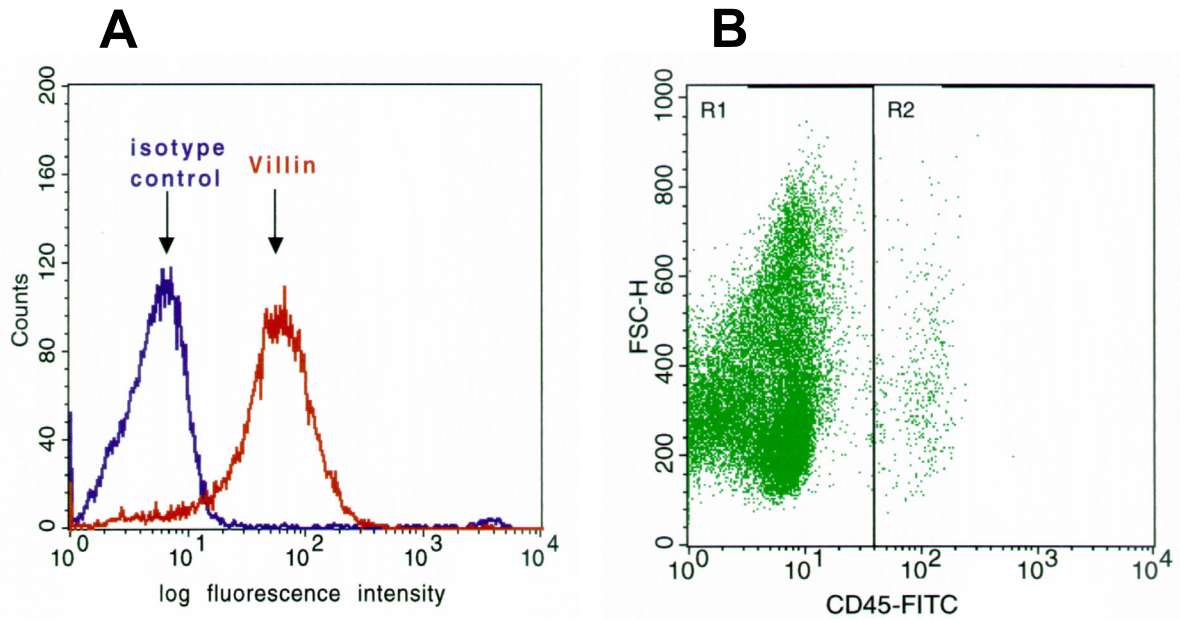


Abbildung 2 A) Expressionsnachweis des enterozytenspezifischen Proteins Villin in mittels MLPC-gesammelten abgeschilferten Zellen durch FACS-Analyse. Die Zellen wurden mit einem monoklonalen Antikörper gegen Villin bzw. mit einer Isotypkontrolle (spezifischer Antikörper aus der Maus) inkubiert. Mittels eines FITC-markierten Sekundärantikörpers gegen Maus-IgG wurden die Villin-positiven Zellen (Enterozyten) in der FACS-Analyse gemessen. Die Fluoreszenzsignale von Villin sind um den Faktor  $10^2$  intensiver als die Isotypkontrolle. Im Mittel waren  $84,15 \pm 6,36$  % der gemessenen Zellen Villin-positiv. B) Der Nachweis von  $CD45^+$  Zellen in einem repräsentativen Perfusat mit FACS-Analyse. R1:  $CD45^-$  Zellen, R2:  $CD45^+$  Zellen ( $1,60 \pm 0,49$  %).

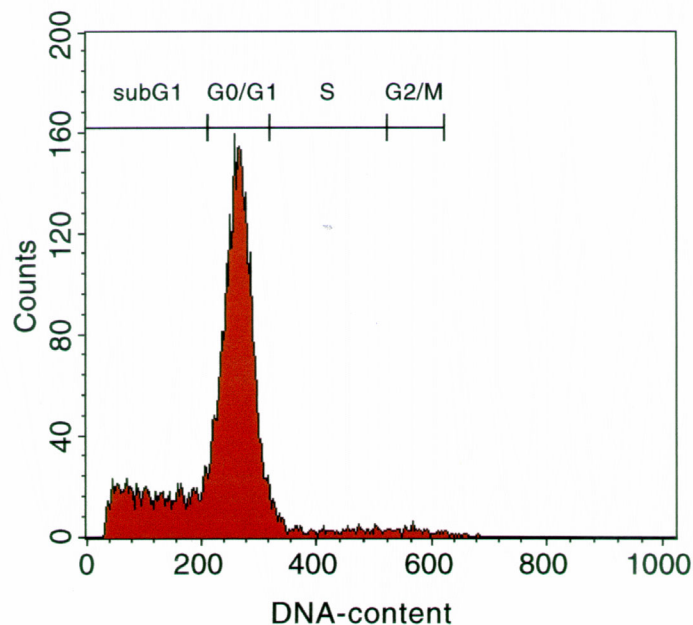
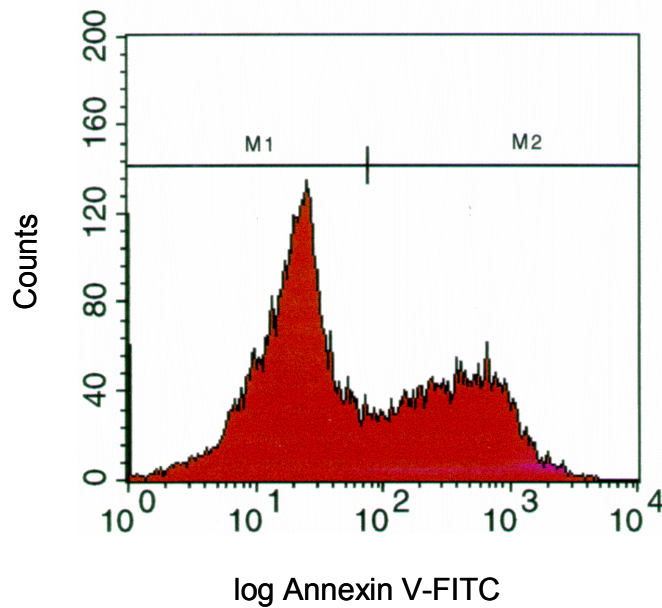


Abbildung 3 Repräsentative durchflusszytometrische Analyse zur Messung des DNA-Gehaltes eines Perfusates. Der DNA-Gehalt der abgeschilferten Zellen wurde mittels Propidiumjodid im FACS-Gerät analysiert. Der unterschiedliche DNA-Gehalt der subG1, G0 / G1-Phase, S-Phase sowie G2 / M-Phase ist dargestellt. Bei diesem Probanden waren 24,6 %, 72,8 %, 2,1 % und 0,5 % der Zellen in der subG1, G0 / G1, S bzw. G2 / M-Phase.

Um nachzuweisen, dass der beobachtete Zelltod (DNA-Gehalt  $< 2 N$ ) durch Apoptose verursacht wurde, wurde mittels des Apoptosemarkers Annexin V eine weitere Untersuchung am FACS-Gerät durchgeführt. In Abbildung 4 ist das Ergebnis einer FACS-Analyse eines gesammelten Perfusates gezeigt. Von den untersuchten Zellen waren  $30,27 \pm 7,91 \%$  Annexin V-positiv und Propidiumjodid-negativ, d.h. in der frühen Apoptose. Nur  $4,43 \pm 1,69 \%$  der Zellen waren in der späten Apoptosephase, d.h. die Zellen wurden in der FACS-Analyse als Annexin V-positiv und Propidiumjodid-positiv charakterisiert. Zwischen der Anzahl von Zellen mit subdiploidem Chromosomensatz ( $< 2 N$ ) und der Anzahl Annexin V-positiver Zellen bestand eine positive Korrelation ( $r = 0,74$ ;  $p = 0,006$ ). Damit konnte bestätigt werden, dass sich der Hauptanteil der Zellen mit subdiploidem DNA-Gehalt in der frühen Apoptosephase befand. Mittels FACS-Messung wurde auch die durchschnittlich gesammelte Zellzahl von  $56,23 \times 10^6$  Zellen / 2h bestimmt. Die Zellzahl in den gemessenen Perfusaten korrelierte mit dem Mittelwert des Proteingehaltes der Zellhomogenate aus den entsprechenden untersuchten Segmenten ( $r = 0,57$ ;  $p = 0,0098$ ). In Tabelle 4 sind alle Ergebnisse der FACS-Analyse zusammengefasst. Die untersuchten Probanden waren in die klinische Studie IKP 164 eingeschlossen (siehe Abschnitt: 4.2.1.4) Es zeigte sich bei den untersuchten Probanden (7-12) kein Einfluss von Rifampicin bzw. Chinidin auf die Apoptose.

**Tabelle 4 Charakterisierung von intestinalen, abgeschilferten Zellen durch FACS-Analyse. Die Zellen wurden mit dem multiluminalen Perfusionskatheter aus einem 20 cm isolierten Dünndarmsegment über 2 Stunden aspiriert.**

Proband	7	8	9	10	11	12	Mittelwert	Standard-abweichung
Villin-positive Zellen [%]	92,45	91,93	80,85	79,73	78,09	81,82	84,15	6,36
CD45-positive Zellen [%]	2,57	1,34	1,61	1,39	1,31	1,40	1,60	0,49
Annexin V-positive Zellen / Propidiumjodid-negative Zellen [%]	24,09	43,65	36,21	26,82	26,21	24,61	30,27	7,91
Annexin V-positive Zellen / Propidiumjodid-positive Zellen [%]	2,93	5,17	6,99	5,37	2,69	3,43	4,43	1,69
Gesamt-Annexin V-positive Zellen [%]	27,02	48,81	43,2	32,19	28,9	28,05	34,70	9,10
Zellen mit subdiploiden DNA –Gehalt [%]	29,80	23,10	20,45	28,07	25,22	39,90	27,76	6,83



**Abbildung 4** Annexin V-FITC-Färbung von abgeschilfertem Enterozyten nachgewiesen mit Hilfe der FACS-Analyse.  $34,70 \pm 9,10$  % der gemessenen Zellen sind Annexin V-positiv.

### 5.1.2 Expression von Cytochrom P450 Enzymen in abgeschilfertem Enterozyten

Die mRNA- und Proteinexpression von Cytochrom P450 Enzymen wurde in abgeschilfertem Enterozyten untersucht. Die mRNA-Expressionsanalyse von CYP3A4 wurde wie in Glaeser et al. beschrieben durchgeführt (Glaeser et al., 2002). Mit den Enterozyten von sechs Probanden erfolgte die CYP3A4 mRNA-Expressionsanalyse durch semiquantitative RT-PCR. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Abbildung 5 und Tabelle 5 gezeigt. Die Proteinexpression wurde für CYP2C8, CYP2C9, CYP2D6 und CYP3A4 untersucht. Alle genannten Cytochrom P450 Enzyme konnten in Homogenaten von abgeschilfertem Enterozyten von sechs Probanden nachgewiesen werden. Zum Nachweis, dass Enterozytenhomogenat für die Immunoblotanalyse verwendet wurde, erfolgte zudem die Detektion des enterozytenspezifischen Proteins Villin. Zusätzlich wurde noch das Protein des housekeeping genes Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH) nachgewiesen, um die Verunreinigung der Enterozytenpräparationen mit extrazellulärem Protein abzuschätzen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6 und Tabelle 5 gezeigt. Um die konstante Qualität der Enterozyten über einen längeren Zeitraum zu überprüfen, wurden Enterozyten aus einer Sammelperiode von 1,5 Stunden mit Immunoblotanalyse untersucht. Es zeigten sich nur geringe Unterschiede im CYP3A4 Gehalt der Homogenate von vier Perfusaten, welche innerhalb von 1,5 Stunden gesammelt wurden, was die gleichbleibende Qualität der Perfusate belegte. Die Immunoblotanalyse der Homogenate eines Probanden ist in Abbildung 7 gezeigt.

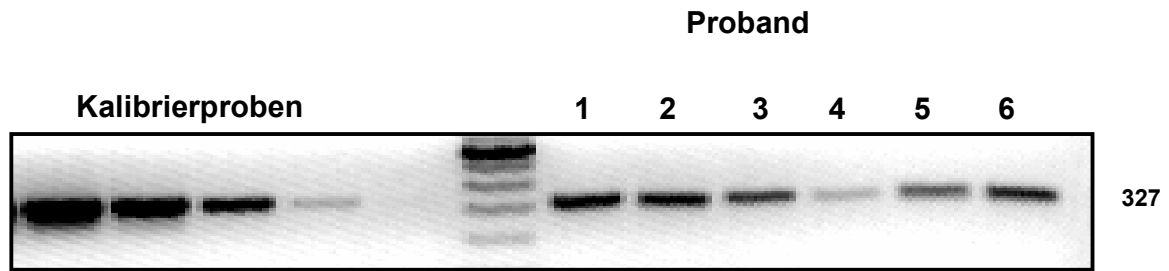


Abbildung 5 CYP3A4 mRNA-Expressionsanalyse mit RT-PCR bei sechs Probanden. Als Positivkontrollen wurden Verdünnungen (1 pg, 100 fg, 10 fg und 1 fg) von einem CYP3A4 cDNA-Plasmid (von Dr. F. J. Gonzalez, Bethesda MD, USA, zur Verfügung gestellt) verwendet.

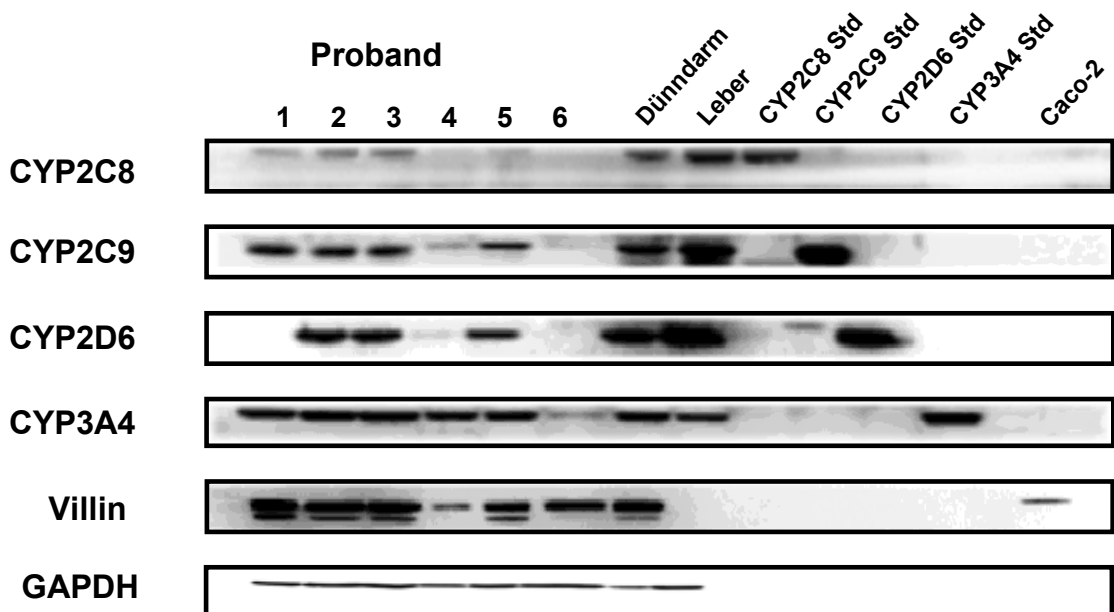
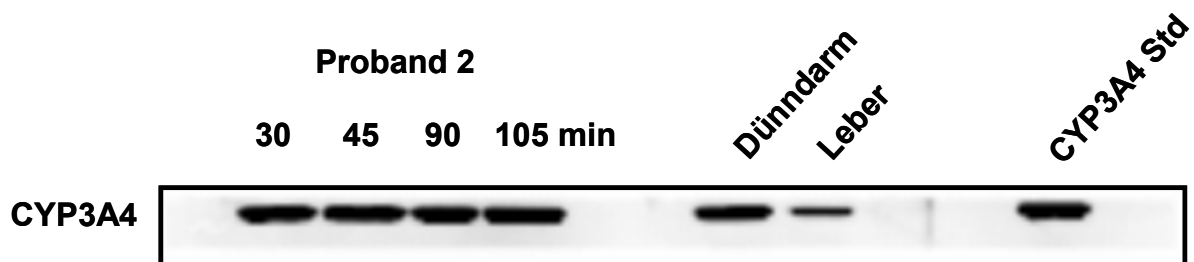


Abbildung 6 Immunoblotanalyse von CYP2C8, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4, Villin und GAPDH in Homogenaten abgeschilfterer Enterozyten von sechs Probanden. 20 µg Gesamtprotein wurden von jedem Enterozytenhomogenat verwendet. 20 µg von fünf gepoolten Enterozyten- bzw. Leberhomogenaten (chirurgisch gewonnene Gewebeprobe) und rekombinant hergestellte Cytochrom P450 Enzyme (CYP2C8, CYP2C9 und CYP3A4: 500 fmol; CYP2D6: 75 fmol) wurden als Positivkontrollen verwendet. Proband 1 und 6 zeigen keine CYP2D6 Expression, da beide „poor metabolizer“ mit dem Genotyp \*4 / 4\* sind.



**Tabelle 5 CYP2C8, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4, Villin und GAPDH Expression in humanen abgeschilferten Enterozyten, die mit einem multiluminalen Perfusionskatheter gewonnen wurden. n.d.: nicht detektierbar, PM: „poor metabolizer“. Der Gehalt von Villin und GAPDH in den abgeschilferten Enterozyten ist im Verhältnis zum Gehalt des Enterozytenhomogenatpools aus chirurgischen Proben angegeben.**

Proband	1	2	3	4	5	6	Mittelwert	Standard- abweichung
CYP2C8 [pmol / mg Protein]	9,29	9,35	9,09	9,62	9,26	n.d.	9,32	0,19
CYP2C9 [pmol / mg Protein]	8,17	7,21	5,49	4,71	9,53	n.d.	7,02	1,96
CYP2D6 [pmol / mg Protein]	PM	1,81	1,68	0,08	0,77	PM	1,08	0,82
CYP3A4 [pmol / mg Protein]	30,13	49,19	47,40	18,04	33,24	n.d.	35,60	12,92
Villin [%]	129	152	121	9	71	83	94	51
GAPDH [%]	192	298	339	180	238	436	281	98
CYP3A4 cDNA-Plasmidkopien [fg]	96,5	60,7	20,6	1,5	9,7	30,6	36,6	35,8



**Abbildung 7 Immunoblotanalyse von CYP3A4 aus vier Homogenaten abgeschilfterer Enterozyten eines Probanden gesammelt. Die Perfusate wurden in einem Zeitraum von 1,5 Stunden (15-30, 30-45, 75-90, 90-105 Minuten) gesammelt. 20 µg Protein wurden von jedem Homogenat geladen. 20 µg von fünf gepoolten Enterozyten- bzw. Leberhomogenaten (chirurgisch gewonnene Gewebeprobe) und rekombinant hergestelltem Cytochrom P450 3A4 (500 fmol) wurden als Positivkontrollen verwendet.**

### 5.1.3 Aktivität von Cytochrom P450 Enzymen in abgeschilferten Enterozyten

Die Aktivitätsbestimmungen von CYP2C8, CYP2C9 und CYP3A4 wurde wie in 4.2.6 beschrieben mit dem Substrat Verapamil durchgeführt. Die Enterozytenhomogenate von jeweils fünf Probanden aus den klinischen Studien IKP 114 und IKP 164 wurden für die Aktivitätsbestimmung verwendet. Der durch Abspaltung des Dimethoxyethylrest gebildete Metabolit D-617 und das durch N-Desmethylierung gebildete Norverapamil sind die Hauptmetaboliten des Verapamils. Diese Reaktionen werden durch vorwiegend CYP3A4 katalysiert (Kroemer et al., 1993; von Richter, 2000). Die Bildung von D-702 und D-703 in der Leber wird vor allem durch Mitglieder der CYP2C Familie katalysiert (Busse et al., 1995; von Richter, 2000). Die Bildung von D-617 und Norverapamil streute zwischen den untersuchten Probanden um die Faktoren 12 bzw. 25 (D-617: 40,34-481,40 pmol / min / mg Protein; Norverapamil: 50,63-1267,42 pmol / min / mg Protein). Die durchschnittlichen Bildungsraten von D-617 und Norverapamil in abgeschilferten Enterozyten waren  $186,65 \pm 131,23$  pmol / min / mg Protein bzw.  $329,22 \pm 371,34$  pmol / min / mg Protein. Weiterhin existierte erwartungsgemäß eine signifikante Korrelation zwischen D-617- bzw. Norverapamilbildung und der Expression von CYP3A4 in den abgeschilferten Enterozyten ( $r = 0,85$ ;  $p < 0,01$  für D-617;  $r = 0,83$ ;  $p < 0,01$  für Norverapamil). Die Expression von CYP3A4 in den entsprechenden Enterozytenhomogenaten wurde mit Immunoblotanalyse bestimmt. Eine signifikante Korrelation fand sich auch zwischen der D-617- und Norverapamilbildung bei den zehn untersuchten Probanden ( $r = 0,96$ ;  $p < 0,0001$ ). Die *ex vivo* Bildungsraten von D-617 und Norverapamil sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Die Bildung von D-702 und D-703 wurde ebenfalls in den Enterozytenhomogenaten der zehn Probanden untersucht. Die durchschnittliche Bildungsrate von D-702 bzw. D-703 in Homogenaten abgeschilfterter Enterozyten lag bei  $193,98 \pm 98,96$  pmol / min / mg Protein bzw.  $99,30 \pm 62,27$  pmol / min / mg Protein. Die Bildung von D-702- bzw. D-703 variierte zwischen den zehn untersuchten Probanden um die Faktoren 10 bzw. 15 (D-702: 22,44-337,20 pmol / min / mg Protein; D-703: 22,33-230,25 pmol / min / mg Protein). In den untersuchten Enterozytenhomogenaten bestand keine Korrelation zwischen der D-702 Bildung und der CYP2C9 Proteinexpression. Auch zwischen der D-703 Bildung und der CYP2C8 Proteinexpression bestand keine Korrelation. Ein nicht signifikanter Trend war zwischen der D-703 Bildung und der CYP3A4 Proteinexpression bei den untersuchten Proben vorhanden. Es bestand aber eine signifikante Korrelation zwischen der D-702- und D-703 Bildung ( $r = 0,80$ ;  $p < 0,01$ ). Die *ex vivo* Bildungsraten von D-702 und D-703 sind in Tabelle 7 gezeigt.

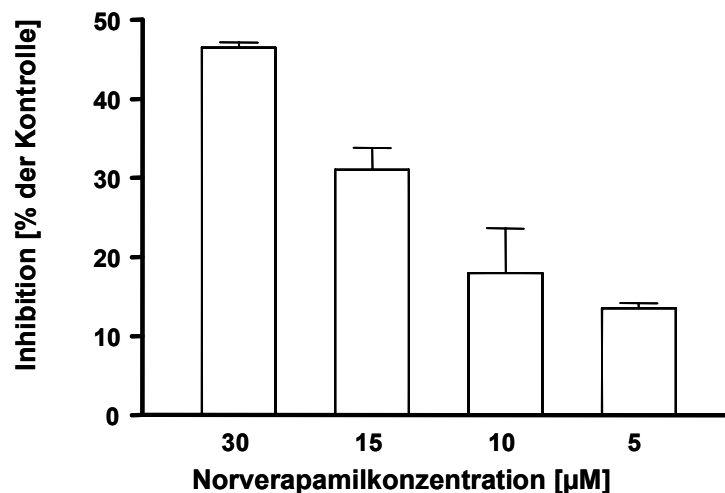
In weiteren Experimenten wurde die potentielle Hemmung von CYP3A4 durch Norverapamil untersucht (siehe 4.2.6.3). Norverapamil wurde in den Konzentrationen 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 15  $\mu\text{M}$  und 30  $\mu\text{M}$  eingesetzt. In Abbildung 8 sind die Ergebnisse mit rekombinantem CYP3A4 (CYP3A4 + P450 Reduktase + Cytochrom  $b_5$  Supersomes<sup>TM</sup>) gezeigt. Es bestand eine signifikante Korrelation zwischen der eingesetzten Norverapamilkonzentration und der Inhibition der CYP3A4-vermittelten [ $^2\text{H}_7$ ]-Norverapamilbildung ( $r=0,98$ ;  $p<0,05$ ). In Übereinstimmung zu den gezeigten Ergebnissen wurde in den Homogenaten der abgeschilferten Enterozyten mit einer Konzentration von 30  $\mu\text{M}$  Norverapamil eine Inhibition der [ $^2\text{H}_7$ ]-Norverapamilbildung um 30 % gemessen.

**Tabelle 6 Ex vivo Bildungsraten von D-617 und Norverapamil in abgeschilferten Enterozyten, die mit einem MLPC gesammelt wurden. Die Aktivitätsbestimmungen erfolgten mit dem Substrat Verapamil (250  $\mu\text{M}$ ) und 50  $\mu\text{g}$  Enterozytenhomogenat bei einer Inkubationszeit von 5 Minuten.**

Proband	D-617 [pmol / min / mg Protein]	Norverapamil [pmol / min / mg Protein]
1	202,14	363,78
2	481,40	1267,42
3	347,25	618,18
4	209,12	238,73
5	110,36	111,77
7	153,24	200,65
9	192,34	278,41
10	40,34	50,63
11	86,20	104,00
12	44,06	58,67
Mittelwert	186,65	329,22
Standard- abweichung	131,23	371,34

**Tabelle 7** *Ex vivo* Bildungsraten von D-702 und D-703 in abgeschilferten Enterozyten, die mit einem MLPC gesammelt wurden. Die Aktivitätsbestimmungen erfolgten mit dem Substrat Verapamil (250  $\mu\text{M}$ ) und 50  $\mu\text{g}$  Enterozytenhomogenat bei einer Inkubationszeit von 5 Minuten.

Proband	D-702 [ $\mu\text{mol} / \text{min} / \text{mg Protein}$ ]	D-703 [ $\mu\text{mol} / \text{min} / \text{mg Protein}$ ]
1	91,63	70,50
2	337,20	230,25
3	244,95	160,15
4	188,57	133,57
5	22,44	22,33
7	343,56	124,30
9	209,46	75,61
10	154,94	58,55
11	181,42	60,21
12	165,64	57,50
Mittelwert	193,98	99,30
Standard- abweichung	98,96	62,27



**Abbildung 8** Inhibition der [ $^2\text{H}_7$ ]-Norverapamilbildung aus [ $^2\text{H}_7$ ]-Verapamil durch verschiedene Norverapamilkonzentrationen (30  $\mu\text{M}$ , 15  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ ). Die Inkubationen wurden mit rekombinantem CYP3A4 (CYP3A4 + P450 Reduktase + Cytochrom  $b_5$  Supersomes<sup>TM</sup>) durchgeführt. Bei 30  $\mu\text{M}$  Norverapamil kommt es zu einer Inhibition des [ $^2\text{H}_7$ ]-Verapamilumsatzes um 46 %. Konzentrationsabhängig nimmt die Inhibition des [ $^2\text{H}_7$ ]-Verapamilumsatzes durch Norverapamil ab.

#### 5.1.4 Einfluss von Rifampicin auf den intestinalen Arzneimittelmetabolismus

Mit dem multiluminalen Perfusionskatheter wurde in der klinischen Studie IKP 164 der Einfluss von Chinidin und Rifampicin auf die Pharmakokinetik des P-Glykoproteinsubstrates Digoxin nach i.v. Gabe untersucht. Im Abschnitt „Klinische Studie IKP 164“ ist das Studienprotokoll beschrieben. Im Folgenden wird der Einfluss von Rifampicin auf Expression und Aktivität verschiedener intestinaler Cytochrom P450 Enzyme betrachtet.

##### 5.1.4.1 Cytochrom P450 2C8

Mittels Immunoblotanalyse (siehe Abschnitt 4.2.5.5) wurde die Proteinexpression von CYP2C8 vor und während Rifampicineinnahme untersucht. In Abbildung 9 ist die Immunoblotanalyse der CYP2C8 Expression von sechs Probanden vor und während der Rifampicineinnahme gezeigt. Bei den sechs Probanden konnte eine signifikante Zunahme der CYP2C8 Expression um den Faktor  $2,06 \pm 0,51$  ( $p = 0,003$ ) nachgewiesen werden. Die Expression nahm von  $5,14 \pm 0,86$  pmol / mg Protein vor Rifampicineinnahme auf  $10,37 \pm 2,26$  pmol / mg Protein während der Rifampicineinnahme zu. Die Ergebnisse der densitometrischen Auswertung der CYP2C8 Expression vor und während Rifampicineinnahme sind in Abbildung 10 gezeigt.

Weiterhin wurde auch der Metabolismus von Verapamil vor und während der Rifampicineinnahme in den abgeschilferten Enterozyten von fünf Probanden untersucht. Wie in Abschnitt „Aktivität von Cytochrom P450 Enzymen in abgeschilferten Enterozyten“ beschrieben, katalysiert in der Leber vorwiegend CYP2C8 die Umsetzung von Verapamil zu D-703. Überraschenderweise wurde die Umsetzung von Verapamil zu D-703 durch Rifampicineinnahme in den abgeschilferten Enterozyten nicht induziert. Die Bildung von D-703 im Homogenat der abgeschilferten Enterozyten war vor Rifampicineinnahme  $108,05 \pm 198,76$  pmol / min / mg Protein (Bereich: 15,52-463,53 pmol / min / mg Protein), während der Rifampicineinnahme  $92,91 \pm 155,43$  pmol / min / mg Protein (Bereich: 23,68-370,87 pmol / min / mg Protein). Auch die Bildung des Verapamilmetaboliten D-702, welche durch verschiedene Mitglieder der CYP2C Familie katalysiert wird (Busse et al., 1995), zeigte vor [ $211,74 \pm 379,60$  pmol / min / mg Protein (Bereich: 35,38-890,67 pmol / min / mg Protein)] und während Rifampicineinnahme [ $208,97 \pm 351,43$  pmol / min / mg Protein (Bereich: 40,16-837,48 pmol / min / mg Protein)] keinen Unterschied. Die Analyse wurde mit den Enterozytenhomogenaten der Probanden 7,10,11,12 und 14 durchgeführt, da die Menge des Enterozytenhomogenates der anderen Probanden nicht ausreichend war.

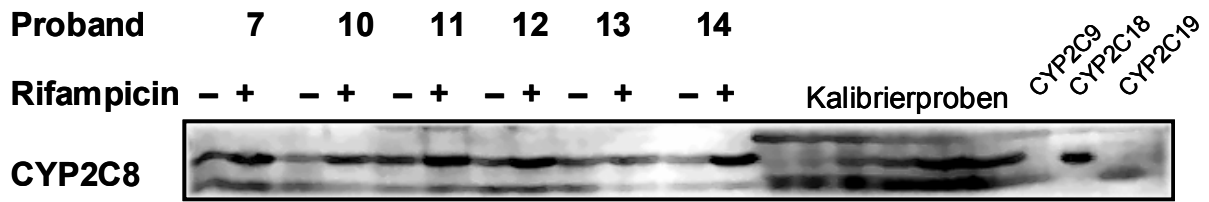


Abbildung 9 Immunoblotanalyse von CYP2C8 in abgeschilferten Enterozyten von sechs Probanden vor und während Rifampicineinnahme. Zur Herstellung der aufzutragenden Proben wurden die Enterozytenhomogenate von fünf Perfusatfraktionen gepoolt. Nach diesen Homogenatpools wurden die Kalibrierproben aus rekombinatem CYP2C8 aufgetragen. Zur Kontrolle auf mögliche Kreuzaktivität des verwendeten Antikörpers wurden auf den letzten drei Spuren jeweils 500 fmol rekombinantes CYP2C9, CYP2C18 und CYP2C19 aufgetragen. Es konnte bei jedem Probanden eine Zunahme der CYP2C8 Expression unter Rifampicineinnahme nachgewiesen werden.

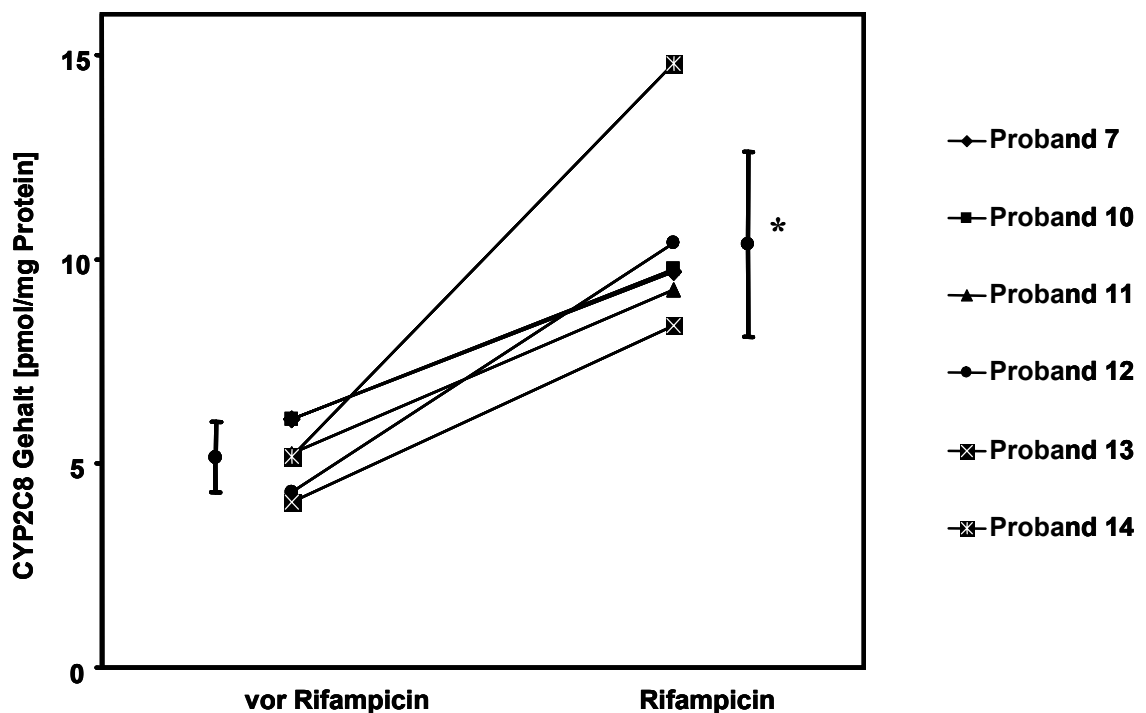


Abbildung 10 CYP2C8 Expression in abgeschilferten Enterozyten bei gesunden freiwilligen Probanden vor und 10 Tage nach Rifampicineinnahme. Proband 14 zeigt die stärkste Induktion von allen untersuchten Probanden. Die Expression von CYP2C8 nahm von  $5,14 \pm 0,86$  auf  $10,37 \pm 2,26$  pmol / mg Protein zu. \* Die Zunahme der CYP2C8 Expression war signifikant ( $p= 0,003$ ).

#### 5.1.4.2 Cytochrom P450 2C9

Wie in Abschnitt 4.2.5.5 beschrieben wurde auch die CYP2C9 Proteinexpression vor und während Rifampicineinnahme (siehe Abschnitt: 5.1.4) mittels Immunoblotanalyse untersucht. In Abbildung 11 ist die Immunoblotanalyse der CYP2C9 Expression von sechs Probanden vor und während Rifampicineinnahme gezeigt. Auch bei CYP2C9 konnte eine signifikante Zunahme der CYP2C9 Proteinexpression um den Faktor  $1,42 \pm 0,30$  ( $p=0,007$ ) nachgewiesen werden. Die basale Expression von CYP2C9 lag bei  $4,18 \pm 1,37$  pmol / mg Protein. Nach Einnahme von Rifampicin erhöhte sich die Expression von CYP2C9 auf  $5,70 \pm 1,14$  pmol / mg Protein. Die Veränderung der CYP2C9 Proteinexpression der einzelnen Probanden ist in Abbildung 12 gezeigt. Wie im Abschnitt „Inkubationen zur Bestimmung der Cytochrom P450 Enzymaktivität“ beschrieben, wurde die Enzymaktivität von CYP2C9 durch Bestimmung des Diclofenacmetaboliten 4'-Hydroxydiclofenac vor und während Rifampicineinnahme (siehe Abschnitt: 5.1.4) bestimmt. Es konnte eine nicht signifikante Zunahme der 4'-Hydroxydiclofenacbildung während der Einnahme von Rifampicin von  $13,37 \pm 6,69$  auf  $29,45 \pm 17,48$  pmol / min / mg Protein nachgewiesen werden. Die Analyse wurde mit den Enterozytenhomogenaten der Probanden 7,10,11,12 und 14 durchgeführt, da die Menge des Enterozytenhomogenates der anderen Probanden nicht ausreichend war.

#### 5.1.4.3 Cytochrom P450 3A4

Zusätzlich zur Immunoblotanalyse wurde auch die Expression der CYP3A4 mRNA mit quantitativer RT-PCR analysiert (siehe „Quantitative RT-PCR“). Die Expression der CYP3A4 mRNA änderte sich von  $74,61 \pm 44,16$  auf  $143,18 \pm 68,35$   $\mu\text{g}_{\text{pUVI/3A4}} / \mu\text{g}_{\beta\text{-actin}}$  HepG2. Dabei handelte es sich um eine signifikante Induktion um den Faktor  $2,29 \pm 1,58$  ( $p < 0,05$ ). Die Zunahme der CYP3A4 mRNA Expression jedes Probanden ist in Abbildung 13 dargestellt. Die Immunoblotanalyse von CYP3A4 in den abgeschilferten Enterozyten von sechs Probanden vor und während Rifampicinwirkung zeigte das zu erwartende Ergebnis (Kolars et al., 1992). Die Expression von CYP3A4 nahm von  $34,13 \pm 10,74$  pmol / mg Protein auf  $113,86 \pm 31,05$  pmol / mg Protein zu. Dies war eine signifikante Zunahme um den Faktor  $3,46 \pm 1,00$  ( $p=0,0007$ ). In Abbildung 14 ist die Immunoblotanalyse von CYP3A4 in den abgeschilferten Enterozyten gezeigt. Die Induktion der CYP3A4 Proteinexpression der Probanden ist in Abbildung 15 dargestellt. Wie im Abschnitt 4.2.6.3 beschrieben, erfolgte die Enzymaktivitätsbestimmung von CYP3A4 in den abgeschilferten Enterozyten von fünf Probanden vor und während Rifampicineinnahme durch die Messung der Verapamilmetaboliten D-617 und Norverapamil. Es konnte für D-617 und Norverapamil eine signifikante Induktion der Metabolitenbildung unter Rifampicineinnahme nachgewiesen werden. Die Bildung von D-

617 nahm signifikant von  $125,88 \pm 118,83$  pmol / min / mg Protein auf  $277,17 \pm 145,50$  pmol / min / mg Protein zu ( $p < 0,05$ ). Dies entsprach einem Induktionsfaktor von  $3,24 \pm 2,23$ . Im Falle von Norverapamil war auch eine signifikante Zunahme der Norverapamilbildung unter Rifampicineinwirkung von  $113,03 \pm 57,88$  pmol / min / mg Protein auf  $398,43 \pm 148,20$  pmol / min / mg Protein nachweisbar ( $p < 0,05$ ). Diese Zunahme entsprach einem Induktionsfaktor von  $4,90 \pm 3,67$ . Die Bildungsdaten von D-617 und Norverapamil sind in Tabelle 8 gezeigt. Weiterhin korrelierten die Induktionsfaktoren der Norverapamilbildung mit den Induktionsfaktoren von CYP3A4 Protein ( $r = 0,96$ ;  $p < 0,01$ ), wogegen keine Korrelation zwischen den D-617 Induktionsfaktoren und den Induktionsfaktoren von CYP3A4 Protein vorhanden war.

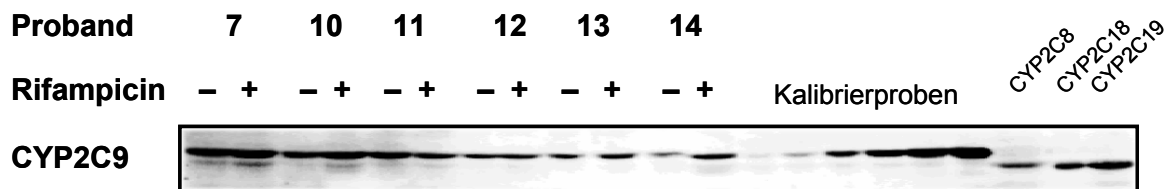


Abbildung 11 Immunoblotanalyse von CYP2C9 in abgeschilferten Enterozyten von sechs Probanden vor und während Rifampicineinnahme. Zur Herstellung der aufzutragenden Proben wurden die Enterozytenhomogenate von fünf Perfusatfraktionen gepoolt. Nach diesen Homogenatpools wurden die Kalibrierproben aus rekombinantem CYP2C9 aufgetragen. Als Kontrolle für die Kreuzaktivität des verwendeten Antikörpers sind auf den letzten drei Spuren jeweils 500 fmol rekombinantes CYP2C8, CYP2C18 und CYP2C19 aufgetragen. Bei jedem Probanden konnte eine Zunahme der CYP2C9 Expression unter Rifampicineinnahme nachgewiesen werden.



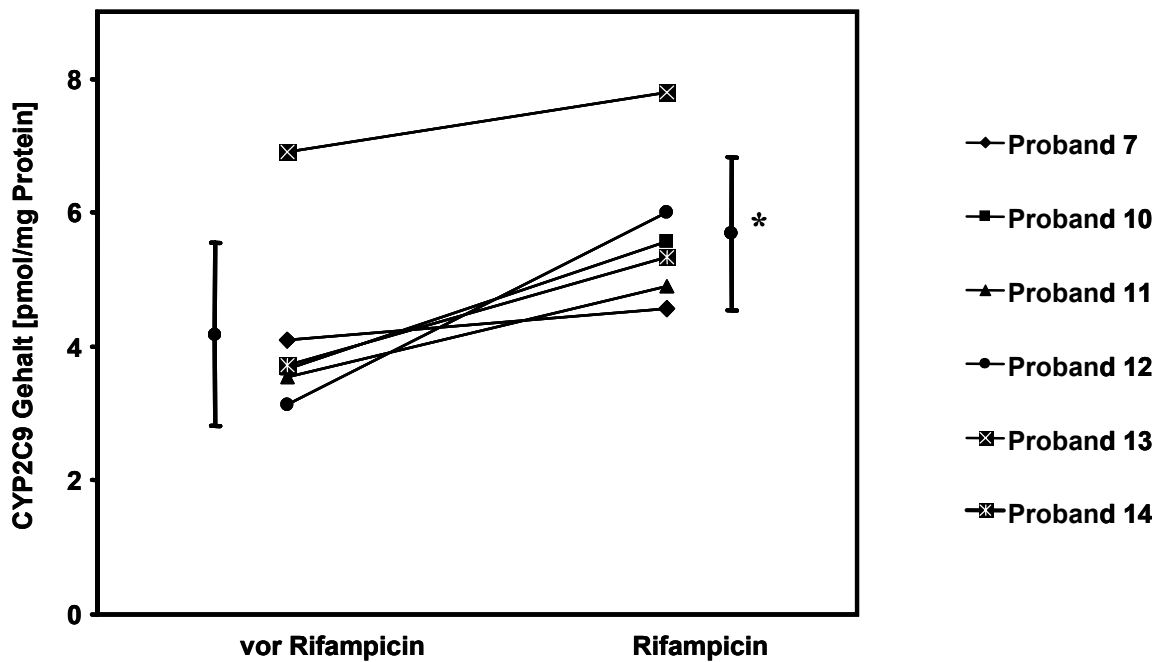


Abbildung 12 Zunahme der CYP2C9 Expression in abgeschilferten Enterozyten bei gesunden freiwilligen Probanden nach Rifampicineinnahme. Proband 13 zeigt insgesamt eine höhere Expression von CYP2C9 im Vergleich zu allen weiteren untersuchten Probanden. Die mittlere Expression von CYP2C9 nahm von  $4,18 \pm 1,37$  auf  $5,70 \pm 1,14$  pmol/mg Protein zu. \* Die Zunahme CYP2C9 Expression war signifikant ( $p=0,007$ ).

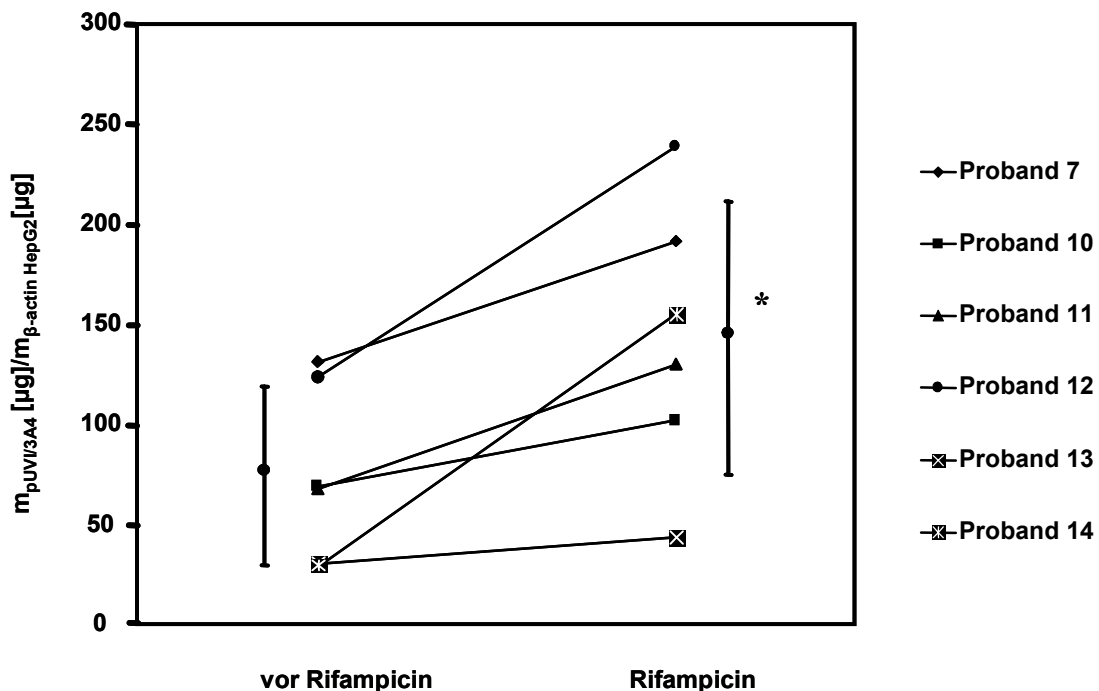


Abbildung 13 Mit quantitativer Real Time-PCR wurde die Expression von CYP3A4 mRNA in abgeschilferten Enterozyten von sechs Probanden vor und während Rifampicineinnahme untersucht. Rifampicin bewirkte bei den untersuchten Proben eine Zunahme um den Faktor  $2,29 \pm 1,58$ . Die Expression der CYP3A4 mRNA streute sowohl vor als auch während der Rifampicineinnahme. Bei Proband 14 konnte die stärkste Induktion um den Faktor 5,49 nachgewiesen werden. Als Ausgangsmaterial für die cDNA Synthese wurde die Gesamt-RNA der abgeschilferten Enterozyten von zwei Segmenten, welche mit dem multiluminalen Perfusionskatheter isoliert wurden, jeweils vor und während Rifampicineinnahme gepoolt. \* Die Zunahme der CYP3A4 mRNA war signifikant ( $p < 0,05$ ).

Tabelle 8 *Ex vivo* Bildungsraten von D-617 und Norverapamil vor und während Rifampicineinnahme in Homogenaten von abgeschilferten Enterozyten von fünf Probanden. Für die Untersuchungen wurden 250 µM Verapamil mit 50 µg Homogenat für 5 Minuten inkubiert. Proband 13 wurde aus den oben genannten Gründen nicht in die Analyse miteinbezogen (siehe Abschnitt: „Cytochrom P450 2C8“). \* Die Zunahme der D-617 und Norverapamilbildung war signifikant ( $p < 0,05$ ).

Proband	D-617 (pmol / min / mg Protein)		Norverapamil (pmol / min / mg Protein)	
	vor Rifampicin	Rifampicin	vor Rifampicin	Rifampicin
7	117,28	141,21	194,19	255,64
10	55,24	347,28	70,66	647,59
11	82,14	192,00	120,07	336,20
12	42,56	206,68	45,86	392,77
14	332,20	498,66	134,39	359,94
Mittelwert	125,88	277,17*	113,03	398,43*
Standard- abweichung	118,83	145,50	57,88	148,20

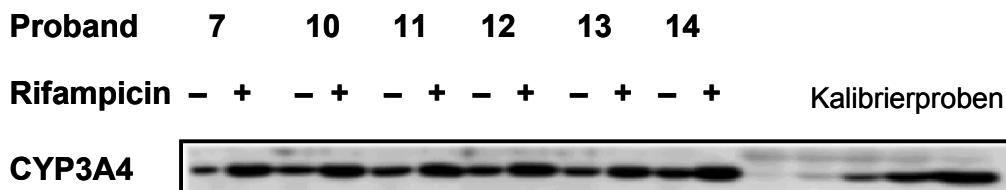


Abbildung 14 Immunoblotanalyse von CYP3A4 in abgeschilferten Enterozyten von sechs Probanden vor und während Rifampicineinnahme. Zur Herstellung der aufzutragenden Proben wurden die Enterozytenhomogenate von fünf Perfusatfraktionen gepoolt. Nach diesen Homogenatpools wurden die Kalibrierproben aus rekombinantem CYP3A4 aufgetragen. Bei jedem Probanden konnte eine Zunahme der CYP3A4 Expression unter Rifampicineinnahme nachgewiesen werden.

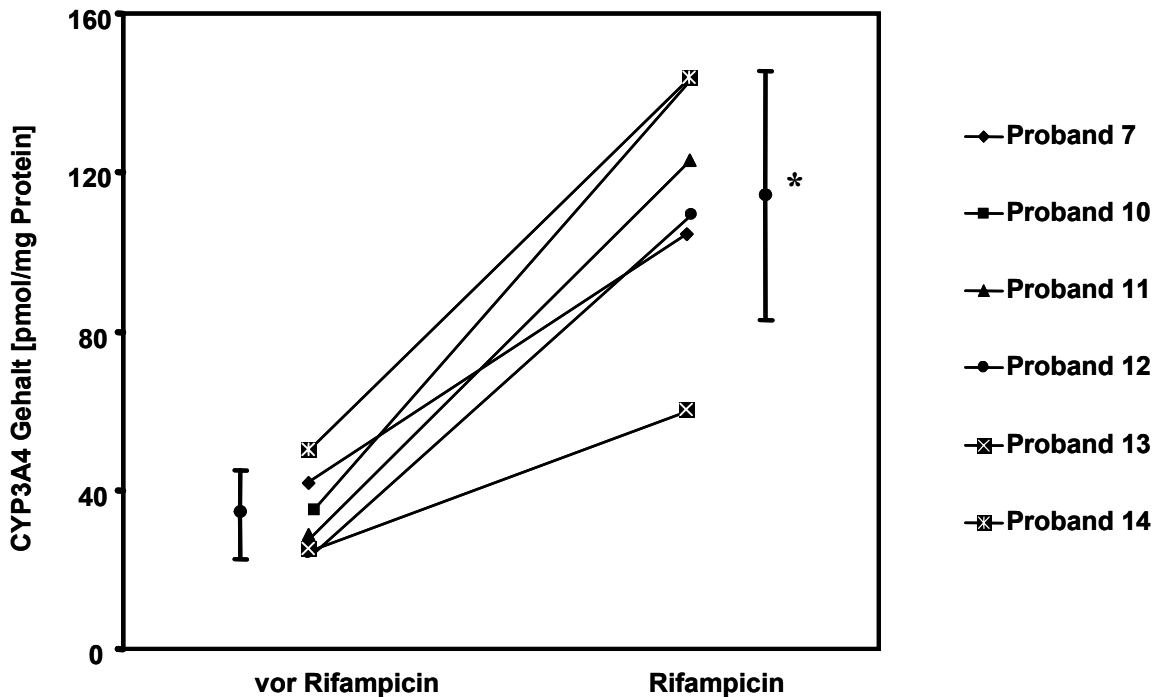


Abbildung 15 Zunahme der CYP3A4 Expression in abgeschilferten Enterozyten von sechs Probanden nach Rifampicineinnahme. Proband 12 zeigte die stärkste Induktion von CYP3A4 im Vergleich zu allen weiteren untersuchten Probanden. Die Expression von CYP3A4 nahm von  $34,13 \pm 10,74$  auf  $113,86 \pm 31,05$  pmol / mg Protein zu. \* Die Zunahme der CYP3A4 Expression war signifikant ( $p= 0,0007$ ).

#### 5.1.4.4 Cytochrom P450 2D6

Mit Immunoblotanalyse wurde der Einfluss von Rifampicin auf die CYP2D6 Expression in abgeschilferten Enterozyten von sechs Probanden untersucht. Eine nicht signifikante, durchschnittliche Zunahme um 63 % wurde mit der Untersuchung nachgewiesen. In Abbildung 16 ist die Immunoblotanalyse von CYP2D6 gezeigt. Die mittlere Expression von CYP2D6 änderte sich während Rifampicineinnahme von  $0,16 \pm 0,13$  pmol / mg Protein auf  $0,26 \pm 0,23$  pmol / mg Protein. Dieser Effekt war vor allem auf die relativ ausgeprägte Induktion bei Proband 12 zurückzuführen, der sich bei entsprechenden Wiederholungsmessungen ähnlich verhielt. Da Proband 7 für CYP2D6 den Genotyp \*4 / \*4 hatte und damit „poor metabolizer“ war (siehe 5.1.2), wurden die Ergebnisse dieses Probanden nicht in die Auswertung miteinbezogen. Die Änderung der CYP2D6 Proteinexpression der einzelnen Probanden ist in Abbildung 17 dargestellt.

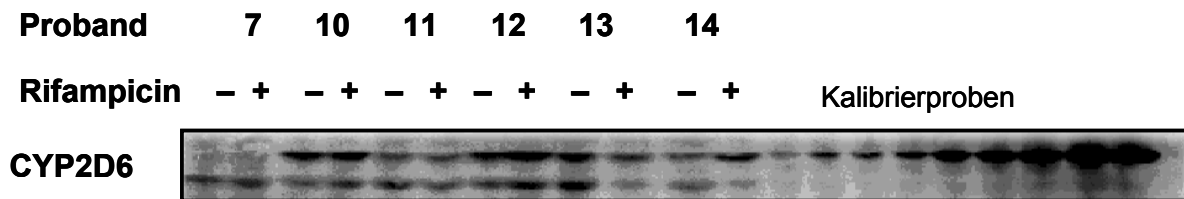


Abbildung 16 Immunoblotanalyse von CYP2D6 in abgeschilferten Enterozyten von sechs Probanden vor und während Rifampicineinnahme. Zur Herstellung der aufzutragenden Proben wurden die Enterozytenhomogenate von fünf Perfusatfraktionen gepoolt. Nach diesen Homogenatpools wurden die Kalibrierproben aus rekombinatem CYP2D6 aufgetragen. In Spur 1 und 2 konnte keine CYP2D6 Expression nachgewiesen werden, weil der Proband ein „poor metabolizer“ mit dem Genotyp \*4 / \*4 ist. Dieser Proband wurde in die Auswertung nicht miteinbezogen.

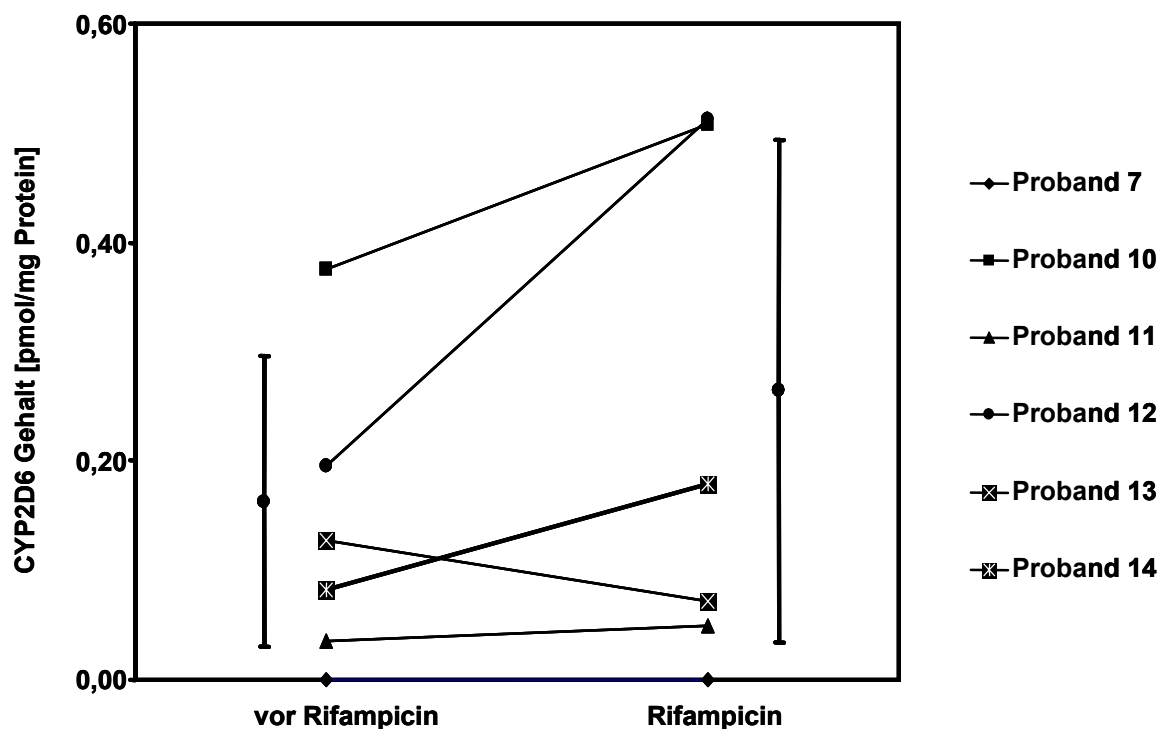


Abbildung 17 Die fünf CYP2D6-exprimierenden Probanden wiesen vor sowie während der Rifampicineinnahme eine starke Variabilität in der Proteinexpression auf. Proband 7 („poor metabolizer“, Genotyp: \*4 / \*4) ist auf der X-Achse dargestellt, da keine Proteinexpression nachweisbar war. Eine nicht signifikante Zunahme um 63 % war im Mittel nachweisbar. Die Expression änderte sich durchschnittlich von  $0,16 \pm 0,13$  pmol / mg Protein auf  $0,26 \pm 0,23$  pmol / mg Protein.

#### 5.1.4.5 Vergleich des Ausmaßes der Induktion der untersuchten Cytochrom P450 Enzyme

Weiterhin wurden die Induktionsfaktoren für die verschiedenen Cytochrom P450 Enzyme miteinander korreliert, um auf mögliche Gemeinsamkeiten im Induktionsmechanismus zu schließen. Es zeigte sich eine gerade signifikante Korrelation zwischen den CYP2C9 und CYP3A4 Induktionsfaktoren ( $p=0,05$ ). In Tabelle 9 sind alle Induktionsfaktoren der untersuchten Probanden für CYP2C8, CYP2C9 und CYP3A4 sowie für CYP3A4 mRNA gezeigt.

#### 5.1.4.6 Villin und Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase

Wie im Abschnitt 4.2.5.5 beschrieben, wurde das enterozytenspezifische Protein Villin und das Protein GAPDH detektiert. Beide Proteine zeigten unter Rifampicinwirkung keine Veränderung der Expression. Die Villinexpression wies in allen Proben einen Variationskoeffizienten von 22 % auf. Die GAPDH-Expression zeigte innerhalb der Proben einen Variationskoeffizienten von 33 %. Die Immunoblotanalyse von Villin und GAPDH ist in Abbildung 18 gezeigt.

### 5.2 *Intestinaler Arzneimitteltransport*

#### 5.2.1 Expression von P-Glykoprotein in abgeschilferten Enterozyten

Die Homogenate der gesammelten abgeschilferten Enterozyten wurden auf die Expression des Arzneimitteltransporters P-Glykoprotein untersucht (siehe 4.2.5.5). In den Homogenaten der abgeschilferten Enterozyten konnte mit Immunoblotanalyse P-Glykoprotein nachgewiesen werden. In Abbildung 19 ist ein Immunoblot von P-Glykoprotein in abgeschilferten Enterozyten von sechs Probanden gezeigt. Die quantitative Auswertung der P-Glykoproteinexpression ist in Tabelle 10 gezeigt.

#### 5.2.2 Expression von MRP2 in intestinalem Gewebe

In den Homogenaten und Membranfraktionen (siehe 4.2.3.1.3) von Enterozyten aus chirurgisch gewonnenen Dünndarmproben konnte MRP2 mit Immunoblotanalyse nachgewiesen werden. In den untersuchten Dünndarmproben konnte eine MRP2 Proteinexpression von  $1,84 \pm 1,04$  relativen Einheiten mit einem Variationskoeffizienten von 57 % nachgewiesen werden (siehe Tabelle 11 und Abbildung 20). Die MRP2 Expression wurde in relativen Einheiten angegeben, da der absolute MRP2 Gehalt des Kalibriermaterials (MDCKII Zellen, (Evers et al., 1998)) nicht bekannt war.

Tabelle 9 Die Induktionsfaktoren der untersuchten Probanden für CYP2C8, CYP2C9, CYP3A4 und CYP3A4 mRNA. Die Induktionsfaktoren von CYP2C9 und CYP3A4 wiesen eine gerade signifikante Korrelation auf ( $p=0,05$ ).

Proband	CYP2C8	CYP2C9	CYP3A4 mRNA	CYP3A4	CYP2D6
7	1,60	1,12	1,46	2,46	n.d.
10	1,61	1,52	1,49	4,15	1,35
11	1,76	1,38	1,93	4,34	1,39
12	2,43	1,92	1,94	4,57	2,62
13	2,07	1,13	1,45	2,42	0,57
14	2,87	1,43	5,49	2,83	2,20

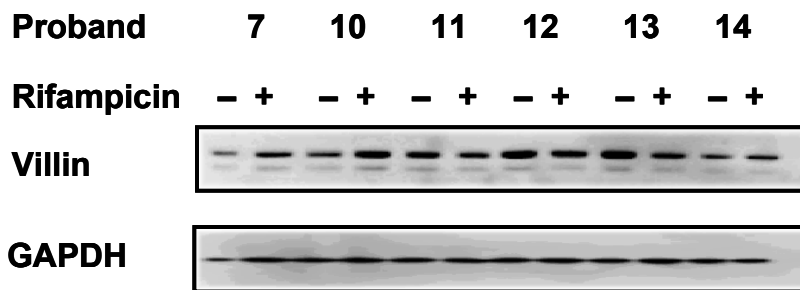


Abbildung 18 Immunoblotanalyse von Villin und GAPDH in abgeschilferten Enterozyten von sechs Probanden vor und während Rifampicineinnahme. Zur Herstellung der aufzutragenden Proben wurden die Enterozytenhomogenate von fünf Perfusatfraktionen gepoolt. Die Signale von Villin und GAPDH zeigten keine signifikanten Änderungen der Proteinexpression nach 10-tägiger Rifampicineinnahme.

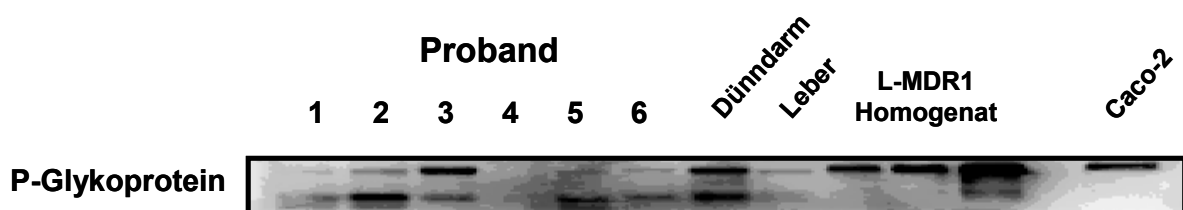


Abbildung 19 Immunoblotanalyse von P-Glykoprotein von sechs Probanden aus Homogenaten abgeschilfelter Enterozyten. 25  $\mu$ g Gesamtprotein wurden von jedem Enterozytenhomogenat verwendet. 20  $\mu$ g von fünf gepoolten Enterozyten- bzw. Leberhomogenaten (chirurgisch gewonnene Gewebeproben) wurden als Positivkontrollen verwendet. Weiterhin wurden drei Verdünnungen von L-MDR1 Zellhomogenat verwendet (von links nach rechts: 0,5  $\mu$ g, 1,0  $\mu$ g und 5  $\mu$ g) Die letzte Spur wurde mit 20  $\mu$ g Caco-2 Zellhomogenat beladen. P-Glykoprotein konnte in allen Homogenaten, mit Ausnahme von Proband 4, nachgewiesen werden. Es sind ein 170 kDa und 90 kDa-Signal sichtbar. Die Bande bei 170 kDa stellt das nicht degradierte P-Glykoprotein dar. Die 90 kDa Bande ist eine P-Glykoproteinabbauabande.

### 5.2.3 Expression von BCRP in abgeschilferten Enterozyten

Die abgeschilferten Enterozyten wurden auf die Proteinexpression von BCRP untersucht. Im Homogenat der Enterozyten konnte BCRP detektiert werden. Für diese Untersuchung wurden die Enterozyten verschiedener Sammelfractionen (siehe 4.2.1) eines Probanden verwendet. Innerhalb der Sammelfractionen variierte die BCRP Expression um 43 %. In Abbildung 21 ist die Immunoblotanalyse der verschiedenen Sammelfractionen dargestellt. Der Proband war in die klinische Studie IKP 176 eingeschlossen.

**Tabelle 10 P-Glykoproteinexpression in abgeschilferten Enterozyten. Der relative Gehalt von P-Glykoprotein ist im Verhältnis zur Expression im Enterozytenhomogenatpool aus chirurgischen Proben angegeben.**

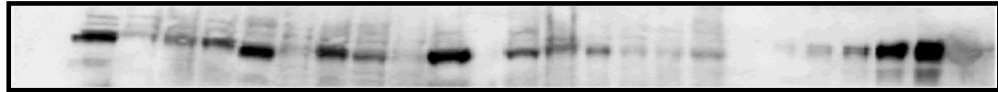
Proband	1	2	3	4	5	6	Mittelwert	Standard- abweichung
P-Glykoprotein [%]	10	65	89	0	35	35	39	33

**Tabelle 11 MRP2 Proteinexpression in Enterozytenhomogenaten aus chirurgisch gewonnenen Dünndarmproben. Als Kalibrierproben wurden Verdünnungen des Homogenates von MRP2-überexprimierenden MDCKII Zellen verwendet. Durch lineare Regression der Kalibrierproben wurde die MRP2 Expression der untersuchten Dünndarmproben errechnet. Da die absolute MRP2 Menge in den Homogenaten nicht bekannt war, wurde die Expression in relativen Einheiten zu den Verdünnungen angegeben.**

Patient	MRP2 Proteinexpression [relative Einheit]
A	3,77
C	1,08
D	1,54
E	2,11
F	3,79
G	1,09
I	2,35
L	1,58
M	1,00
O	4,04
R	0,94
S	1,63
T	1,36
U	2,52
AA	1,05
AI	1,05
AJ	1,27
AK	0,97
Mittelwert	1,84
Standardabweichung	1,04
Variationskoeffizient (%)	57

Patient A C D E F G I L M O R S TAA AI AJ AK Kalibrierproben

MRP2



$\beta$ -Actin

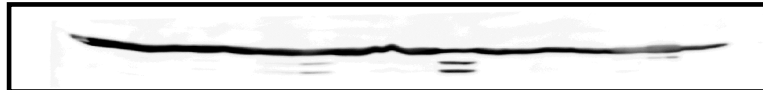


Abbildung 20 Immunoblotanalyse zum Nachweis von MRP2 und  $\beta$ -Actin aus Enterozytenhomogenaten chirurgisch gewonnener Dünndarmproben. 100  $\mu$ g Enterozytenhomogenat sind für die Analyse verwendet worden (Ausnahme Dünndarm U: 50  $\mu$ g). Als Kalibrierproben wurden Verdünnungen eines Homogenates von MRP2-überexprimierenden MDCKII Zellen verwendet. (von rechts nach links: 7,5  $\mu$ g; 5,0  $\mu$ g; 2,5  $\mu$ g; 1,0  $\mu$ g und 0,5  $\mu$ g). Die MRP2 Expression bei den 18 untersuchten Dünndarmproben zeigte einen Variationskoeffizienten von 57 %. Die Proteinexpression des housekeeping genes  $\beta$ -Actin war in den untersuchten Proben relativ konstant.

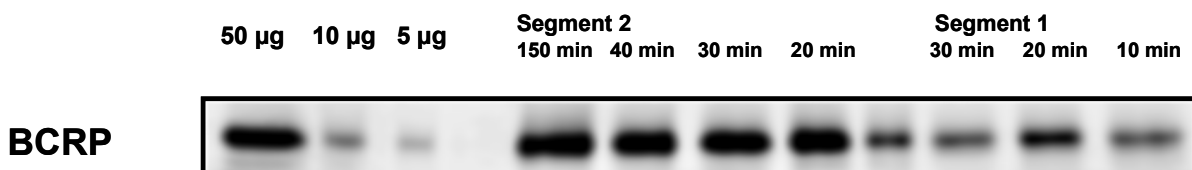


Abbildung 21 Qualitativer Nachweis der BCRP Expression in Homogenaten von abgeschilferten Enterozyten verschiedener Sammelfraktionen aus Segment 1 und Segment 2 eines Probanden. Die Spuren 1-3 sind Verdünnungen eines Homogenates (50  $\mu$ g, 10  $\mu$ g und 5  $\mu$ g). Die restlichen Spuren wurden mit 25  $\mu$ g Homogenat beladen. Die vierte Spur von rechts ist mit 25  $\mu$ g des Homogenates von Spur 1-3 beladen worden. Die Expression von BCRP ist in den abgeschilferten Enterozyten verschiedener Sammelzeitpunkte aus Segment 2 konstant, während der Nachweis von BCRP in den abgeschilferten Enterozyten aus Segment 1 leichten Schwankungen unterlag.



## 5.2.4 Einfluss von Rifampicin auf den intestinalen Arzneimitteltransport

Mit dem multiluminalen Perfusionskatheter wurde in der in klinischen Studie IKP 164 der Einfluss von Rifampicin und Chinidin auf die Pharmakokinetik von Digoxin nach i.v. Gabe untersucht. In Abschnitt „Klinische Studie IKP 164“ ist das Studiendesign beschrieben. Im Folgenden wird der Einfluss von Rifampicin auf die Expression von P-Glykoprotein und BCRP bzw. der Einfluss von Rifampicin sowie Chinidin auf die Funktion von P-Glykoprotein betrachtet.

### 5.2.4.1 P-Glykoprotein

Die Expression von P-Glykoprotein in abgeschilferten Enterozyten vor und während Rifampicineinnahme wurde mit Immunoblotanalyse untersucht. Es konnte das zu erwartende Ergebnis der P-Glykoproteininduktion unter Rifampicinwirkung nachgewiesen werden (Greiner et al., 1999). Die P-Glykoproteinexpression stieg um den Faktor  $2,48 \pm 2,22$  ( $p=0,05$ ). Der Immunoblot der P-Glykoproteinexpression vor und während Rifampicineinnahme ist in Abbildung 22 gezeigt. Die Änderung der P-Glykoproteinexpression in abgeschilferten Enterozyten ist in Abbildung 23 dargestellt.

Zusätzlich zum Einfluss von Rifampicin auf die P-Glykoproteinexpression wurde auch der Zusammenhang zwischen der Digoxinsekretion (0,5 mg i.v.) ins Darmlumen und der P-Glykoproteinexpression im Darm untersucht. Digoxin ist ein P-Glykoproteinsubstrat, dessen direkte Sekretion in den Dünndarm bei Mäusen nachgewiesen wurde (Mayer et al., 1997). Es wurde deshalb eine Korrelationsanalyse zwischen der P-Glykoproteinexpression und der AUC (area under the curve) von Digoxin im Plasma nach intravenöser Gabe durchgeführt. Zwischen der  $AUC_{iv}$  von Digoxin und der P-Glykoproteinexpression konnte eine Korrelation nachgewiesen werden ( $r_s = -0,73$ ;  $p < 0,01$ ; siehe Abbildung 24). Weiterhin konnten  $0,45 \pm 0,24$  % der intravenös applizierten Digoxindosis in einem 20 cm isoliertem Dünndarmsegment innerhalb von drei Stunden nachgewiesen werden. Unter Rifampicingabe erhöhte sich die Digoxinmenge im Perfusat um den Faktor  $2,2 \pm 2,0$ .

Wie im Abschnitt „Klinische Studie IKP 164“ beschrieben, wurde mit dem MLPC ein 20 cm Dünndarmsegment mit chinidinhaltigem Standardpuffer infundiert. Chinidin ist nicht nur ein P-Glykoproteininhibitor, sondern auch ein P-Glykoproteinsubstrat (Fromm et al., 1999). Deshalb wurde der Einfluss von Rifampicin auf die Chinidinresorption untersucht. Nach 10-tägiger Rifampicingabe zeigte sich eine signifikant höhere luminaire Chinidinkonzentration (dosiskorrigiert) ( $1,51 \pm 0,76$  vs.  $2,64 \pm 1,00 \mu\text{g} \times \text{h} \times \text{ml}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ ;  $p < 0,05$ ; siehe Abbildung 25). Dementsprechend nahm die Plasma  $AUC_{0-3\text{h}}$  (dosiskorrigiert) von Chinidin unter Rifampicingabe signifikant ab ( $3,58 \pm 1,98$  vs.  $0,66 \pm 0,37 \text{ ng} \times \text{h} \times \text{ml}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ ;  $p < 0,01$ ; siehe Abbildung 25). Diese Ergebnisse weisen auf die

Bedeutung des intestinalen P-Glykoproteins für die Chinidinresorption hin. Deshalb wurde die intraluminale bzw. Plasma  $AUC_{0-3h}$  (dosiskorrigiert) von Chinidin mit der P-Glykoproteinexpression aus den gleichzeitig gesammelten abgeschilferten Enterozyten korreliert. Für die intraluminale  $AUC_{0-3h}$  von Chinidin konnte eine positive Korrelation mit der intestinalen P-Glykoproteinexpression bestätigt werden ( $r_s = 0,55$ ;  $p < 0,05$ ; siehe Abbildung 26). Die Plasma  $AUC_{0-3h}$  von Chinidin korrelierte negativ mit der intestinalen P-Glykoproteinexpression ( $r_s = -0,67$ ;  $p < 0,01$ ; Abbildung 26). An dieser Stelle soll auch erwähnt werden, dass die Plasma  $AUC_{0-3h}$  von Chinidin nicht nur von der P-Glykoproteinexpression in abgeschilferten Enterozyten beeinflusst wurde. Da Chinidin auch ein CYP3A4 Substrat ist, korrelierte die  $AUC_{0-3h}$  (dosiskorrigiert) von Chinidin auch mit dem CYP3A4 Gehalt in den abgeschilferten Enterozyten ( $r_s = -0,76$ ;  $p < 0,01$ ).

#### 5.2.4.2 BCRP

Der Einfluss von Rifampicin auf die Expression von BCRP wurde mittels Immunoblotanalyse untersucht. Dazu wurden Membranen „gestrippt“ (siehe 4.2.5.6) und das BCRP nach Inkubation mit den entsprechenden Antikörpern detektiert. Es konnte bei den sechs analysierten Probanden keine signifikante Veränderung der BCRP-Expression nachgewiesen werden. Durchschnittlich nahm die BCRP-Expression bei den sechs untersuchten Proben um den Faktor 0,76 ab. In Abbildung 27 ist ein Immunoblot von BCRP gezeigt.

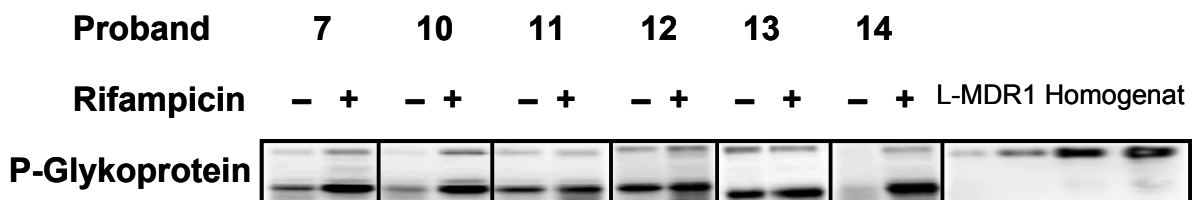


Abbildung 22 Immunoblotanalyse von P-Glykoprotein in abgeschilferten Enterozyten von sechs Probanden vor und während Rifampicineinnahme. Zur Herstellung der aufzutragenden Proben wurden die Enterozytenhomogenate von fünf Perfusatfraktionen gepoolt. Nach den Proben wurden die Kalibrierproben aus L-MDR1 Homogenat (von rechts nach links: 5,0  $\mu$ g; 2,5  $\mu$ g; 1,0  $\mu$ g und 0,5  $\mu$ g Gesamtprotein) aufgetragen. Bei der P-Glykoproteindetektion mit Immunoblotanalyse sind zwei Signalbanden zu erkennen. Die obere Bande ist das P-Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 170 kDa, die untere Bande stellt eine Degradationsbande im Bereich von 120-90 kDa dar.

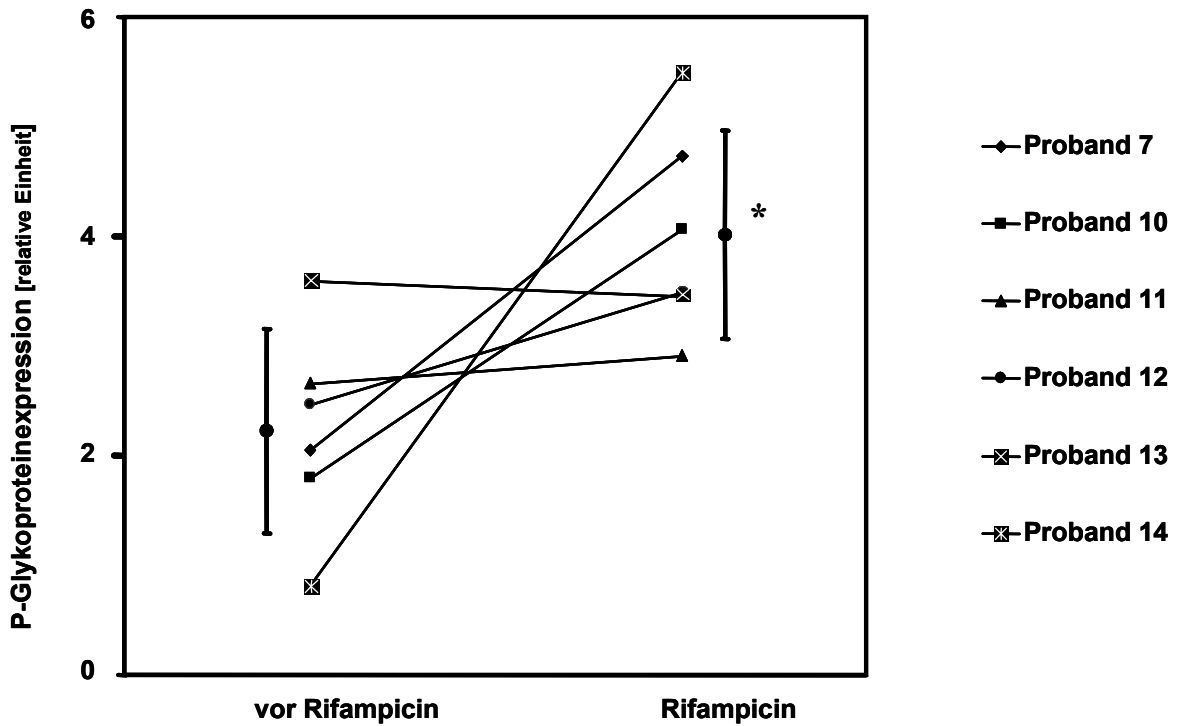


Abbildung 23 Zunahme der P-Glykoproteinexpression in abgeschilferten Enterozyten bei gesunden freiwilligen Probanden nach Rifampicineinnahme. Proband 14 zeigte die stärkste Induktion von P-Glykoprotein im Vergleich zu allen weiteren untersuchten Probanden. Bei Proband 13 war keine Induktion der Expression durch Rifampicin erkennbar. Die Expression von P-Glykoprotein nahm von  $2,22 \pm 0,93$  auf  $4,01 \pm 0,95$  relativen Einheiten zu. Die relativen Einheiten wurden in Bezug auf die Kalibrierkurve des L-MDR1 Homogenates berechnet. \*  $p \leq 0,05$

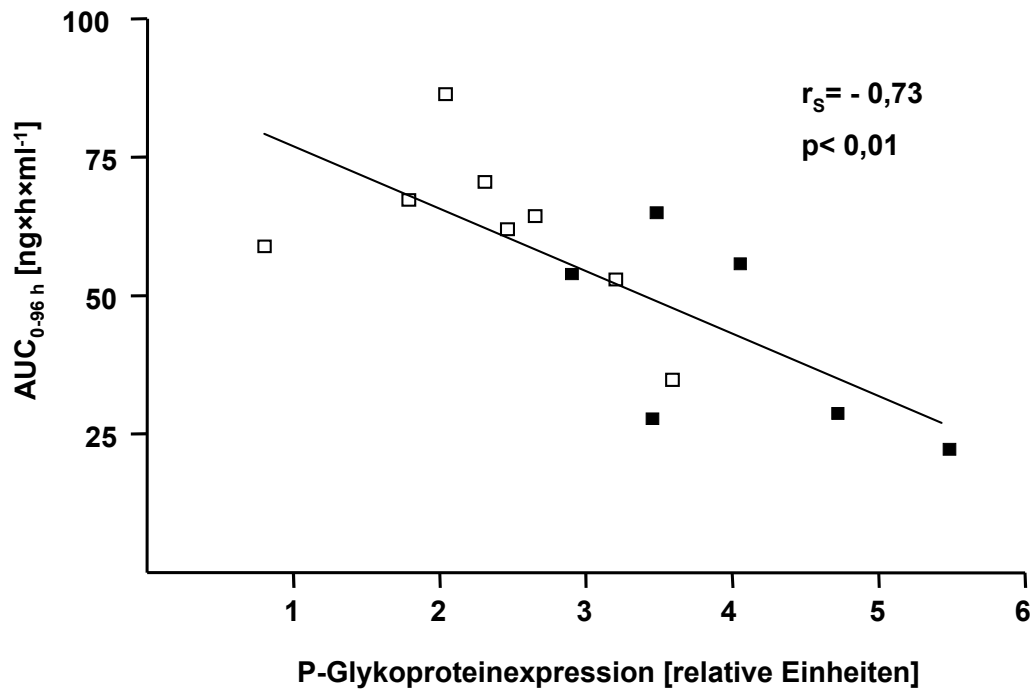


Abbildung 24 Korrelation zwischen der Plasma  $AUC_{0-96 h}$  von intravenös appliziertem Digoxin (1 mg) und der P-Glykoproteinexpression in abgeschilferten Enterozyten, gesammelt mit dem MLPC. □: vor Rifampicineinnahme, ■ nach 10-tägiger Rifampicingabe (600 mg / Tag).

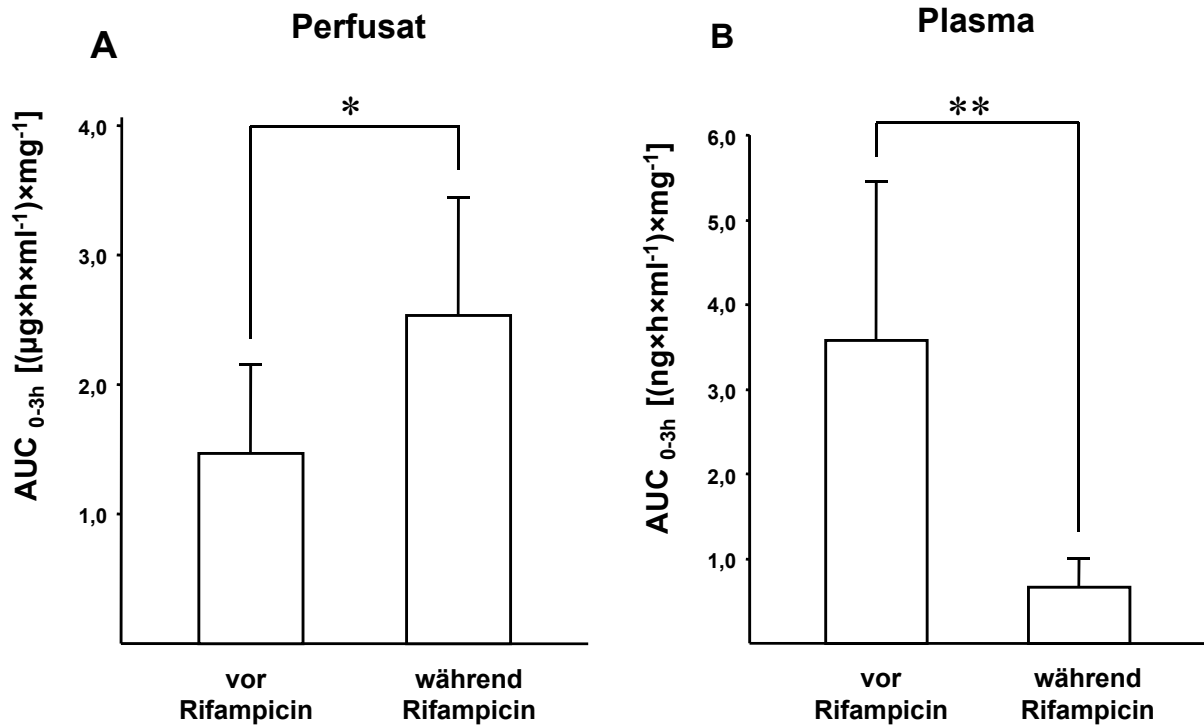


Abbildung 25 Dosiskorrigierte intraluminale (A) und Plasma (B) AUC<sub>0-3h</sub> von Chinidin vor und während Rifampicingabe \* p < 0,05; \*\*p < 0,01

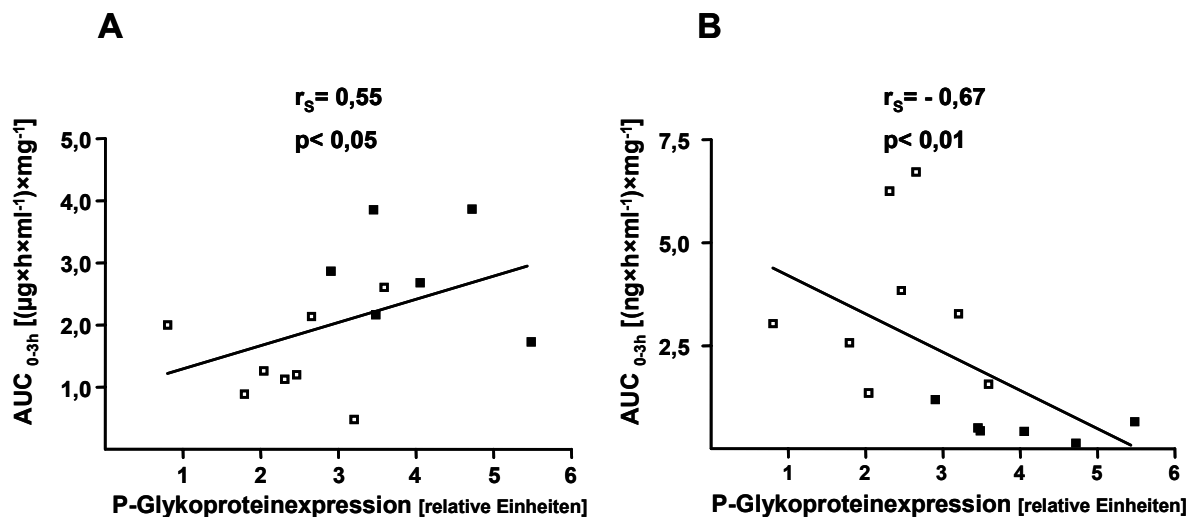


Abbildung 26 Korrelation zwischen der dosiskorrigierten intraluminale (A) und Plasma (B) AUC<sub>0-3h</sub> von Chinidin mit der P-Glykoproteinexpression in abgeschilferten Enterozyten nach intraluminale Applikation von Chinidin in ein 20 cm Dünndarmsegment. □: vor Rifampicineinnahme, ■: nach 10-tägiger Rifampicingabe (600 mg / Tag).

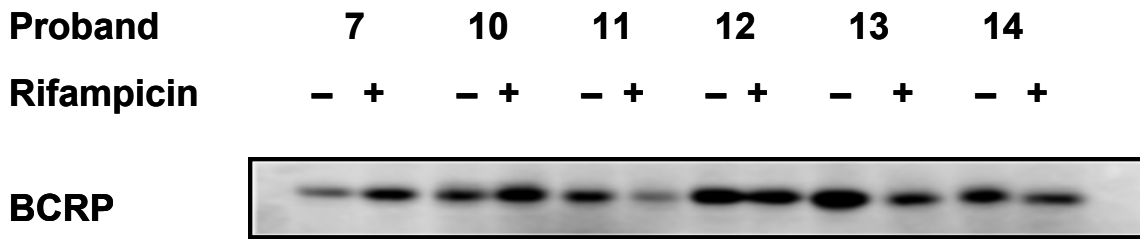


Abbildung 27 Immunoblotanalyse von BCRP in abgeschilferten Enterozyten von sechs Probanden vor und während Rifampicineinnahme. Zur Herstellung der aufzutragenden Proben wurden die Enterozytenhomogenate von fünf Perfusatfraktionen gepoolt. Bei den sechs untersuchten Proben war keine einheitliche Änderung der BCRP-Expression unter Rifampicinwirkung zu erkennen.

### 5.2.5 Vergleich der MRP2-Expression in intestinalem und hepatischem Gewebe

Mit der Gewebesammlung (siehe 4.2.3), bei welcher duodenales und hepatisches Gewebe von einem Patienten gesammelt wurden, können vergleichende Expressionsanalysen zwischen den beiden Geweben für Proteine und mRNA durchgeführt werden. Für die Analyse von MRP2 in Dünndarm und Leber wurde die mRNA-Expression mit quantitativer RT-PCR und die Proteinexpression mit Immunoblotanalyse untersucht.

#### 5.2.5.1 MRP2 mRNA-Expression in intestinalem und hepatischem Gewebe

Das gesammelte Probenmaterial ermöglichte eine Untersuchung auf eine intraindividuelle Koregulation von MRP2 in intestinalem und hepatischem Gewebe. Wie in „Kalibrierproben für quantitative RT-PCR“ beschrieben wurden als Kalibriermaterial für MRP2 cDNA Verdünnungen einer Leber verwendet. Die MRP2 mRNA-Expression im Dünndarm wurde auf die enterozytenspezifische Villin mRNA-Expression normalisiert. Die MRP2 mRNA-Expression in der Leber wurde auf die  $\beta$ -Actin mRNA-Expression normalisiert. Die MRP2 mRNA-Analyse in Dünndarm und Leber von 23 Gewebepaaren zeigte keine Korrelation zwischen Dünndarm und Leber. In Abbildung 28 sind die MRP2 mRNA-Expressionen der jeweiligen Dünndarm- und Leberpaare aus einem Patient im Verhältnis zueinander dargestellt.

### 5.2.5.2 MRP2 Proteinexpression in intestinalelem und hepatischem Gewebe

Mit Immunoblotanalyse wurde die MRP2 Proteinexpression in intestinalelem und hepatischem Gewebe untersucht. Von 18 Patienten wurde die MRP2 Expression in Dünndarm und Leber untersucht. Die Analyse zeigte, dass sich die mittlere MRP2 Expression zwischen Dünndarm und Leber bei 18 untersuchten Gewebeproben nicht unterscheidet. In Dünndarm und Leber wurde eine MRP2 Expression von  $1,21 \pm 0,92$  bzw.  $1,37 \pm 0,56$  relative Einheiten / mg Protein nachgewiesen. Es konnte auch keine Korrelation der MRP2 Expression zwischen Dünndarm und Leber nachgewiesen werden. In Abbildung 29 ist die Immunoblotanalyse der Dünndarm- und Leberproben von jeweils 18 Patienten gezeigt. Weiterhin konnte bei den Dünndarmproben F, L, O, S und AJ eine leicht verlängerte Migrationsstrecke des MRP2 Proteins festgestellt werden. In Abbildung 30 ist die MRP2 Expression in Dünndarm und Leber der untersuchten Patienten gezeigt.

### 5.2.5.3 Korrelation der MRP2 mRNA-Expression und der MRP2 Proteinexpression

Mit den in Abschnitt 5.2.5.1 und 5.2.5.2 gezeigten Ergebnissen wurde eine Korrelationsanalyse durchgeführt. Es wurde untersucht, ob die MRP2 mRNA-Expression mit der Proteinexpression von MRP2 in Dünndarm bzw. Leber korreliert. Im Lebergewebe konnte eine derartige Korrelation nicht nachgewiesen werden. Im Dünndarmgewebe konnte dagegen eine solche Korrelation gezeigt werden. Abhängig von der Normalisierung der MRP2 mRNA-Expressionsdaten mit Villin (siehe Abschnitt: „MRP2 mRNA-Expression in intestinalelem und hepatischem Gewebe“) zeigten sich geringfügig andere Ergebnisse. Wurden die MRP2 mRNA-Daten auf die eingesetzte Gesamt-RNA normalisiert, ergab sich eine signifikante Korrelation mit den Proteinexpressionsdaten von MRP2 ( $p= 0,004$ ;  $r= 0,74$ ). Wenn die MRP2 mRNA-Daten auf Villin normalisiert wurden, ergab sich eine etwas schwächere Korrelation mit den Proteinexpressionsdaten ( $p= 0,064$ ;  $r= 0,53$ ).

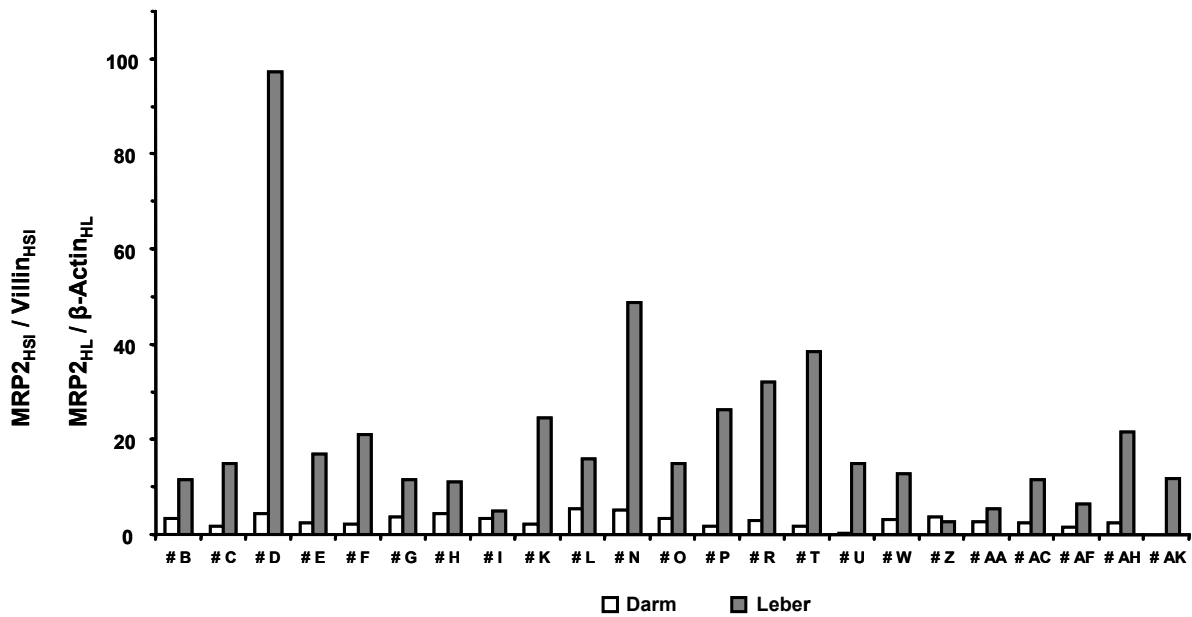


Abbildung 28 MRP2 mRNA-Expressionsanalyse mit quantitativer RT-PCR. Für die MRP2 und Villin mRNA-Untersuchung wurden die Mengen an cDNA, welche 20 ng eingesetzter Gesamt-RNA für die cDNA Synthese entsprechen, genutzt. Für die β-Actin Detektion wurden 2 ng Gesamt-RNA, welche für die cDNA eingesetzt wurde, verwendet. Die MRP2 mRNA-Expression im Dünndarm wies bei den untersuchten Patienten einen Variationskoeffizienten von 43 % auf. Die β-Actin mRNA-Expression in den untersuchten Lebern der 23 Patienten streute mit einem Variationskoeffizienten von 96 % sehr stark. Die MRP2 mRNA-Expression in der Leber von Patient D zeigte einen deutlich, im Vergleich zu allen weiteren untersuchten Lebern und Därmen, erhöhten Wert. Die Expression der MRP2 mRNA in der Leber D war im Vergleich zu den anderen Lebern ohne β-Actin Normalisierung am höchsten. Die β-Actin Werte der Leber D befanden sich im Normbereich.

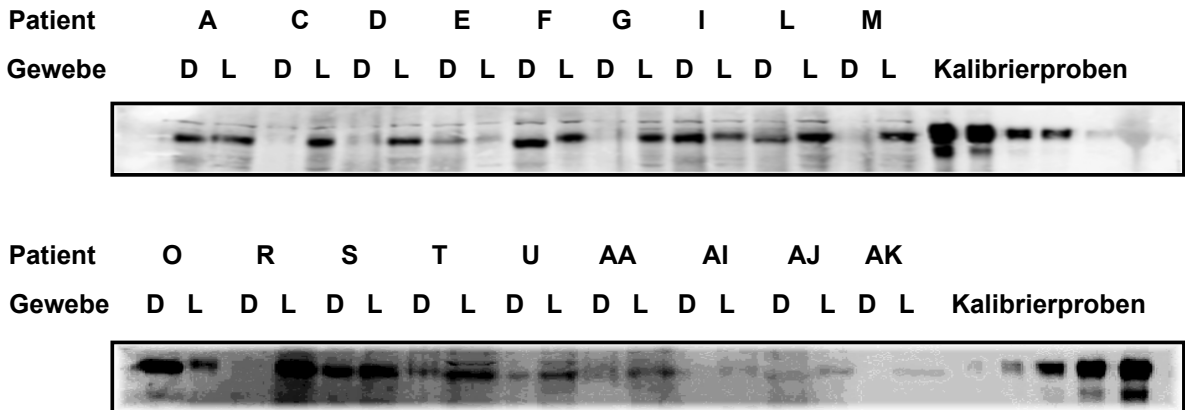
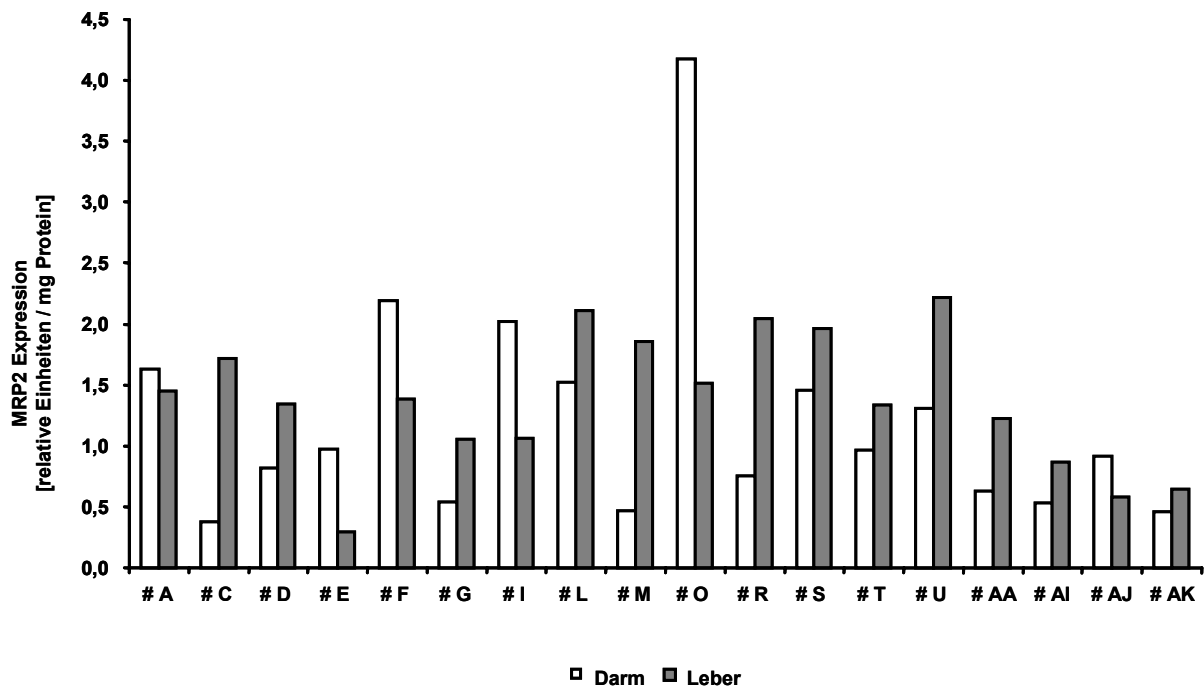


Abbildung 29 Immunoblotanalyse von MRP2 in Dünndarm- und Leberhomogenaten von jeweils 18 Patienten. Für die Untersuchung wurden 100 µg Gesamtprotein der Homogenate verwendet (außer bei Patient U: 50 µg). Die Proben sind entsprechend der Patientencodierung von links nach rechts aufgetragen (A-AK), wobei zuerst das Dünndarmhomogenat (D) und dann das Leberhomogenat (L) aufgetragen wurde. Als Kalibrierproben wurden Verdünnungen eines Homogenates MRP2-überexprimierender MDCKII Zellen aufgetragen (7,5 µg; 5,0 µg; 2,5 µg; 1,0 µg; 0,5 µg). MRP2 ist in den Dünndarmproben C, M, R und AK nicht nachweisbar. Im Durchschnitt konnte kein Unterschied zwischen Dünndarm und Leber in der Expression von MRP2 der 18 untersuchten Proben festgestellt werden. Weiterhin konnte bei den Dünndarmproben F, L, O, S und AJ eine leicht verlängerte Migrationsstrecke des MRP2 Proteins festgestellt werden.



**Abbildung 30** Proteinexpression von MRP2 in Dünndarm- und Leberhomogenaten vom selben Patienten. Die MRP2 Expression ist in relativen Einheiten / mg Protein angegeben. Die relative Einheit wurde in Bezug auf das verwendete Kalibriermaterial (MRP2-überexprimierender MDCKII Zellen) errechnet. Durchschnittlich zeigten sich keine Unterschiede zwischen der MRP2 Expression in Dünndarm und Leber. In Dünndarm und Leber wurde eine MRP2 Expression von  $1,21 \pm 0,92$  bzw.  $1,37 \pm 0,56$  relative Einheiten / mg Protein nachgewiesen.



## 6 Diskussion

### 6.1 *Intestinaler Arzneimittelmetabolismus*

#### 6.1.1 Charakterisierung von humanen abgeschilferten Enterozyten

Mit dem multiluminalen Perfusionskatheter konnte in einem Zeitraum von zwei Stunden eine große Menge an Zellen aus einem 20 cm Dünndarmsegment gesammelt werden ( $56,2 \times 10^6$  Zellen). Der Gesamtproteingehalt zeigt, dass im Vergleich zu einer Duodenalbiopsie sehr viel mehr Protein gewonnen werden kann. Aus der FACS-Analyse wurde ersichtlich, dass der Hauptteil der gesammelten Zellen Villin-positiv ist, d.h. es sich um Enterozyten handelt. Es ist bekannt, dass CD45-positive Leukozyten in geringen Mengen in Perfusaten vorkommen (Ahrenstedt et al., 1991). Da der Anteil an CD45-positiven Leukozyten in der gesammelten Zellpopulation nur sehr gering war, können die gesammelten Zellen als nahezu reine Enterozytenpopulation angesehen werden. Die Untersuchung der Vitalität der gesammelten Enterozyten zeigte, dass sich nur ein geringer Anteil der Zellen in der Apoptose befindet. Der Hauptanteil der gesammelten Zellen waren abgeschilferte, vitale Enterozyten. Dieser Befund unterscheidet sich von der bisher bekannten Annahme, dass abgeschilferte Zellen aus dem Duodenum in der Regel apoptotisch sind (Shibahara et al., 1995). Diese Ergebnisse resultieren möglicherweise aus den experimentellen Bedingungen während der Enterozytensammlung, da apoptoseinduzierende Faktoren wie z. B. Gallensäuren durch Spülung der Segmente nur in geringen Konzentrationen im 20 cm isolierten Dünndarmsegment vorhanden waren. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass mit dem MLPC reine Enterozyten gewonnen werden können. Die abgeschilferten Enterozyten stellen einen entscheidenden Fortschritt für Untersuchungen zum intestinalen Arzneimittelmetabolismus und –transport dar, weil sie einerseits sehr gut für Expressionsanalysen von arzneimittelmetabolisierenden Enzymen und Arzneimitteltransporter verwendet werden können. Aufgrund dieser Tatsache können auch pharmakokinetische Parameter von Arzneimitteln, die während einer Studie mit dem MLPC verabreicht werden, mit der Expression von Enzymen und Transportern in den abgeschilferten Enterozyten in Verbindung gebracht werden, und somit wichtige Aussagen über Eliminationsmechanismen getroffen werden.

#### 6.1.2 Expression von Cytochrom P450 Enzymen in abgeschilferten Enterozyten

Der Nachweis von CYP3A4 mRNA in abgeschilferten Enterozyten stimmt mit den Ergebnissen früherer Untersuchungen aus intestinalen Biopsien von Lown (Lown et al.,

1994) und Kivistö (Kivistö et al., 1996) überein. Auch mRNA von weiteren Cytochrom P450 Enzymen (CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18, CYP2C19 und CYP2D6) und P-Glykoprotein (Dr. E.-U. Griese, nicht publizierte Daten) konnte nachgewiesen werden. Die Gesamtmenge an RNA, welche aus abgeschilferten Enterozyten isoliert wurde, ist im Vergleich um das 8-fache geringer als die Menge aus Mukosapräparationen von chirurgisch gewonnenen Darmproben (nicht gezeigte Daten). Eine mögliche Ursache hierfür könnte die Veränderung des Ausmaßes der RNA und Proteinsynthese in den Enterozyten entlang der Krypten-Villus-Achse sein. Am Beispiel der Sucroseisomaltase wurde nachgewiesen, dass die mRNA von der Krypte bis zur Villusmitte zunimmt und von der Villusmitte zur Villusspitze abnimmt (Traber et al., 1992). Im Gegensatz dazu wurde für verschiedene Transportproteine und Enzyme eine Zunahme der Proteinexpression von der Krypte bis zur Villusspitze gezeigt (Gibson et al., 1998; Kolars et al., 1994; Mottino et al., 2000). Da der Hauptteil der abgeschilferten Enterozyten von der Villusspitze kommt, kann postuliert werden, dass diese Zellen aufgrund ihres Differenzierungsgrades eine geringere mRNA Menge aufweisen, womit der geringe Gehalt an Gesamt-RNA in den abgeschilferten Enterozyten erklärt werden kann. Die Proteinexpression von CYP2C8, CYP2C9, CYP2D6 und CYP3A4 konnte in den abgeschilferten Enterozyten nachgewiesen werden. Die CYP2C8 Proteinexpression wurde damit erstmals im Dünndarm des Menschen nachgewiesen. Die Proteinexpression von CYP2C9, CYP2D6 und CYP3A4 in abgeschilferten Enterozyten ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen früherer Untersuchungen (Kolars et al., 1994; Madani et al., 1999; von Richter, 2000). Die geringe Variabilität des CYP3A4 Gehaltes der gesammelten Enterozyten innerhalb einer Sammelperiode bei einem Probanden zeigt die gute, konstante Qualität der gewonnenen Zellen während einer Katheterintubation. Dies bietet in Zukunft die Möglichkeit, Veränderungen in der Expression von Enzymen, die innerhalb kurzer Zeiträume auftreten, beobachten zu können, wie sie zum Beispiel beim CYP3A4 durch Grapefruitsaft hervorgerufen werden (Lown et al., 1997). Der Nachweis von Villin mittels Immunoblotanalyse in den Homogenaten der abgeschilferten Zellen bestätigte die Ergebnisse der FACS-Analysen bezüglich des Vorhandenseins von Enterozyten in der gesammelten Zellpopulation. Die geringe Variabilität des in der Immunoblotanalyse detektierten GAPDHs bewies, dass die gesammelten Enterozyten nur gering mit extrazellulären Proteinen kontaminiert waren. Dies ist ein weiteres Qualitätsmerkmal, das die Überlegenheit der mit dem MLPC gewonnenen, abgeschilferten Enterozyten gegenüber herkömmlichen Duodenalbiopsien demonstriert.

### 6.1.3 Aktivität von Cytochrom P450 Enzymen in abgeschilferten Enterozyten

Cytochrom P450 3A4 katalysiert die Umsetzung von Verapamil zu den Hauptmetaboliten D-617 und Norverapamil. Die zu erwartende Korrelation zwischen der Expression von CYP3A4 in den abgeschilferten Enterozyten und der Metabolitenbildung, welche bereits von Kroemer et al. (Kroemer et al., 1993) in der Leber gefunden wurde, konnte nun auch für Dünndarmproben gezeigt werden. Im Dünndarm ist CYP3A4, welches in der Leber nahezu ausschließlich die Bildung der Hauptmetaboliten D-617 und Norverapamil katalysiert (Kroemer et al., 1993), auch an der Bildung dieser Metaboliten beteiligt. Die fehlende Korrelation zwischen dem Metabolit D-703 und der Proteinexpression von CYP2C8 deutet darauf hin, dass ein weiteres, noch nicht charakterisiertes Enzym an der Bildung der Metaboliten im Dünndarm beteiligt sein muss, denn in der Leber korrelierte die Bildung von D-703 mit dem CYP2C8 Gehalt (von Richter, 2000). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Bildung von D-702 und D-703 in humanen Lebermikrosomen durch einen inhibitorischen Antikörper gegen CYP2C gehemmt werden konnte, wodurch die Beteiligung dieser Enzyme am Metabolismus von Verapamil nachgewiesen wurde (Busse et al., 1995). Auch das Verhältnis der Bildungsraten von D-702 und D-703 unterschied sich zwischen Leber und Dünndarm. In Lebermikrosomen wurde eine geringere Bildung von D-702 im Vergleich zu D-703 nachgewiesen (Busse et al., 1995). Dagegen war die D-702 Bildungsrate im Vergleich zu D-703 in abgeschilferten Enterozytenhomogenaten höher, was die Vermutung der Beteiligung eines noch nicht charakterisierten Enzymes bestärkt. Die Korrelation zwischen der Metabolitenbildung von D-617 und Norverapamil bzw. D-702 und 703 gibt einen Hinweis, dass die Bildungen der entsprechenden Metabolite im Dünndarm durch die selben Cytochrom P450 Enzyme katalysiert wird. In Inhibitionsversuchen zeigte sich, dass der Metabolit Norverapamil seine eigene Bildung im Sinne einer Produkthemmung in bereits relativ geringen Konzentrationen beeinflusst. Solche geringen Konzentrationen an Norverapamil (5 µM-12 µM) wurden in einer Studie mit dem multiluminalen Perfusionskatheter (Dr. O. von Richter, nicht publizierte Daten) nach „oralen“ Verapamilgabe über der Katheter in den Perfusaten nachgewiesen. Aus früheren Untersuchungen ist gut bekannt, dass Verapamil einen inhibierenden Effekt auf die Aktivität von CYP3A4 hat (Ma et al., 2000). *In vivo* wird der inhibitorische Effekt bei Verapamilgabe auf CYP3A4 also sowohl durch Verapamil selbst, als auch durch den Primärmetaboliten Norverapamil vermittelt.

#### 6.1.4 Einfluss von Rifampicin auf den intestinalen Arzneimittelmetabolismus

Die Induktion der Proteinexpression von CYP3A4 im Dünndarm durch Rifampicin wurde von Kolars (Kolars et al., 1992) mit immunhistochemischen Methoden nachgewiesen. In dieser Studie wurde keine Quantifizierung der Induktion vorgenommen. In Übereinstimmung mit Kolars et al. (Kolars et al., 1992) wurde in der vorliegenden Arbeit nach 10 Tagen Rifampicineinnahme (600 mg / d) eine deutliche Zunahme der Proteinexpression von CYP3A4 in abgeschilferten Enterozyten mit Immunoblotanalyse nachgewiesen. Bei der Interpretation dieser Ergebnisse muss beachtet werden, dass die abgeschilferten Enterozyten einen hohen Anteil an ausdifferenzierten Zellen enthalten, welche sich hauptsächlich im oberen Bereich eines Darmvillus befinden und die für den Arzneimittelmetabolismus relevanten Zellen darstellen. Das Ausmaß der CYP3A4 Induktion in abgeschilferten Enterozyten war in guter Übereinstimmung mit einer Studie von Greiner (Greiner et al., 1999), in welcher eine 4,4-fache CYP3A Induktion in Duodenalbiopsien mittels Westernblot bestimmt wurde. Der Einfluss von Rifampicin auf den prähepatischen Metabolismus wurde bereits für das Antiarrhythmikum Verapamil *in vivo* gezeigt (Fromm et al., 1996). In dieser Studie wurde ein unterschiedliches Induktionsausmaß des intestinalen und hepatischen Verapamilmetabolismus durch Rifampicin gezeigt. Die Induktion von CYP3A4 in den abgeschilferten Enterozyten steht somit in Übereinstimmung zu den bisher publizierten Daten. Die beobachtete CYP3A4 mRNA Induktion in den abgeschilferten Enterozyten durch Rifampicin ist geringer als die von Kolars et al. gefundene fünf- bis achtfache Induktion in Duodenalbiopsien (Kolars et al., 1992). Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass zwei verschiedene Gewebepreparationen bei den Untersuchungen verwendet wurden. Weiterhin könnte auch die verwendete Analysenmethode der CYP3A4 mRNA für diesen Unterschied verantwortlich sein. Kolars et. al. bestimmten die CYP3A4 mRNA mittels Northern Blot, wohingegen in dieser Arbeit die mRNA der abgeschilferten Enterozyten mit quantitativer Real Time-PCR gemessen wurde. Die Normalisierung des CYP3A4 mRNA Gehaltes durch zwei verschiedene Gene ergab bei Kolars et. al. unterschiedliche Induktionsfaktoren. In der zitierten Studie wurden die Sucrase-Isomaltase und FABP (fatty acid binding protein) zum Normalisieren verwendet, dagegen wurde der CYP3A4 mRNA Gehalt bei den Enterozyten auf  $\beta$ -Actin bezogen. Die Normalisierung mit der Sucrase-Isomaltase und dem FABP ergab eine 5- bzw. 8-fache Induktion der CYP3A4 mRNA. Trotz des quantitativen Unterschiedes zwischen den beiden Untersuchungen konnte die Induktion in den abgeschilferten Enterozyten auf transkriptioneller Ebene nachgewiesen werden. Die funktionelle Charakterisierung von CYP3A4 durch *in vitro* Inkubationsversuche mit Homogenaten abgeschilfelter Enterozyten zeigte die erwartete

Zunahme der Bildung der Verapamilmetaboliten D-617 und Norverapamil. Die nicht vorhandene Korrelation zwischen den Induktionsfaktoren der D-617 Bildung und den Induktionsfaktoren von CYP3A4 ist möglicherweise mit dem zusätzlichen Anteil von CYP1A2 an der D-617 Bildung zu erklären (Kroemer et al., 1993). Mit dieser zusätzlichen Beteiligung von CYP1A2 an der D-617 Bildung kann auch die geringere Induktion der Bildung von D-617 im Vergleich zum Norverapamil erklärt werden. Die Bedeutung der Induktion des intestinalen Arzneimittelmetabolismus durch Rifampicin konnte *in vivo* z.B. für den Calciumantagonisten Verapamil gezeigt werden (Fromm et al., 1996).

Es gibt bisher keine systematischen Untersuchungen über die Induzierbarkeit von Cytochrom P450 Enzymen in Enterozyten durch Rifampicin. Die Induktion von CYP2C8 und CYP2C9 durch Rifampicin sowie die Korrelation zwischen den Induktionsfaktoren von CYP3A4 und CYP2C9 geben einen Hinweis auf eine PXR-vermittelte Induktion. Dies ist in Übereinstimmung zu verschiedenen früheren Untersuchungen. Ein erster Hinweis auf eine PXR-Beteiligung an der Induktion von CYP2C8 und CYP2C9 durch Rifampicin wurde durch Gerbal-Chaloin gefunden (Germal-Chaloin et al., 2001). In primären Hepatozyten zeigte die CYP2C8- und CYP2C9 mRNA-Induktion durch Rifampicin (10 µM) die gleiche Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit wie die Induktion von CYP3A4 mRNA. Das deutete darauf hin, dass PXR an diesem Induktionsmechanismus beteiligt sein könnte, denn CYP3A4 wird über den Transkriptionsfaktor PXR induziert (Goodwin et al., 1999). Die Induktion von CYP2C8 und CYP2C9 konnte unabhängig in zwei weiteren Studien bestätigt werden (Rae et al., 2001; Raucy et al., 2002). In der Studie von Rae wurde die Induktion in primären Hepatozyten mittels Expressions-Arrays und RNase-Protection-assay nachgewiesen. Raucy wies die Induktion mit RNase-Protection-assay und Western Blot nach. Weitere Hinweise auf eine Beteiligung von PXR an der CYP2C8/9 Induktion durch Rifampicin wurden in einer Untersuchung von Drocourt mit humanen Hepatozyten gefunden (Drocourt et al., 2001). Es konnte gezeigt werden, dass die Calciumkanalblocker vom Nifedipintyp PXR-Liganden sind und CYP3A Enzyme induzieren. Da diese Substanzklasse in primären Hepatozyten auch CYP2C9 induzierte, stellt diese Untersuchung einen weiteren Hinweis für die PXR-Beteiligung an der CYP2C8/9 Induktion dar. In Untersuchungen am CYP2C9 Promotor wurden verschiedene Elemente identifiziert, welche für die Regulation von CYP2C9 von Bedeutung sind. So konnten ein GRE (glucocorticoid-responsive element), ein CAR-RE (constitutive androstane receptor-responsive element), welches ein DR4-Motiv enthält (Germal-Chaloin et al., 2002) und ein CAR-RE, welches ein DR5-Motiv (Ferguson et al., 2002) enthält, identifiziert werden. Die Bindung von PXR an die beiden CAR-Bindungsstellen (CAR-RE) konnte mittels EMSA (electrophoretic mobility shift assay) gezeigt werden, wobei eine mäßige Induktion durch PXR nur beim DR4-Element (Germal-Chaloin et al., 2002)

nachgewiesen wurde. Alle diskutierten Daten sowie die Ergebnisse dieser Arbeit weisen auf eine PXR-vermittelte Induktion von CYP2C8 und CYP2C9 durch Rifampicin hin. Dabei muss festgestellt werden, dass weitere Bindungsstellen für PXR im CYP2C8/9 Promotor, welche für die nachgewiesene Induktion von CYP2C8 und CYP2C9 zusätzlich verantwortlich sein könnten, noch nicht identifiziert wurden. In den zitierten Studien zur CYP2C8/9 Induktion wurde immer eine stärkere mRNA- bzw. Proteininduktion von CYP2C8 als von CYP2C9 beobachtet (Gerbai-Chaloin et al., 2001; Rae et al., 2001; Raucy et al., 2002). Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen diese Erkenntnisse. Dagegen war die Induktion der CYP2C8 und CYP2C9 Proteinexpression in den abgeschilferten Enterozyten geringer als in den zitierten Studien. Diese Unterschiede liegen in den experimentellen Unterschieden der Untersuchungen begründet. Die Ergebnisse mit den abgeschilferten humanen Enterozyten stellen die bisher einzigen Expressionsuntersuchungen beim Menschen dar und geben damit einen ersten Hinweis auf das Ausmaß der Induktion *in vivo*. Die funktionelle Charakterisierung von CYP2C8 durch die Bestimmung des Verapamilmetaboliten D-703 zeigte keine Veränderung unter Rifampicineinwirkung. Dies ist möglicherweise auf die schon erwähnte Tatsache, dass die Bildung von D-703 im Dünndarm durch ein noch nicht charakterisiertes Enzym katalysiert wird, zurückzuführen. Die Enzymaktivität von CYP2C9 wurde durch die Messung der Bildung des Metaboliten 4'-Hydroxydiclofenac bestimmt. Diese Zunahme der 4'-Hydroxylierung von Diclofenac in den Enterozyten steht in Übereinstimmung mit der Zunahme der Proteinexpression von CYP2C9 während Rifampicineinnahme. Abschließend kann festgestellt werden, dass Rifampicin nicht nur CYP3A4, sondern auch CYP2C8 und CYP2C9 induziert. Die Konsequenzen der CYP2C9 Induktion durch Rifampicin sind schon seit längerer Zeit bekannt. In einer Studie von Zilly et al. konnte 1977 nachgewiesen werden, dass es bei Patienten mit Leberzirrhose bzw. Cholestase zu einer Verringerung der Halbwertszeit bzw. zu einer Zunahme der Clearance von Hexobarbital und Tolbutamid kommt (Zilly et al., 1977). Zilly postulierte, dass diese Effekte durch Induktion des Arzneimittelstoffwechsels hervorgerufen würden, da die Plasmaeiweißbindung von Tolbutamid nicht beeinflusst wurde (Zilly et al., 1975). Heute ist bekannt, dass CYP2C9 und CYP2C19 Tolbutamid bzw. Hexobarbital verstoffwechseln und damit die Induktion von CYP2C9 und CYP2C19 für die veränderte Pharmakokinetik von Tolbutamid bzw. Hexobarbital verantwortlich war. In einer weiteren Studie wurde 1985 während der Behandlung von Tuberkulosepatienten der Einfluss von Rifampicin auf die Kinetik des CYP2C9-Substrates Phenytoin untersucht (Kay et al., 1985). Auch in diesem Fall zeigte sich eine Verringerung der Halbwertszeit bzw. Zunahme der Clearance bei einer kombinierten Gabe von Phenytoin und Rifampicin. Im Laufe der Zeit wurden weitere Interaktionen zwischen CYP2C9-Substraten und Rifampicin beobachtet. So zeigte

sich eine Abnahme der Prothrombin AUC im Plasma bei Kombination des Gerinnungshemmers Warfarin mit Rifampicin (Heimark et al., 1987). Weitere CYP2C9-Substrate, von denen bekannt ist, dass Rifampicin die Pharmakokinetik und Pharmakodynamik beeinflusst, sind die Sulfonylharnstoffe Glyburid und Glipizid (Niemi et al., 2001) und der AT<sub>1</sub>-Antagonist Losartan (Williamson et al., 1998). Aufgrund der relativ großen Anzahl von Rifampicininteraktionsstudien werden im Folgenden noch zwei interessante Studien kurz betrachtet. Nach Vorgabe der WHO wurden Leprapatienten in Nigeria täglich mit Dapson (100 mg) und Clofazimin (50 mg) sowie einmal monatlich mit Rifampicin (600 mg) behandelt. Es wurde eine Verringerung der Halbwertszeit und der Plasmakonzentration von Dapson beobachtet (Pieters et al., 1988). In einer weiteren Studie mit HIV-positiven Patienten, welche mit Trimethoprim und Sulfamethoxazol (Cotrimoxazol) zur Prophylaxe von Pneumocystis carinii- und Toxoplasmoseinfektionen behandelt wurden, zeigte sich bei gleichzeitiger Rifampicingabe zur Behandlung von Tuberkulose eine Abnahme der AUC<sub>0-24 h</sub> des CYP2C9-Substrates Trimethoprim. Das Versagen der Prophylaxe gegen Pneumocystis carinii kann aufgrund dieses Befundes nicht ausgeschlossen werden, wobei die Wirksamkeit der Prophylaxe gegen Toxoplasmoseinfektionen reduziert wurde (Ribera et al., 2001). Alle erwähnten Beispiele zeigen, dass neben CYP3A4-Substraten auch die Pharmakokinetik bzw. Pharmakodynamik von CYP2C8/9-Substraten durch Rifampicin beeinflusst werden. Mit der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Rifampicin zusätzlich zur Induktion des hepatischen Arzneimittelmetabolismus (Gerbai-Chaloin et al., 2001) auch zu einer Induktion des intestinalen Arzneimittelmetabolismus führte. Daraus kann geschlossen werden, dass bei der therapeutischen Kombination von Rifampicin mit oral applizierten Arzneimitteln, welche Substrate für CYP2C8/9 bzw. CYP3A4 sind, schon ein beträchtlicher Anteil verstärkt prähepatisch metabolisiert wird.

Der Einfluss von Rifampicin auf das polymorph exprimierte CYP2D6 wurde ebenfalls mittels der gesammelten Enterozyten untersucht. In einer Studie von Eichelbaum et al. (Eichelbaum et al., 1986) wurde eine schwache, 1,24-fache Steigerung der oralen Clearance von Spartein nach Rifampicineinnahme (600 mg / d, 8 d, n= 6) gefunden. In diese Studie waren sechs schnelle Metabolisierer (extensive metabolizer) für Spartein eingeschlossen. Die CYP2D6 Proteinexpression in den abgeschilferten Enterozyten nahm ebenfalls unter Rifampicin nicht signifikant zu. Dies ist in Übereinstimmung mit den pharmakokinetischen Daten von Eichelbaum et al. (Eichelbaum et al., 1986).

Zusätzlich zu den genannten Proteinen wurde auch der Einfluss von Rifampicin auf das enterozytenspezifische Protein Villin und das Protein GAPDH untersucht. Für diese Proteine wurde keine Änderung der Expression erwartet. Für Villin konnte in einer Studie von Greiner et al. (Greiner et al., 1999) keine Änderung der Expression nachgewiesen

werden. Diese Untersuchung wurde mit humanen Duodenalbiopsien durchgeführt. Für GAPDH gibt es keine Erkenntnisse über die Beeinflussung von Rifampicin in humanem Gewebe. Es wurde lediglich von Geick et al. (Geick et al., 2001) publiziert, dass es zu keiner Änderung der GAPDH mRNA Expression unter Rifampicinbehandlung in LS174T Zellen kommt. In der vorliegenden Arbeit wurde also erstmals nachgewiesen, dass es *in vivo* zu keiner Änderung der GAPDH Expression in Enterozyten unter Rifampicineinnahme kommt.

## **6.2 Intestinaler Arzneimitteltransport**

### **6.2.1 Expression von P-Glykoprotein in abgeschilferten Enterozyten**

Die apikale Expression von P-Glykoprotein in Enterozyten ist schon seit längerem bekannt (Cordon-Cardo et al., 1990; Thiebaut et al., 1987). In den abgeschilferten Enterozyten konnte die intestinale P-Glykoproteinexpression bestätigt werden. Die individuell verschieden starke P-Glykoproteinexpression in den abgeschilferten Enterozyten konnte nicht durch die von Hoffmeyer et al. beschriebene C3435T Mutation in Exon 26 (Hoffmeyer et al., 2000) erklärt werden, was auf die geringe Zahl von sechs untersuchten Probanden zurückgeführt werden kann. Ein Proband hatte den Genotyp C/C, drei Probanden den Genotyp C/T und zwei Probanden den Genotyp T/T. Die Bestimmung von P-Glykoprotein mittels Immunoblotanalyse in abgeschilferten Enterozyten bietet die Möglichkeit, die erhaltenen Expressionsdaten mit pharmakokinetischen Daten von Arzneimitteln, die in Studien mit dem MLPC untersucht werden, zu korrelieren, um somit die Bedeutung von P-Glykoprotein für die Pharmakokinetik der entsprechenden Arzneimittel zu bestimmen.

### **6.2.2 Expression von MRP2 in intestinale Gewebe**

Die Expression von MRP2 mRNA und MRP2 Protein im Dünndarm des Menschen konnte mit RT-PCR und Immunhistochemie aus humanen Biopsien nachgewiesen werden (Fromm et al., 2000). Der Nachweis von MRP2 in den Homogenaten der abgeschilferten Enterozyten mit Immunoblotanalyse war nicht möglich. Für den Nachweis von MRP2 müssen weitere Präparationsschritte von Membranfraktionen aus den Homogenaten der abgeschilferten Enterozyten durchgeführt werden. Die Expression von MRP2 Protein konnte in den Enterozytenhomogenaten chirurgisch gewonnener Darmproben nachgewiesen werden. Ob die moderate Variation der MRP2 Proteinexpression durch Mutationen oder krankheitsbedingte Faktoren bedingt ist, ist Gegenstand weiterer Analysen. Da MRP2 eine Vielzahl von endogenen (Glucuronid- Sulfat- und Glutathionkonjugate) und exogenen (Chemotherapeutika, Antibiotika und ACE-Hemmer) Substraten transportiert (Gerk et al., 2002) sollte versucht werden, Untersuchungen zur



Bedeutung von MRP2 im Weiteren auch durch die Optimierung der Sammlung von abgeschilferten Enterozyten zu ermöglichen.

### **6.2.3 Expression von BCRP in abgeschilferten Enterozyten**

Die Expression von BCRP mRNA und BCRP Protein konnte mit quantitativer RT-PCR, RNase Protectionassay und Immunoblotanalyse in intestinale Gewebe nachgewiesen werden (Jonker et al., 2000; Maliepaard et al., 2001; Taipalensuu et al., 2001). Jonker et al. zeigten die Bedeutung von BCRP für die Bioverfügbarkeit von Topotecan nach oraler Applikation im Mausmodell (Jonker et al., 2000). In Wildtyp- und P-Glykoproteindefizienten Mäusen kam es bei gleichzeitiger oraler Gabe des BCRP- und P-Glykoproteininhibitors GF120918 im Vergleich zu den entsprechenden Kontrolltieren zu einer drastischen Zunahme der Bioverfügbarkeit von Topotecan. Nach intravenöser Applikation von Topotecan und gleichzeitiger oraler Applikation des BCRP-Inhibitors GF120918 in P-Glykoproteindefizienten Mäusen konnte eine verminderte intestinale Sekretion von Topotecan im Vergleich zu den Kontrolltieren beobachtet werden. Diese Studie zeigt die Bedeutung von BCRP für die Bioverfügbarkeit von Topotecan. Der Nachweis von BCRP in den abgeschilferten Enterozyten beweist, dass BCRP möglicherweise auch beim Menschen eine Bedeutung für Resorption bzw. Elimination bestimmter Arzneimittel hat.

### **6.2.4 Einfluss von Rifampicin auf den intestinalen Arzneimitteltransport**

Die Induktion der P-Glykoprotein- und MRP2-Expression durch Rifampicin konnte in humanen Biopsieproben nachgewiesen werden (Fromm et al., 2000; Greiner et al., 1999). Da abgeschilferte Enterozyten für die Detektion von P-Glykoprotein genutzt werden können (Abschnitt: 6.2.1), wurde die P-Glykoproteinexpression unter Rifampicineinnahme (10 d, 600 mg / d) in den Homogenaten der abgeschilferten Enterozyten untersucht. Es wurde eine Zunahme der P-Glykoproteinexpression mit Immunoblotanalyse nachgewiesen. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit den schon publizierten Ergebnissen (Greiner et al., 1999). Die erhöhte Digoxinsekretion ins Dünndarmlumen nach Rifampicingabe und die negative Korrelation der P-Glykoproteinexpression in den abgeschilferten Enterozyten mit der Plasma AUC von Digoxin beweisen eindeutig die Beteiligung von intestinale P-Glykoprotein an der Elimination von Digoxin im Menschen. Die Ergebnisse stehen im Einklang mit dem Nachweis der direkten intestinalen Sekretion von Digoxin in gallengangsligierten Mäusen (Mayer et al., 1996). Die Funktion von P-Glykoprotein und deren Beeinflussung durch Rifampicin konnte zusätzlich auch am Beispiel des P-Glykoproteinsubstrates (Fromm et al., 1999) Chinidin verdeutlicht werden. Die signifikant erhöhte lumenale Chinidinkonzentration unter Rifampicineinnahme wies auf eine Beeinflussung der Chinidinresorption durch P-Glykoprotein hin. Der Einfluss von P-

Glykoprotein auf die Chinidinresorption im Menschen wurde durch den direkten Zusammenhang zwischen der P-Glykoproteinexpression in abgeschilferten Enterozyten und den AUCs von Chinidin im Plasma bzw. Perfusat bestätigt. In dieser Studie konnte mittels des MLPC die Bedeutung von intestinalem P-Glykoprotein für die Digoxinelimination bzw. Chinidinresorption und deren Beeinflussung durch Rifampicin im Menschen erstmals eindeutig bewiesen werden.

Im Weiteren wurde auch die Proteinexpression von BCRP vor und während Rifampicineinnahme in den Homogenaten der abgeschilferten Enterozyten untersucht. Da sich die BCRP Proteinexpression unter Rifampicineinnahme durchschnittlich nur leicht abnahm, kann geschlossen werden, dass Rifampicin keinen Einfluss auf die intestinale BCRP Expression hat. Es ist daher auch zu vermuten, dass die Regulation der BCRP Expression nicht über den Transkriptionsfaktor PXR läuft, da dieser für die Rifampicin-vermittelte Induktion von CYP3A4 und P-Glykoprotein verantwortlich ist (Geick et al., 2001; Goodwin et al., 1999).

### **6.2.5 Vergleich der MRP2-Expression in intestinalem und hepatischem Gewebe**

Im Rahmen der Gewebesammlung wurden Darm- und Leberproben, die von demselben Patienten stammten, gesammelt. Dies ermöglichte eine Aussage über die Koregulation von MRP2 in intestinalem und hepatischem Gewebe. Aus den Ergebnissen der quantitativen RT-PCR kann geschlossen werden, dass keine Koregulation zwischen den beiden Geweben bezüglich MRP2 besteht. Das bedeutet, dass die Regulation der MRP2 Expression intraindividuell unabhängig zwischen Darm und Leber verläuft. Da für die quantitative RT-PCR keine *in vitro*-transkribierte MRP2 cRNA zur Verfügung stand, konnte keine absolute Quantifizierung der MRP2 mRNA in Darm und Leber vorgenommen werden. Damit kann auch keine vergleichende quantitative Aussage bezüglich der MRP2 Expression getroffen werden. Da kein Unterschied in der MRP2 Expression zwischen Darm und Leber zu detektieren war, kann angenommen werden, dass beide Organe an der Elimination von Fremdstoffen bzw. Metaboliten der Phase II Reaktionen beteiligt sind. Die Daten der MRP2 mRNA-Expressionsanalyse und der MRP2 Proteinexpressionsanalyse aus Darm und Leber wurden miteinander korreliert. Die nicht vorhandene Korrelation von MRP2 mRNA mit MRP2 Protein in der Leber gibt einen Hinweis auf eine komplexe Regulation auf transkriptioneller und translationeller Ebene. Im Darm zeigte sich eine Korrelation zwischen der MRP2 mRNA und MRP2 Protein. Das Ergebnis der Korrelation war jedoch abhängig von Normalisierung der MRP2 mRNA. Wenn die Daten der MRP2 mRNA auf die eingesetzte RNA Menge normalisiert wurden ergab sich eine gute Korrelation zwischen der MRP2 mRNA- und MRP2 Proteinexpression, wogegen eine Normalisierung mit der enterozytenspezifisch

exprimierten Villin mRNA eine gerade nicht signifikante Korrelation ergab. Die Korrelation der MRP2 mRNA mit MRP2 Protein im Dünndarm gibt einen Hinweis, dass die Proteinmenge von MRP2 direkt von der Menge an MRP2 mRNA abhängt. In einer Untersuchung von Kast et al. wurde die Beteiligung von FXR (**f**arnesoid **X**-activated **r**eceptor), PXR und CAR an der Regulation von MRP2 in HepG2 Zellen nachgewiesen (Kast et al., 2002). Ob für die vorhandene Korrelation zwischen MRP2 mRNA und Protein im Dünndarm hauptsächlich nur einer der genannten Transkriptionsfaktoren verantwortlich ist bzw. nur das Zusammenspiel der Faktoren diese Korrelation ermöglicht, muss Gegenstand weiterer Untersuchungen sein, um die gewebsspezifische Regulation aufzuklären und damit Aussagen über die Bedeutung der Arzneimittelresorption- und Elimination treffen zu können. Da der Grad der Korrelation von der Normalisierung auf Gesamt-RNA bzw. Villin mRNA abhängt, stellt sich die Frage ob Villin zur Normalisierung geeignet ist.

## 7 Literaturverzeichnis

- Ahrenstedt O., Knutson F., Knutson L., Krog M., Sjoberg O. and Hallgren R. (1991). "Cell recovery during segmental intestinal perfusion in healthy subjects and patients with Crohn's disease." *Gut* **32**(2): 170-3.
- Arnhold J., Mueller S., Arnold K. and Grimm E. (1991). "Chemiluminescence intensities and spectra of luminol oxidation by sodium hypochlorite in the presence of hydrogen peroxide." *J Biolumin Chemilumin* **6**(3): 189-92.
- Barbarash R. A. (1985). "Verapamil-rifampin interaction." *Drug Intell Clin Pharm* **19**(7-8): 559-60.
- Biorad (1989). Increased Transfer Efficiency Using A Discontinuous Buffer System with the Trans-Blot® Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell, Biorad Laboratories: US/EG Bulletin 2134.
- Borst P., Evers R., Kool M. and Wijnholds J. (1999). "The multidrug resistance protein family." *Biochim Biophys Acta* **1461**(2): 347-57.
- Bort R., Mace K., Boobis A., Gomez-Lechon M. J., Pfeifer A. and Castell J. (1999). "Hepatic metabolism of diclofenac: role of human CYP in the minor oxidative pathways." *Biochem Pharmacol* **58**(5): 787-96.
- Brangi M., Litman T., Ciotti M., Nishiyama K., Kohlhagen G., Takimoto C., Robey R., Pommier Y., Fojo T. and Bates S. E. (1999). "Camptothecin resistance: role of the ATP-binding cassette (ABC), mitoxantrone-resistance half-transporter (MXR), and potential for glucuronidation in MXR-expressing cells." *Cancer Res* **59**(23): 5938-46.
- Büchler M., König J., Brom M., Kartenbeck J., Spring H., Horie T. and Keppler D. (1996). "cDNA cloning of the hepatocyte canalicular isoform of the multidrug resistance protein, cMrp, reveals a novel conjugate export pump deficient in hyperbilirubinemic mutant rats." *J Biol Chem* **271**(25): 15091-8.
- Busse D., Cosme J., Beaune P., Kroemer H. K. and Eichelbaum M. (1995). "Cytochromes of the P450 2C subfamily are the major enzymes involved in the O-demethylation of verapamil in humans." *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **353**(1): 116-21.
- Buters J. T., Korzekwa K. R., Kunze K. L., Omata Y., Hardwick J. P. and Gonzalez F. J. (1994). "cDNA-directed expression of human cytochrome P450 CYP3A4 using baculovirus." *Drug Metab Dispos* **22**(5): 688-92.
- Cordon-Cardo C., O'Brien J. P., Casals D., Rittman-Grauer L., Biedler J. L., Melamed M. R. and Bertino J. R. (1989). "Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(2): 695-8.

- Cordon-Cardo C., O'Brien J. P., Boccia J., Casals D., Bertino J. R. and Melamed M. R. (1990). "Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human normal and tumor tissues." *J Histochem Cytochem* **38**(9): 1277-87.
- Doering W. (1979). "Quinidine-digoxin interaction: Pharmacokinetics, underlying mechanism and clinical implications." *N Engl J Med* **301**(8): 400-4.
- Doyle L. A., Yang W., Abruzzo L. V., Krogmann T., Gao Y., Rishi A. K. and Ross D. D. (1998). "A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(26): 15665-70.
- Drocourt L., Pascussi J. M., Assenat E., Fabre J. M., Maurel P. and Vilarem M. J. (2001). "Calcium channel modulators of the dihydropyridine family are human pregnane X receptor activators and inducers of CYP3A, CYP2B, and CYP2C in human hepatocytes." *Drug Metab Dispos* **29**(10): 1325-31.
- Edelbroek M., Horowitz M., Dent J., Sun W. M., Malbert C., Smout A. and Akkermans L. (1994). "Effects of duodenal distention on fasting and postprandial antropyloroduodenal motility in humans." *Gastroenterology* **106**(3): 583-92.
- Eichelbaum M., Mineshita S., Ohnhaus E. E. and Zekorn C. (1986). "The influence of enzyme induction on polymorphic sparteine oxidation." *Br J Clin Pharmacol* **22**(1): 49-53.
- Evers R., Kool M., van Deemter L., Janssen H., Calafat J., Oomen L. C., Paulusma C. C., Oude Elferink R. P., Baas F., Schinkel A. H. and Borst P. (1998). "Drug export activity of the human canalicular multispecific organic anion transporter in polarized kidney MDCK cells expressing cMOAT (MRP2) cDNA." *J Clin Invest* **101**(7): 1310-9.
- Ferguson S. S., LeCluyse E. L., Negishi M. and Goldstein J. A. (2002). "Regulation of human CYP2C9 by the constitutive androstane receptor: discovery of a new distal binding site." *Mol Pharmacol* **62**(3): 737-46.
- Fromm M. F., Busse D., Kroemer H. K. and Eichelbaum M. (1996). "Differential induction of prehepatic and hepatic metabolism of verapamil by rifampin." *Hepatology* **24**(4): 796-801.
- Fromm M. F., Kim R. B., Stein C. M., Wilkinson G. R. and Roden D. M. (1999). "Inhibition of P-glycoprotein-mediated drug transport: A unifying mechanism to explain the interaction between digoxin and quinidine." *Circulation* **99**(4): 552-7.
- Fromm M. F., Kauffmann H. M., Fritz P., Burk O., Kroemer H. K., Warzok R. W., Eichelbaum M., Siegmund W. and Schrenk D. (2000). "The effect of rifampin treatment on intestinal expression of human MRP transporters." *Am J Pathol* **157**(5): 1575-80.

- Geick A., Eichelbaum M. and Burk O. (2001). "Nuclear receptor response elements mediate induction of intestinal MDR1 by rifampin." *J Biol Chem* **276**(18): 14581-7.
- Gerbal-Chaloin S., Pascussi J. M., Pichard-Garcia L., Daujat M., Waechter F., Fabre J. M., Carrere N. and Maurel P. (2001). "Induction of CYP2C genes in human hepatocytes in primary culture." *Drug Metab Dispos* **29**(3): 242-51.
- Gerbal-Chaloin S., Daujat M., Pascussi J. M., Pichard-Garcia L., Vilarem M. J. and Maurel P. (2002). "Transcriptional regulation of CYP2C9 gene. Role of glucocorticoid receptor and constitutive androstane receptor." *J Biol Chem* **277**(1): 209-17.
- Gerk P. M. and Vore M. (2002). "Regulation of expression of the multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) and its role in drug disposition." *J Pharmacol Exp Ther* **302**(2): 407-15.
- Gibson P. R., Birchall I., Rosella O., Albert V., Finch C. F., Barkla D. H. and Young G. P. (1998). "Urokinase and the intestinal mucosa: evidence for a role in epithelial cell turnover." *Gut* **43**(5): 656-63.
- Glaeser H., Drescher S., van der Kuip H., Behrens C., Geick A., Burk O., Dent J., Somogyi A., Von Richter O., Griese E. U., Eichelbaum M. and Fromm M. F. (2002). "Shed human enterocytes as a tool for the study of expression and function of intestinal drug-metabolizing enzymes and transporters." *Clin Pharmacol Ther* **71**(3): 131-40.
- Glasel J. A. (1995). "Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm/280nm absorbance ratios." *Biotechniques* **18**(1): 62-3.
- Goodwin B., Hodgson E. and Liddle C. (1999). "The orphan human pregnane X receptor mediates the transcriptional activation of CYP3A4 by rifampicin through a distal enhancer module." *Mol Pharmacol* **56**(6): 1329-39.
- Gottesman M. M., Ambudkar S. V., Cornwell M. M., Pastan I. and U.A. G. (1996). Multidrug resistance transporter. *Molecular Biology of Membrane Transport Disorders*. S. G. Schultz. New York, Plenum Press: 243-257.
- Greiner B., Eichelbaum M., Fritz P., Kreichgauer H. P., von Richter O., Zundler J. and Kroemer H. K. (1999). "The role of intestinal P-glycoprotein in the interaction of digoxin and rifampin." *J Clin Invest* **104**(2): 147-53.
- Guhlmann A., Krauss K., Oberdorfer F., Siegel T., Scheuber P. H., Muller J., Csuk-Glanzer B., Ziegler S., Ostertag H. and Keppler D. (1995). "Noninvasive assessment of hepatobiliary and renal elimination of cysteinyl leukotrienes by positron emission tomography." *Hepatology* **21**(6): 1568-75.
- Heimark L. D., Gibaldi M., Trager W. F., O'Reilly R. A. and Goulart D. A. (1987). "The mechanism of the warfarin-rifampin drug interaction in humans." *Clin Pharmacol Ther* **42**(4): 388-94.

- Hirohashi T., Suzuki H. and Sugiyama Y. (1999). "Characterization of the transport properties of cloned rat multidrug resistance-associated protein 3 (MRP3)." *J Biol Chem* **274**(21): 15181-5.
- Hoffmeyer S., Burk O., von Richter O., Arnold H. P., Brockmoller J., Johné A., Cascorbi I., Gerloff T., Roots I., Eichelbaum M. and Brinkmann U. (2000). "Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(7): 3473-8.
- Homburg C. H., de Haas M., von dem Borne A. E., Verhoeven A. J., Reutelingsperger C. P. and Roos D. (1995). "Human neutrophils lose their surface Fc gamma RIII and acquire Annexin V binding sites during apoptosis in vitro." *Blood* **85**(2): 532-40.
- Huber M., Guhlmann A., Jansen P. L. and Keppler D. (1987). "Hereditary defect of hepatobiliary cysteinyl leukotriene elimination in mutant rats with defective hepatic anion excretion." *Hepatology* **7**(2): 224-8.
- Ito K., Suzuki H., Hirohashi T., Kume K., Shimizu T. and Sugiyama Y. (1997). "Molecular cloning of canalicular multispecific organic anion transporter defective in EHBR." *Am J Physiol* **272**(1 Pt 1): G16-22.
- Jedlitschky G., Leier I., Buchholz U., Hummel-Eisenbeiss J., Burchell B. and Keppler D. (1997). "ATP-dependent transport of bilirubin glucuronides by the multidrug resistance protein MRP1 and its hepatocyte canalicular isoform MRP2." *Biochem J* **327** ( Pt 1): 305-10.
- Jonker J. W., Smit J. W., Brinkhuis R. F., Maliepaard M., Beijnen J. H., Schellens J. H. and Schinkel A. H. (2000). "Role of breast cancer resistance protein in the bioavailability and fetal penetration of topotecan." *J Natl Cancer Inst* **92**(20): 1651-6.
- Juliano R. L. and Ling V. (1976). "A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants." *Biochim Biophys Acta* **455**(1): 152-62.
- Kamisako T., Leier I., Cui Y., König J., Buchholz U., Hummel-Eisenbeiss J. and Keppler D. (1999). "Transport of monoglucuronosyl and bisglucuronosyl bilirubin by recombinant human and rat multidrug resistance protein 2." *Hepatology* **30**(2): 485-90.
- Kartenbeck J., Leuschner U., Mayer R. and Keppler D. (1996). "Absence of the canalicular isoform of the MRP gene-encoded conjugate export pump from the hepatocytes in Dubin-Johnson syndrome." *Hepatology* **23**(5): 1061-6.

- Kast H. R., Goodwin B., Tarr P. T., Jones S. A., Anisfeld A. M., Stoltz C. M., Tontonoz P., Kliewer S., Willson T. M. and Edwards P. A. (2002). "Regulation of multidrug resistance-associated protein 2 (ABCC2) by the nuclear receptors pregnane X receptor, farnesoid X-activated receptor, and constitutive androstane receptor." *J Biol Chem* **277**(4): 2908-15.
- Kay L., Kampmann J. P., Svendsen T. L., Vergman B., Hansen J. E., Skovsted L. and Kristensen M. (1985). "Influence of rifampicin and isoniazid on the kinetics of phenytoin." *Br J Clin Pharmacol* **20**(4): 323-6.
- Kim R. B., Fromm M. F., Wandel C., Leake B., Wood A. J., Roden D. M. and Wilkinson G. R. (1998). "The drug transporter P-glycoprotein limits oral absorption and brain entry of HIV-1 protease inhibitors." *J Clin Invest* **101**(2): 289-94.
- Kivistö K. T., Bookjans G., Fromm M. F., Griese E. U., Münzel P. and Kroemer H. K. (1996). "Expression of CYP3A4, CYP3A5 and CYP3A7 in human duodenal tissue." *Br J Clin Pharmacol* **42**(3): 387-9.
- Klimecki W. T., Futscher B. W., Grogan T. M. and Dalton W. S. (1994). "P-glycoprotein expression and function in circulating blood cells from normal volunteers." *Blood* **83**(9): 2451-8.
- Koike K., Kawabe T., Tanaka T., Toh S., Uchiumi T., Wada M., Akiyama S., Ono M. and Kuwano M. (1997). "A canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) antisense cDNA enhances drug sensitivity in human hepatic cancer cells." *Cancer Res* **57**(24): 5475-9.
- Kolars J. C., Awni W. M., Merion R. M. and Watkins P. B. (1991). "First-pass metabolism of cyclosporin by the gut." *Lancet* **338**(8781): 1488-90.
- Kolars J. C., Schmiedlin-Ren P., Schuetz J. D., Fang C. and Watkins P. B. (1992). "Identification of rifampin-inducible P450III A4 (CYP3A4) in human small bowel enterocytes." *J Clin Invest* **90**(5): 1871-8.
- Kolars J. C., Lown K. S., Schmiedlin-Ren P., Ghosh M., Fang C., Wrighton S. A., Merion R. M. and Watkins P. B. (1994). "CYP3A gene expression in human gut epithelium." *Pharmacogenetics* **4**(5): 247-59.
- Komatani H., Kotani H., Hara Y., Nakagawa R., Matsumoto M., Arakawa H. and Nishimura S. (2001). "Identification of breast cancer resistant protein/mitoxantrone resistance/placenta-specific, ATP-binding cassette transporter as a transporter of NB-506 and J-107088, topoisomerase I inhibitors with an indolocarbazole structure." *Cancer Res* **61**(7): 2827-32.



- König J., Nies A. T., Cui Y., Leier I. and Keppler D. (1999). "Conjugate export pumps of the multidrug resistance protein (MRP) family: localization, substrate specificity, and MRP2-mediated drug resistance." *Biochim Biophys Acta* **1461**(2): 377-94.
- König J., Rost D., Cui Y. and Keppler D. (1999). "Characterization of the human multidrug resistance protein isoform MRP3 localized to the basolateral hepatocyte membrane." *Hepatology* **29**(4): 1156-63.
- Kool M., de Haas M., Scheffer G. L., Scheper R. J., van Eijk M. J., Juijn J. A., Baas F. and Borst P. (1997). "Analysis of expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, homologues of the multidrug resistance-associated protein gene (MRP1), in human cancer cell lines." *Cancer Res* **57**(16): 3537-47.
- Krishna D. R. and Klotz U. (1994). "Extrahepatic metabolism of drugs in humans." *Clin Pharmacokinet* **26**(2): 144-60.
- Kroemer H. K., Echizen H., Heidemann H. and Eichelbaum M. (1992). "Predictability of the in vivo metabolism of verapamil from in vitro data: contribution of individual metabolic pathways and stereoselective aspects." *J Pharmacol Exp Ther* **260**(3): 1052-7.
- Kroemer H. K., Gautier J. C., Beaune P., Henderson C., Wolf C. R. and Eichelbaum M. (1993). "Identification of P450 enzymes involved in metabolism of verapamil in humans." *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **348**(3): 332-7.
- Laemmli U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(259): 680-5.
- Lang T., Klein K., Fischer J., Nussler A. K., Neuhaus P., Hofmann U., Eichelbaum M., Schwab M. and Zanger U. M. (2001). "Extensive genetic polymorphism in the human CYP2B6 gene with impact on expression and function in human liver." *Pharmacogenetics* **11**(5): 399-415.
- Läpple F. (1999). Charakterisierung der Expression und Induzierbarkeit von arzneimittel-metabolisierenden Enzymen der CYP2C-Subfamilie in humanen Geweben. Fakultät für Chemie. Stuttgart, Universität Stuttgart.
- Licinio J. and Wong M. (2002). *Pharmacogenomics The Search for individualized Therapies*. Weinheim (Germany), WILEY-VCH Verlag GmbH.
- Lin J. H., Chiba M. and Baillie T. A. (1999). "Is the role of the small intestine in first-pass metabolism overemphasized?" *Pharmacol Rev* **51**(2): 135-58.
- Lin J. M., Shan X., Hanaoka S. and Yamada M. (2001). "Luminol chemiluminescence in unbuffered solutions with a cobalt(II)-ethanolamine complex immobilized on resin as catalyst and its application to analysis." *Anal Chem* **73**(21): 5043-51.
- Lin T., Chen G. C., Muroso E. P., Osterman J. and Nankin H. R. (1982). "Estradiol receptors of two distinct populations of Leydig cells." *Steroids* **40**(1): 53-63.

- Lown K. S., Kolars J. C., Thummel K. E., Barnett J. L., Kunze K. L., Wrighton S. A. and Watkins P. B. (1994). "Interpatient heterogeneity in expression of CYP3A4 and CYP3A5 in small bowel. Lack of prediction by the erythromycin breath test." *Drug Metab Dispos* **22**(6): 947-55.
- Lown K. S., Bailey D. G., Fontana R. J., Janardan S. K., Adair C. H., Fortlage L. A., Brown M. B., Guo W. and Watkins P. B. (1997). "Grapefruit juice increases felodipine oral availability in humans by decreasing intestinal CYP3A protein expression." *J Clin Invest* **99**(10): 2545-53.
- Lown K. S., Mayo R. R., Leichtman A. B., Hsiao H. L., Turgeon D. K., Schmiedlin-Ren P., Brown M. B., Guo W., Rossi S. J., Benet L. Z. and Watkins P. B. (1997). "Role of intestinal P-glycoprotein (mdr1) in interpatient variation in the oral bioavailability of cyclosporine." *Clin Pharmacol Ther* **62**(3): 248-60.
- Ma B., Prueksaritanont T. and Lin J. H. (2000). "Drug interactions with calcium channel blockers: possible involvement of metabolite-intermediate complexation with CYP3A." *Drug Metab Dispos* **28**(2): 125-30.
- MacFarland A., Abramovich D. R., Ewen S. W. and Pearson C. K. (1994). "Stage-specific distribution of P-glycoprotein in first-trimester and full-term human placenta." *Histochem J* **26**(5): 417-23.
- Madani S., Paine M. F., Lewis L., Thummel K. E. and Shen D. D. (1999). "Comparison of CYP2D6 content and metoprolol oxidation between microsomes isolated from human livers and small intestines." *Pharm Res* **16**(8): 1199-205.
- Mahon W. A., Inaba T. and Stone R. M. (1977). "Metabolism of flurazepam by the small intestine." *Clin Pharmacol Ther* **22**(2): 228-33.
- Maliepaard M., van Gastelen M. A., de Jong L. A., Pluim D., van Waardenburg R. C., Ruevekamp-Helmers M. C., Floot B. G. and Schellens J. H. (1999). "Overexpression of the BCRP/MXR/ABCP gene in a topotecan-selected ovarian tumor cell line." *Cancer Res* **59**(18): 4559-63.
- Maliepaard M., Scheffer G. L., Faneyte I. F., van Gastelen M. A., Pijnenborg A. C., Schinkel A. H., van De Vijver M. J., Scheper R. J. and Schellens J. H. (2001). "Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues." *Cancer Res* **61**(8): 3458-64.
- Martin S. J., Reutelingsperger C. P., McGahon A. J., Rader J. A., van Schie R. C., LaFace D. M. and Green D. R. (1995). "Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl." *J Exp Med* **182**(5): 1545-56.

- Mayer U., Wagenaar E., Beijnen J. H., Smit J. W., Meijer D. K., van Asperen J., Borst P. and Schinkel A. H. (1996). "Substantial excretion of digoxin via the intestinal mucosa and prevention of long-term digoxin accumulation in the brain by the *mdr* 1a P-glycoprotein." *Br J Pharmacol* **119**(5): 1038-44.
- Mayer U., Wagenaar E., Dorobek B., Beijnen J. H., Borst P. and Schinkel A. H. (1997). "Full blockade of intestinal P-glycoprotein and extensive inhibition of blood-brain barrier P-glycoprotein by oral treatment of mice with PSC833." *J Clin Invest* **100**(10): 2430-6.
- Miyake K., Mickley L., Litman T., Zhan Z., Robey R., Cristensen B., Brangi M., Greenberger L., Dean M., Fojo T. and Bates S. E. (1999). "Molecular cloning of cDNAs which are highly overexpressed in mitoxantrone-resistant cells: demonstration of homology to ABC transport genes." *Cancer Res* **59**(1): 8-13.
- Mottino A. D., Hoffman T., Jennes L. and Vore M. (2000). "Expression and localization of multidrug resistant protein *mrp2* in rat small intestine." *J Pharmacol Exp Ther* **293**(3): 717-23.
- Nelson D. R., Kamataki T., Waxman D. J., Guengerich F. P., Estabrook R. W., Feyereisen R., Gonzalez F. J., Coon M. J., Gunsalus I. C., Gotoh O. and et al. (1993). "The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature." *DNA Cell Biol* **12**(1): 1-51.
- Niemi M., Backman J. T., Neuvonen M., Neuvonen P. J. and Kivisto K. T. (2001). "Effects of rifampin on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of glyburide and glipizide." *Clin Pharmacol Ther* **69**(6): 400-6.
- Ozols J. (1990). "Preparation of membrane fractions." *Methods Enzymol* **182**: 225-35.
- Paine M. F., Shen D. D., Kunze K. L., Perkins J. D., Marsh C. L., McVicar J. P., Barr D. M., Gillies B. S. and Thummel K. E. (1996). "First-pass metabolism of midazolam by the human intestine." *Clin Pharmacol Ther* **60**(1): 14-24.
- Paulusma C. C., Bosma P. J., Zaman G. J., Bakker C. T., Otter M., Scheffer G. L., Scheper R. J., Borst P. and Oude Elferink R. P. (1996). "Congenital jaundice in rats with a mutation in a multidrug resistance-associated protein gene." *Science* **271**(5252): 1126-8.
- Paulusma C. C., Kool M., Bosma P. J., Scheffer G. L., ter Borg F., Scheper R. J., Tytgat G. N., Borst P., Baas F. and Oude Elferink R. P. (1997). "A mutation in the human canalicular multispecific organic anion transporter gene causes the Dubin-Johnson syndrome." *Hepatology* **25**(6): 1539-42.
- Pieters F. A., Woonink F. and Zuidema J. (1988). "Influence of once-monthly rifampicin and daily clofazimine on the pharmacokinetics of dapsone in leprosy patients in Nigeria." *Eur J Clin Pharmacol* **34**(1): 73-6.

- QIAGEN G. (2001). RNeasy® Mini Handbook, Qiagen: 113.
- Rae J. M., Johnson M. D., Lippman M. E. and Flockhart D. A. (2001). "Rifampin is a selective, pleiotropic inducer of drug metabolism genes in human hepatocytes: studies with cDNA and oligonucleotide expression arrays." *J Pharmacol Exp Ther* **299**(3): 849-57.
- Raucy J. L., Mueller L., Duan K., Allen S. W., Strom S. and Lasker J. M. (2002). "Expression and induction of CYP2C P450 enzymes in primary cultures of human hepatocytes." *J Pharmacol Exp Ther* **302**(2): 475-82.
- Ribera E., Pou L., Fernandez-Sola A., Campos F., Lopez R. M., Ocana I., Ruiz I. and Pahissa A. (2001). "Rifampin reduces concentrations of trimethoprim and sulfamethoxazole in serum in human immunodeficiency virus-infected patients." *Antimicrob Agents Chemother* **45**(11): 3238-41.
- Sambrook J. and Russell D. W. (2001). *Molecular Cloning A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schaub T. P., Kartenbeck J., Konig J., Spring H., Dorsam J., Staehler G., Storkel S., Thon W. F. and Keppler D. (1999). "Expression of the MRP2 gene-encoded conjugate export pump in human kidney proximal tubules and in renal cell carcinoma." *J Am Soc Nephrol* **10**(6): 1159-69.
- Schinkel A. H., Mol C. A., Wagenaar E., van Deemter L., Smit J. J. and Borst P. (1995). "Multidrug resistance and the role of P-glycoprotein knockout mice." *Eur J Cancer* **31A**(7-8): 1295-8.
- Schinkel A. H., Wagenaar E., van Deemter L., Mol C. A. and Borst P. (1995). "Absence of the mdr1a P-Glycoprotein in mice affects tissue distribution and pharmacokinetics of dexamethasone, digoxin, and cyclosporin A." *J Clin Invest* **96**(4): 1698-705.
- Schinkel A. H. (1997). "The physiological function of drug-transporting P-glycoproteins." *Semin Cancer Biol* **8**(3): 161-70.
- Schinkel A. H., Mayer U., Wagenaar E., Mol C. A., van Deemter L., Smit J. J., van der Valk M. A., Voordouw A. C., Spits H., van Tellingen O., Zijlmans J. M., Fibbe W. E. and Borst P. (1997). "Normal viability and altered pharmacokinetics in mice lacking mdr1-type (drug-transporting) P-glycoproteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(8): 4028-33.
- Shen D. D., Kunze K. L. and Thummel K. E. (1997). "Enzyme-catalyzed processes of first-pass hepatic and intestinal drug extraction." *Adv Drug Deliv Rev* **27**(2-3): 99-127.
- Shibahara T., Sato N., Waguri S., Iwanaga T., Nakahara A., Fukutomi H. and Uchiyama Y. (1995). "The fate of effete epithelial cells at the villus tips of the human small intestine." *Arch Histol Cytol* **58**(2): 205-19.

- Smith P. K., Krohn R. I., Hermanson G. T., Mallia A. K., Gartner F. H., Provenzano M. D., Fujimoto E. K., Goeke N. M., Olson B. J. and Klenk D. C. (1985). "Measurement of protein using bicinchoninic acid [published erratum appears in Anal Biochem 1987 May 15;163(1):279]." Anal Biochem **150**(1): 76-85.
- Strayhorn V. A., Baciewicz A. M. and Self T. H. (1997). "Update on rifampin drug interactions, III." Arch Intern Med **157**(21): 2453-8.
- Taipalensuu J., Tornblom H., Lindberg G., Einarsson C., Sjoqvist F., Melhus H., Garberg P., Sjoström B., Lundgren B. and Artursson P. (2001). "Correlation of gene expression of ten drug efflux proteins of the ATP-binding cassette transporter family in normal human jejunum and in human intestinal epithelial Caco-2 cell monolayers." J Pharmacol Exp Ther **299**(1): 164-70.
- Thiebaut F., Tsuruo T., Hamada H., Gottesman M. M., Pastan I. and Willingham M. C. (1987). "Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(21): 7735-8.
- Towbin H., Staehelin T. and Gordon J. (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(9): 4350-4.
- Traber P. G., Yu L., Wu G. D. and Judge T. A. (1992). "Sucrase-isomaltase gene expression along crypt-villus axis of human small intestine is regulated at level of mRNA abundance." Am J Physiol **262**(1 Pt 1): G123-30.
- Tsujii H., König J., Rost D., Stockel B., Leuschner U. and Keppler D. (1999). "Exon-intron organization of the human multidrug-resistance protein 2 (MRP2) gene mutated in Dubin-Johnson syndrome." Gastroenterology **117**(3): 653-60.
- Tusnady G. E., Bakos E., Varadi A. and Sarkadi B. (1997). "Membrane topology distinguishes a subfamily of the ATP-binding cassette (ABC) transporters." FEBS Lett **402**(1): 1-3.
- Vermes I., Haanen C., Steffens-Nakken H. and Reutelingsperger C. (1995). "A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V." J Immunol Methods **184**(1): 39-51.
- von Richter O. (2000). Expression und Funktion arzneimittelmetabolisierender Enzyme und des ABC-Transporters P-Glykoprotein in Dünndarm und Leber des Menschen. Fakultät für Chemie und Pharmazie. Tübingen, Eberhard-Karls-Universität: 151.
- von Richter O., Eichelbaum M., Schönberger F. and Hofmann U. (2000). "Rapid and highly sensitive method for the determination of verapamil, [<sup>2</sup>H<sub>7</sub>]verapamil and metabolites in biological fluids by liquid chromatography-mass spectrometry." J Chromatogr B Biomed Sci Appl **738**(1): 137-47.

- von Richter O., Greiner B., Fromm M. F., Fraser R., Omari T., Barclay M. L., Dent J., Somogyi A. A. and Eichelbaum M. (2001). "Determination of in vivo absorption, metabolism, and transport of drugs by the human intestinal wall and liver with a novel perfusion technique." *Clin Pharmacol Ther* **70**(3): 217-27.
- Warburg O. and Christian W. (1942). "Isolierung und Kristallisation des Gärungsferments Enolase." *Biochem. Z.* **13**: 269-282.
- Watkins P. B., Wrighton S. A., Schuetz E. G., Molowa D. T. and Guzelian P. S. (1987). "Identification of glucocorticoid-inducible cytochromes P-450 in the intestinal mucosa of rats and man." *J Clin Invest* **80**(4): 1029-36.
- West A. B., Isaac C. A., Carboni J. M., Morrow J. S., Mooseker M. S. and Barwick K. W. (1988). "Localization of villin, a cytoskeletal protein specific to microvilli, in human ileum and colon and in colonic neoplasms." *Gastroenterology* **94**(2): 343-52.
- Westermeier R. (1993). *Electrophoresis in Practice*. Weinheim (Germany), VCH Verlagsgesellschaft mbH.
- Williamson K. M., Patterson J. H., McQueen R. H., Adams K. F., Jr. and Pieper J. A. (1998). "Effects of erythromycin or rifampin on losartan pharmacokinetics in healthy volunteers." *Clin Pharmacol Ther* **63**(3): 316-23.
- Yamazaki M., Akiyama S., Ni'inuma K., Nishigaki R. and Sugiyama Y. (1997). "Biliary excretion of pravastatin in rats: contribution of the excretion pathway mediated by canalicular multispecific organic anion transporter." *Drug Metab Dispos* **25**(10): 1123-9.
- Zilly W., Breimer D. D. and Richter E. (1975). "Induction of drug metabolism in man after rifampicin treatment measured by increased hexobarbital and tolbutamide clearance." *Eur J Clin Pharmacol* **9**(2-3): 219-27.
- Zilly W., Breimer D. D. and Richter E. (1977). "Stimulation of drug metabolism by rifampicin in patients with cirrhosis or cholestasis measured by increased hexobarbital and tolbutamide clearance." *Eur J Clin Pharmacol* **11**(4): 287-93.

## 8 Lebenslauf

Geburtsdatum: 16. Mai 1976  
Geburtsort: Güstrow  
Familienstand: ledig

### 8.1 Beruflicher Werdegang

1982-1989: Besuch der Polytechnischen Oberschule  
1989-1994: Besuch des John-Brinckman Gymnasium in Güstrow  
1994: Abitur am John-Brinckman Gymnasium in Güstrow  
September 1994: Beginn des Biopharmakologiestudiums in Greifswald  
(Hauptfach: Pharmakologie und Toxikologie, Nebenfächer:  
Biochemie und Immunologie)  
1998-1999: Anfertigung der Diplomarbeit am Deutschen  
Krebsforschungszentrum [Thema: Beeinflussung der  
Aufnahme des neuen Tumortheraeutikums  $\beta$ -D-Glucosyl-  
ifosfamidmustard (Glufosfamid) in Tumorzellen durch  
Interferenzstrom]  
Betreuer: Prof. Dr. Manfred Wießler (DKFZ Heidelberg)  
Prof. Dr. Werner Siegmund  
September 1999: Abschluss der Diplomarbeit und Erlangung des  
akademischen Grades Diplom-Humanbiologe  
seit Januar 2000: Promotion zum Dr. rer. nat. am Dr. Magarete Fischer-Bosch-  
Institut für Klinische Pharmakologie  
Betreuer: Prof. Dr. Michel Eichelbaum  
PD Dr. Martin Friedrich Fromm

### 8.2 Abstracts und Preise

Glaeser H, Drescher S, Geick A, Behrens C, van der Kuip H, von Richter O, Burk O, Fromm MF, Eichelbaum M. Characterization of shedded human enterocytes obtained with a multilumen perfusion catheter.

*Eur J Clin Pharmacol* 2000; 56: A7.

Drescher S, Glaeser H, Hitzl M, Herrlinger C, van der Kuip H, Eichelbaum M, Fromm MF. Direct intestinal excretion is an important route of digoxin elimination in humans.

*Eur J Clin Pharmacol* 2000; 56: A16.

Gläser H, Drescher S, Burk O, Wolbold R, Eichelbaum M, Fromm MF. Induction of CYP2C8, CYP2C9, and CYP3A4 by rifampin in shed human enterocytes.

*Drug Metab Rev* 2001; 33 Suppl 1: 90.

Drescher S, Gläser H, Hitzl M, Eichelbaum M, Fromm MF. Digoxin elimination in humans by intestinal secretion.

*Drug Metab Rev* 2001; 33 Suppl 1: 140.

Glaeser H, Drescher S, Eichelbaum M, Fromm MF. Induction of intestinal and biliary digoxin secretion in humans by rifampin.

*Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2002; 365 Suppl. 1: R 109.

Hitzl M, Klein K, Nüssler AK, Neuhaus P, Gläser H, Drescher S, Fritz P, Zanger UM, Eichelbaum M, Fromm MF. Influence of rifampin and omeprazole on MRP3 expression in human enterocytes and hepatocytes.

*Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2002; 365 Suppl. 1: R 120.

Best Poster Award 6<sup>th</sup> International ISSX Meeting, München, 7. – 11. Oktober 2001

### **8.3 Originalarbeiten**

Glaeser H, Drescher S, van der Kuip H, Behrens C, Geick A, Burk O, Dent J, Somogyi A, von Richter O, Griese E-U, Eichelbaum M, Fromm MF. Shed human enterocytes as a tool to study expression and function of intestinal drug metabolizing enzymes and transporters.

*Clin Pharmacol Ther*, 2002; 71: 131-140.

Burk O, Tegude H, Koch I, Hustert E, Wolbold R, Glaeser H, Klein K, Fromm MF, Nuessler AK, Neuhaus P, Zanger UM, Eichelbaum M, Wojnowski L. Molecular mechanisms of polymorphic CYP3A7 expression in adult human liver and intestine.

*J Biol Chem*, 2002; 277: 24280-8.

Bhardwaj RK, Glaeser H, Becquemont L, Klotz U, Gupta SK, Fromm MF. Piperine, a major constituent of black pepper, inhibits human P-glycoprotein and CYP3A4.

*J Pharmacol Exp Ther*, 2002; 302: 645-50.



Drescher S, Glaeser H, Mürdter T, Hitzl M, Eichelbaum M, Fromm MF. P-glycoprotein-mediated intestinal and biliary digoxin transport in humans.

*Clin Pharmacol Ther*, 2003; 73: 223-31.

#### **8.4 Wissenschaftliche Vorträge**

Charakterisierung von abgeschilfferten humanen Enterozyten, gesammelt mit einem multiluminalen Perfusionskatheter

(2. Jahreskongress für Klinische Pharmakologie 2000 und 10. Jahrestagung der GKPharm, 05. Oktober 2000, Berlin)

Induction of CYP2C8, CYP2C9 and CYP3A4 by rifampin in shedded human enterocytes

(6<sup>th</sup> International ISSX Meeting, 10. Oktober 2001, München)

Induktion der intestinalen und biliären Sekretion von Digoxin durch Rifampicin

(43. Frühjahrstagung der DGPT, 12. März 2002, Mainz)

## 9 Danksagung

Herrn Professor Michel Eichelbaum danke ich für die Bereitstellung des anspruchsvollen Themas und die Möglichkeit, die Doktorarbeit am Dr. Margarete Fischer-Bosch Institut für Klinische Pharmakologie anzufertigen.

Ich danke Herrn Professor Dieter H. Wolf vom Institut für Biochemie und Herrn Professor Peter Scheurich vom Institut für Zellbiologie und Immunologie der Universität Stuttgart für die Begutachtung meiner Arbeit.

Für die ständige Diskussionsbereitschaft, konstruktive Kritik und viele Anregungen danke ich meinem Arbeitsgruppenleiter PD. Dr. Martin Friedrich Fromm.

Für die gute Zusammenarbeit und die Unterstützung bei der Durchführung der klinischen Studien möchte ich mich bei Dr. Siegfried Drescher und Anja Bengel bedanken.

Renzo Wolbold danke ich für die kritische und sorgfältige Durchsicht des Manuskriptes sowie für die spannenden wissenschaftlichen Diskussionen.

Weiterhin danke ich Susanne Johnson, Sabine Rekersbrink und Monika Seiler für die Hilfe im Labor.

Der Robert Bosch Stiftung gilt mein Dank für die finanzielle Unterstützung.

Für die gute Zusammenarbeit möchte ich mich bei den Kolleginnen und Kollegen des Instituts für Klinische Pharmakologie bedanken.