

**Arzneistoffabsorption in Caco-2/TC7 Zellen:
Ibuprofen und der
Monocarboxylat-Transporter 1 (MCT1)**

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2007

vorgelegt von

Jutta Susanne Braun

Tag der mündlichen Prüfung

12. September 2007

Dekan

Prof. Dr. L. Wesemann

1. Berichterstatter

Prof. Dr. M. A. Wahl

2. Berichterstatter

Prof. Dr. R. Daniels

Die vorliegende Arbeit entstand unter der Anleitung von

Herrn Prof. Dr. Martin A. Wahl

Am Lehrstuhl für Pharmazeutischen Technologie und Biopharmazie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen.

Meinem verehrten Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Martin A. Wahl, danke ich für die Möglichkeit, diese interessante und facettenreiche Arbeit in seinem Arbeitskreis durchführen zu können sowie für seine stets vorhandene Hilfs- und Diskussionsbereitschaft und die vertrauensvolle Zusammenarbeit. Die Weiterbildungsseminare zum Fachapotheker für Arzneimittelinformation, der Besuch von internationalen Kongressen und Workshops und die Teilnahme an Exkursionen zu verschiedenen Unternehmen und Messen haben dazu beigetragen, meine fachspezifischen Kenntnisse gleichermaßen zu vertiefen und zu erweitern.

Herrn Prof. Dr. Rolf Daniels danke ich für die Erstellung des Zweitgutachtens und die sehr angenehme und bereichernde Zusammenarbeit bei unserem Buchprojekt.

Herrn Prof. Dr. Peter C. Schmidt danke ich für die umfassenden pharmazeutisch-technologischen Kenntnisse, die ich sowohl als Studentin als auch als Doktorandin während seiner Zeit als Lehrstuhlinhaber erwerben konnte.

Die Caco-2/TC7 Zellen wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. K.-W. Bock, Toxikologisches Institut, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, zur Verfügung gestellt. Dafür bedanke ich mich ganz herzlich.

Bei Frau Dr. Ulrike Sausbier möchte ich mich herzlichst für die vielen wertvollen Hinweise und Anregungen bedanken, die entscheidend zum derart erfolgreichen Gelingen der immunchemischen Färbungen beigetragen haben.

Frau Cornelia Witt und Frau Martina Brenn danke ich für die hervorragende Zusammenarbeit und gegenseitige Unterstützung in allen Fragen der Zellkultur.

Frau Beer, Herrn Walker und Herrn Weyhing gebührt mein Dank für ihre Hilfestellung bei der Bewältigung administrativer und technischer Probleme.

Meiner Kollegin und Wegbegleiterin, Frau Ragna Wischumerski, danke ich ganz herzlich für ihre unerschöpfliche Hilfsbereitschaft, den regen Gedankenaustausch und das freundschaftliche Teilen vieler Höhen und Tiefen.

Bei meinen derzeitigen und ehemaligen Arbeitskollegen möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit, das angenehme Arbeitsklima und die zahlreichen gemeinsamen Unternehmungen bedanken.

Den Wahlpflichtfachstudenten, die durch ihre Projektarbeiten am Fortschreiten meiner Arbeit beteiligt waren, möchte ich für ihren Einsatz meinen Dank aussprechen.

Allergrößter Dank gebührt meiner Familie, deren Vertrauen und rückhaltlose Unterstützung den Erfolg dieser Arbeit maßgeblich beeinflusst hat.

Meinen Eltern

in Liebe und Dankbarkeit

„Die Neugier steht immer an erster Stelle eines Problems, das gelöst werden will.“

Galileo Galilei

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht beziehungsweise vorgestellt:

Publikation

Braun, J. S.; Sausbier, U. und Wahl, M. A. – “Evaluation of two different antibody systems in the indirect immunochemical staining of the Monocarboxylate Transporter 1 (MCT1) in Caco-2/TC7 cells” – zur Publikation eingereicht

Kongressberichte

Braun, J. S. und Wahl, M. A. - „Relevance of the monocarboxylate transporter in the absorption of ibuprofen in Caco-2/TC7 cells“ – Vortrag und Abstract, 47. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT), 04. - 06. April, Mainz 2006, Naunyn-Schmiedeberg’s Arch. Pharmacol., 372, Suppl 1, S. 15 (2006)

Braun, J. S. und Wahl, M. A. - „Role of the monocarboxylate transporter in the absorption of ibuprofen in Caco-2/TC7 cells“ – Vortrag, DPhG Jahrestagung, 05. - 08. Oktober, Mainz 2005, Abstract im Tagungsband, ISBN 3-00-016844-3, S. 85, KV T12 (2005)

Braun, J. S. und Wahl, M. A. - “pH-Dependent passive and active transport of ibuprofen in Caco-2/TC7 cells” – Poster, AAPS Workshop on Drug Transporters in ADME: From the Bench to the Bedside, 05. - 07. März, Bethesda, Maryland, USA (2007)

Braun, J. S. und Wahl, M. A. - „Role of the monocarboxylate transporter in the absorption of ibuprofen in Caco-2/TC7 cells“ – Poster, 5th APV World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, 27. - 30. März, Genf 2006, Abstract im Tagungsband, S. 129, Abstract 129 (2006)

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung und Zielsetzung.....	1
1.1	Einleitung.....	1
1.2	Bioverfügbarkeit und gastrointestinale Resorption	3
1.2.1	Bioverfügbarkeit, Pharmakokinetik und die Rolle von Arzneistofftransportern	3
1.2.2	Resorption und biologische Barrieren	4
1.2.3	Physiologie des Gastrointestinaltrakts	5
1.2.4	Epitheliale Transportmechanismen	7
1.2.4.1	Parazelluläre Permeabilität	8
1.2.4.2	Transzellulärer Transport	8
1.3	Die Caco-2/TC7 Zellkultur als <i>in vitro</i> Modell für das gastrointestinale Epithel.....	11
1.3.1	Modelle zur Untersuchung intestinaler Absorption.....	11
1.3.2	Charakterisierung der Caco-2 Zelllinie	12
1.3.2.1	Die Caco-2 Zellkultur.....	12
1.3.2.2	Der TC7 Subklon.....	13
1.3.3	Bekannte Arzneistofftransporter in Caco-2 Zellen.....	14
1.3.3.1	Effluxtransporter	14
1.3.3.2	Aufnahmetransporter.....	15
1.4	Die Monocarboxylat-Transporter (MCTs)	16
1.4.1	Die MCT Familie.....	16
1.4.2	Topologie.....	16
1.4.3	Funktion.....	17
1.4.4	Isotypen und Gewebeverteilung	18
1.4.5	Der Monocarboxylat-Transporter 1 (MCT1)	18
1.4.5.1	Bekannte Substrate des MCT1	18
1.4.5.2	Hemmstoffe des MCT1	19
1.4.5.3	Verteilung des MCT1 im Intestinum	19
1.5	Zielsetzung.....	20
2	Immunchemische Lokalisierung des MCT1.....	22
2.1	Einleitung.....	22

2.2	Immunchemische Färbung und fluoreszenzmikroskopische Lokalisierung des MCT1 in Caco-2/TC7 Zellen	22
2.2.1	Das Cytoskelett und F-Actin	22
2.2.2	Markierung von Zellkernen und F-Actin	23
2.2.3	Einfluss der Fixierungsmethode auf die Färberesultate	25
2.2.4	Lokalisierung des MCT1 mit zwei verschiedenen Antikörpersets	28
2.3	Bewertung der Ergebnisse.....	32
3	Permeationsstudien an Caco-2/TC7 Zellen.....	33
3.1	Einleitung	33
3.2	Untersuchung der Permeation von Ibuprofen und Propranolol	34
3.2.1	Konzentrationsabhängigkeit des Ibuprofen-Transports.....	34
3.2.2	Einfluss der Temperatur auf den Transport.....	36
3.2.3	Einfluss von Natriumazid	38
3.2.4	Einfluss des P-gp-Substrats Verapamil	41
3.2.5	pH-Abhängigkeit des Transports	44
3.2.6	Einfluss von Benzoesäure auf den Transport	49
3.2.7	Kombinierter Einfluss eines pH-Gradienten und Benzoesäure	52
3.2.8	Einfluss von α -Cyano-4-hydroxycinnamat (CHC).....	53
3.2.8.1	Einfluss von CHC auf die Permeation von Ibuprofen.....	53
3.2.8.2	Einfluss von CHC auf die Permeation von Benzoesäure.....	54
3.3	Bewertung der Ergebnisse.....	57
4	Material und Methoden	61
4.1	Material und Geräte	61
4.1.1	Die Zellkultur.....	61
4.1.2	Medien und Reagenzien für die Zellkultur.....	61
4.1.3	Material und Geräte für die Zellkultur	62
4.1.4	Antikörper und Hilfsstoffe für die Immunfluoreszenz.....	62
4.1.5	Verwendete Puffer und Lösungen für die Immunfluoreszenz	63
4.1.6	Wirkstoffe.....	63
4.1.7	Lösungsmittel und Chemikalien.....	64
4.1.8	Geräte zur allgemeinen Verwendung und Verbrauchsmaterial.....	65
4.1.9	Fluoreszenzmikroskopie.....	66
4.1.10	HPLC-UV – Apparativer Aufbau	67
4.1.11	Datenverarbeitung	67

4.1.11.1	Hardware.....	67
4.1.11.2	Software	68
4.2	Kultivierung der Caco-2/TC7 Zellen.....	68
4.2.1	Allgemeine Kultivierung der Caco-2/TC7 Zellen	68
4.2.2	Kultivierung für die <i>in vitro</i> Permeationsstudien	70
4.2.3	Kultivierung für die Immunchemie	70
4.3	Die Caco-2/TC7 Zellkultur als <i>in vitro</i> Permeationsmodell	71
4.3.1	Durchführung der Permeationsstudien.....	71
4.3.1.1	Transportpuffer.....	71
4.3.1.2	Permeationsstudien am Transwell-System.....	72
4.3.1.3	Ermittlung des apparenten Permeationskoeffizienten (P_{app}).....	73
4.3.2	Integrität der Zellmonolayer.....	74
4.3.2.1	Transepithelialer elektrischer Widerstand (TEER).....	74
4.3.2.2	Fluorescein-Natrium als hydrophiler Marker	76
4.4	Methoden der Immunfluoreszenz	77
4.4.1	Grundlagen.....	77
4.4.2	Auswahl geeigneter Träger für die Zellmonolayer im Rahmen der immunchemischen Färbungen	78
4.4.3	Auswahl der Antikörper, Seren und weiteren Markersubstanzen	78
4.4.3.1	Auswahl der Primärantikörper.....	79
4.4.3.2	Auswahl der Sekundärantikörper	80
4.4.3.3	Blockierung unspezifischer Färbung	80
4.4.3.4	Hintergrundfärbung	80
4.4.3.5	Auswahl der Fluoreszenzfarbstoffe	81
4.4.4	Optimierung der Konzentrationen der Antikörper und Fluoreszenzmarker.....	82
4.4.5	Fixierungsmethoden	83
4.4.6	Eindecken der Präparate.....	84
4.4.7	Durchführung der immunchemischen Färbungen	85
4.4.8	Fluoreszenzmikroskopie.....	85
4.5	Kochkolben und Verteilungskoeffizient.....	86
4.5.1	Bestimmung des Verteilungskoeffizienten V_k	86
4.5.2	Bestimmung des Verteilungsverhaltens mit Hilfe des Koch-Kolbens...	86
4.6	Analytische und statistische Methoden.....	88

4.6.1	Analytische Methoden	88
4.6.1.1	Validierung der analytischen Methoden	88
4.6.1.2	HPLC-Methoden zur Bestimmung von Ibuprofen	89
4.6.1.3	HPLC-Methode zur Bestimmung von Benzoesäure	92
4.6.1.4	UV-spektrophotometrische Methode zur Bestimmung von Propranolol	94
4.6.1.5	Fluoreszenzspektroskopische Methode zur Bestimmung von Fluorescein-Natrium	95
4.6.2	Statistische Methoden	96
5	Zusammenfassung	97
6	Literaturverzeichnis.....	103
7	Anhang.....	113
7.1	Immunchemisches Färbeprotokoll	113
7.2	HPLC-UV Analytik von Ibuprofen, Methoden A und B.....	114
7.3	HPLC-UV Analytik von Benzoesäure.....	117
7.4	UV-Analytik von Propranolol	118
7.5	UV-Spektren und Strukturformeln.....	120
7.6	Firmenverzeichnis.....	122

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

A, B, etc.	Unterschiedliche Buchstaben in Diagrammen kennzeichnen signifikante Unterschiede (4.6.2)
AP	apikal
BL	basolateral
BS	Benzoessäure
ca.	circa
et al.	et alii
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
MG	Molekulargewicht
ns	nicht signifikant
P_{app}	apparenter Permeationskoeffizient
SD	Standardabweichung
UV	ultravioletter Bereich des Spektrums
VB	Vertrauensbereich

Besondere Hinweise

Die Fehlerbalken in den Abbildungen geben die Standardabweichung des Mittelwerts an.

Gesetzlich geschützte Warenzeichen werden ohne besondere Kennzeichnung verwendet.

1 EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG

1.1 EINLEITUNG

Die orale Darreichung von Arzneistoffen ist nach wie vor die Applikationsart der ersten Wahl. Sie wird vom Patienten als angenehmste Form der Verabreichung empfunden und stellt bis heute die am häufigsten genutzte Arzneiform dar. Voraussetzung für die Möglichkeit einer oralen Darreichung ist die ausreichende orale Bioverfügbarkeit des jeweiligen Wirkstoffs. In der pharmazeutischen Forschung wird jedoch durch die Methoden der kombinatorischen Chemie eine ständig ansteigende Zahl neuer Wirkstoffe generiert, von denen ein zunehmender Anteil nur eine geringe Löslichkeit in wässrigem Medium besitzt. Hieraus resultiert in vielen Fällen eine unzureichende intestinale Permeabilität und dadurch eine zu geringe orale Bioverfügbarkeit (Rasenack und Müller, 2005). Diese Entwicklung macht zum einen Selektionsverfahren notwendig, die möglichst schnell und kostengünstig in der Lage sind, die Wirkstoffkandidaten mit dem höchsten Anwendungspotential herauszufiltern. Zum anderen stellt sich für die pharmazeutische Entwicklung die Herausforderung, geeignete galenische Technologien so zur Anwendung zu bringen, dass diese Wirkstoffe in Form spezieller Drug-Delivery-Systeme ausreichend bioverfügbar gemacht werden. Zusätzlich werden Modelle zur Vorhersage des pharmakokinetischen und pharmakologischen Verhaltens (z. B. orale Bioverfügbarkeit, Metabolismus bzw. Arzneistoff-Interaktionen, Pharmakogenomik) neuer Wirkstoffe erforderlich. Grundlage für den Erfolg der genannten Verfahren und Modelle sind detaillierte Kenntnisse über die Mechanismen der Arzneistoffabsorption und der dabei zu überwindenden biologischen Barrieren.

Im Falle oraler Darreichung fungiert das intestinale Epithel als diejenige Barriere, die die Absorption von Arzneistoffen sowie von Nährstoffen kontrolliert. Ein weit verbreitetes *in vitro* Modell zur Untersuchung von intestinalen Absorptionsprozessen ist die aus einem humanen Colon Adenokarzinom abgeleitete Caco-2 Zelllinie, die seit ihrer Isolierung durch J. Fogh im Jahre 1977 ausführlich charakterisiert wurde (Hidalgo et al., 1989; Artursson, 1990; Hilgers et al., 1990; Wilson et al., 1990; Hillgren et al., 1995). Die Caco-2 Zellen werden bei der Beantwortung einer Vielzahl verschiedener Fragestellungen eingesetzt. Beispielsweise soll die in Caco-2 Zellen ermittelte

Permeabilität von neuen Wirkstoffen die Vorhersage der absoluten Bioverfügbarkeit der Substanz *in vivo* ermöglichen; Struktur-Transport-Beziehungen für Carrier-vermittelte Transportwege werden bestimmt und Targeting-Strategien entwickelt; der Einfluss von pharmazeutischen Hilfsstoffen, Salzen und Nahrungsbestandteilen auf den Arzneistofftransport kann untersucht werden; chemische Strategien (z. B. Prodrugs), die die Permeabilität der intestinalen Mucosa verstärken oder den intestinalen Metabolismus eines Wirkstoffs minimieren sollen, können beurteilt werden; potenzielle toxische Effekte von Wirkstoffkandidaten oder Hilfsstoffen auf die Darmschleimhaut können erkannt werden. Bei der Aufklärung intestinaler Mechanismen des Arzneistofftransports (z. B. parazellulär versus transzellulär; passive Diffusion versus Carrier-vermittelte Mechanismen) nehmen die Caco-2 Zellen eine besonders herausragende Position ein (Borchardt, 1995). Die Bedeutung der Caco-2 Zelllinie als *in vitro* Modell für biopharmazeutische Permeabilitätsuntersuchungen manifestiert sich unter anderem in einer Industrierichtlinie der amerikanischen FDA (Food and Drug Administration), welche ein Klassifizierungssystem für pharmazeutische Wirkstoffe aus schnell freisetzenden, festen, oral applizierten Formulierungen beinhaltet. Das so genannte Biopharmaceutics Classification System (BCS) teilt Arzneistoffe anhand ihrer Löslichkeit und ihrer in Caco-2 Zellen ermittelten Permeabilität in vier Klassen ein (Amidon et al., 1995; FDA Guidance for Industry, 2000).

Der im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendete Modellarzneistoff Ibuprofen ist ein nicht-steroidales Antirheumatikum (non-steroidal antiinflammatory drug, NSAID) (Struktur siehe Abbildung 7-5, Anhang), das innerhalb des Biopharmazeutischen Klassifizierungssystems (BCS) aufgrund seiner hohen Permeabilität, aber pH-abhängig schlechten Löslichkeit, der Klasse II zugeordnet wird (Potthast et al., 2005). In der Literatur finden sich zahlreiche Angaben zum Transport von Ibuprofen. Jedoch ist nicht abschließend geklärt, ob die gute Permeabilität von Ibuprofen auf rein passiver Diffusion basiert oder ob ein aktiver Mechanismus beteiligt ist. Im Zusammenhang mit dem Transport von NSAIDs, die wie Salicylsäure und Ketoprofen einen Monocarboxylsäure-Rest in ihrer Struktur aufweisen, wird wiederholt der Monocarboxylat-Transporter 1 (MCT1) genannt (Takanaga et al., 1994; Tsuji und Tamai, 1996; Neuhoff et al., 2005; Choi et al., 2005). Zusätzlich zur passiven Permeabilität der genannten Arzneistoffe wird diesem Carrier eine Rolle an deren Membrantransport zugeschrieben. Auch in Verbindung mit dem Transport von Ibuprofen wird mehrfach auf den pH-abhängigen, MCT1-vermittelten Transport

hingewiesen (Tamai et al., 1995; Ogihara et al., 1996; Korjamo et al., 2005). Andere Arbeitsgruppen beschreiben jedoch einen pH-abhängigen, aber dennoch rein passiven Absorptionsmechanismus, sowohl für Ibuprofen (Legen et al., 2003; Lee et al., 2005) als auch für weitere NSAIDs (Takagi et al., 1998; Legen und Kristl, 2003).

Vor diesem Hintergrund zahlreicher, jedoch widersprüchlicher Angaben zum Ibuprofen-Transport, bleibt die Frage der tatsächlichen Transportcharakteristik von Ibuprofen und die mögliche Beteiligung des MCT1 offen, so dass die Aufklärung dieses Sachverhalts im Fokus der vorliegenden Arbeit liegt. Um die Interpretation pharmakokinetischer Erkenntnisse über den Transport von Ibuprofen und einen möglichen Zusammenhang mit dem MCT1 auf einer soliden Basis zu ermöglichen, ist es erforderlich, die zelluläre Distribution dieses Transportproteins zu kennen. Hierzu gibt es einige Hinweise von anderen Arbeitsgruppen (2.1). Allerdings wurde die Lokalisation des MCT1 am Caco-2 Subklon TC7 bisher noch nicht untersucht.

1.2 BIOVERFÜGBARKEIT UND GASTROINTESTINALE RESORPTION

1.2.1 Bioverfügbarkeit, Pharmakokinetik und die Rolle von Arzneistofftransportern

Das Ausmaß und die Geschwindigkeit, mit der ein Wirkstoff aus einer Zubereitung resorbiert wird und am Wirkort angelangt, wird als Bioverfügbarkeit eines Arzneistoffs bezeichnet. Diese ist bei Arzneimitteln, die intravenös verabreicht werden, definitionsgemäß 100%. Die absolute Bioverfügbarkeit gibt den Anteil der Bioverfügbarkeit nach Verabreichung einer Substanz ins Zentralkompartiment im Vergleich zur intravenösen Applikation an. Unter oraler Bioverfügbarkeit versteht man in diesem Zusammenhang den Anteil einer oralen Dosis, die in den systemischen Kreislauf gelangt. Diese ergibt sich hierbei aus dem pharmakokinetischen Verhalten des Wirkstoffs, also dem Weg des Wirkstoffs im Körper, der nach oraler Applikation mit dem LADME Modell beschrieben werden kann: Liberation (Freisetzung), Absorption, Distribution, Metabolisierung, Exkretion. In allen Abschnitten dieses Modells, abgesehen von der Freisetzung aus der Darreichungsform, sind Transportsysteme von

großer Bedeutung: An Absorptionsbarrieren beispielsweise können Transporter die Aufnahme von Substanzen durch das gastrointestinale Epithel ermöglichen und sind gleichermaßen für den Efflux mancher Arzneistoffe verantwortlich. Transportsysteme sind weiterhin mitbestimmend für die Gewebeverteilung (Distribution) von Arzneistoffen, indem sie die Aufnahme in die Zielzellen oder die Ausschleusung aus diesen regulieren oder auch die Überwindung der Blut-Hirn- bzw. der Blut-Plazenta-Schranke vermitteln. Durch die Vermittlung des In- und Effluxes von Arzneistoffen in Hepatozyten können Transporter modulierend in den Metabolismus von Wirksubstanzen eingreifen. Eine weitere Rolle spielen sie außerdem bei der biliären und renalen Exkretion sowie beim Übertritt in die Muttermilch.

1.2.2 Resorption und biologische Barrieren

Die Resorption des Arzneistoffs ist derjenige pharmakokinetische Aspekt, welcher den ersten bioverfügbarkeitsbestimmenden Schritt darstellt und im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit steht. Unter Resorption versteht man die Aufnahme eines Wirkstoffs durch biologische Barrieren in die Blutbahn oder in das Lymphgefäßsystem. Die Membranen, die dabei durchquert werden müssen, sind z. B. die Plasmamembranen der Enterozyten bei der Resorption aus dem Magen-Darm-Trakt, die Sinusoidalmembran bei der Aufnahme aus dem Pfortaderblut in die Leber oder die Membranen der Gefäßendothelzellen beim Übertritt ins Gehirn. Wenngleich diese Membranen nicht identisch sind, so zeichnen sie sich doch durch wesentliche gemeinsame Strukturmerkmale aus (Fluid-Mosaik-Modell, Abbildung 1-1): Die Zellmembran besteht aus einer Phospholipiddoppelschicht, in die Proteine ein- oder aufgelagert sind und dabei ein Mosaik bilden. Durch die ganze Membran reichende Proteine bilden Poren in der Lipiddoppelschicht. Dabei hat man sich die Membran dynamisch, d. h. in dauernder Änderung begriffen, vorzustellen. Da diese lipophilen Zellmembranen von wässriger Gewebsflüssigkeit umgeben sind, lassen sich zwei für den Resorptionsprozess entscheidende Wirkstoffkenngrößen ableiten. Diese sind die Wasserlöslichkeit des Wirkstoffs und seine Permeabilität, d. h. sein Vermögen, die beschriebenen Membranen zu überwinden.

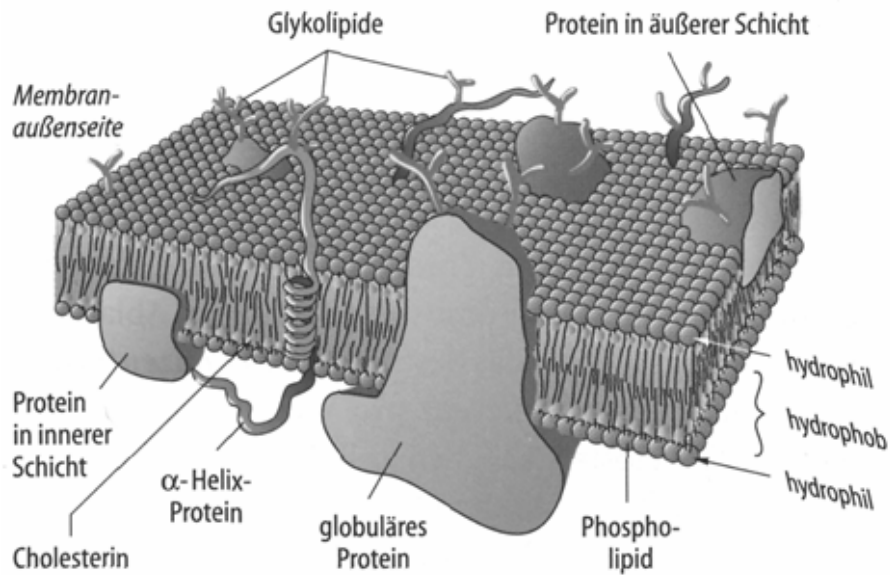


Abbildung 1-1 Prinzipieller Aufbau der Plasmamembran (Thews und Vaupel 2005).

Für Arzneistoffe aus oraler Darreichungsform ist der Gastrointestinaltrakt der bevorzugte Resorptionsort und daher die Darmschleimhaut diejenige biologische Barriere, die der Arzneistoff überwinden muss. Einige anatomisch-physiologische Grundlagen des Gastrointestinaltrakts sollen diesen komplexen Zusammenhang im folgenden Abschnitt verdeutlichen.

1.2.3 Physiologie des Gastrointestinaltrakts

Der Magen-Darm-Trakt gliedert sich in die Abschnitte Oropharynx, Ösophagus, Magen, Dünn- und Dickdarm, in welche die Ausführungsgänge der exkretorischen Drüsen, Mundspeicheldrüsen, Pankreas und Leber einmünden. Die einzelnen Wandabschnitte des gesamten Trakts sind prinzipiell ähnlich aufgebaut (Abbildung 1-2). Abweichungen im Aufbau ergeben sich durch die unterschiedlichen Funktionen. Während der Mund-Rachenraum und die Speiseröhre ausschließlich dem Weitertransport dienen, haben Magen, Gallenblase, Zäkum und Rektum vor allem Reservoirfunktion. Der Hauptort für Verdauung und Absorption ist der Dünndarm.

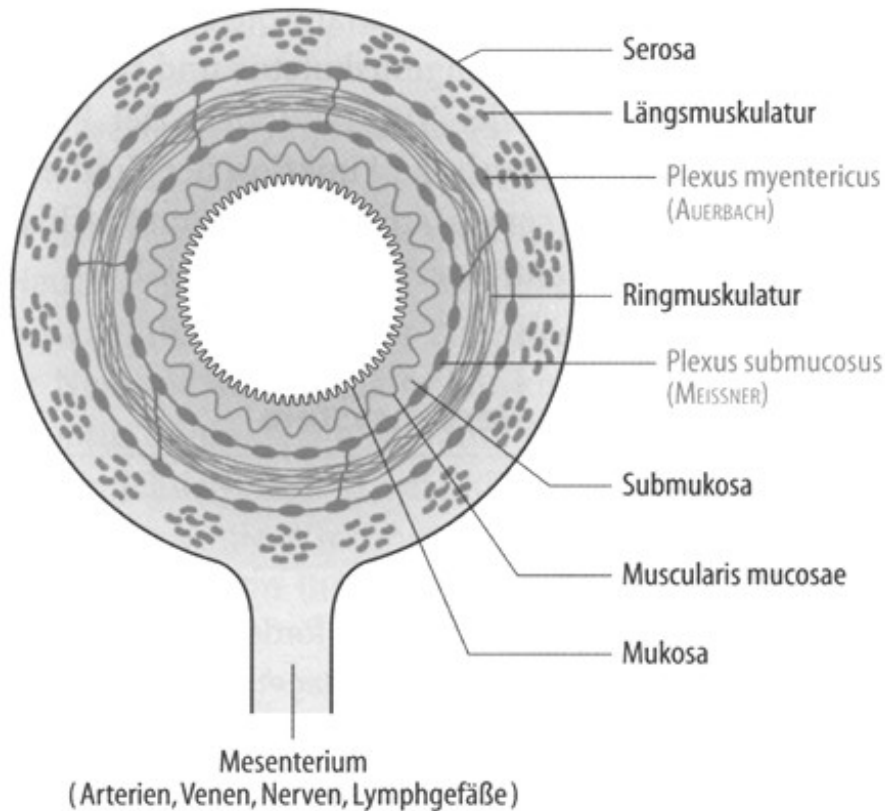


Abbildung 1-2 Wandschichten des Magen-Darm-Kanals in schematischer Darstellung (Thews und Vaupel 2005).

Der Dünndarm besteht aus drei aufeinander folgenden Abschnitten: dem Duodenum (20-30 cm lang), dem Jejunum (1,5 m lang) und dem Ileum (2 m lang). Durch die Ausbildung von Falten, Zotten (Villi) und fingerartigen Ausstülpungen der absorptiven Enterozyten (Mikrovilli, Bürstensaum) wird die für den Absorptionsprozess notwendige große Oberfläche geschaffen. Die absorbierende Gesamtoberfläche erreicht dadurch etwa 200 m² (Abbildung 1-3). Der Dickdarm ist etwa 120-150 cm lang. Die Colonozyten tragen dichte, jedoch kürzere Mikrovilli als die Enterozyten; die Zotten (Villi) fehlen im Colon.


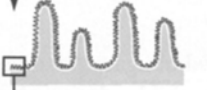


	Struktur	Gesamtoberfläche [m ²]
Darm als Zylinder		0,33
Kerckring-Falten		1
Zotten (Villi)		10
Microvilli		200

Abbildung 1-3 Vergrößerung der Darmschleimhaut-Oberfläche durch spezielle morphologische Strukturen (angelehnt an Thews und Vaupel 2005).

Gastrointestinale Epithelzellen bilden ein einschichtiges Zylinder- oder Palisaden-Epithel mit einer typischen polaren Struktur. An der funktionellen Außenseite befindet sich die apikale Membran, die auch als Bürstensaummembran bezeichnet wird und das Lumen des Magen-Darm-Kanals begrenzt. Die der Blutseite zugewandten Membranpartien fasst man unter der Bezeichnung basolaterale Membran zusammen. Die seitlichen (lateralen) Membranen benachbarter Zellen begrenzen den Interzellularspalt. Dieser ist nach der apikalen Seite hin durch den Schlussleistenkomplex mehr oder weniger stark abgedichtet. Dieser Komplex besteht aus den eigentlichen Schlussleisten (Tight Junctions), die als Netzwerk benachbarte Zellen verbinden und aus einem gürtelförmigen Desmosom, das dem mechanischen Zusammenhalt der Epithelzellen dient. Durch diesen Aufbau besitzen die Epithelzellen eine durchgehende Oberfläche.

1.2.4 Epitheliale Transportmechanismen

Das Epithel des Gastrointestinaltrakts dient dem Stoff- und Flüssigkeitsaustausch. Die Transportleistungen der Epithelzellen werden hierbei durch spezifische Transportsysteme bewirkt. Einen Überblick über diese Systeme, deren jeweiliger Anteil am Resorptionsprozess arzneistoffspezifisch ist, gibt Abbildung 1-4.

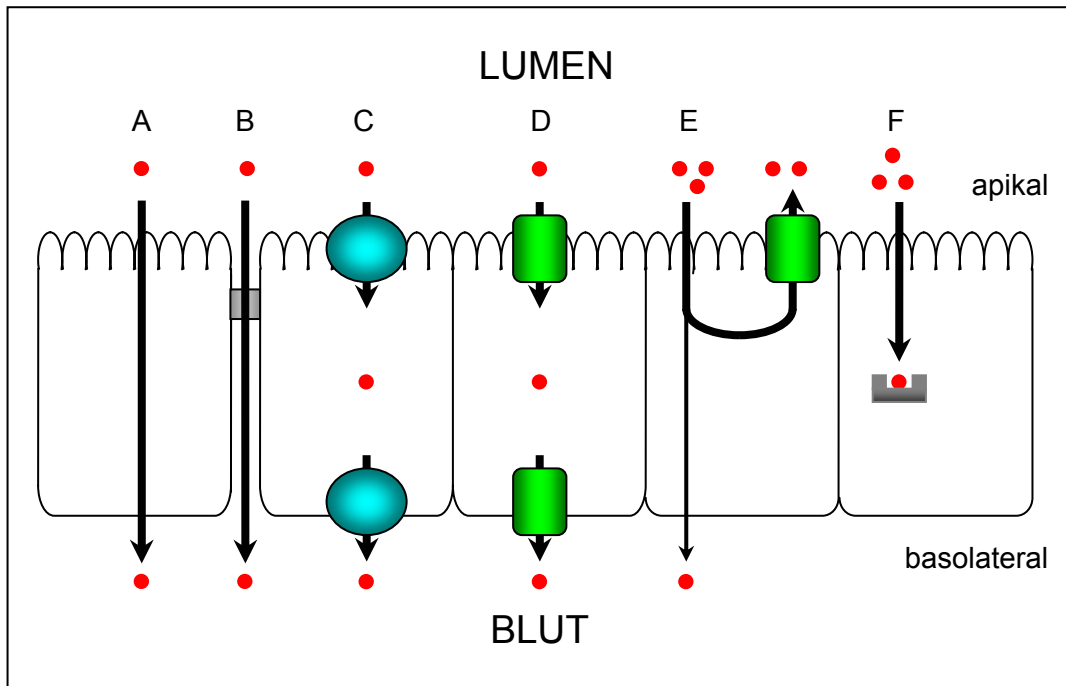


Abbildung 1-4 Schematische Übersicht über epitheliale Transportmechanismen: (A) passiv transzellulär; (B) passiv parazellulär; (C) sekundär aktiv, Carrier-vermittelt; (D) primär aktiv, Absorption; (E) primäraktiv, Efflux; (F) intrazellulärer Metabolismus.

Grundsätzlich können Transportmechanismen in zwei große Gruppen eingeteilt werden, die parazelluläre Permeabilität und den transzellulären Transport.

1.2.4.1 Parazelluläre Permeabilität

Die parazelluläre, rein passive Permeabilität, wird durch transepitheliale Gradienten angetrieben. Ihr Weg führt durch die Schlussleisten hindurch und über die gesamte Länge des Interzellularspalts. Die Schlussleisten sind sowohl für gelöste Substanzen (Voraussetzung: Hydrophilie, MG < 300 g/mol) als auch für Wasser bis zu einem gewissen Grad durchlässig. Im Intestinum nimmt die Durchlässigkeit der Tight Junctions von proximal nach distal hin deutlich ab. Diese entspricht der Porengröße für ungeladene Moleküle (Jejunum ca. 0,8 nm; Ileum ca. 0,4 nm; Colon ca. 0,2 nm) und der Ionenselektivität (Thews und Vaupel 2005).

1.2.4.2 Transzellulärer Transport

Passive Diffusion

Der passiv transzelluläre Stofftransport führt durch die apikale Membran, das Zytoplasma, die basolaterale Membran und meist auch über eine gewisse Strecke des

Interzellularrspalts. Passive Diffusion erfordert keine Energie, sondern der Arzneistoff diffundiert aufgrund eines Konzentrationsgefälles durch die entsprechende Zellmembran. Darüber hinaus ist die Diffusionsgeschwindigkeit von der Fläche und der Dicke der Membran sowie von einem stoffspezifischen Diffusionskoeffizienten abhängig. Dieser Zusammenhang wird durch das Fick'sche Diffusionsgesetz quantitativ beschrieben (Gleichung 1). Der Diffusionskoeffizient wiederum ist vom Diffusionsmedium (z. B. Viskosität und absolute Temperatur) und der Art des diffundierenden Moleküls (z. B. Molekülgröße und -struktur, Lipophilie, pK_a , Ladung) abhängig.

$$\frac{dm}{dt} = D \cdot P \cdot \frac{A}{d} \cdot (c_a - c_i) \quad \text{Gleichung 1}$$

dm/dt	Diffusionsgeschwindigkeit [mg/s]
D	Diffusionskoeffizient [cm^2/s]
P	Verteilungskoeffizient zwischen Membran und Außenmedium
A	zur Diffusion verfügbare Fläche der Membran [cm^2]
$(c_a - c_i)$	Konzentrationsgradient über die Membran [mg/ml]
d	Diffusionsstrecke; Dicke der Membran [cm]

An den Grenzflächen der Membran stellt sich ein Verteilungsgleichgewicht gemäß dem Verteilungskoeffizienten ein; der Transport innerhalb der Membran folgt dem Diffusionsgesetz. Daraus folgt, dass ein Arzneistoff sowohl wasserlöslich als auch lipidlöslich sein muss, um biologische Membranen durchdringen zu können. Als Maß hierfür eignet sich der $\log P$, der Logarithmus des Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten der betrachteten Substanz im nicht ionisierten Zustand. Für Arzneistoffe mit $\log P$ -Werten nahe 2 wird beispielsweise grundsätzlich eine vollständige Absorption vorhergesagt. Bei $\log P$ -Werten > 4 beginnt die Permeabilität allmählich zu sinken (Lipinski, 2000; Artursson et al., 2001), da der Arzneistoff dann so hydrophob ist, dass er leicht in die Lipiddoppelschicht eindringt, sie jedoch nicht mehr verlassen kann. Im Falle ionisierbarer Arzneistoffe wird anstelle des $\log P$ häufig der $\log D$, der Logarithmus des Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten der betrachteten Substanz bei einem bestimmten pH-Wert, angegeben, da dieser unter Umständen eine aussagekräftigere Interpretationsgrundlage schafft (Artursson et al., 2001).

Erleichterte Diffusion

Carrier-vermittelte oder sekundär aktive Mechanismen erleichtern die transzelluläre Absorption bestimmter Substanzen. Sie nutzen einen durch primär aktiven Transport entstandenen Gradienten aus, verbrauchen selbst jedoch kein ATP. Dieses Prinzip erleichtert insbesondere sehr hydrophilen Substanzen das Durchdringen von Zellmembranen, indem die Moleküle durch die Kopplung an den Carrier vorübergehend ausreichend lipophile Eigenschaften erhalten. Ein Beispiel für ein solches sekundär aktives System ist der Natrium-abhängige Glucose Transport im Dünndarm. Die ATP-gebundene Natriumpumpe verursacht einen zelleinwärts gerichteten elektrochemischen Gradienten für Natrium, der die Triebkraft für die Aufnahme von Glucose im Cotransport mit Natrium aus dem Darmlumen ist. In der Zelle findet eine Aufkonzentrierung der Glucose statt, so dass diese die Zelle durch die basolaterale Membran durch erleichterte Diffusion wieder verlassen kann.

Aktiver Transport

Der primär aktive Transport erfolgt ausschließlich transzellulär. Er ist an die ATP-Hydrolyse gebunden; d. h. er ist energieabhängig und dadurch zum Stofftransport entgegen eines Konzentrationsgradienten befähigt. Solche aktiven Transportprozesse sind sättigbar, da sie eine begrenzte Kapazität haben. Zu dieser Gruppe gehören auch aktive Efflux Transporter, allen voran P-Glycoprotein (P-gp), das in der apikalen Membran exprimiert wird und die Absorption von Substanzen ins Blut begrenzt, indem es diese aktiv zurück ins intestinale Lumen transportiert.

Endozytose

Kleine Flüssigkeitströpfchen (Pinocytose) bzw. Feststoffpartikel (Phagozytose) werden durch vesikulären Einschluss als Ganzes durch die Membran geschleust. Bei der Persorption gelangen feste Teilchen (Nanopartikel) zwischen den Membranen der Epithelzellen hindurch in den Organismus.

Welcher Transportmechanismus für welchen Arzneistoff in Frage kommt, hängt von seinen physikochemischen Eigenschaften ab, wie zum Beispiel vom Molekulargewicht bzw. von seinem molekularen Volumen, vom pK_a -Wert, der Löslichkeit und chemischen Stabilität. Physiologische Faktoren wie die Magenentleerung, die gastrointestinale Motilität, der intestinale pH-Wert, die Durchblutung, der Lymphfluss, der pathologische Zustand, Arzneistoff-Interaktionen, die Ernährung und das Auflösungsverhalten im Mucus sind ebenso relevant.

1.3 DIE CACO-2/TC7 ZELLKULTUR ALS *IN VITRO* MODELL FÜR DAS GASTROINTESTINALE EPITHEL

1.3.1 Modelle zur Untersuchung intestinaler Absorption

Die Methoden zur Untersuchung intestinaler Absorption können in drei große Gruppen eingeteilt werden, nämlich die *in vivo*, *in situ* und *in vitro* Methoden.

***In vivo* Modelle**

Der Vorteil der *in vivo* Modelle ist die Einbindung der dynamischen Komponenten der mesenterischen Blutzirkulation, des Mucus-Layers und allen weiteren Faktoren, die die Arzneistoff-Dissolution und -Resorption beeinflussen können. Das am häufigsten verwendete Tiermodell für *in vivo* Studien ist die Ratte, da dieses die menschlichen Gegebenheiten am Besten widerspiegelt. Die Grenzen solcher Modelle liegen in der Unmöglichkeit, die individuell an der Absorption beteiligten Variablen unabhängig voneinander zu betrachten sowie in der Gefahr falsch-positiver Ergebnisse (Le Ferrec et al., 2001).

***In situ* Modelle**

In situ Modelle werden sowohl an anästhetisierten Ratten als auch an Menschen (Einführung eines Katheters nach der Ballon- oder Loc-1-Gut-Technik) eingesetzt. Auch hier sind sämtliche physiologischen Aspekte, die die Absorption beeinflussen, wie z. B. Metabolismus, gegenwärtig. Daraus ergibt sich ein standardisierbares und reproduzierbares Modell, das außerdem eine gute Korrelation mit pharmakokinetischen Studien *in vivo* bietet. Derartige Untersuchungen, speziell die am Menschen, können jedoch nicht in der Routine eingesetzt werden (Le Ferrec et al., 2001).

***In vitro* Modelle**

Es gibt zahlreiche *in vitro* Modelle, z. B. die Methode des „everted gut sac“ am umgestülpten Ratten-Intestinum, isolierte und perfundierte Organe bzw. intestinale Segmente, die Ussing Kammern und nicht zuletzt verschiedene Zellmodelle. Auf die einzelnen aufgezählten Modelle kann an dieser Stelle nicht in aller Ausführlichkeit eingegangen werden, so dass der Schwerpunkt auf die Zellkulturmodelle, insbesondere die Caco-2 Zellen, gelegt wird.

Zellkulturmodelle weisen einige Vorteile gegenüber den bisher beschriebenen Absorptionsmodellen für Arzneistoffe auf. Unter anderem können Permeabilität und Metabolismus eines Arzneistoffs schnell beurteilt werden; es besteht die Möglichkeit der Untersuchung der Arzneistoffabsorption unter kontrollierten Bedingungen; die Zellkulturen sind relativ simple Systeme; störende Einflüsse durch den Mucus-Layer sind nicht vorhanden; Methoden zur Verbesserung der Arzneistoffabsorption, wie z. B. der Einsatz von Prodrugs oder absorptionsverbessernder Hilfsstoffe, können schnell getestet werden; automatisierte Verfahren und HTS (High Throughput Screening) sind möglich; Zellkulturen bieten die Gelegenheit der Durchführung von Studien an humanen Zellen; außerdem eröffnen sie die Möglichkeit der Minimierung zeitaufwändiger, teurer und teilweise kontrovers diskutierter Tierversuche.

Als nachteilig im Vergleich zur *in vivo* bzw. *in situ* Situation kann beurteilt werden, dass physiologische Faktoren, die die Darmpassage beeinflussen, z. B. Mucusbildung (Diffusionsbarriere), Gallensalze und Cholesterol (oberflächenaktive Substanzen, Solubilisierung), in Zellkulturmodellen nicht vorhanden sind. Das Caco-2 Zellkulturmodell ist außerdem ein statisches Modell, das nur Zellen eines Zelltyps tumoralen Ursprungs beinhaltet. Ein weiterer Nachteil der Zellkulturmodelle ist die gelegentlich schwierige Extrapolation der Daten auf die *in vivo* Situation – ein Problem, das jedoch fast alle *in vitro* Modelle gemein haben (Le Ferrec et al., 2001; Artursson, 1991).

1.3.2 Charakterisierung der Caco-2 Zelllinie

1.3.2.1 Die Caco-2 Zellkultur

Die Caco-2 Zelllinie wurde 1974 von J. Fogh, einem dänischen Arzt, aus dem Colon Adenokarzinom eines Patienten kaukasischer Rasse isoliert und charakterisiert (Fogh et al., 1977). Die Caco-2 Zellen sind immortale und adhärente Zellen, die unter normalen Zellkulturbedingungen spontan ausdifferenzieren und morphologische und physiologische Ähnlichkeit zum Dünndarmepithel des Menschen aufweisen. Die Zellen polarisieren, bilden Dome und einen gut ausgebildeten Bürstensaum mit entsprechender Enzymausstattung und Tight Junctions zwischen benachbarten Zellen. Caco-2 Zellen bilden keinen Mucus-Layer, was in Studien zum Arzneistofftransport aber häufig ausgenutzt wird, um beteiligte Mechanismen unabhängig von diesem zu

untersuchen. Bei der Anzucht der Caco-2 Zellen beispielsweise auf Polycarbonatfiltern bilden sie Monolayer aus ausdifferenzierten, säulenartigen Zellen (sog. Zylinder- bzw. Palisaden-Epithel) mit Mikrovilli und Tight Junctions auf der apikalen Seite. Die Zellkerne befinden sich im Allgemeinen im basalen Teil der Zellen (Artursson, 1991).

1.3.2.2 Der TC7 Subklon

Der Subklon TC7 wurde aus einer späten Passage (# 198; T für *tardif*, spät) der ursprünglichen Caco-2 Zelllinie von A. Zweibaum, INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Villejuif, Frankreich), abgeleitet (Chantret et al., 1994). In einigen Studien wurde gezeigt, dass die TC7 Zellen für Untersuchungen zum Arzneistofftransport eine gute Alternative zur ursprünglichen Caco-2 Zelllinie darstellen und sogar Vorteile bieten (Caro et al., 1995; Grès et al., 1998). Entscheidend für die Nützlichkeit der TC7 Zellen ist die Möglichkeit, Absorptionsstudien losgelöst vom Hauptmetabolisierungsenzym für Arzneistoffe, CYP3A4, durchführen zu können. Im Vergleich mit den ursprünglichen Caco-2 Zellen zeigt der TC7-Klon zwar eine höhere Enzymaktivität von CYP3A (Carrière et al., 1994; Raeissi et al., 1999), allerdings handelt es sich hierbei wahrscheinlich nicht um die Isoform CYP3A4, sondern um CYP3A5 (Raeissi et al., 1997). Ein weiterer Vorteil der Caco-2/TC7 Zellen liegt darin, dass sie in einen deutlich geringeren P-gp-vermittelten Efflux als die ursprünglichen Caco-2 Zellen zeigen (Grès et al., 1998), da für diese eine starke Überexpression gegenüber humanem Colon *in vivo* bekannt ist (Le Ferrec et al., 2001). Zusätzliche Unterschiede zwischen Caco-2 Zellen und dem Subklon TC7 liegen im geringeren Glucose-Bedarf der TC7 Zellen, ihrer höheren Wachstumsrate und ihrer höheren Zelldichte in der stationären Phase, also zwischen Tag 9 und Tag 15 nach Aussaat (Tabelle 1-1).

Tabelle 1-1 Eigenschaften der Caco-2 Zellen und des Subklons TC7¹

	Caco-2	Caco-2/TC7
Generationszeit [h]	30	20-24 / 26
Zelldichte [Zellen / 25 cm ²]	13 · 10 ⁶	18 · 10 ⁶ / 16 · 10 ⁶

¹ Daten verschiedener Autoren (Grès et al., 1998; Chantret et al., 1994) durch Querstriche abgetrennt

1.3.3 Bekannte Arzneistofftransporter in Caco-2 Zellen

1.3.3.1 Effluxtransporter

Transporter können eine bedeutende Rolle in der Limitierung der Arzneistoffabsorption durch deren Sekretion ins intestinale Lumen spielen (Anderle et al., 2004). Der bekannteste Effluxtransporter und der wahrscheinlich am Besten untersuchte Arzneistofftransporter überhaupt ist P-Glycoprotein (P-gp). P-gp gehört zur Gruppe der ABC-Transporter (ATP-Binding-Cassette) (ABCB1) und ist das MDR1-Genprodukt (Multiple Drug Resistance). Dieser Transporter zeichnet sich durch eine geringe Substratspezifität und große Kapazität aus. P-gp ist ein ATP-abhängiger Transporter, der aus 12 Transmembranspannen aufgebaut und im Darm in der apikalen Membran lokalisiert ist. Damit übt er eine aktive Barrierenfunktion für Xenobiotika aus. (Loo et al., 2004). Zu den bekannten Substraten gehören unter anderem Digoxin, Cyclosporin A, Tacrolimus, Sequinavir, Indinavir, Vinblastin, Vincristin, Verapamil und Taxol (Balimane et al., 2004).

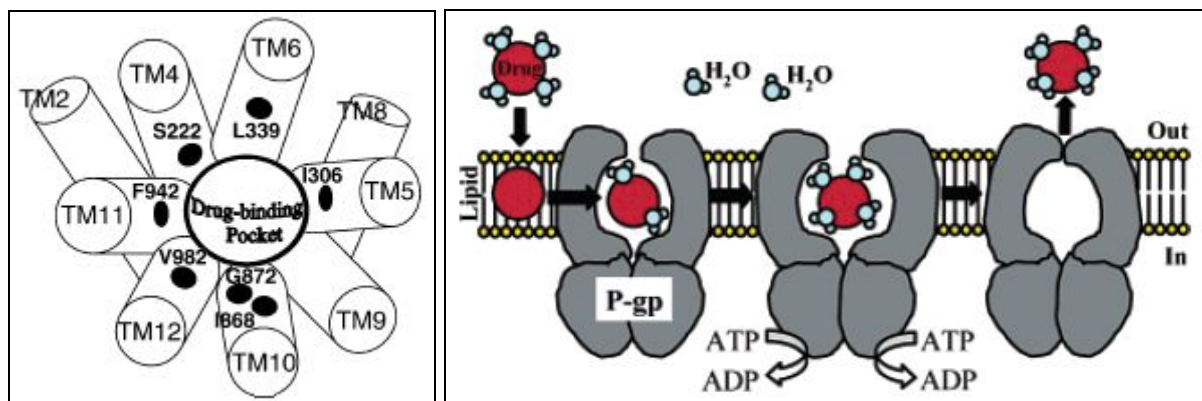


Abbildung 1-5 P-Glycoprotein (P-gp). Skizze der trichterförmigen und für Wasser zugänglichen Arzneistoff-Bindetasche (links) und Modell des postulierten Efflux-Mechanismus (rechts) (Loo et al., 2004).

Der zugrunde liegende Efflux-Mechanismus sieht nach Loo et al. (2004) folgendermaßen aus (Abbildung 1-5, rechte Seite). Bei der Diffusion eines Arzneistoffs aus dem extrazellulären wässrigen Medium in die Lipid-Doppelschicht wird dieser dehydriert. In der Membran wird der Arzneistoff von P-gp aufgegriffen („Staubsauger-Funktion“) oder diffundiert in die Arzneistoff-Bindetasche (Abbildung 1-5, linke Seite). Dort wird er im Verlauf der ATP-Hydrolyse rehydriert. Durch die

ATP-Hydrolyse treten Konformationsänderungen ein, die zu einem Zustand geringerer Affinität des P-gp zum Arzneistoff führen. Resultat ist die Expulsion des Arzneistoffs ins extrazelluläre Medium.

1.3.3.2 Aufnahmetransporter

Eine große Anzahl absorptiver intestinaler Membrantransporter spielt eine wichtige Rolle bei der Aufnahme und Verteilung von Nährstoffen, Arzneistoffen und Prodrugs. Die Liste bekannter Aufnahmetransporter ist inzwischen so groß, dass an dieser Stelle eine Tabelle mit wenigen ausgewählten Beispielen einen kleinen Überblick verschaffen soll (Tabelle 1-2). Trotzdem sind die relevanten Transporter für die meisten Arzneistoffe weitgehend unbekannt bzw. deren Funktionalität, Gewebeverteilung, Transportkapazität und Substratspezifität nicht hinreichend aufgeklärt (Anderle et al., 2004).

Tabelle 1-2 Übersicht über intestinale Aufnahmetransporter (Auszug aus Steffansen et al., 2004)

<i>Carrier System für</i>	<i>Protein</i>	<i>Zelluläre Lokalisation</i>	<i>Substratbeispiel</i>
Aminosäuren	LAT1-4F2hc TAT1 PAT	AP / BL BL AP	Baclofen, L-Dopa L-Dopa GABA, D-Cycloserin
Peptide	PEPT1	AP	Orale Cephalosporine, β-Lactam Antibiotika, ACE- Hemmer, Valacyclovir
Glucose	SGLT1 GLUT5	AP AP / BL	D-Glucose D-Fructose
Fettsäuren	FATP4	AP	Cholesterol, Palmitat
Nucleoside	ENT1 CNT1	BL AP	Purine, Cladribin, Cytarabin Purinnucleoside, AZT
Monocarboxylate	MCT1	Ubiquitär	Pyruvat, Lactat, Propionat, Butyrat, Benzoesäure, Nicotinsäure, Salicylat, Pravastatin
Phosphate	NaPiIIb	Unbekannt	HPO ₄ ²⁻
Gallensäuren	ASBT / ISBT	AP	Cholesterol, Taurocholat, Glycodeoxycholat

Organische Anionen	OAT2 OATPB	BL AP	Acetylsalicylat, Methotrexat Pravastatin, Enalapril
Organische Kationen	OCT1	BL	Aciclovir, Desipramin, Dopamin, Noradrenalin
Vitamine	SVCT1 THTR1 RFT / FOLT SMVT	AP AP Unbekannt Unbekannt	Ascorbinsäure Thiamin Folsäure, Methotrexat Biotin, Panthothenat,

1.4 DIE MONOCARBOXYLAT-TRANSPORTER (MCTs)

1.4.1 Die MCT Familie

Die Monocarboxylat-Transporter Familie gehört zur *SLC16* Genfamilie (*SLC* für *solute carrier*). Diese umfasst inzwischen 14 Mitglieder, wobei Orthologe in unterschiedlichen Spezies identifiziert wurden. Vier MCTs (MCT1-MCT4) wurden bisher funktionell charakterisiert (Halestrap und Meredith, 2004). Die MCTs sind integrale Membranproteine, deren physiologische Rolle im Transport endogener metabolisch bedeutender Monocarboxylate wie Lactat, Pyruvat und Ketonkörpern besteht. Der zugrunde liegende Mechanismus ist der äquimolare Cotransport der Substrate mit Protonen im Sinne einer erleichterten Diffusion (Enerson und Drewes, 2003).

1.4.2 Topologie

Die MCTs sind aus 12 Transmembranspannen (TMs) mit intrazellulären Amino- und Carboxy-Termini aufgebaut. Die größte Sequenzvariation zwischen Isoformen zeigt sich im C-Terminus und in dem großen intrazellulären Loop zwischen TM 6 und TM 7 (Abbildung 1-6). Im Gegensatz dazu sind die Transmembranspannen selbst hoch konserviert. Das Hilfsprotein CD147 wurde als essentiell für die korrekte Expression und Funktionalität von MCT1 und MCT4 identifiziert (Halestrap und Meredith, 2004).

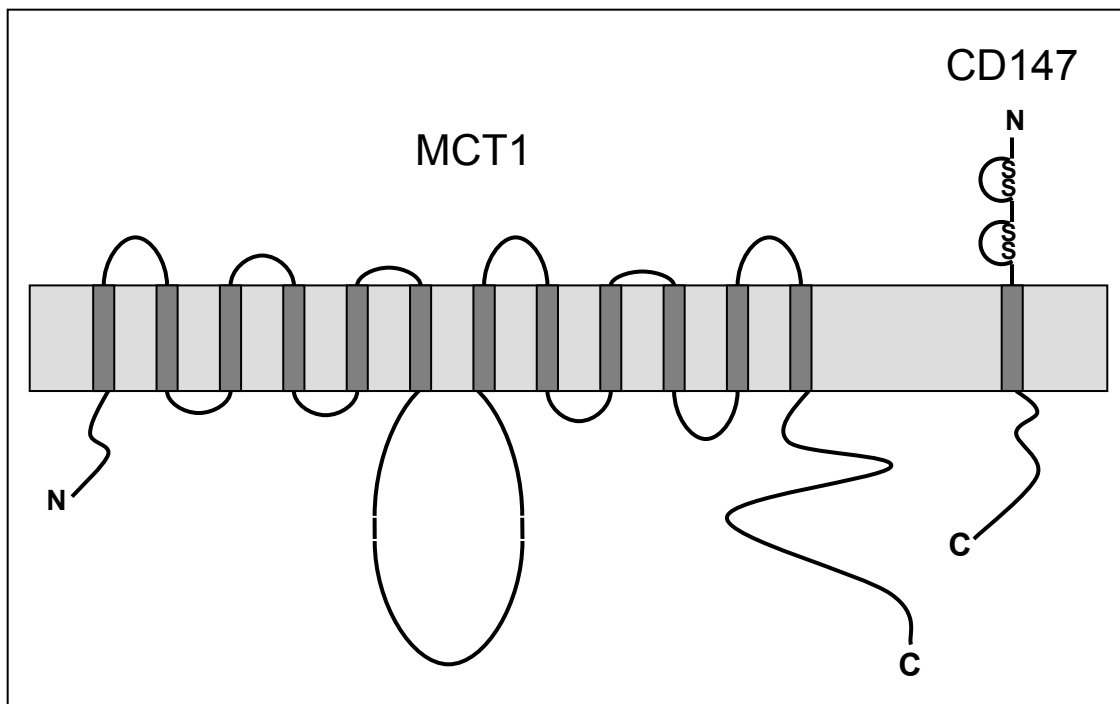


Abbildung 1-6 Vorgeschlagene Topologie der MCT-Familienmitglieder (modifiziert nach Halestrap und Meredith, 2004)

1.4.3 Funktion

Die funktionellen Eigenschaften der MCT-Familie wurden anhand des Transports von Lactat über MCT1 an Erythrozyten beschrieben. MCT1 fördert entweder den Netto-Transport eines Monocarboxylats mit einem Proton oder den Austausch eines Monocarboxylats mit einem anderen (Deuticke, 1982). Mechanistisch erfolgt dies über die geordnete Bindung eines Protons an den Carrier, gefolgt von einem Lactat-Anion. Dies bewirkt eine Konformationsänderung, die das Substrat nach innen durch die Membran transportiert (Poole und Halestrap, 1993). Anschließend werden die Substrate nacheinander und in umgekehrter Reihenfolge freigesetzt und die leere Substratbindungsstelle kehrt an die äußere Oberfläche zurück. Es wurde gezeigt, dass der letzte Schritt der geschwindigkeitsbestimmende ist (Deuticke, 1982). Der Translokationszyklus ist reversibel, wobei der Lactat Transport stimuliert werden kann, indem der pH-Wert auf der einen Seite von 8 auf 6 abgesenkt wird oder indem man den pH-Wert auf der anderen Seite der Membran anhebt (Halestrap und Price, 1999).

1.4.4 Isotypen und Gewebeverteilung

MCT1 und MCT4 werden in unterschiedlichem Ausmaß in den meisten Geweben von Menschen und (Säuge-)Tieren exprimiert, während MCT2 deutlich restriktiver verteilt ist und MCT3 ausschließlich in der Basalmembran des retinalen Pigmentepithels (RPE) gefunden wird. MCT5 kommt überwiegend in der Plazenta vor, MCT6 in Niere und Plazenta, MCT7 in Pankreas und Gehirn und MCT8 in Leber, Niere und Herz (Halestrap und Price, 1999).

Im gastrointestinalen Epithel ist die MCT1-Isoform von großer Bedeutung, während andere MCT-Isoformen einen vernachlässigbaren Einfluss zu besitzen scheinen (Halestrap und Price, 1999, Enerson und Drewes, 2003). Studien hinsichtlich der intestinalen Verteilung von MCT-Isoformen wurden mit dem Caecum des Hamsters und dem Colon von Schweinen und Menschen durchgeführt. In beiden Fällen wurde MCT1 gefunden, MCT2 jedoch nicht (Garcia et al., 1995; Ritzhaupt et al., 1998 a). Angaben über die Expression weiterer Isoformen sind derzeit noch nicht zu finden.

1.4.5 Der Monocarboxylat-Transporter 1 (MCT1)

1.4.5.1 Bekannte Substrate des MCT1

Der MCT1 (*SLC16A1*) transportiert kurzkettige (C2 bis C5) unverzweigte aliphatische Monocarboxylate, wie z. B. Acetat und Propionat. Substituenten an C2 und C3 werden teilweise toleriert oder sogar präferiert (z. B. Pyruvat, L-Lactat, Acetoacetat und β -Hydroxybutyrat). Dicarboxylate, Tricarboxylate und Sulfonate werden überhaupt nicht transportiert. Der Carrier ist stereoselektiv für 2-Hydroxy-substituierte Monocarboxylate (z. B. Affinität zu L-Lactat 10fach höher als zu D-Lactat), aber z. B. nicht für β -Hydroxybutyrat (Halestrap und Meredith, 2004).

Es wurde gezeigt, dass MCT1 den Transport von Lactat, Salicylsäure, Benzoesäure und weiteren exogenen Monocarboxylaten über die Blut-Hirn-Schranke vermittelt (Kido et al. 2000). Ebenso wird eine bedeutende Rolle des MCT1 für die intestinale Absorption exogener schwacher organischer Carboxylsäuren diskutiert. Es wird davon ausgegangen, dass der MCT1 an der intestinalen Absorption von gewissen β -Lactam-Antibiotika, kurzkettigen Fettsäuren (Short Chain Fatty Acids, SCFAs) wie Butyrat sowie von NSAIDs wie Salicylsäure und Ketoprofen beteiligt ist (Enerson und

Drewes, 2003; Emoto et al., 2002; Neuhoff et al., 2005; Choi et al., 2005). Eine Möglichkeit zur Identifizierung der Substrate des MCT1 besteht in Inhibitionsstudien unter Verwendung möglichst spezifischer Hemmstoffe dieses Transporters.

1.4.5.2 Hemmstoffe des MCT1

Die MCT1-Hemmstoffe können in drei Kategorien eingeteilt werden (Halestrap und Meredith, 2004):

Zu den kompetitiven und am Besten untersuchten Inhibitoren für MCT1 zählen unter anderem Cyano-Zimtsäurederivate, wie z. B. α -Cyano-4-hydroxycinnamat (CHC). Hierbei ist zu beachten, dass CHC zwar oft als spezifischer Inhibitor für MCT1 genannt wird, jedoch ebenso den mitochondrialen Pyruvattransporter und den Anionenaustauscher AE1 hemmt.

Eine Bandbreite amphiphiler Verbindungen unterschiedlicher Struktur können als potente Hemmstoffe eingesetzt werden, so z. B. die Bioflavonoide Quercetin und Phloretin. Diese hemmen allerdings ebenfalls AE1 und andere Membrantransportprozesse.

Stilbendisulfonate, 4,4'-Diisothiocyanostilben-2,2'-disulfonat (DIDS) als ein Beispiel, wirken als reversible Hemmstoffe des MCT1 in Erythrocyten, jedoch mit deutlich geringerer Affinität als für AE1. MCT1 erfährt des Weiteren eine irreversible Hemmung durch verschiedene Thiol- und Amino-Reagenzien und ist besonders sensitiv gegenüber *p*-Chloromercuribenzoatesulfonat (pCMBS).

1.4.5.3 Verteilung des MCT1 im Intestinum

Bisher wurde der MCT1 in Geweben unterschiedlicher Spezies immunchemisch lokalisiert, ebenso in verschiedenen Zellkulturen. Immunoblots zeigten, dass das MCT1-Protein im humanen Intestinum vom Duodenum bis zum Colon reichlich exprimiert und vornehmlich in der luminalen Membran des Colons lokalisiert ist (Ritzhaupt et al., 1998 a, Gill et al., 2005, Englund et al., 2006). Es wurde berichtet, dass das Ausmaß der MCT1-Protein- und mRNA-Expression in der luminalen Membran von Epithelzellen auf der Oberfläche der Colonmucosa am größten ausfällt und mit dem Abstieg in die Krypten schnell abnimmt (Lambert et al., 2002). Eine immunhistochemische Studie bestätigte die Begrenzung auf apikale Membranen durch die

Markierung mit einem gegen den humanen MCT1 gerichteten Antikörper und dessen Visualisierung durch ein Chromogen (Gill et al., 2005). In der humanen intestinalen Zelllinie Caco-2 wurde herausgefunden, dass die mRNA-Expression des MCT1 in Caco-2 Zellen dem Expressionsprofil des humanen Dünndarms näher kommt als anderen Darmabschnitten des Menschen. Das zeitliche mRNA-Expressionsprofil des MCT1 in Caco-2 Zellen relativ zu dem im humanen Intestinum verhält sich von Tag 4 bis Tag 21 konstant (Englund et al., 2006). In Monolayern des Caco-2/BBe Subklons wurde die Lokalisation des MCT1 in der apikalen Plasmamembran aufgezeigt (Buyse et al., 2002).

1.5 ZIELSETZUNG

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit ist die Aufklärung aktiver Transportmechanismen von Arzneistoffen mit Hilfe der Caco-2/TC7 Zellen als *in vitro* Modell für das gastrointestinale Epithel. Die Kenntnis dieser Mechanismen ist unter anderem im Zusammenhang mit der oralen Bioverfügbarkeit neuer Wirkstoffe von Bedeutung.

Als Modellarzneistoff wird das nicht-steroidale Antirheumatikum Ibuprofen ausgewählt. Ibuprofen ist der BCS-Klasse II zuzuordnen und aufgrund seiner dementsprechend guten Permeabilität für die Untersuchung von Transportmechanismen grundsätzlich geeignet. Vorversuche mit Ibuprofen ergeben außerdem den Hinweis darauf, dass neben rein passiver Diffusion ein aktiver Transportmechanismus an dessen Permeation beteiligt sein muss. In der Literatur finden sich einige Angaben über die passive Permeabilität von Ibuprofen, aber auch Hinweise auf die Beteiligung des Monocarboxylat-Transporters 1 (MCT1). Jedoch sind die gefundenen Aussagen inkonsistent (1.1), so dass die tatsächliche Rolle des MCT1 am Transport von Ibuprofen ungeklärt bleibt.

Auf dieser Basis ergibt sich als Arbeitshypothese die Annahme, dass die Permeation von Ibuprofen neben der rein passiv transzellulären Diffusion durch einen Carrier, möglicherweise den MCT1, vermittelt wird. Die Überprüfung dieser Hypothese erfolgt über Permeationsstudien an Caco-2/TC7 Zellen, unterstützt durch die immunchemische Lokalisierung des MCT1 in diesen Zellen.

Die Permeationsstudien repräsentieren einen mechanistischen Ansatz und werden an Monolayern der Caco-2/TC7 Zellen in Transwells durchgeführt. Hierbei werden grundsätzlich beide Transportrichtungen untersucht, also sowohl die Richtung der Absorption als auch die der Sekretion. Dieses Vorgehen liefert Informationen über die Art des beteiligten aktiven Mechanismus, da dieser in beide Richtungen gleichermaßen oder, z. B. im Falle eines Efflux-Transporters, bevorzugt in eine Richtung funktionieren könnte. Weiterhin werden grundlegende Aspekte der Ibuprofen-Permeation, wie z. B. Konzentrationsabhängigkeit oder der Bedarf an Stoffwechselenergie, herausgefiltert. Darauf aufbauend wird durch den Einsatz von Substraten oder Inhibitoren möglicherweise beteiligter Transporter, wie z. B. MCT1 oder P-gp, deren Beteiligung am Transport von Ibuprofen untersucht. Zur vergleichenden Einordnung der erhaltenen Ergebnisse über den Ibuprofen-Transport werden die Schlüsselexperimente parallel mit Propranolol, einem Modellarzneistoff für rein passiv transzelluläre Permeation, durchgeführt.

Um gemeinsam mit den Ergebnissen der Permeationsstudien weiteren Aufschluss über die Rolle des MCT1 beim Ibuprofen-Transport zu erhalten, soll die zelluläre Verteilung des MCT1-Proteins in den Caco-2/TC7 Zellen bestimmt werden. Zu diesem Zweck wird die Methode der Immunfluoreszenz an unserem Lehrstuhl neu etabliert. Diese besteht in der immunchemischen Markierung des MCT1-Proteins nach der so genannten 2-Schritt indirekten Färbemethode und der anschließenden fluoreszenzmikroskopischen Detektion. Hierfür müssen geeignete Antikörper ausgewählt und ein detailliertes Färbeprotokoll erstellt werden. Außerdem kommen verschiedene Fixierungsmethoden zum Einsatz, die ebenso wie die Antikörper hinsichtlich ihrer Eignung in dieser Anwendung zu überprüfen sind. Für die Lokalisierung des MCT1 ist darüber hinaus eine räumliche Orientierung in den Zellen erforderlich, die durch die entsprechende Hintergrundfärbung von Zellkernen und F-Actin ermöglicht wird. Durch dieses Vorgehen kann eine valide Aussage über die räumliche Verteilung des MCT1-Proteins in den Caco-2/TC7 Zellen getroffen werden.

Durch die Zusammenfassung aller Einzelresultate der Permeationsstudien und der Immunfluoreszenz kann somit ein Gesamtbild der Transportcharakteristik von Ibuprofen beschrieben werden, das auch die Beurteilung der möglichen Beteiligung des MCT1 umfasst.

2 IMMUNCHEMISCHE LOKALISIERUNG DES MCT1

2.1 EINLEITUNG

Wie in Kapitel 1.4.4 beschrieben, liefern inzwischen einige Literaturstellen Angaben über die Verteilung von MCT-Isoformen im Intestinum. Es besteht jedoch weiterhin die Möglichkeit, dass neben MCT1 weitere Isoformen der MCT Familie im menschlichen Darmtrakt exprimiert werden. Im Hinblick auf Permeationsstudien zur Aufklärung von Transportmechanismen macht dies die eindeutige Zuordnung der molekularen Identität des im Einzelnen beteiligten Transporters sehr komplex. Dieser Sachverhalt verdeutlicht die Bedeutung der Kenntnis des Expressionsprofils und vor allem der zellulären Lokalisation des in Frage kommenden Transportproteins für die Interpretation der pharmakokinetischen Daten.

Die zelluläre Lokalisation des MCT1 in Caco-2 Zellen wurde zwar vor kurzem beschrieben (Buyse et al., 2002), allerdings im Subklon BBe (1.4.5.3). Im Caco-2/TC7 Subklon wurde diese nach dem aktuellen Kenntnisstand noch nicht gezeigt und soll daher im Folgenden untersucht werden. Hierfür wird eine immunchemische Färbemethode etabliert, die die Lokalisierung des MCT1 mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht. Außerdem wird die Funktionsfähigkeit und Spezifität zweier eingesetzter Antikörpersysteme bewertet.

2.2 IMMUNCHEMISCHE FÄRBUNG UND FLUORESZENZ- MIKROSKOPISCHE LOKALISIERUNG DES MCT1 IN CACO-2/TC7 ZELLEN

2.2.1 Das Cytoskelett und F-Actin

Das Cytosol eukaryotischer Zellen enthält ein Cytoskelett, das die Zellgestalt gewährleistet, für die Zellbeweglichkeit verantwortlich ist und intrazellulären Stofftransport ermöglicht. Das Cytoskelett besteht aus mindestens drei verschiedenen Faserarten bzw. Proteinfilamenttypen, nämlich den Intermediärfilamenten

(mechanische Stabilisierung), den Mikrotubuli (Zellorganisation und intrazellulärer Stofftransport) und den Actinfilamenten (Formgebung und Fortbewegung von Zellen) (Abbildung 2-1) (Alberts, 2005).

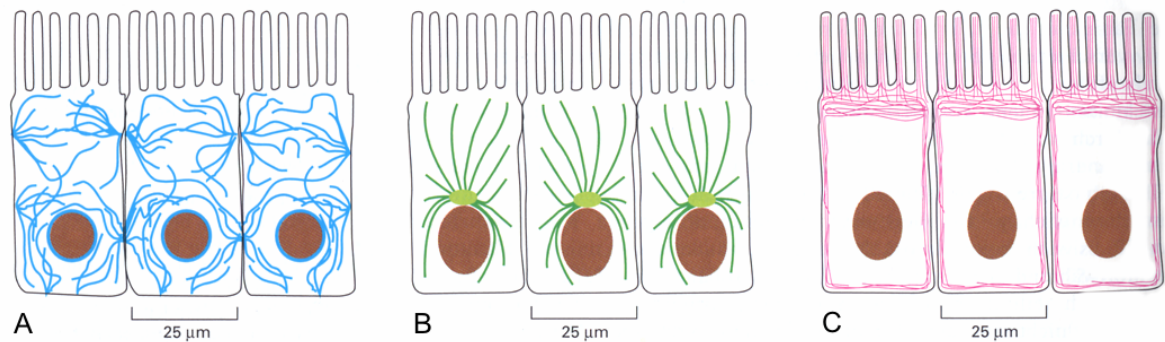


Abbildung 2-1 Die drei Proteinfilamenttypen, die das Cytoskelett bilden, am Beispiel von Darmepithelzellen: (A) Intermediärfilamente, (B) Mikrotubuli und (C) Actinfilamente (Alberts, 2005).

Die Actinfilamente und speziell deren Lokalisation in der Zelle sind für die immunchemischen Nachweise (2.2.2 und 4.4.3.4) von besonderer Bedeutung. Daher werden sie an dieser Stelle genauer betrachtet. Das Actin-Cytoskelett dient unter anderem der Zellbewegung und der Formgebung der Zelloberfläche. Es ist aus Bündeln und Netzwerken von einzelnen Actinfilamenten, die auch als F-Actin bezeichnet werden, aufgebaut. Monomeres Actin ist globulär (G-Actin) und kann zur doppelhelikalen filamentären Form (F-Actin, bzw. Actinfilamente) polymerisieren. Diese flexiblen Strukturen sind überall in der Zelle verteilt; besonders häufig befindet sich jedoch unterhalb der Plasmamembran ein actinreicher Cortex. Speziell im Darm stabilisieren F-Actin-Bündel die lange schlanke Gestalt der Mikrovilli der Bürstensaumzellen.

2.2.2 Markierung von Zellkernen und F-Actin

Die Lokalisierung des MCT1-Proteins in der Zelle und innerhalb des Zellverbands ist nur möglich, wenn die Ausrichtung des Zellmonolayers (apikale bzw. basolaterale Membran) und eine Orientierung innerhalb der Zellen (z. B. Lage des Zellkerns) eindeutig zugeordnet bzw. vorgenommen werden kann (4.4.3.4).

Wie bereits beschrieben, ist das Erscheinungsbild der zum dichten Monolayer herangewachsenen und ausdifferenzierten Caco-2 Zellen säulenartig (1.3.2.1). Die

Zellkerne befinden sich im basalen Teil der Zellen und werden mit DAPI angefärbt (4.4.3.4). Die Abbildung der (apikalen) Zellmembran wird über die Visualisierung des Actin-Cytosketts mittels fluoreszenzmarkiertem Phalloidin vorgenommen (4.4.3.4). Dieser Ansatz wird als erfolgversprechend angesehen, da Peterson und Mooseker (1992) bereits eine intensive Anfärbung von F-Actin mit Hilfe von Rhodamin-Phalloidin in der Bürstensaummembran von Caco-2/BBE Zellen und eine schwächer ausgeprägte Färbung in der basolateralen Membran gezeigt haben.

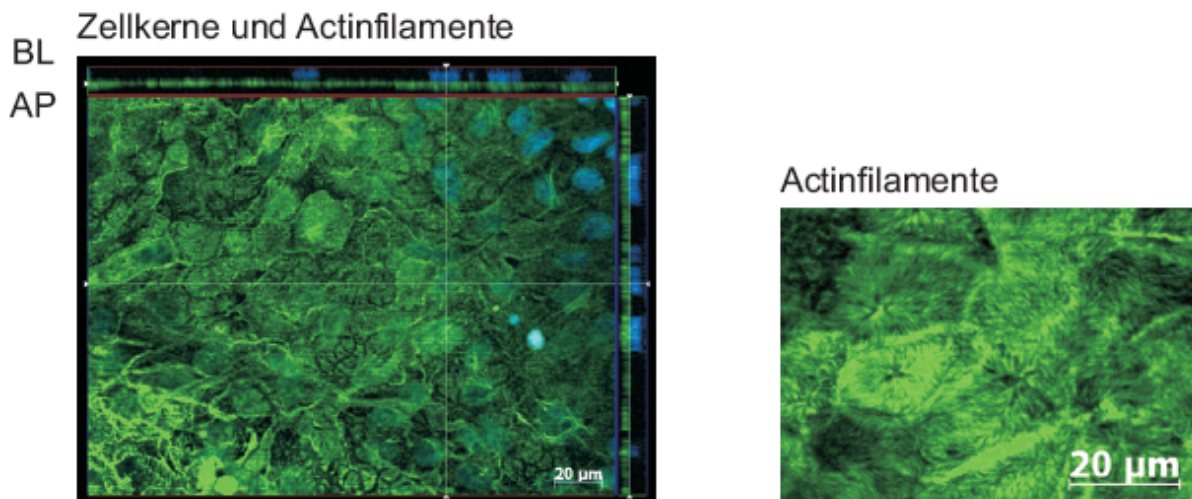


Abbildung 2-2 Schnittansicht (1 µm Z-Schnittdicke) und 2D-Aufsicht von Seiten der Bürstensaummembran des Caco-2/TC7 Zellmonolayers, erstellt mit der mikroskopischen Methode der strukturierten Beleuchtung. F-Actin-Färbung mit Alexa 488-Phalloidin (grün) und Kernfärbung mit DAPI (blau) nach Fixierung mit 4 % PFA. AP, apikale Membran; BL, basolaterale Membran.

Nach der Anfärbung mit DAPI und Alexa 488-konjugiertem Phalloidin können in der zweidimensionalen Aufsicht die Actinfilamente des Cortex bzw. der Microvilli gut dargestellt werden (Abbildung 2-2, rechts). In der Schnittansicht der Zellmonolayer ist F-Actin ausschließlich auf der apikalen Zellseite zu erkennen, da sich hier in den Microvilli und im Cortex unterhalb der Plasmamembran der Großteil des F-Actins befindet (Abbildung 2-2, links). Die actinreichen Bereiche beschreiben auf diese Weise die Form der apikalen Plasmamembran. Im Gegensatz zu Peterson und Mooseker (1992) ist in den hier gezeigten Präparaten keine Immunfluoreszenz in der basolateralen Plasmamembran zu erkennen. Durch die Kernfärbung mit DAPI wird die Lage einzelner Zellen kenntlich gemacht. Da sich die Zellkerne nahe der basalen

Membran befinden, wird in Kombination mit der Markierung von F-Actin eine räumliche Orientierung im Zellverbund möglich.

2.2.3 Einfluss der Fixierungsmethode auf die Färberesultate

Um valide Ergebnisse über die Verteilung des MCT1 zu erhalten, werden die Färberesultate in Abhängigkeit von der Fixierung mit Methanol bzw. 4 % Paraformaldehyd verglichen und bewertet, da beide Fixierungsagenzien, wie in Kapitel 4.4.5 beschrieben, Vor- und Nachteile haben. Des Weiteren werden zwei verschiedene Sets von Primär- und Sekundärantikörpern beurteilt (Tabelle 4-13), von denen eines noch nicht in dieser Form verwendet wurde.

Zur Markierung des MCT1-Proteins wird zum einen der Antikörper anti-human MCT1 (C20) aus der Ziege (goat anti-human MCT1) (Santa Cruz Biotechnology) ausgewählt, der für die Anwendung in immunhistochemischen Studien nach Methanolfixierung empfohlen wird. Es handelt sich hierbei um einen gereinigten polyklonalen Antikörper, der gegen ein C-terminales Peptid des humanen MCT1 gerichtet ist (Kapitel 4.4.3.1). Zum anderen wird der Antikörper anti-human MCT1 (aa 3-14) aus dem Kaninchen (rabbit anti-human MCT1) (QED Bioscience) eingesetzt, der nach dem aktuellen Kenntnisstand noch nicht für immunocytochemische Färbungen verwendet wurde, sondern nur für Immunoblots. Dieser Antikörper ist gegen eine N-terminale Sequenz des humanen MCT1 gerichtet. Die ausgewählten Primärantikörper erkennen also verschiedene Sequenzen des MCT1-Proteins, wobei beide intrazellulär lokalisiert sind, da sowohl das C-terminale als auch das N-terminale Ende des humanen MCT1-Proteins ins Cytoplasma reichende Domänen sind (1.4.2).

Beide Primärantikörper werden nach der 2-Schritt indirekten Methode (4.4.1) an einen korrespondierenden und fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper gekoppelt und auf diese Weise der fluoreszenzmikroskopischen Detektion zugänglich gemacht. Diese Sekundärantikörper werden jeweils Alexa 555-konjugiert (rot) ausgewählt, um in einer Dreifachfärbung die parallele Visualisierung des humanen MCT1, der mit DAPI markierten Zellkerne (blau) und der Actinfilamente (Alexa 488-konjugiert, grün) zu ermöglichen.

Nach der Fixierung mit Methanol und nachfolgender Färbung mit dem goat Antikörper anti-human MCT1 ist das MCT1-Protein hauptsächlich auf der lateralen Seite der

Zellen zu erkennen, während es im Bereich des Bürstensaums kaum auftritt (Abbildung 2-3, obere Hälfte). Werden die Zellen mit Methanol fixiert, aber mit dem rabbit Antikörper anti-human MCT1 gefärbt, sind die lateralen Zellmembranen, in Übereinstimmung mit dem ersten Antikörper, ebenfalls immunopositiv (Abbildung 2-3, untere Hälfte). Als Unterschied bleibt festzustellen, dass der MCT1 bei der Markierung mit dem rabbit Antikörper über die ganze Bürstensaummembran verteilt zu sein scheint. Weiterhin sind ungefärbte Spalte zwischen benachbarten Zellen zu erkennen. Diese Beobachtung mag entweder auf die intrazellulären Bindungsstellen der Primäantikörper oder aber auf eine tatsächliche räumliche Distanz der Transportproteine zurückzuführen sein. Als eine weitere Erklärung für das Auftreten dieses Phänomens sollte in Betracht gezogen werden, dass die beobachteten Zellstrukturen nahe der Auflösungsgrenze des mikroskopischen Systems liegen. Die beschriebenen Unterschiede der Färberesultate nach der Fixierung mit Methanol könnten durch die verschiedenen Bindungsstellen der Antikörper begründet sein.

Nach der Fixierung mit 4 % PFA sind die immunpositiven Bereiche bei beiden Antikörpern ebenfalls auf die apikale Seite der Zellmonolayer beschränkt (Abbildung 2-4). Der MCT1 kann über den Großteil der Bürstensaummembran hinweg detektiert werden. Was die Qualität der Färbeergebnisse angeht, so erscheinen die immunpositiven Bereiche nach der PFA-Fixierung weniger eindeutig ausgeprägt, vor allem bei Verwendung des goat Antikörpers anti-human MCT1. Im Vergleich mit der Methanolfixierung entsteht der Eindruck, dass die Antikörper nach der Fixierung mit 4 % PFA und der daraus resultierenden Quervernetzung nicht in der Lage sind, genauso tief in die Zellen und die laterale Plasmamembran vorzudringen.

Die Färbungen nach Fixierung mit Methanol bzw. 4 % PFA liefern vergleichbare Resultate. Das MCT1-Protein ist vornehmlich auf der apikalen Zellseite und in der lateralen Plasmamembran zu erkennen. Bei der Verwendung beider Antikörpersets sind innerhalb der Zellen keine weiteren MCT1-positiven Stellen zu erkennen (Daten nicht abgebildet). Die aufgezeigten Unterschiede in den Färbungen können möglicherweise auf die unterschiedlichen Bindungsstellen der Primäantikörper zurückgeführt werden. Gleichwohl muss berücksichtigt werden, dass die Fixierungsmethoden selbst einen gewissen Einfluss auf die immunchemischen Ergebnisse ausüben. Die Zusammensetzung der Plasmamembran wird durch beide Konservierungsmethoden in unterschiedlicher Art und Weise verändert (4.4.5). Trotz der

grundsätzlich durchgeführten Permeabilisierung durch den Zusatz von Triton-X 100 zur Antikörper-Verdünnungslösung (Tabelle 4-4) ergeben sich Unterschiede in der Zugänglichkeit der intrazellulären Bindungsstellen des MCT1-Proteins.

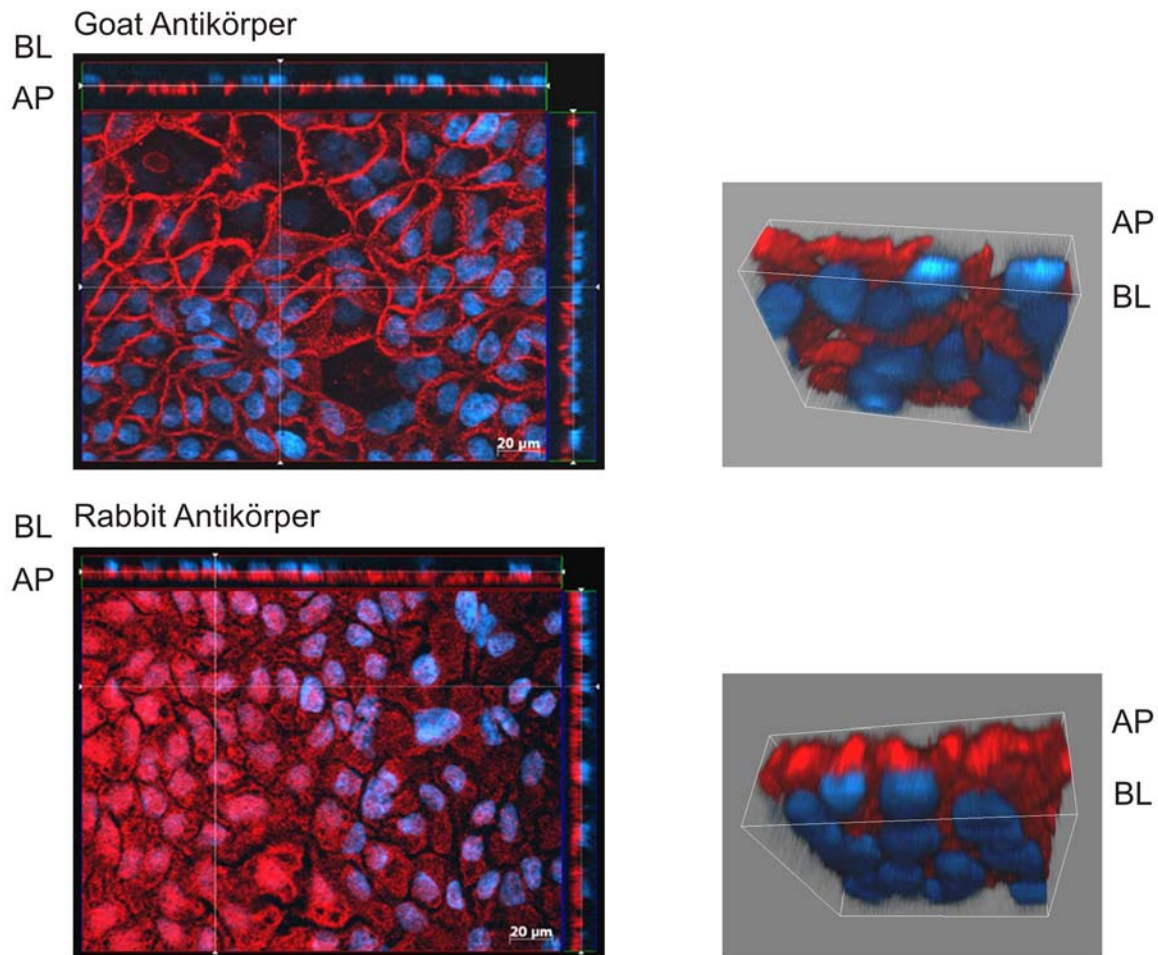


Abbildung 2-3 Färberesultate nach Fixierung mit Methanol. Schnittansicht ($1\ \mu\text{m}$ Z-Schnittdicke) und 3D-Bilder von Caco-2/TC7 Monolayern. Darstellung des MCT1 mit dem Antikörper goat anti-human MCT1 (obere Hälfte) bzw. dem Antikörper rabbit anti-human MCT1 (untere Hälfte) (jeweils rot durch Alexa-555-konjugierte Sekundärantikörper). Zellkerne sind blau dargestellt (DAPI Färbung). AP, apikale Seite der Zellen; BL, basolaterale Seite der Zellen.

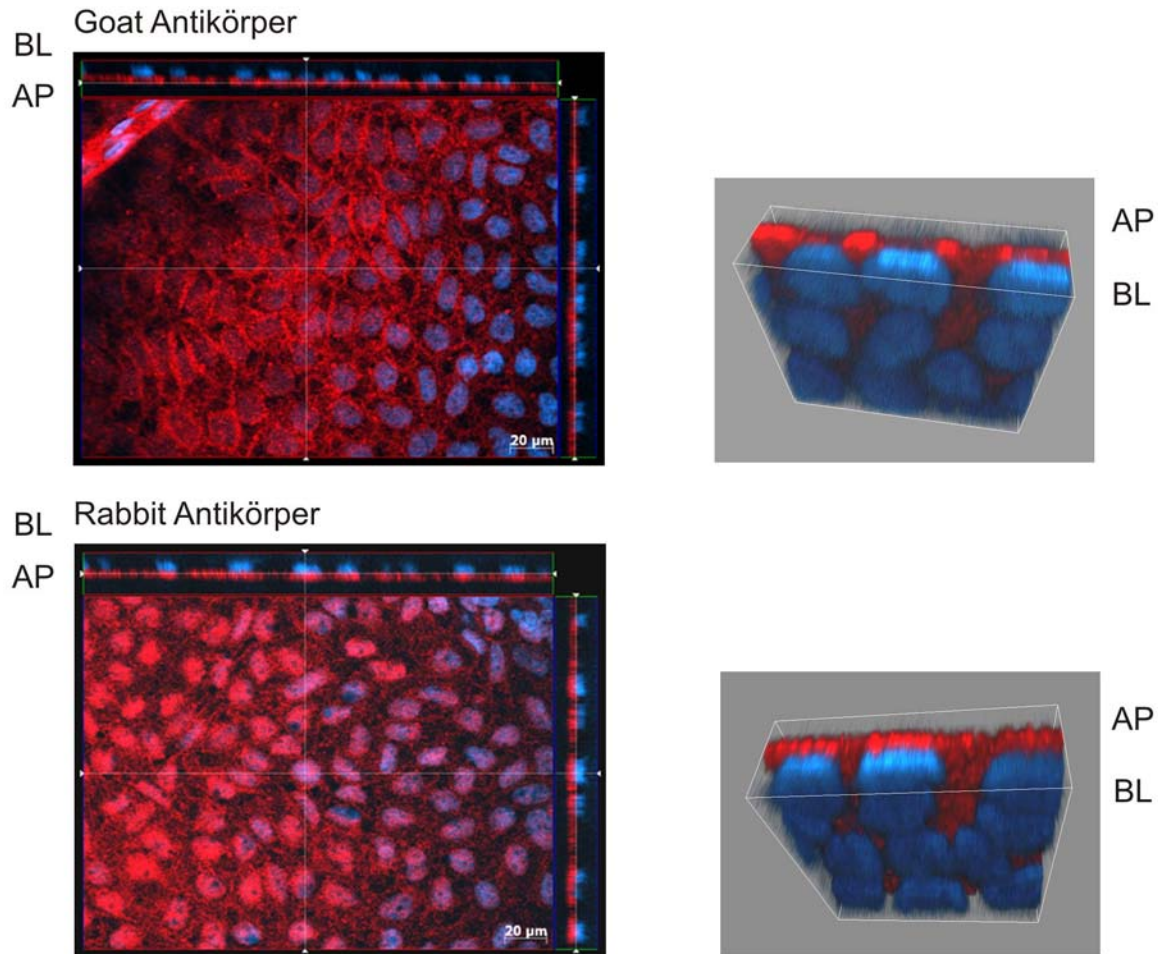


Abbildung 2-4 Färberesultate nach Fixierung mit 4 % Paraformaldehyd. Schnittansicht (1 µm Z-Schnittdicke) und 3D-Bilder von Caco-2/TC7 Monolayern. Darstellung des MCT1 mit dem Antikörper goat anti-human MCT1 (obere Hälfte) bzw. dem Antikörper rabbit anti-human MCT1 (untere Hälfte) (jeweils rot durch Alexa-555-konjugierte Sekundärantikörper). Zellkerne sind blau dargestellt (DAPI Färbung). AP, apikale Seite der Zellen; BL, basolaterale Seite der Zellen.

2.2.4 Lokalisierung des MCT1 mit zwei verschiedenen Antikörpersets

Die Verteilung des MCT1 in Caco-2/TC7 Zellmonolayern wird anhand der beschriebenen dreifachen immunchemischen Färbung gezeigt. Die Ergebnisse zeigen bei beiden Sets von Primär- und korrespondierenden Sekundärantikörpern eine Begrenzung des MCT1-Proteins auf eine Seite des Zelllayers. Es wird ersichtlich, dass der MCT1 in der Nähe von F-Actin und als Konsequenz daraus in der apikalen Zellmembran lokalisiert ist (Abbildung 2-5). Anhand der Darstellung der Einzelbilder („Galerieansicht“ Abbildung 2-6), aus denen sich die Schnittansicht der

Dreifachfärbung mit Hilfe des rabbit Antikörpers anti-human MCT1 (Abbildung 2-5, untere Hälfte) zusammensetzt, wird dieser Sachverhalt noch einmal verdeutlicht. Bedingt durch die cytoplasmatischen Bindungsstellen beider Primärantikörper scheinen die MCT1-gefärbten Regionen etwas näher am Zellkern zu liegen als die Actinfilamente. Auch hier sind MCT1-negative Spalte zwischen Zellen zu sehen, wohingegen diese für F-Actin positiv sind (Abbildung 2-5, obere Hälfte, 3D-Bilder). Entsprechend den Ergebnissen, die bei der Untersuchung des Einflusses der Fixierungsmethoden gefunden wurden (2.2.3), sind Bereiche immunopositiver Färbung des MCT1 in der Bürstensaummembran zu sehen sowie eine intensive Immunfluoreszenz in der lateralen Membran der apikalen Seite der Zellen.

Diese Ergebnisse stimmen mit Berichten über den menschlichen Dünndarm und luminalen Colonmembranen überein, deren Daten aus Immunoblots und Immunfluoreszenzstudien stammen (Ritzhaupt et al., 1998 a; Gill et al., 2005; Lambert et al., 2002). Auch in Caco-2/BBe Zellen wurde durch Immunfluoreszenzmikroskopie gezeigt, dass der MCT1 primär in der apikalen Plasmamembran und im direkt darunter liegenden Cytoplasma lokalisiert ist (Buyse et al., 2002), wohingegen in der ursprünglichen Caco-2 Zelllinie bisher nur die mRNA Expressionslevel des MCT1 gezeigt wurden (Englund et al., 2006).

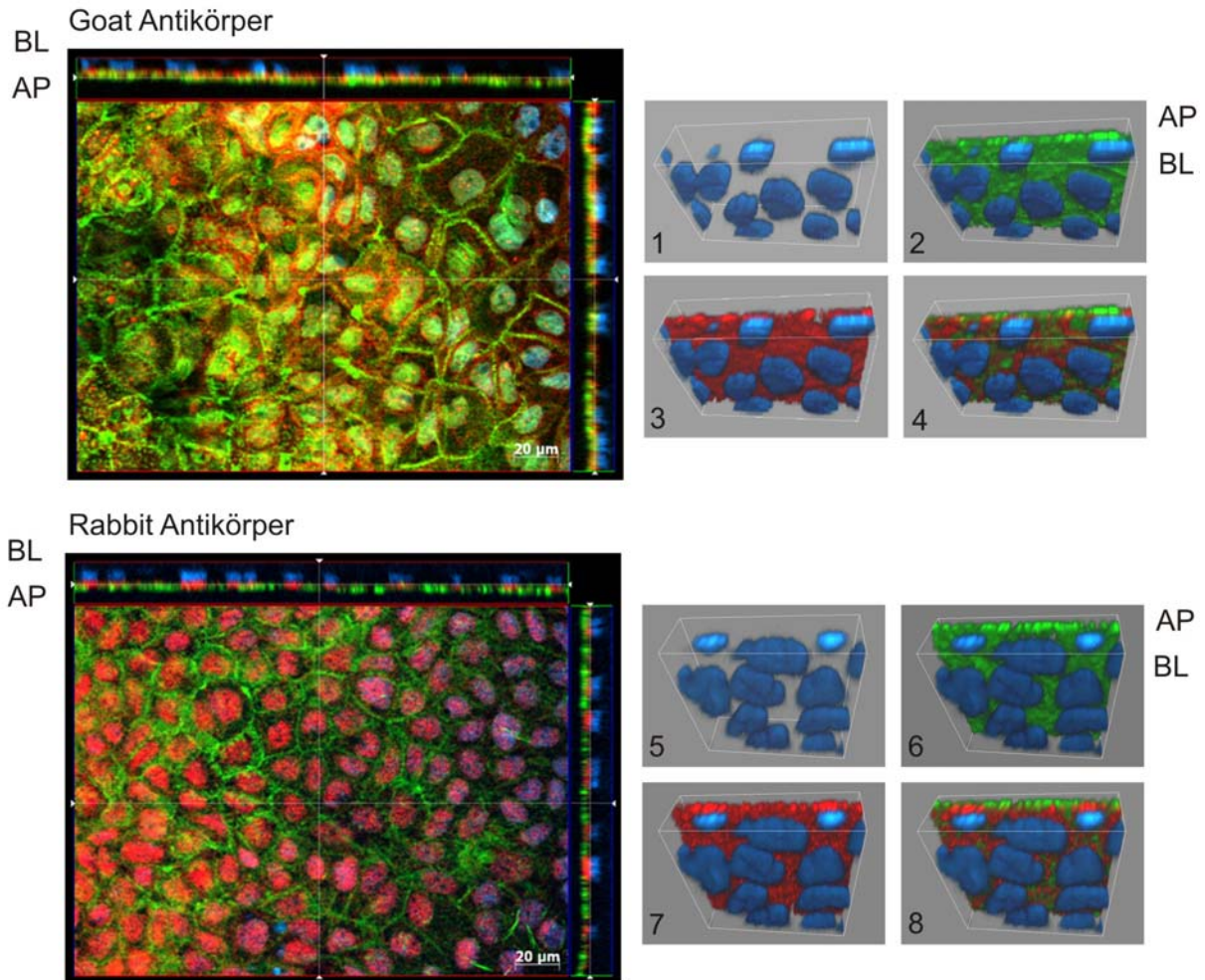


Abbildung 2-5 Ergebnisse der Dreifachfärbung nach Fixierung mit 4 % Paraformaldehyd. Schnittansicht (1 μm Z-Schnittdicke) und 3D-Bilder von Caco-2/TC7 Zellmonolayern. Darstellung des MCT1 mit dem Antikörper goat anti-human MCT1 (obere Hälfte) bzw. dem Antikörper rabbit anti-human MCT1 (untere Hälfte) (jeweils rot durch Alexa-555-konjugierte Sekundärantikörper). Zellkerne sind blau dargestellt (DAPI Färbung), F-Actin grün (Alexa 488-Phalloidin). Die Zusammensetzung der 3D-Bilder aus Zellkernen, F-Actin und MCT1 (4, 8) ist dargestellt: Zellkerne (1, 5), Mischbild von Zellkernen und F-Actin (2, 6) und Mischbild von Zellkernen und MCT1 (3, 7). AP, apikale Seite der Zellen; BL, basolaterale Seite der Zellen.

Rabbit Antikörper

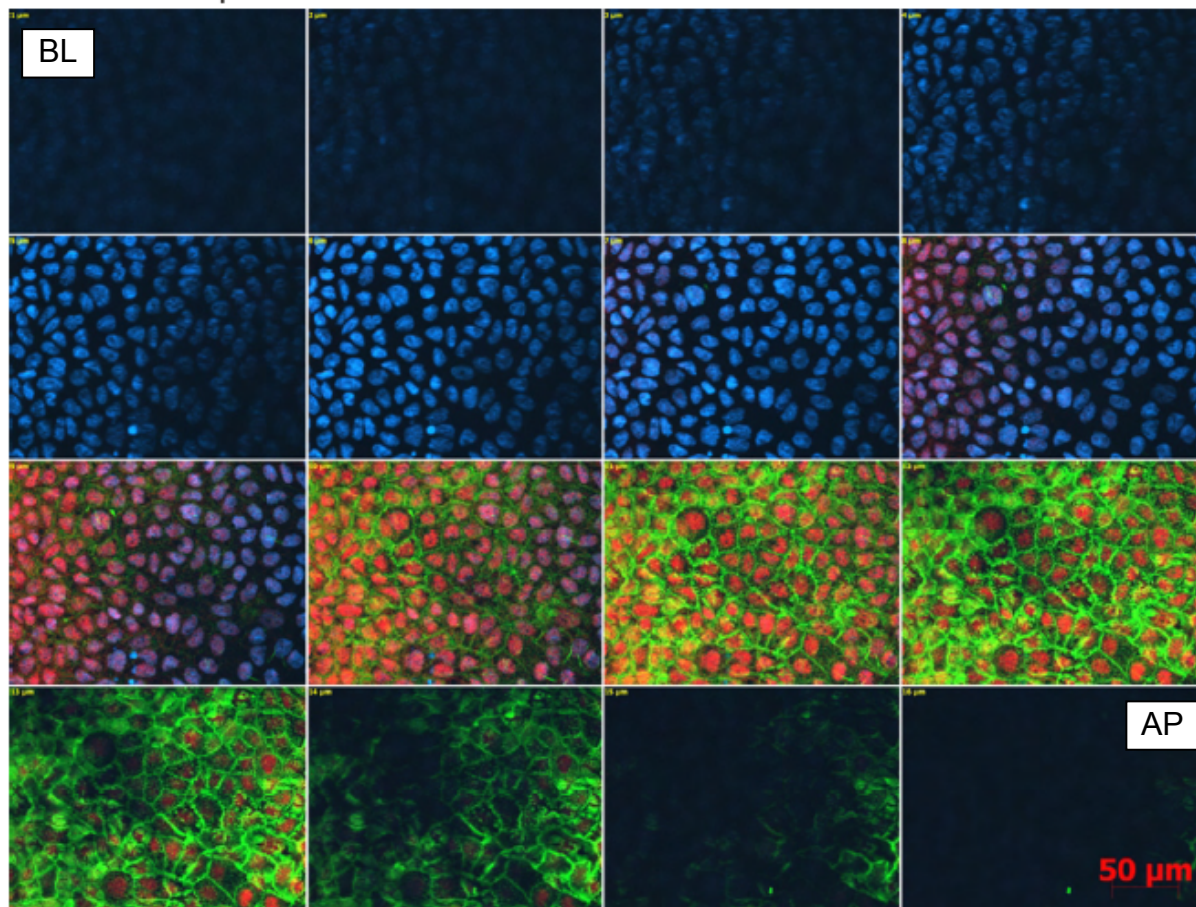


Abbildung 2-6 Ergebnisse der Dreifachfärbung nach Fixierung mit 4 % Paraformaldehyd. Galerieansicht zur Darstellung des Aufbaus einer Schnittansicht (Z-Stapel aus 16 Z-Schnitten zu je 1 μm Z-Schnittdicke) von Caco-2/TC7 Zellmonolayern. Darstellung des MCT1 mit dem Antikörper rabbit anti-human MCT1 (rot durch Alexa-555-konjugierten Sekundärantikörper). Zellkerne sind blau dargestellt (DAPI Färbung), F-Actin grün (Alexa 488-Phalloidin). AP, apikale Seite der Zellen; BL, basolaterale Seite der Zellen.

2.3 BEWERTUNG DER ERGEBNISSE

Im Rahmen der immunchemischen Untersuchungen liegt das Hauptaugenmerk auf der Lokalisation des MCT1-Proteins in Caco-2/TC7 Zellen, an denen auch die Permeationsstudien (3) durchgeführt werden. Die Polarisierung der Zellmonolayer und eine räumliche Orientierung innerhalb der Zellen werden durch die Hintergrundfärbung von Zellkernen und F-Actin aufgezeigt und erlauben so eine definierte Aussage über die Lokalisation des MCT1-Proteins. Mit der Methode der indirekten Immunfluoreszenz gelingt es, die restriktive Expression des MCT1 auf der apikalen Seite der Zellen darzustellen. Der Transporter ist über die Bürstensaummembran hinweg sowie in den lateralen Plasmamembranen dieses Teils der Zellen verteilt.

Der Fixierungsvorgang wird anhand des Vergleichs zweier Fixierungsmethoden und der anschließend erhaltenen Färbeergebnisse validiert. Es wird gezeigt, dass beide Fixierungsagenzien richtige und nahezu identische Verteilungsergebnisse des MCT1 erbringen, wobei aufgrund ihrer unterschiedlichen Wirkungsweise geringfügige Unterschiede auftreten. Beide verwendeten Sets von Antikörpern anti-MCT1 bestätigen das Auftreten des Transporters in der apikalen Zellmembran. Hierbei stellen beide Primärantikörper, also auch der zuvor noch nicht in der Immunfluoreszenz eingesetzte Antikörper rabbit anti-human MCT1 (QED Bioscience), ihre Nützlichkeit in der immunchemischen Visualisierung des MCT1 unter Beweis.

3 PERMEATIONSSTUDIEN AN CACO-2/TC7 ZELLEN

3.1 EINLEITUNG

Permeationsstudien am Transwell-System (4.3.1) repräsentieren einen mechanistischen Ansatz zur Aufklärung der am Arzneistoff-Transport beteiligten Prozesse. Dieser sieht vor, über einen geeigneten Versuchsaufbau durch die Variation der Umgebungsbedingungen (z. B. pH-Wert), Eingriffe in den Zellstoffwechsel (z. B. Blockade der Energiegewinnung der Zelle) oder den Einsatz von Inhibitoren, charakteristische Aspekte des Transports herauszufiltern um diese schließlich zu einem möglichst realistischen Gesamtbild zusammenzufügen (Artursson et al., 1996).

Für die Interpretation der Ergebnisse der Permeationsstudien im Bezug auf eine mögliche Beteiligung des MCT1 ist die Kenntnis seiner Verteilung in den verwendeten Caco-2/TC7 Zellen von großer Bedeutung. Die Restriktion des MCT1 auf die apikale Seite der Zellen wurde in Kapitel 2 bereits gezeigt. Gleichmaßen entscheidend ist das zeitliche Expressionsprofil des Transporters. Es wurde beschrieben, dass die mRNA-Expression des MCT1 in Caco-2 Monolayern relativ zu der im menschlichen Dünndarm von Tag 4 bis Tag 21 konstant ist (Englund et al., 2006). Da die Zellmonolayer in der vorliegenden Arbeit ab Tag 21 verwendet werden, ist davon auszugehen, dass der MCT1 auch in diesem Zeitraum entsprechend exprimiert wird.

Der Modellarzneistoff Ibuprofen wird als Racemat eingesetzt, obwohl bekannt ist, dass das (S)-Enantiomer die eigentliche Wirkform darstellt. Da jedoch weiterhin bekannt ist, dass (R)-(-)-Ibuprofen unter physiologischen Bedingungen eine unidirektionale metabolische Inversion zu (S)-(+)-Ibuprofen erfährt (Davies, 1998), und da weder Ogihara et al. (1996) noch Awadallah (2003) signifikante Unterschiede im Transport der beiden Enantiomere in Caco-2 Zellen finden konnten, erscheint die Untersuchung enantiomerenreinen Arzneistoffs als nicht zwingend erforderlich.

Die Schlüsselexperimente zur Untersuchung des Ibuprofen-Transports werden zur Kontrolle ebenfalls mit Propranolol durchgeführt. Dieser Betablocker ist ein Modellarzneistoff für rein passiv transzellulären Transport (Artursson, 1990) und ermöglicht folglich eine Einordnung der Resultate von Ibuprofen.

3.2 UNTERSUCHUNG DER PERMEATION VON IBUPROFEN UND PROPRANOLOL

Außer bei den Experimenten zur Konzentrationsabhängigkeit des Ibuprofen-Transports (100 - 1600 µg/ml bzw. 0,5 - 8 mM Ibuprofen) wird in der Regel eine mittlere Konzentration von 800 µg/ml bzw. 4 mM Ibuprofen eingesetzt.

3.2.1 Konzentrationsabhängigkeit des Ibuprofen-Transports

Rein passiver Transport ist nach dem Fick'schen Diffusionsgesetz dadurch gekennzeichnet, dass sich die kumulativ permeierte Substanzmenge über der Zeit proportional zur eingesetzten Konzentration verhält (1.2.4.2 Gleichung 1); d. h. je höher die eingesetzte Konzentration ist, umso größer wird die Steigung der Plots aus kumulativ permeierter Substanzkonzentration über der Zeit. Wird aus diesen Plots für jede Donorkonzentration der apparente Permeationskoeffizient P_{app} ermittelt (4.3.1.3 Gleichung 3), ergeben sich durch die Normierung auf die Ausgangskonzentration im Donorkompartiment im Falle eines rein passiven Transports konstante Werte für P_{app} . Im Gegensatz dazu tritt bei aktivem Transport ab einer bestimmten Konzentration Sättigung ein. Dies ist dadurch zu erkennen, dass die kumulativ permeierte Substanzkonzentration über der Zeit bei Erhöhung der Donorkonzentration der jeweiligen Substanz ab dem Erreichen eines Schwellenwerts nicht weiter ansteigt. In der Folge bedeutet das für die Permeationskoeffizienten konstante Werte bis zum Schwellenwert und absinkende Werte ab dem Eintreten der Transporter-Sättigung.

Die Untersuchung einer möglichen Konzentrationsabhängigkeit des Ibuprofen-Transports erfolgt anhand der Permeationscharakteristik von fünf möglichst äquidistanten Ibuprofen-Konzentrationen im Bereich von 100 - 1600 µg/ml (0,5 - 8 mM). Bei der Auswahl der Konzentrationen wird darauf geachtet, dass diese im Bereich der Löslichkeit von Ibuprofen liegen und dass während der Experimente 'sink'-Bedingungen eingehalten werden. Die Löslichkeit von Ibuprofen in Natriumphosphatpuffer wurde von Martin (2003) bestimmt. Es ergeben sich pH-abhängige Sättigungslöslichkeiten von 3,14 mg/ml bei pH 7,5 über ca. 2,8 mg/ml bei pH 6,8 bis ca. 0,4 mg/ml bei pH 5,5. Mit der hier eingesetzten Maximalkonzentration von 1600 µg/ml wird demnach der Löslichkeitsbereich von Ibuprofen annähernd ausgeschöpft, aber nicht überschritten.

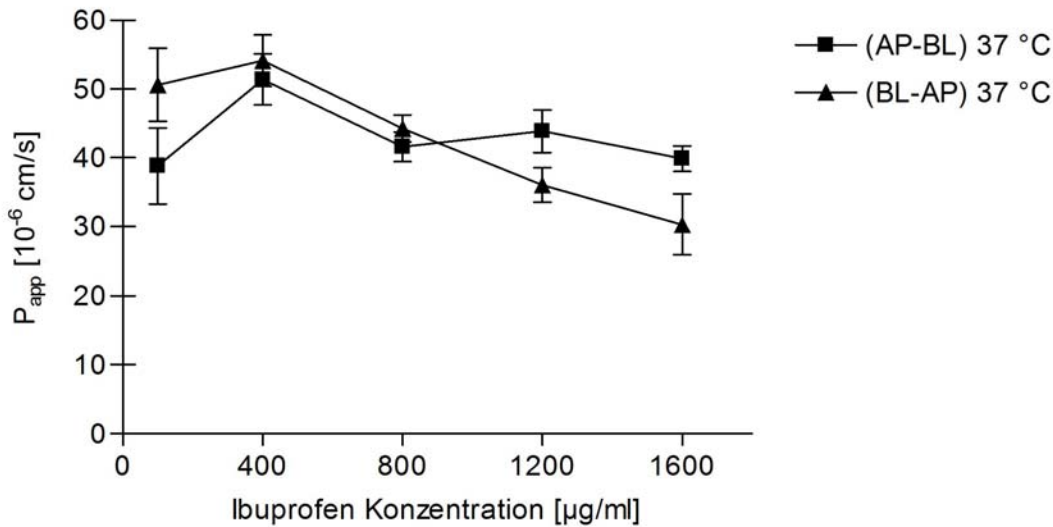


Abbildung 3-1 Konzentrationsabhängigkeit des Transports von Ibuprofen im Konzentrationsbereich von 100 - 1600 µg/ml. Darstellung der Permeationskoeffizienten über der Ibuprofen Konzentration in beiden Transportrichtungen bei 37 °C.

In Richtung des auswärts gerichteten Transports (BL-AP) liegen die P_{app} -Werte bei 100 und 400 µg/ml Ibuprofen auf einem ähnlichen Niveau um $50 \cdot 10^{-6}$ cm/s (Abbildung 3-1). Nach dem Überschreiten dieses Schwellenwerts bis hin zur höchsten Konzentration von 1600 µg/ml Ibuprofen sinkt der P_{app} bis auf einen Wert von ca. $30 \cdot 10^{-6}$ cm/s kontinuierlich ab. Dieses Ergebnis ist als ein starker Hinweis auf einen zugrunde liegenden sättigbaren Transportmechanismus zu deuten.

In Richtung der Absorption (AP-BL) ist der P_{app} ab 800 µg/ml ebenfalls niedriger als bei 400 µg/ml, jedoch stagnieren die Werte auf dem bei 800 µg/ml erreichten Niveau und sinken nicht weiter ab. Im unteren Konzentrationsbereich ist ein deutlicher Anstieg des Permeationskoeffizienten festzustellen. Als Erklärung hierfür kommt ein bei 100 µg/ml noch nicht in seiner Kapazität ausgelasteter aktiver Transportmechanismus in Frage. Es ist außerdem denkbar, dass sich die Qualität der verwendeten Zell-Passagen unterscheidet.

Das erhaltene Profil der Konzentrationsabhängigkeit der Permeationskoeffizienten weist auf die Beteiligung eines sättigbaren Transports in Richtung der Sekretion hin. Entsprechende Ergebnisse wurden kürzlich für Ketoprofen und Naproxen gezeigt (Choi et al., 2005). Hier lässt sich jedoch keine eindeutige Schlussfolgerung

hinsichtlich des zugrunde liegenden Mechanismus in Richtung der Absorption ziehen, so dass weitere Untersuchungen folgen müssen.

3.2.2 Einfluss der Temperatur auf den Transport

Die Experimente zur Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit von Ibuprofen werden bei 4 °C wiederholt. Es ist davon auszugehen, dass unter diesen Bedingungen der Zellstoffwechsel und somit jeglicher energiegetriebene (Transport-)Prozess in der Zelle unterdrückt wird. Bei einer Beteiligung aktiver Mechanismen müssten folglich die Permeationskoeffizienten um einen entsprechenden Betrag an Wert verlieren. Im Vergleich mit den Resultaten aus den vorhergehenden Versuchen bei 37 °C sollte es daher durch Subtraktion der Transportraten möglich sein, den relativen Anteil des aktiven und passiven Transports am Gesamttransport zu quantifizieren (Hu und Borchardt, 1990).

Die passiven Transportprozesse in der Zelle sind jedoch nicht vollständig von der Temperaturänderung unabhängig (Cogburn et al., 1991). Bei einer Absenkung der Temperatur auf 4 °C wird nicht nur die Energiegewinnung der Zellen unterdrückt, sondern auch die passive Permeabilität abgesenkt, da der Diffusionskoeffizient (1.2.4.2) temperaturabhängig ist. Außerdem ist von einer Rigidisierung der Zellmembran (1.2.2) auszugehen. Dieser Zusammenhang kann durch die Messung des TEER-Werts (4.3.2.1) bei 37 °C und bei 4 °C in Hank's Puffer verdeutlicht werden. Während der TEER-Wert bei 37 °C $160 \pm 5,2 \Omega \text{ cm}^2$ ($n = 8$) beträgt, werden bei der erniedrigten Temperatur Werte um $447 \pm 25,0 \Omega \text{ cm}^2$ ($n = 8$) gemessen. Dies entspricht einer 2,8-fachen Erhöhung des spezifischen Widerstands, die mit einer Verminderung der passiv parazellulären Permeabilität um denselben Faktor einhergehen müsste. Was dieser Zusammenhang für die passiv transzelluläre Permeabilität bedeutet, hängt von spezifischen Eigenschaften des jeweiligen Arzneistoffs ab und ist folglich schwer vorherzusagen.

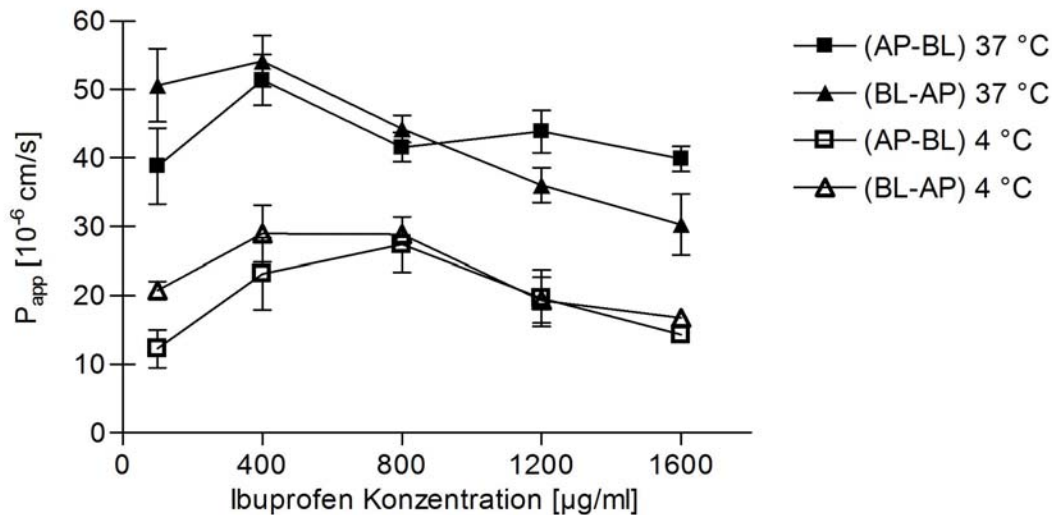


Abbildung 3-2 Konzentrations- und Temperaturabhängigkeit des Transports von Ibuprofen. Darstellung der Permeationskoeffizienten über der Ibuprofen Konzentration in beiden Transportrichtungen bei 37 °C und 4 °C.

Bei 4 °C werden im beobachteten Konzentrationsbereich um ca. 50 % niedrigere P_{app} -Werte gefunden als bei 37 °C (Abbildung 3-2). Der Verlauf der Werte des P_{app} ähnelt dem von 37 °C: auch bei 4 °C steigen die Werte bis zu einem Schwellenwert an, wie es bei 37 °C primär in Richtung BL-AP gezeigt wurde, und sinken dann ab. Allerdings findet eine Verschiebung des Schwellenwerts von 400 auf 800 µg/ml Ibuprofen statt. Die verbleibende Restpermeation ist theoretisch auf den passiven Anteil des Gesamttransports zurückzuführen. Diese Annahme wird im Folgenden mit Propranolol in einem temperaturabhängigen Experiment überprüft. Aufgrund des passiv transzellulären Permeationsverhaltens von Propranolol ist hier zwar mit einer geringeren Abnahme der P_{app} -Werte zu rechnen als bei Beteiligung eines aktiven Mechanismus. Trotz der Vorversuche zur Temperaturabhängigkeit der TEER-Werte ist bisher aber nicht klar, in welchem Ausmaß sich die Erniedrigung der Temperatur in diesem Falle tatsächlich auf die Permeationskoeffizienten auswirkt.

Wie bei Ibuprofen beobachtet, ist auch bei Propranolol eine temperaturabhängige Reduktion der Permeationskoeffizienten zu beobachten (Abbildung 3-3). Das Ausmaß des Rückgangs der Permeation liegt in einer Größenordnung, die mit den Ergebnissen von Ibuprofen vergleichbar ist und die sogar noch geringer ausfällt, als durch den Anstieg des TEER-Werts und die dadurch verminderte passiv parazelluläre Permeabilität zu erwarten wäre. Die Experimente mit auf 4 °C abgesenkter Temperatur liefern somit nur die Bestätigung für den passiven Anteil der Permeation

beider Arzneistoffe. Ein Rückschluss auf aktiven Transport ist offensichtlich nicht möglich. Hierbei ist auch denkbar, dass durch die Temperaturenniedrigung auf 4 °C nicht alle an die Stoffwechselenergie gebundenen Transportmechanismen vollständig unterbunden werden können. Je nach Größenordnung des Anteils des aktiven Transports an der Gesamtpermeation von Ibuprofen wäre es daher möglich, dass dieser nicht komplett gehemmt und folglich durch die Methode der Temperaturenniedrigung nicht erkannt werden kann.

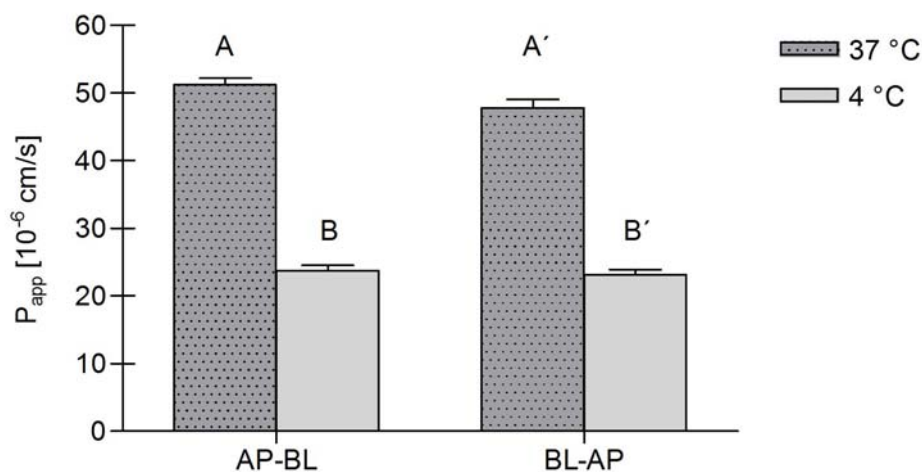


Abbildung 3-3 Temperaturabhängigkeit der Permeation von Propranolol (1 mM). Darstellung der Permeationskoeffizienten in beiden Transportrichtungen bei 37 °C und 4 °C.

Ähnliche Resultate werden auch in anderen Arbeitsgruppen erhalten. Neuhoff et al. (2005) finden bei Untersuchungen mit Indometacin (passive Permeation) und Salicylsäure (MCT1-vermittelter Transport) keine Möglichkeit, die jeweils involvierten Transportmechanismen zuverlässig zu erkennen. Eine Unterscheidung unterschiedlicher Transportmechanismen in Abhängigkeit von der Temperatur ist laut Cogburn et al. (1991) nur in gewissen Grenzen möglich, so dass weiterführende Experimente für eine definierte Bestimmung von Transportwegen empfohlen werden.

3.2.3 Einfluss von Natriumazid

Eine Möglichkeit, passiven Transport von aktivem zu unterscheiden, ist die Blockade der ATP-Synthese und damit der Energieproduktion der Zelle mit Natriumazid. Bei derartigen Experimenten wird Natriumazid häufig in einer Konzentration von 10 mM

eingesetzt (z. B. Tsuji et al., 1994; Legen et al., 2003; Konishi et al., 2004). Es ist jedoch bekannt, dass die ATP-Depletion die Integrität der Tight Junctions rasch beeinträchtigt (Artursson et al., 1996; Legen et al., 2003). Um diesen Effekt so gering wie möglich zu halten, wird die Konzentration für Natriumazid für die folgenden Experimente auf 5 mM festgesetzt. Denn schon bei dieser Konzentration zeigen zeitabhängige Messungen des TEER-Werts stetig sinkende Widerstandswerte (nach 60 min nur noch $67 \pm 4,5$ % des Ausgangswerts ($n = 8$)), was mit einer Steigerung der parazellulären Permeabilität gleichbedeutend ist.

Der Einfluss von Natriumazid auf die Ibuprofen-Permeation wird bei 37 °C und bei 4 °C untersucht. Im Falle einer Beteiligung primär aktiver Transportmechanismen an der Ibuprofen-Permeation wäre unter dem Einfluss von Natriumazid mit einem Rückgang der Permeationskoeffizienten zu rechnen. Bei 37 °C kann dies nicht beobachtet werden (Abbildung 3-4), was im Einklang mit Ergebnissen von Legen et al. (2003) steht. Diese beobachteten ebenfalls keine signifikante Erniedrigung der P_{app} -Werte von Ibuprofen (250 µM) in Gegenwart von Natriumazid (10 mM) und weisen zudem darauf hin, dass die Anwesenheit des Natriumazids im Inkubationsmedium zu einem schnellen Absinken der TEER-Werte während der Versuche führt. Es ist daher zu vermuten, dass die hier beobachtete geringe Erhöhung der Permeationskoeffizienten in Gegenwart von Natriumazid der beschriebenen Beeinträchtigung der Integrität der Tight Junctions durch Natriumazid zuzuschreiben ist.

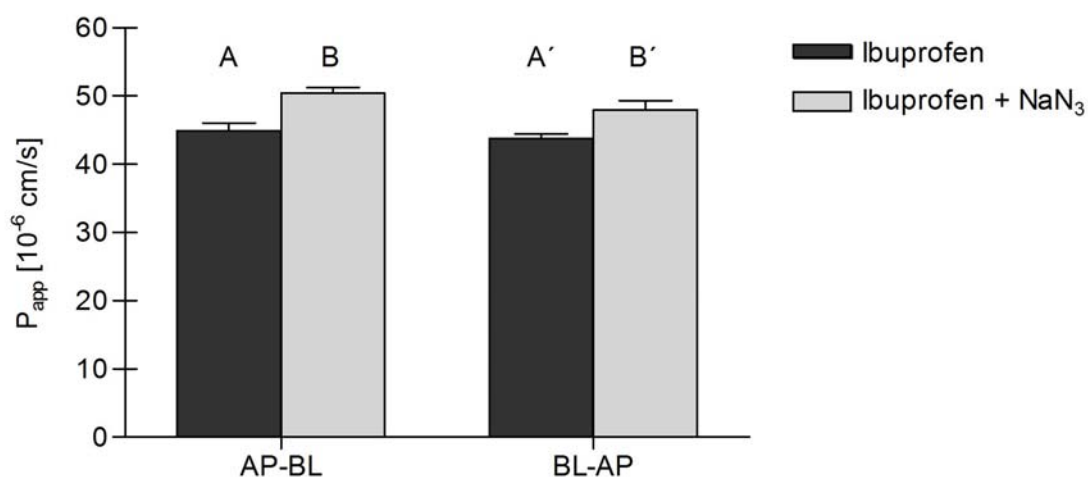


Abbildung 3-4 Einfluss von Natriumazid (5 mM) auf die Permeationskoeffizienten von Ibuprofen (4 mM) in beide Transportrichtungen bei 37 °C.

Bei erniedrigter Temperatur ist davon auszugehen, dass energiegetriebene bzw. an die ATP-Hydrolyse gekoppelte Mechanismen unterdrückt werden, zumindest anteilig. Unter dem zusätzlichen Einfluss von Natriumazid ist schließlich eine annähernd vollständige Unterbindung energieabhängiger Mechanismen anzunehmen. Eine dementsprechende Verminderung der Permeationskoeffizienten von Ibuprofen ist bei 4 °C zu beobachten (Abbildung 3-5), was auf die Beteiligung aktiver Mechanismen sowohl bei der Absorption als auch bei der Sekretion hinweist. Hierbei kann es sich entweder um verschiedene Transportsysteme handeln, oder um einen einzelnen Carrier, der in der Lage ist, in beide Richtungen zu transportieren, wie z. B. der MCT1. Bei 4 °C werden jedoch nicht nur energieabhängige Transportwege unterdrückt (3.2.2), sondern auch die passive Permeabilität fällt geringer aus; es ist von einer Rigidisierung der Zellmembran auszugehen. Aufgrund dieser Tatsache ergibt die Integritätsmessung (TEER-Werte und Permeabilität von Fluorescein-Natrium) bei diesen Versuchsbedingungen fast grundsätzlich dichte Monolayer. Das bedeutet, dass eine geringfügige Beeinträchtigung der Dichtigkeit der Zellmonolayer durch Natriumazid, wie sie bei 37 °C in den Permeationsstudien zu erkennen ist (Abbildung 3-4), bei 4 °C kaum ins Gewicht fallen kann. Dieser Zusammenhang erklärt, warum bei 37 °C die Hemmung aktiver Mechanismen durch Natriumazid nicht zu erkennen ist.

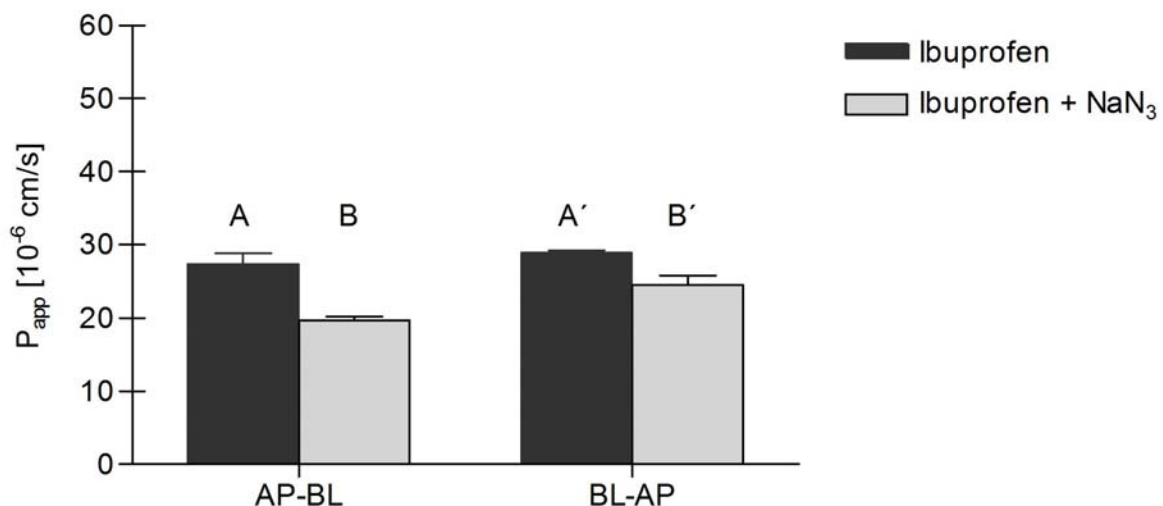


Abbildung 3-5 Einfluss von Natriumazid (5 mM) auf die Permeationskoeffizienten von Ibuprofen (4 mM) in beide Transportrichtungen bei 4 °C.

Schlussfolgernd weisen die Permeationsstudien in Anwesenheit von Natriumazid bei beiden Transportrichtungen auf eine Beteiligung primär oder sekundär aktiver Mechanismen am Ibuprofen-Transport hin.

3.2.4 Einfluss des P-gp-Substrats Verapamil

Mit dem Calciumkanalblocker Verapamil, einem bekannten Substrat und Inhibitor des primär aktiven Efflux-Transporters P-gp (1.3.3.1), soll dessen mögliche Beteiligung am auswärts gerichteten Transport von Ibuprofen überprüft werden. Als P-gp-Hemmstoff wird Verapamil bei Transportstudien üblicherweise in Konzentrationen bis 500 μM eingesetzt (Le Ferrec et al., 2001). In unserem Labor hat sich der Einsatz von 200 μM bewährt (Awadallah, 2003). Die mögliche Beteiligung von P-gp am Transport von Ibuprofen wird in beiden Permeationsrichtungen an drei verschiedenen Konzentrationen (100, 800 und 1600 $\mu\text{g/ml}$ Ibuprofen) untersucht. Außerdem wird ein temperaturabhängiges Experiment durchgeführt und der Einfluss von Verapamil auf die Permeation von Propranolol ermittelt.

Im Falle eines P-gp-getriebenen Effluxes wäre bei dessen Hemmung mit einer Erhöhung der Absorption (AP-BL) und einer Verminderung des auswärts gerichteten Transports (BL-AP) zu rechnen. Für Ibuprofen ist dies bei 37 °C bei allen drei betrachteten Konzentrationen aber nicht der Fall (Abbildung 3-6 (AP-BL) und Abbildung 3-7 (BL-AP)). In Richtung AP-BL ist keine signifikante Änderung der Permeationskoeffizienten zu beobachten, während in Richtung BL-AP in der Tendenz eine leichte Erhöhung der Permeationskoeffizienten, also eher der umgekehrte als der zu erwartende Effekt, eintritt. Die Beteiligung von P-gp am Transport von Ibuprofen ist daher auszuschließen, so dass ein anderes Transportsystem für die im Natriumazid-Experiment gefundene Sekretion (3.2.3) verantwortlich sein muss. Die leichte Erhöhung der Permeationskoeffizienten in Richtung BL-AP (Abbildung 3-7) ist möglicherweise dadurch zu erklären, dass Verapamil aufgrund seiner Wirkung als Calciumantagonist die passive Permeabilität der Zellmonolayer mit der Zeit erhöht, wobei die basolaterale Seite der Zellmonolayer deutlich sensitiver auf derartige Umgebungseinflüsse reagiert, als dies bei der Bürstensaummembran der Fall ist. Daher tritt dieser Effekt auch nur in Richtung BL-AP auf.

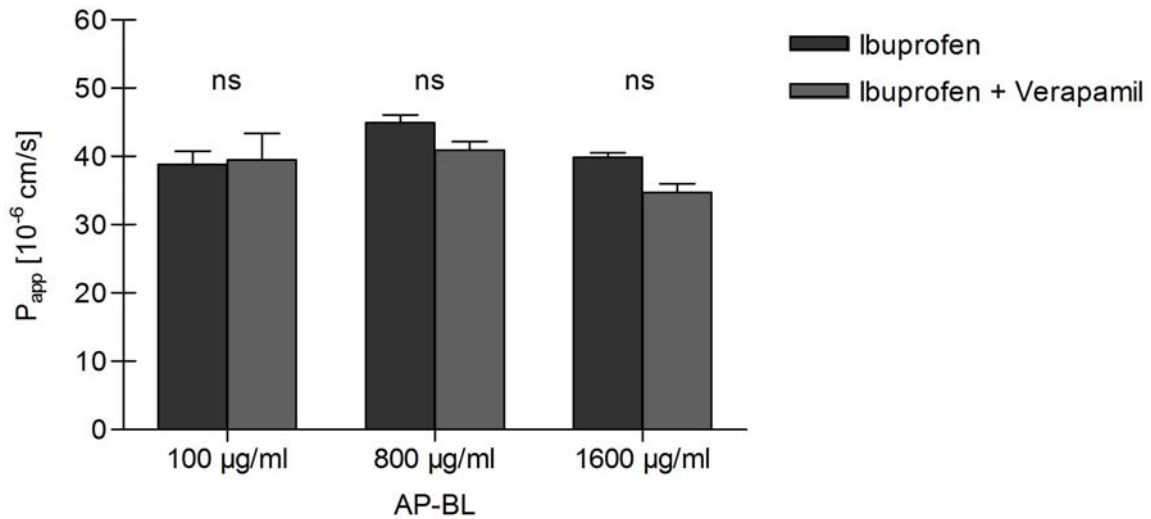


Abbildung 3-6 Einfluss von Verapamil (200 μ M) auf die Permeationskoeffizienten von Ibuprofen in Richtung AP-BL bei 37 °C.

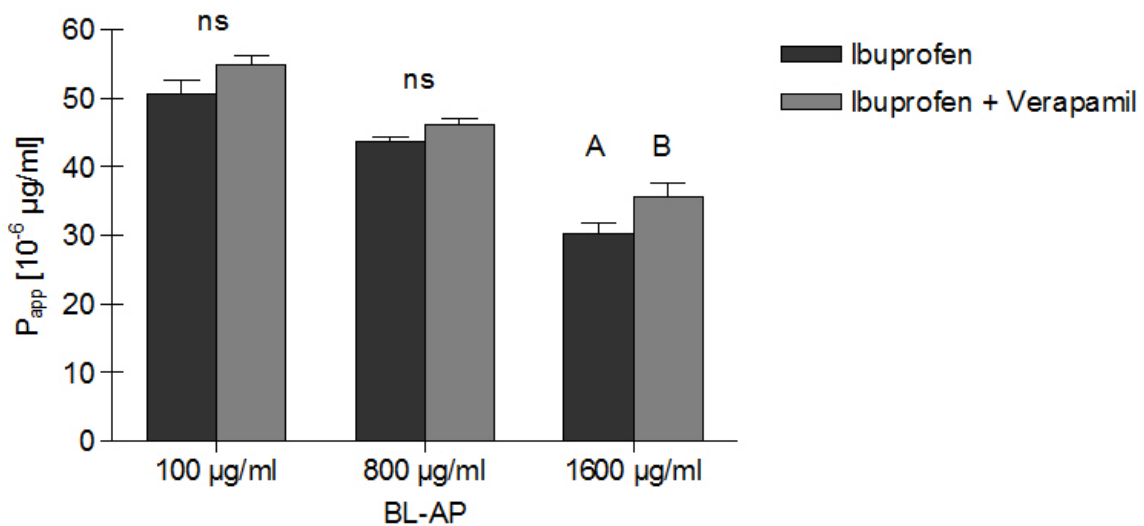


Abbildung 3-7 Einfluss von Verapamil (200 μ M) auf die Permeationskoeffizienten von Ibuprofen in Richtung BL-AP bei 37 °C.

Bei 4 °C ist in Gegenwart von Verapamil ein leichter Rückgang der P_{app} -Werte von Ibuprofen (Abbildung 3-8) zu verzeichnen. Dass der bei 37 °C beschriebene Anstieg der Permeationskoeffizienten nicht auftritt, ist wiederum auf die grundsätzlich erhöhte Dichtigkeit der Zellmonolayer bei 4 °C zurückzuführen. Da die Erniedrigung der P_{app} -Werte in beide Transportrichtungen zu beobachten ist, ist auch hier nicht von einem Zusammenhang mit P-gp auszugehen. Warum in Anwesenheit von Verapamil verminderte Permeationskoeffizienten von Ibuprofen auftreten, kann nicht abschließend geklärt werden. Es gibt keine Anhaltspunkte dafür, dass an der Permeation von

Verapamil weitere aktive Carrier außer P-gp beteiligt sein könnten. Daher ist nicht davon auszugehen, dass die vorliegenden Daten von der Hemmung eines anderen, bis dahin nicht bekannten, Transportsystems durch Verapamil herrühren. Als einzige Erklärung kann angeführt werden, dass die Permeationsstudien von Ibuprofen mit und ohne Verapamil an verschiedenen Zellchargen durchgeführt wurden, die möglicherweise zu diesen Unterschieden in den Ergebnissen geführt haben könnten.

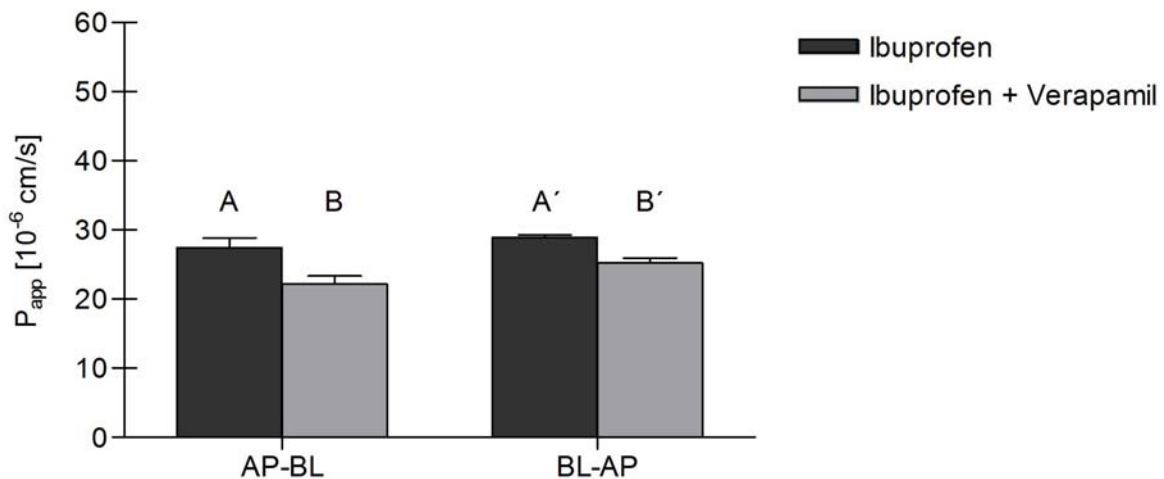


Abbildung 3-8 Einfluss von Verapamil ($200 \mu\text{M}$) auf die Permeationskoeffizienten von Ibuprofen (4 mM) in beide Transportrichtungen bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$.

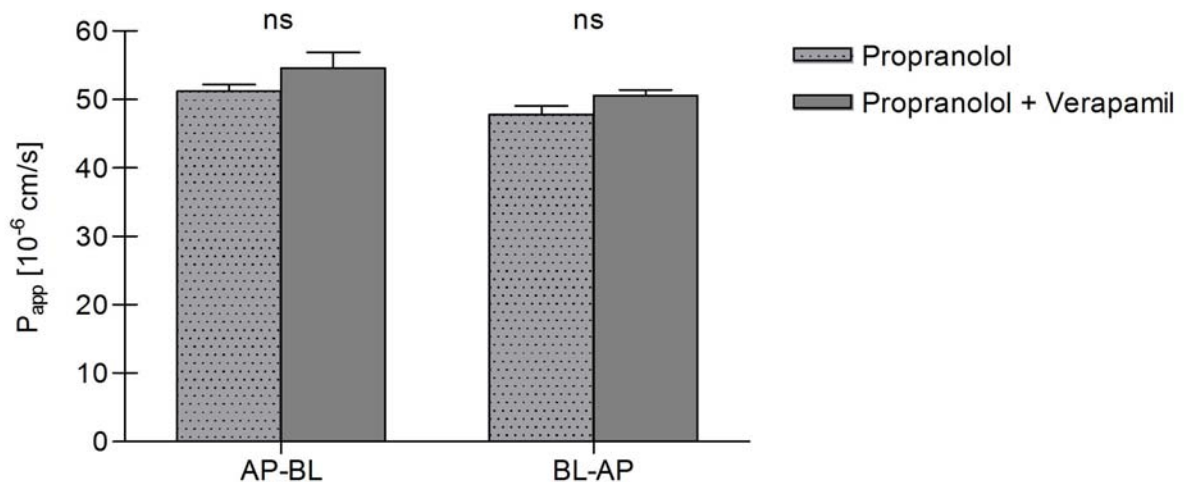


Abbildung 3-9 Einfluss von Verapamil ($200 \mu\text{M}$) auf die Permeationskoeffizienten von Propranolol (1 mM) in beide Transportrichtungen bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$.

Bei Propranolol zeigt Verapamil kaum eine Beeinflussung der Permeation (Abbildung 3-9); die Unterschiede der P_{app} -Werte sind nicht signifikant. Eine Rolle von P-gp ist

aufgrund der gezeigten Resultate folglich weder beim Transport von Ibuprofen noch von Propranolol wahrscheinlich.

3.2.5 pH-Abhängigkeit des Transports

Die Durchführung von Permeationsstudien bei einem pH-Wert von 7,4 in beiden Kammern der Transwells, wie bisher bei allen beschriebenen Versuchen geschehen, ist gängige Praxis (Artursson et al., 1996). Um den physiologischen pH-Bedingungen des Gastrointestinaltraktes näher zu kommen und etwaige pH-abhängige Effekte zu beobachten, wird zum weiteren Erkenntnisgewinn ein pH-Gradient über den Zellmonolayer im Transwell angelegt. Der pH-Wert auf der apikalen Seite (Darmlumen) wird auf pH 6,0 abgesenkt, während auf der basolateralen Seite (Blutseite) pH 7,4 beibehalten wird. Die Permeation von Ibuprofen und Propranolol wird bei diesem Gradienten in beiden Richtungen untersucht. Da die bevorzugte Transportrichtung (Absorption oder Sekretion) des möglicherweise beteiligten Transportmechanismus ermittelt werden soll, wird die Permeation von Ibuprofen und Propranolol auch beim entsprechenden inversen pH-Gradienten (AP pH 7,6 / BL pH 6,0) in beiden Richtungen untersucht.

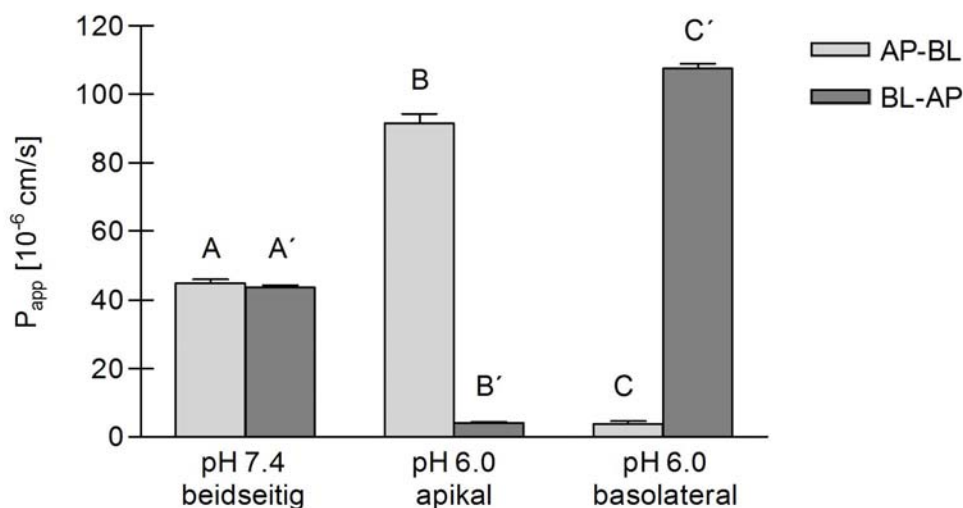


Abbildung 3-10 pH-Abhängigkeit Ibuprofen (4 mM)

Die Ergebnisse zeigen einen starken pH-abhängigen Effekt für Ibuprofen (Abbildung 3-10) und Propranolol (Abbildung 3-11). Die Permeationskoeffizienten von Ibuprofen zeigen jeweils bei Versuchen mit pH 6,0 im Donor- und pH 7,4 im Akzeptorkompartiment einen sprunghaften Anstieg auf über das Doppelte ihrer Vergleichswerte

bei beidseitigem pH 7,4. In entgegengesetzter Richtung, also von pH 7,4 nach pH 6,0, sinkt die Ibuprofen-Permeation hingegen auf minimale Werte von nur noch ca. $4 \cdot 10^{-6}$ cm/s ab (Abbildung 3-10).

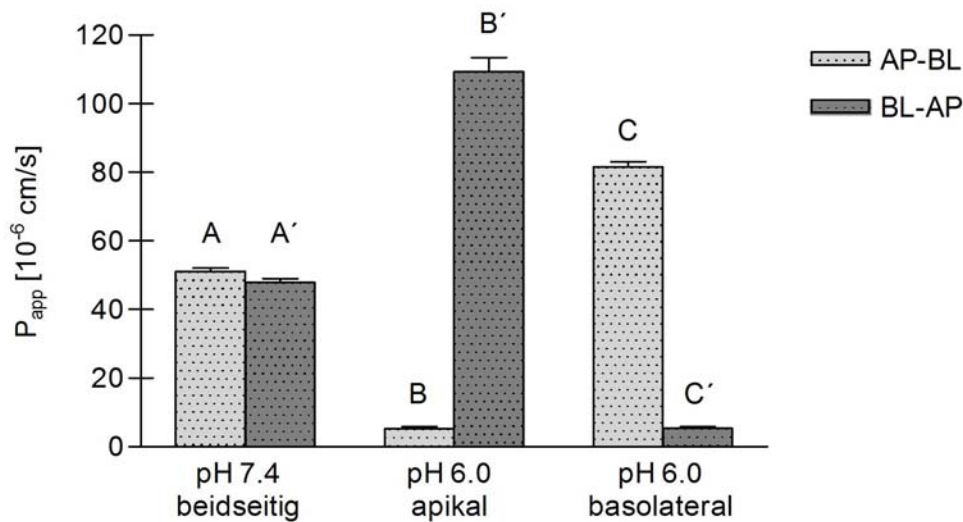


Abbildung 3-11 pH-Abhängigkeit Propranolol (1 mM)

Bei Propranolol ist die pH-Abhängigkeit in umgekehrter Weise zu erkennen. Hier ist ein enormer Anstieg der P_{app} -Werte von höheren zu niedrigeren pH-Werten und extrem kleine Werte bei Versuchen mit pH 6,0 im Donor- und pH 7,4 im Akzeptorkompartiment zu verzeichnen (Abbildung 3-11).

Die gefundenen Ergebnisse werden durch die Berichte von anderen Arbeitsgruppen über pH-abhängige Effekte (Korjamo et al., 2005; Lee et al., 2005; Palmgrén et al., 2004; Laitinen et al., 2003; Legen et al., 2003) für beide verwendeten Wirkstoffe bestätigt. Es stellt sich die Frage, ob die pH-Abhängigkeit der Ibuprofen-Permeation ausschließlich auf einem veränderten Hydrophilie/Lipophilie-Verhältnis der Arzneimoleküle beruht, oder ob ein pH- bzw. H^+ -abhängiger Transportmechanismus die Ursache bzw. zusätzlich beteiligt ist. Um diese Frage zu lösen, werden zwei experimentelle Ansätze gewählt, nämlich die Simulation physiologischer Verteilungsvorgänge mit Hilfe des Kochkolbens (4.5.2) und die Ermittlung der Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten (4.5.1).

Verteilungsverhalten im Kochkolben

Das Verteilungsverhalten im Kochkolben wird nur für Ibuprofen bestimmt, entsprechend den Bedingungen in den Permeationsstudien einmal bei pH 7,4 in Donor- und

Akzeptorphase und einmal in Anwesenheit eines pH-Gradienten mit pH 6,0 in der Donor- und pH 7,4 in der Akzeptorphase.

Bei pH 7,4 in beiden Phasen (Abbildung 3-12) befinden sich am Versuchsende über 80 % des eingesetzten Ibuprofens in der Octanolphase, der Rest verteilt sich auf die Pufferphasen. Das Verhältnis der Donor- zur Akzeptor-Arzneistoffkonzentration nimmt einen Wert von 1,84 an. Theoretisch ist hier aufgrund des identischen pH-Werts und somit identischen Ionisierungsgrades der Arzneistoffmoleküle in beiden wässrigen Phasen mit der Einstellung eines Verhältnisses von 1 zu rechnen. Dieser Gleichgewichtswert wird innerhalb der 75 min des Kochkolben-Experiments nicht vollständig erreicht. Eine Erklärung für den geringen Anteil Ibuprofen, der am Ende die Akzeptor- bzw. simulierte Blutphase erreicht, liefert sein log P-Wert von 3,72 (Palmgrén et al., 2004). Dieser ist nahe der Grenze, ab der die Lipophilie des Arzneistoffs zu hoch ist, als dass er die einmal penetrierte Lipidphase wieder verlassen könnte (1.2.4.2 und Artursson et al., 2001).

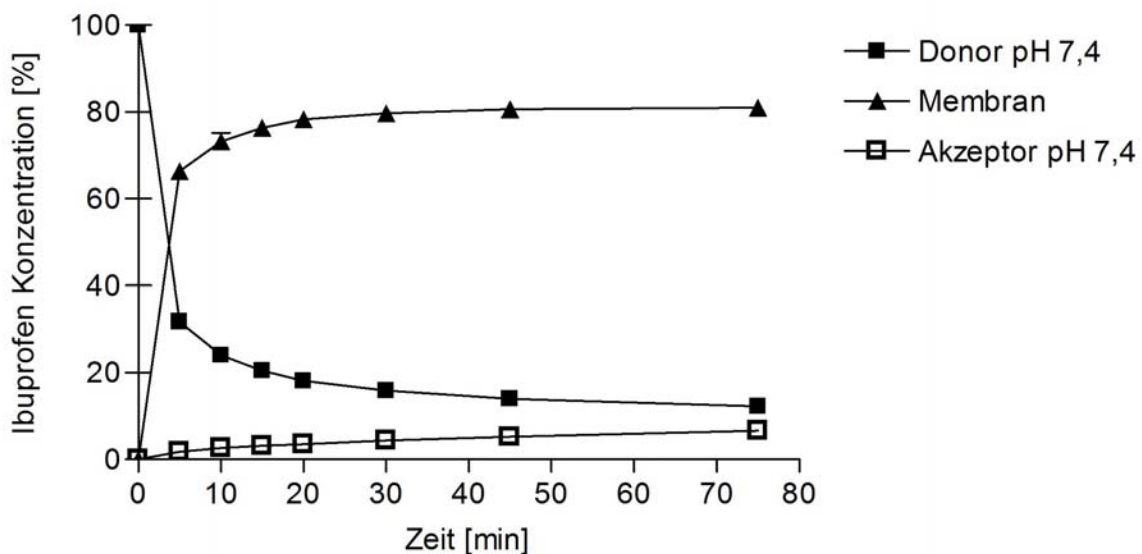


Abbildung 3-12 Verteilungsverhalten von Ibuprofen im Kochkolben bei pH 7,4 in der Donor- und der Akzeptorphase.

Unter den Bedingungen des pH-Gradienten (pH 6,0 / 7,4) befinden sich am Versuchsende über 95 % des eingesetzten Ibuprofens in der Octanolphase (Abbildung 3-13). Der Arzneistoff verteilt sich viel schneller als im Experiment ohne Gradient; das Gleichgewicht ist nach ca. 20 min vollständig erreicht. Zu diesem Zeitpunkt befindet sich so gut wie kein Ibuprofen mehr in der Donorphase. Nach 75 min befindet

sich zwar eine etwa vierfach höhere Konzentration an Ibuprofen im simulierten Blut als im Darmlumen. Entscheidend ist jedoch, dass die Erhöhung des nicht ionisierten Anteils der Arzneistoffmoleküle durch die Verschiebung des pH-Werts auf 6,0 einen derart großen Effekt hat, dass fast der komplette Arzneistoff in die Membranphase wandert.

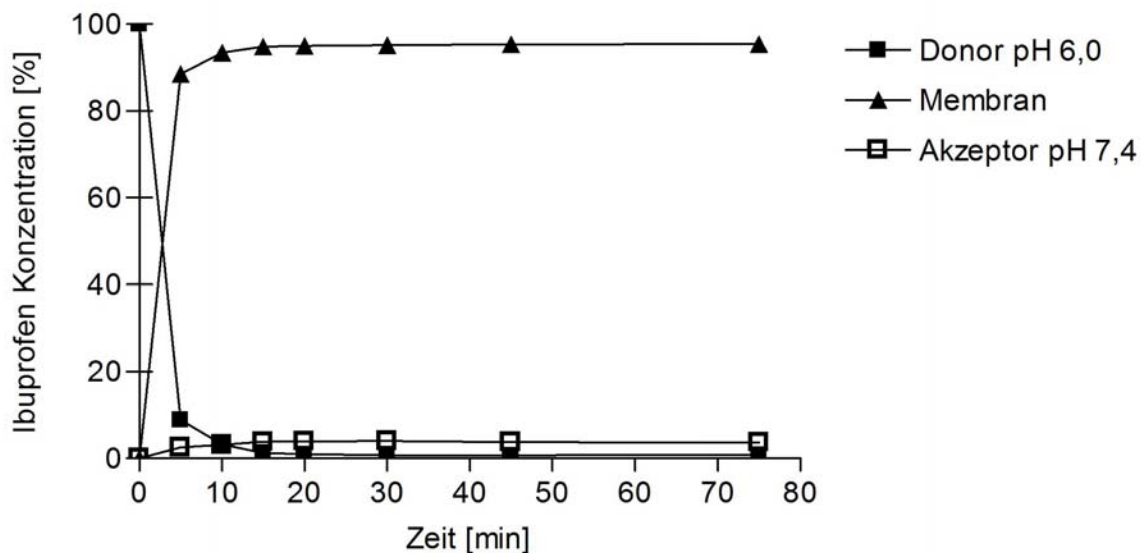


Abbildung 3-13 Verteilungsverhalten von Ibuprofen im Kochkolben bei pH 6,0 in der Donor- und pH 7,4 in der Akzeptorphase.

Die Ergebnisse der Verteilungssimulation im Kochkolben sind unabhängig von unter physiologischen Bedingungen eventuell beteiligten aktiven Transportmechanismen. Die gefundene pH-Abhängigkeit in den Kochkolben-Experimenten kann daher als Hinweis auf einen ebenso rein pH-abhängigen Permeationsmechanismus für Ibuprofen verstanden werden. Weiteren Aufschluss darüber mag der Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient geben.

Der Verteilungskoeffizient V_k

Der Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient steht in enger Verbindung zur pH-Verteilungstheorie (Shore et al., 1957), die eine Erklärungsmöglichkeit für die gefundene pH-Abhängigkeit bietet. Die pH-Verteilungstheorie besagt, dass nur ungeladene und keine ionisierten Arzneistoffmoleküle in der Lage sind, Lipidmembranen zu passieren. Die hierfür entscheidende physikochemische Kenngröße ist der pK_a -Wert des jeweiligen Arzneistoffs (Tabelle 3-1). Vom pK_a -Wert ausgehend können einige Parameter abgeleitet werden, die eine Korrelation mit

Permeationsdaten ermöglichen. Einer dieser Parameter ist der bereits erwähnte log P-Wert (1.2.4.2). Die berechneten log P-Werte für Ibuprofen und Propranolol liegen bei 3,72 bzw. 3,10 (Tabelle 3-1), so dass beide Substanzen grundsätzlich recht günstige Voraussetzungen für eine vollständige Resorption mitbringen. Zur Beurteilung der pH-abhängigen Verteilung sind der bei den jeweiligen pH-Werten ermittelte Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient V_k und der davon abgeleitete log D noch besser geeignet. Die Literaturwerte des log D sind in Tabelle 3-1 zu finden, ebenso die eigenen experimentell ermittelten Verteilungskoeffizienten V_k (4.5.1) und die aus diesen berechneten Logarithmen log V_k . Es fällt auf, dass die experimentell ermittelten log V_k -Werte etwas geringer ausfallen als die log D-Werte der Literatur, denen sie theoretisch entsprechen müssten. Das Ergebnis ist aber vergleichbar. Es wird deutlich, dass sich die Logarithmen der Verteilungskoeffizienten von Ibuprofen als schwache Säure bei niedrigerem pH-Wert im Vergleich zu pH 7,4 etwa verdoppeln. Der umgekehrte Effekt einer vielfachen Verkleinerung der Werte bei pH 6,0 ist bei Propranolol aufgrund seiner Eigenschaft als schwache Base zu beobachten. Diese Ergebnisse korrelieren recht gut mit den gefundenen Ergebnissen aus den pH-abhängigen Permeationsstudien (Abbildung 3-10 und Abbildung 3-11).

Tabelle 3-1 Physikochemische Kenngrößen von Ibuprofen und Propranolol^{2,3}

	<i>Ibuprofen</i>		<i>Propranolol</i>	
pk _a	4,41		9,15	
log P	3,72		3,10	
	<i>pH 7,4</i>	<i>pH 6,0</i>	<i>pH 7,4</i>	<i>pH 6,0</i>
log D	0,77	2,12	1,36	0,27
V_k (n ≥ 4)	3,87 ± 0,366	11,21 ± 0,754	13,46 ± 0,697	1,45 ± 0,035
log V_k	0,59	1,05	1,13	0,16
Ionisationsgrad [%]	99,90	97,49	98,25	99,93
nicht ionisierter Anteil [%]	0,10	2,51	1,75	0,07

Betrachtet man die aus den pk_a-Werten nach Henderson-Hasselbalch berechneten Ionisationsgrade (Tabelle 3-1), so werden für Ibuprofen und Propranolol keine

² pk_a, log P und log D aus Palmgrén et al., 2004

³ Ermittlung der Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten V_k siehe 4.5.1

gravierenden Verschiebungen in Abhängigkeit vom pH-Wert festgestellt. Dies wäre auch nicht zu erwarten, da der Abstand der eingestellten pH-Werte von den pK_a -Werten beider Wirkstoffe jeweils deutlich über eine pH-Einheit beträgt. Bei pH 6,0 ist bei Ibuprofen jedoch ein 25-facher Anstieg und bei Propranolol eine ebenso große Abnahme des Anteils an nicht ionisiertem, lipophilem Arzneistoff festzustellen, der die Permeabilitätsänderung in Abhängigkeit des pH-Werts und auch die Ergebnisse der Kochkolben-Experimente erklären kann.

Als Fazit ist herauszustellen, dass die pH-Abhängigkeit der Permeation von Ibuprofen und Propranolol vorrangig der pH-Verteilungstheorie folgt. Ein gleichermaßen am Transport von Ibuprofen beteiligter Protonen-abhängiger Mechanismus kann unter diesen Bedingungen nicht erkannt werden. Ebensolche Ergebnisse wurden für andere NSAIDs wie z. B. Salicylsäure, Indometacin und Ketoprofen gezeigt (Legen et al., 2003; Neuhoff et al., 2005). Das bedeutet jedoch nicht, dass ein Protonen-abhängiger Carrier nicht beteiligt ist, zumal bekannt ist, dass der MCT1 in der Lage ist, den Umständen angepasst Protonen-abhängig in beide Richtungen zu transportieren (Enerson und Drewes, 2003). Klarheit kann letztlich nur der Einsatz möglichst spezifischer Inhibitoren schaffen.

3.2.6 Einfluss von Benzoesäure auf den Transport

Benzoesäure ist ein bekanntes Substrat des MCT1 im Gehirn (Enerson und Drewes, 2003) und im Intestinum (Tsuji et al., 1994; Tamai et al., 1999) und wird deshalb für Wettbewerbsstudien mit Ibuprofen ausgewählt. Im Rahmen von Permeationsstudien wird Benzoesäure in seiner Funktion als Inhibitor üblicherweise in Konzentrationen von 10 - 20 mM eingesetzt (Harig et al., 1996; Ogihara et al., 1996).

Hier wird ein Konzentrationsbereich von 0,1 - 100 mM Benzoesäure getestet, innerhalb dessen eine konzentrationsabhängige Hemmung des Ibuprofen Nettotransports (normierte Werte, berechnet aus den gemessenen Permeationskoeffizienten von Ibuprofen in Anwesenheit von Benzoesäure bezogen auf diejenigen aus Wiederholungsmessungen ohne Einfluss von Benzoesäure) beobachtet wird (Abbildung 3-14). Da davon ausgegangen wird, dass es sich bei dem zugrunde liegenden Mechanismus der Hemmung am ehesten um eine Konkurrenz von Ibuprofen und Benzoesäure um eine Rezeptor-Bindungsstelle des MCT1 handelt, wird eine

dementsprechende mathematische Anpassung der Messwerte durchgeführt („One site competition“-Fitting). Vorgegeben wird ein Startwert von 100 % als Ibuprofen Nettotransportrate in Abwesenheit von Benzoesäure („Top“; Tabelle 3-2).

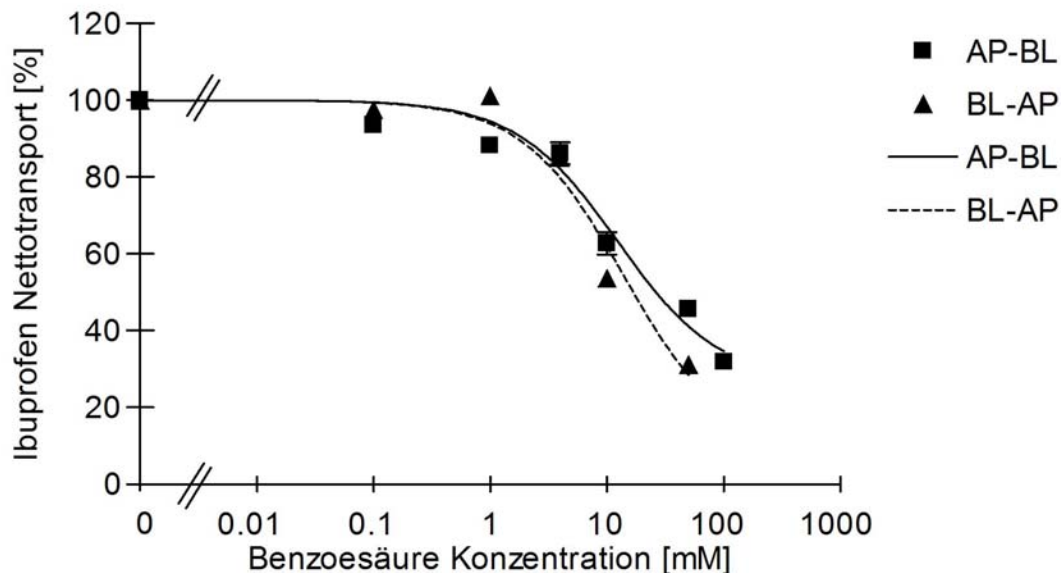


Abbildung 3-14 Einfluss von Benzoesäure auf den Transport von Ibuprofen (4 mM) in beide Transportrichtungen. Darstellung des Nettotransports von Ibuprofen (normiert auf die Permeationskoeffizienten von Ibuprofen ohne Zusatz von Benzoesäure) über ansteigenden Benzoesäure-Konzentrationen im Bereich von 0,1 - 100 mM; Messwerte aus Wiederholungsmessungen ($n \geq 6$) \pm SD (■, ▲) und Ergebnisse des „One site competition“-Fittings (durchgezogene und gestrichelte Linien).

Tabelle 3-2 Kennzahlen des „One site competition“-Fittings der Kompetitionstudien mit Ibuprofen und Benzoesäure als Ergänzung zu Abbildung 3-14.

	AP-BL	BL-AP
	<i>Best-fit values</i>	
Top [%]	100,0	100,0
Bottom [%]	26,656	8,300
EC ₅₀ [mM]	12,284	14,018
	<i>95 % Confidence Intervals</i>	
EC ₅₀ [mM]	10,332 – 14,605	11,062 – 17,762
	<i>Goodness of Fit</i>	
R ²	0,9734	0,9587

Anhand der durch die Anpassung erhaltenen Graphen ist ab äquimolarer Konzentrationen von Ibuprofen und Benzoessäure (4 mM) ein Einfluss auf den Transport von Ibuprofen festzustellen und auch statistisch nachzuweisen. Dies weist auf eine höhere Bindungsaffinität von Benzoessäure als von Ibuprofen zum Rezeptor hin. Im Vergleich der beiden Transportrichtungen zeigt sich eine geringere Hemmung der Ibuprofen-Permeation in absorptiver (AP-BL) Richtung. Der Ibuprofen Nettotransport geht hier bei der höchsten eingesetzten Benzoessäure-Konzentration (100 mM) auf ca. 32 % zurück, während in Richtung BL-AP schon bei 50 mM eine Reduktion der Restpermeation auf 31 % erreicht wird (höhere Benzoessäure-Konzentrationen führen hier zum Integritätsverlust der Zellmonolayer und können daher nicht eingesetzt werden). Die mathematische Anpassung berechnet für den Fall maximaler Hemmung Rest-Transportraten von ca. 27 % (AP-BL) bzw. 8 % Ibuprofen (BL-AP). Auf der Basis dieser Werte berechnet das „One site competition-Fitting“ die EC_{50} -Werte, also die halb-maximale effektive (Wirk-) Konzentration eines Agonisten, bezogen auf das Maximum und das Minimum der möglichen Wirkung (diese Werte können in Abbildung 3-14 nicht abgelesen werden, da hier nur das Fitting innerhalb des durch die Messwerte vorgegebenen Bereichs abgebildet ist). In sekretorischer (BL-AP) Richtung wird die EC_{50} zu ca. 14 mM Benzoessäure berechnet (Tabelle 3-2), in Richtung AP-BL liegt die EC_{50} bei 12,3 mM Benzoessäure, also auf einem sehr ähnlichen Niveau.

Festzuhalten bleibt eine konzentrationsabhängige Hemmung des Transports von Ibuprofen in beide Richtungen. Hierbei erscheint es nicht möglich, den Ibuprofen-Transport mit Benzoessäure vollständig zu unterbinden, schon gar nicht unter physiologischen Bedingungen. Das im Experiment und anhand des Fittings gezeigte Ausmaß der Restpermeation von Ibuprofen kann auf passiv transzellulären Transport zurückgeführt werden. Insgesamt sind die Ergebnisse ein starker Hinweis auf die Beteiligung des MCT1 am Ibuprofen-Transport.

In einem Vergleichsexperiment mit Propranolol und Benzoessäure ist keine Hemmung der Propranolol-Permeation zu beobachten (Abbildung 3-15). Diese Tatsache verdeutlicht die Relevanz der Ergebnisse von Ibuprofen unter dem Einfluss von Benzoessäure und erhärtet die Vermutung einer Beteiligung des MCT1 an dessen Transport. Der nicht zu erwartende Anstieg der P_{app} -Werte von Propranolol könnte

möglicherweise von einer veränderten Zellpermeabilität unter dem gemeinsamen Einfluss von Propranolol und Benzoesäure herrühren.

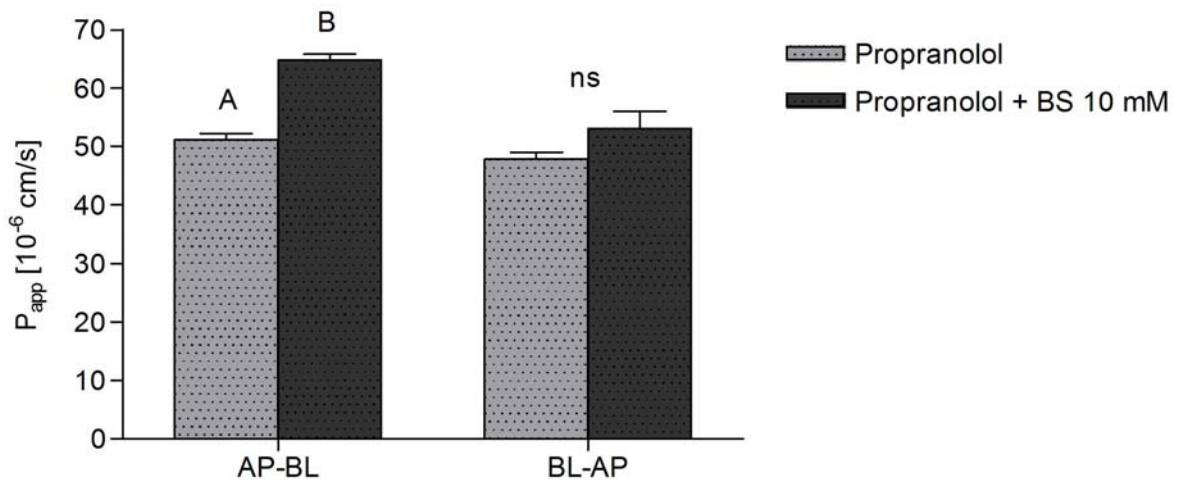


Abbildung 3-15 Einfluss von Benzoesäure (10 mM) auf die Permeationskoeffizienten von Propranolol (1 mM) in beide Transportrichtungen bei 37 °C.

3.2.7 Kombiniertes Einfluss eines pH-Gradienten und Benzoesäure

Die pH-Abhängigkeit des MCT1-vermittelten Transports (Enerson und Drewes, 2003) ist bekannt. Im Falle einer Beteiligung des MCT1 am Transport von Ibuprofen wäre daher zu erwarten, dass dieser in Anwesenheit eines pH-Gradienten durch das MCT1-Substrat Benzoesäure hemmbar ist. Daher werden die P_{app} -Werte von reinem Ibuprofen mittlerer Konzentration (4 mM) mit denen unter Einfluss eines pH-Gradienten (AP pH 6,0 / BL pH 7,4) und denen unter Einfluss desselben pH-Gradienten plus Benzoesäure (4 mM; äquimolar zu Ibuprofen) als Hemmstoff verglichen.

Der bereits in Kapitel 3.2.5 gezeigte Protonen-abhängige Anstieg der Ibuprofen-Permeation bei erniedrigtem pH-Wert im Donorkompartiment kann durch den Zusatz von Benzoesäure signifikant gehemmt werden (Abbildung 3-16). In entgegengesetzter Richtung, von pH 7,4 nach pH 6,0, nimmt der P_{app} -Wert des kombinierten Einflusses von pH-Gradient und Benzoesäure minimale Werte an. Die Beurteilung einer weiteren Hemmung durch Benzoesäure gegenüber dem Einfluss des pH-Gradienten alleine ist aufgrund der in beiden Fällen sehr geringen Permeationskoeffizienten jedoch nicht möglich.

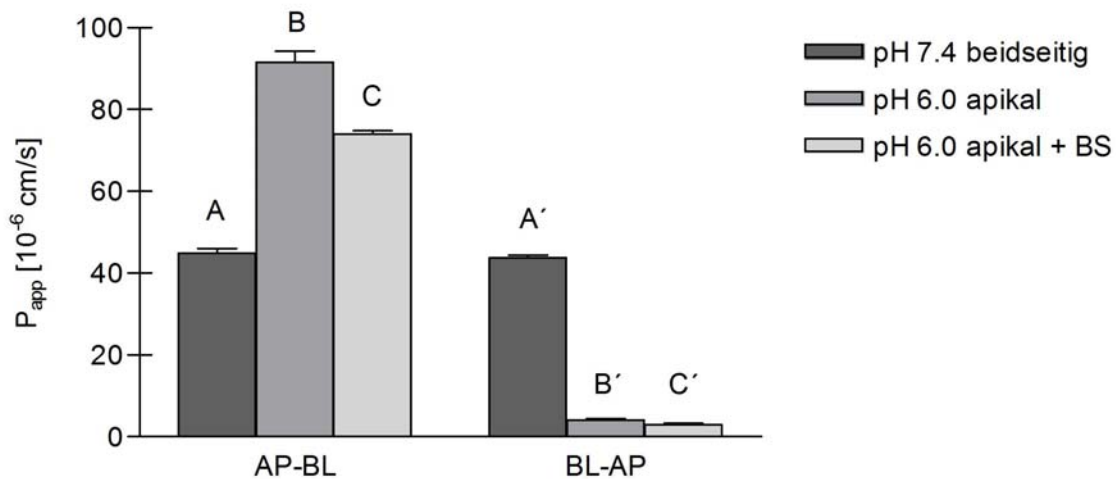


Abbildung 3-16 Einfluss eines pH-Gradienten und Benzoesäure. Darstellung der Permeationskoeffizienten von Ibuprofen (4 mM) in beide Transportrichtungen und Auswirkung eines pH-Gradienten (AP 6,0 / BL 7,4) alleine und bei Kombination des pH-Gradienten mit Benzoesäure (4 mM).

Die beobachtete Hemmung des Ibuprofen-Transports durch Benzoesäure in Anwesenheit eines pH-Gradienten deutet darauf hin, dass die pH-abhängige Steigerung des Ibuprofen-Transports bei erniedrigtem pH-Wert im Donorkompartiment möglicherweise nicht ausschließlich auf die pH-Verteilungstheorie zurückzuführen ist (3.2.5). Vielmehr unterstützt dieses Ergebnis die in Kapitel 3.2.6 gefundenen Hinweise auf einen zugrunde liegenden pH-abhängigen, durch Benzoesäure hemmbaren und folglich über MCT1 vermittelten Transport von Ibuprofen.

3.2.8 Einfluss von α -Cyano-4-hydroxycinnamat (CHC)

α -Cyano-4-hydroxycinnamat (CHC) ist ein kompetitiver Inhibitor des MCT1, wobei zu beachten ist, dass CHC zwar oft als spezifischer Inhibitor für MCT1 genannt wird, jedoch ebenso den mitochondrialen Pyruvattransporter und den Anionenaustauscher AE1 hemmt (1.4.5.2).

3.2.8.1 Einfluss von CHC auf die Permeation von Ibuprofen

CHC wird als MCT1 Hemmstoff in Caco-2 Zellen in einer Konzentration von 5 mM eingesetzt (Cuff et al., 2002; Ritzhaupt et al., 1998 a; Ritzhaupt et al., 1998 b). Im Falle einer tatsächlichen Beteiligung des MCT1 am Ibuprofen-Transport würde die

Verminderung der Permeationskoeffizienten in Anwesenheit von CHC die Bestätigung dafür liefern. Dieser Effekt kann überraschenderweise nicht beobachtet werden (Abbildung 3-17). Die Permeationskoeffizienten von Ibuprofen alleine und diejenigen unter dem Einfluss von CHC sind nicht signifikant unterschiedlich.

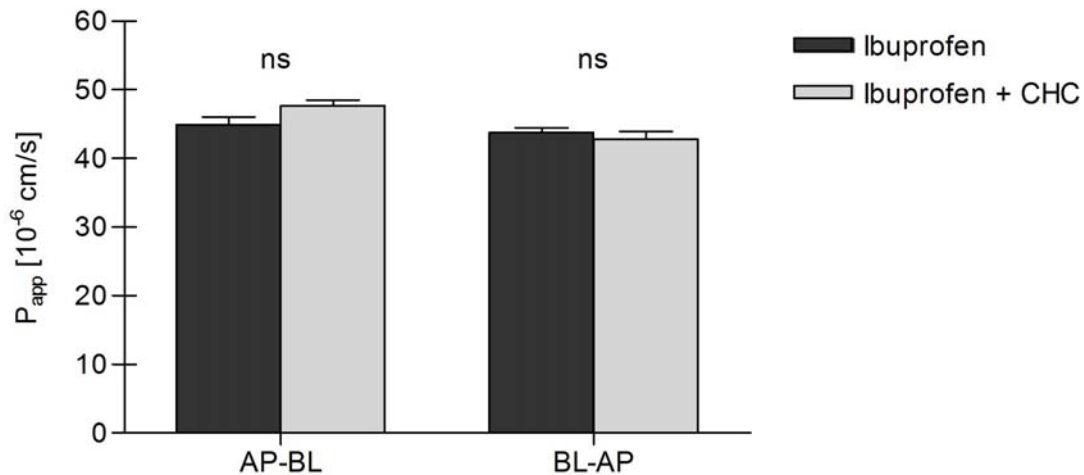


Abbildung 3-17 Einfluss von α -Cyano-4-hydroxycinnamat (CHC) (5 mM) auf die Permeationskoeffizienten von Ibuprofen (4 mM) in beide Transportrichtungen.

Um eine Beurteilungsgrundlage für dieses Ergebnis zu schaffen und die Funktionsfähigkeit der eingesetzten Charge CHC zu überprüfen, wird im folgenden Kapitel die Permeation von Benzoesäure mit und ohne Zusatz von CHC untersucht.

3.2.8.2 Einfluss von CHC auf die Permeation von Benzoesäure

Die Vermittlung des Benzoesäure Transports über MCT1 ist in zahlreichen Publikationen gezeigt worden. Eine Hemmung der Benzoesäure Permeation in Gegenwart des MCT1-Inhibitors CHC ist daher zu erwarten.

Erste Experimente zeigen jedoch keinen Einfluss von CHC auf die Permeation von Benzoesäure (Abbildung 3-19). Um die Möglichkeit auszuschließen, dass die verwendete Ausgangskonzentration von 4 mM Benzoesäure zu hoch war, wird diese auf 2 mM reduziert und das Experiment wiederholt. Auch hier kann kein eindeutiger Effekt ausgemacht werden (Abbildung 3-18). Zwar findet auf rein mathematischer Ebene eine signifikante Erniedrigung der P_{app} -Werte in Richtung BL-AP statt. Diese fällt jedoch so gering aus, dass daraus kaum eine eindeutige Aussage abgeleitet werden kann.

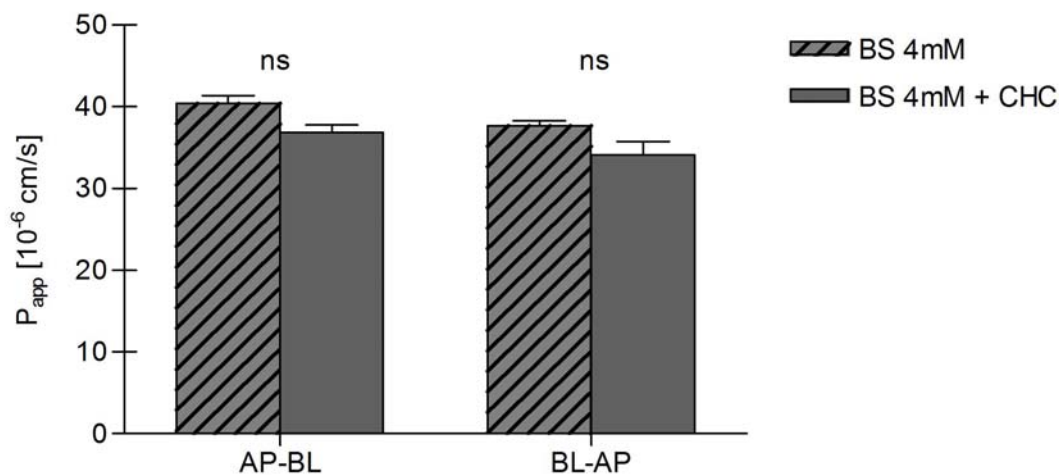


Abbildung 3-19 Einfluss von α -Cyano-4-hydroxycinnamat (CHC) (5 mM) auf die Permeationskoeffizienten von Benzoesäure (4 mM) in beide Transportrichtungen.

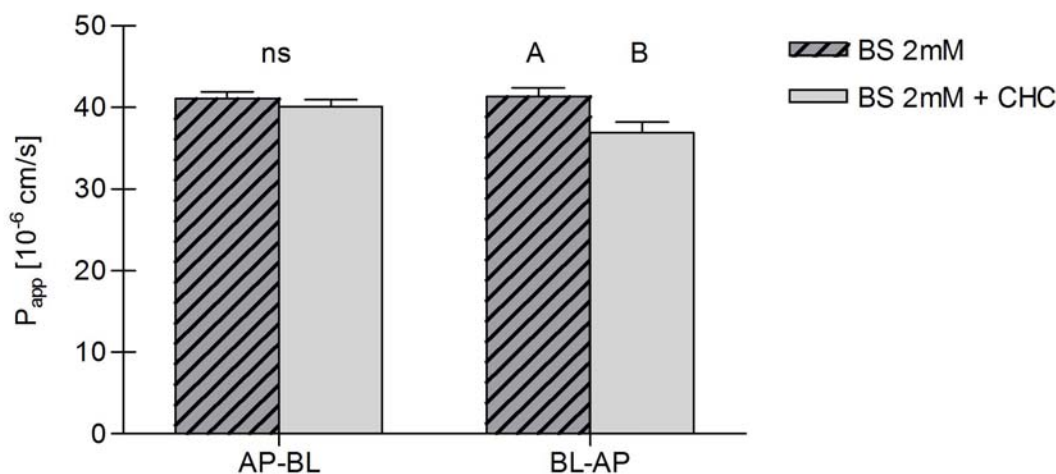


Abbildung 3-18 Einfluss von α -Cyano-4-hydroxycinnamat (CHC) (5 mM) auf die Permeationskoeffizienten von Benzoesäure (2 mM) in beide Transportrichtungen.

Die ermittelten Daten aus den Permeationsstudien unter dem Einfluss von CHC sowohl für Ibuprofen als auch für Benzoesäure zeigen nicht die erwartete Hemmung. Im Gegensatz dazu finden beispielsweise Ritzhaupt et al. (1998 a) eine 40 %-ige Hemmung der L-Lactat Aufnahme durch CHC (5 mM) bei luminalen Membranvesikeln aus dem Schweine-Colon („pig colonic luminal membrane vesicles, LMV“). Cuff et al. (2002) zeigen sogar eine etwa 60 %-ige Verminderung der Aufnahme des MCT1-Substrats Butyrat durch CHC (5 mM) in AAC1 Zellen, einer epithelialen, von einem Colon Adenokarzinom abgeleiteten Zelllinie. Allerdings gibt es auch Berichte

von NSAIDs, die den hier beobachteten Ergebnissen ähneln. In einer Studie, durchgeführt an der humanen Trophoblasten Zelllinie BeWo, ist der Transport von Salicylsäure weder durch CHC noch durch andere MCT-Inhibitoren wie p-CMBS oder DIDS (1.4.5.2) hemmbar; diese vermögen die Resorption von L-Lactat aber sehr wohl zu hemmen (Emoto et al., 2002). Die Autoren schließen daraus, dass NSAIDs potente Inhibitoren des Lactat Transporters sind, obwohl sie selbst hauptsächlich über ein anderes, pH-abhängiges und sättigbares Transportsystem transportiert werden. Itagaki et al. (2006) haben erst kürzlich beschrieben, dass Ibuprofen und andere NSAIDs in HRPE-Zellen (human retinal pigment epithelial cells) als Inhibitoren für den Natrium-abhängigen Monocarboxylsäure-Transporter (SMCT1, Sodium-Coupled Monocarboxylate Transporter; *SLC5A8*) fungieren, jedoch selbst nicht über diesen transportiert werden. Wäre dies auch für Ibuprofen und den MCT1 der Fall, würde sich dennoch nicht erklären lassen, warum die Hemmung des Benzoessäure Transports durch CHC nicht beobachtet werden kann. Der MCT1-vermittelte Transport dieser Monocarboxylsäure wurde mehrfach bestätigt, zuletzt durch Haughton et al. (2007). Dass Ibuprofen eher Inhibitor als Substrat des MCT1 ist, scheint daher recht unwahrscheinlich zu sein, zumal eine eindeutige kompetitive Hemmung des Transports von Ibuprofen durch Benzoessäure in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde (3.2.6). Darüber hinaus gehen Neuhoff et al. (2005) im Falle von Salicylsäure sehr wohl davon aus, dass zusätzlich zum passiv transzellulären Transport der MCT1 beteiligt ist, und zwar zu 10-15 % der Gesamtpermeation. Außerdem wird dem Organischen Anionentransporter OATPB mit ebenfalls 10-15 % eine entsprechende Rolle am Salicylsäure Transport zugeschrieben.

Es ist weiterhin denkbar, dass eine Überlagerung des aktiven Transports durch passive Permeation vorliegt. Wie bereits gezeigt wurde, ist die Expression des MCT1-Proteins auf die apikale Zellseite beschränkt ist (2). Außerdem ist bekannt, dass der MCT1 in der Lage ist, je nach Bedarf bzw. Angebot in beide Richtungen zu transportieren (Enerson und Drewes, 2003). In der Konsequenz heißt das, dass der Arzenistofftransport durch die apikale Zellmembran teilweise MCT1-vermittelt und zusätzlich passiv transzellulär sein kann, während die Permeation über die basolaterale Membran ausschließlich durch passive Permeabilität (oder die Beteiligung eines weiteren Transporters) möglich ist. Wenn nun die passive die Carrier-vermittelte Permeabilität deutlich übersteigt, dann fällt eine Hemmung des Carrier-vermittelten Anteils möglicherweise zu gering aus, als dass diese erkannt werden könnte.

Darüber hinaus ist auch nicht auszuschließen, dass die verwendete CHC Charge aus nicht nachvollziehbaren Gründen keine biologische Aktivität zeigt und daher keine Hemmung des Transports von Benzoesäure und Ibuprofen zu beobachten ist.

3.3 BEWERTUNG DER ERGEBNISSE

Um die am Ibuprofen-Transport beteiligten Mechanismen aufzuklären, werden Permeationsstudien an Transwells durchgeführt. Insbesondere die Rolle des MCT1 soll in diesem Zusammenhang beurteilt werden. Propranolol dient hierbei in seiner Eigenschaft als Modellarzneistoff für passiv transzelluläre Permeation als Vergleichssubstanz.

Die Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit der Ibuprofen-Permeation im Bereich von 100 - 1600 $\mu\text{g/ml}$ bzw. 0,5 - 8,0 mM zeigt sinkende Permeationskoeffizienten ab einem Schwellenwert von 2 mM Ibuprofen. In Richtung der Sekretion (BL-AP) ist dieser Effekt stärker ausgeprägt als in Richtung der Absorption (AP-BL). Dieses Ergebnis ist ein deutlicher Hinweis auf eine Sättigung des Ibuprofen-Transports und damit auf einen zugrunde liegenden Carrier-vermittelten Transport. Bei 4 °C werden die konzentrationsabhängigen Experimente wiederholt. Unter diesen Bedingungen wird im Falle einer Beteiligung aktiver Mechanismen am Ibuprofen-Transport eine entsprechende Verminderung der Permeationskoeffizienten erwartet, obwohl die Erniedrigung der Temperatur mit einer verminderten passiven Diffusion und einer Rigidisierung der Zellmembran einher geht. Da die Ergebnisse von Ibuprofen und Propranolol einen Rückgang der P_{app} -Werte um einen ähnlichen Anteil zeigen, ist hierdurch ein Rückschluss auf das Mitwirken eines aktiven Mechanismus nicht möglich. Dieses Resultat wurde für andere NSAIDs von Neuhoff et al. (2005) in ähnlicher Form gezeigt. Der Effekt der Sättigung des Transports im höheren Konzentrationsbereich ist jedoch auch bei 4 °C zu sehen. Das erhaltene konzentrationsabhängige Profil der Permeationskoeffizienten von Ibuprofen bei 4 °C zeigt innerhalb des schon bei 37 °C betrachteten Konzentrationsbereichs einen ähnlichen Verlauf, jedoch um etwa die Hälfte reduzierte P_{app} -Werte. Die verbleibende Restpermeation ist auf passive Diffusion zurückzuführen, so dass diese Komponente

der Ibuprofen-Permeation, die bereits von anderen Autoren gezeigt wurde (Lee et al., 2005; Legen et al., 2003; Takagi et al., 1998), bestätigt werden kann.

In Anwesenheit des metabolischen Inhibitors Natriumazid und Versuchsbedingungen von 4 °C wird eine eindeutige Reduktion der Permeationskoeffizienten von Ibuprofen in beide Richtungen beobachtet. Dies weist auf die Beteiligung primär oder sekundär aktiver Mechanismen sowohl an der Absorption als auch an der Sekretion von Ibuprofen hin. Eine Rolle von P-gp beim Efflux von Ibuprofen kann jedoch ausgeschlossen werden, da das P-gp Substrat Verapamil keinen entsprechenden Einfluss auf die Permeationskoeffizienten von Ibuprofen ausübt.

Der Einfluss eines pH-Gradienten (AP pH 6,0 / BL pH 7,4) und des korrespondierenden inversen pH-Gradienten auf die Permeation von Ibuprofen wird untersucht, da die pH-Abhängigkeit des MCT1-vermittelten Transports bekannt ist. In beide Transportrichtungen ergibt sich für Ibuprofen bei pH 6,0 im Donor- und pH 7,4 im Akzeptorkompartiment ein bis zu 2,5-facher Anstieg der P_{app} -Werte. In entgegengesetzter Richtung, d. h. von Seiten des höheren pH-Werts, ist die Permeation auf ein Minimum reduziert. Bei Propranolol tritt ein annähernd identischer Effekt auf, allerdings bei umgekehrten pH-Verhältnissen. Daraus wird ersichtlich, dass die pH-Abhängigkeit bei beiden Arzneistoffen in erster Linie auf die pH-Verteilungstheorie und damit auf die pK_a -Werte beider Substanzen zurückzuführen ist. Dieser Zusammenhang, der im Einklang mit den Daten anderer Arbeitsgruppen steht (Korjamo et al., 2005; Palmgrén et al., 2004; Laitinen et al., 2003; Legen et al., 2003), wird durch die experimentelle Ermittlung der Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten beider Arzneistoffe und das Verteilungsverhalten von Ibuprofen im Kochkolben bei entsprechenden pH-Verhältnissen bestätigt. Die Beteiligung eines pH- bzw. H^+ -abhängigen Mechanismus am Ibuprofen-Transport ist, wie es bei Salicylsäure bereits gezeigt wurde (Neuhoff et al., 2005), dennoch möglich. Dieser kann jedoch aufgrund der schwach sauren Eigenschaften von Ibuprofen und der entsprechenden pH-abhängigen Verteilung in diesem Experiment nicht erkannt werden.

Die mögliche Beteiligung des MCT1 am Transport von Ibuprofen wird durch den Einsatz des bekannten MCT1-Substrats Benzoesäure (Enerson und Drewes, 2003; Tsuji et al., 1994; Tamai et al., 1999; Haughton et al., 2007) untersucht. Die konzentrationsabhängige Hemmung von Ibuprofen (4 mM) wird anhand von sechs verschiedenen Konzentrationen Benzoesäure (0,1 - 100 mM) untersucht. Es ergibt sich eine

kompetitive Hemmung des Ibuprofen-Transports durch Benzoesäure ab etwa äquimolarer Konzentration. Die EC_{50} -Werte des „One site competition“-Fittings werden zu 12,3 mM (AP-BL) bzw. 14,0 mM (BL-AP) Benzoesäure berechnet. Außerdem wird in einem weiteren Experiment die durch den pH-Gradienten (Donor pH 6,0 / Akzeptor pH 7,4) um ein Vielfaches erhöhte Permeation von Ibuprofen durch eine äquimolare Konzentration von Benzoesäure signifikant reduziert, so dass aus diesen Ergebnissen auf die Beteiligung des MCT1 am Transport von Ibuprofen geschlossen wird. Ein zusätzlicher Beweis hierfür soll in der Hemmung des Ibuprofen-Transports durch den MCT1-Inhibitor α -Cyano-4-hydroxycinnamat (CHC) gefunden werden. Jedoch zeigen weder Ibuprofen (4 mM) noch Benzoesäure (2 mM und 4 mM) eine Sensitivität gegenüber CHC (5 mM). Vor allem im Fall des bekannten MCT1-Substrats Benzoesäure kann kaum eine Erklärung für diese Resultate gefunden werden, da hier, wie für das MCT1-Substrat L-Lactat, ein eindeutiger hemmender Effekt durch CHC zu erwarten wäre (Emoto et al., 2002). Nahe liegend wäre daher die biologische Inaktivität der eingesetzten Charge CHC. Eine andere Erklärung für das Versagen des CHC-Hemmeffekts ist möglicherweise die Überlagerung des Carrier-vermittelten Anteils durch die passive Permeation. Wie die Ergebnisse der Immunfluoreszenz-Untersuchungen zeigen, wird der MCT1 ausschließlich auf der apikalen Zellseite exprimiert, wobei dieser, je nach Umgebungsbedingungen, in beide Transportrichtungen funktioniert. Die Passage des Arzneistoffs durch die basolaterale Membran kann daher nur passiv transzellulär oder durch die dortige Beteiligung eines weiteren Transporters geschehen. Es ist daher denkbar, dass die passive Permeation, die dann auch auf der apikalen Seite möglich sein muss, den aktiven Anteil überwiegt und dessen Hemmung daher nicht erkannt werden kann.

Zusammenfassend ist aufgrund der Sättigbarkeit der Ibuprofen-Permeation bei höheren Konzentrationen von der Beteiligung aktiver Mechanismen am Transport von Ibuprofen in beide Richtungen auszugehen. Diese Annahme wird durch die Erniedrigung der Permeationskoeffizienten von Ibuprofen bei 4 °C in Anwesenheit des metabolischen Inhibitors Natriumazid unterstützt. Von einem P-gp-vermittelten Efflux von Ibuprofen ist jedoch nicht auszugehen. Die temperaturabhängigen Experimente verdeutlichen die passive Komponente der Ibuprofen-Permeation. Die kompetitive Inhibition durch das MCT1-Substrat Benzoesäure wird in beide Richtungen dargestellt und ist ein starker Hinweis auf die Beteiligung des MCT1 am Transport von Ibuprofen. Die wiederum durch Benzoesäure hemmbare Protonen-abhängige

Steigerung der Ibuprofen-Permeation stützt diese Annahme. Insgesamt ist daher zusätzlich zu einer passiven Komponente von der Beteiligung des MCT1 am Transport von Ibuprofen auszugehen.

4 MATERIAL UND METHODEN

4.1 MATERIAL UND GERÄTE

4.1.1 Die Zellkultur

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendete Caco-2 Zelllinie wurde 1974 von J. Fogh aus einem humanen Colon Adenokarzinom isoliert (Fogh et al., 1977). Der Subklon TC7 wurde aus einer späten Passage (# 198; T für *tardif*, spät) dieser Zelllinie von A. Zweibaum, INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Villejuif, Frankreich), abgeleitet. Die Caco-2/TC7 Zellen stellte uns freundlicherweise Prof. Dr. K.-W. Bock, Toxikologisches Institut, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, zur Verfügung.

4.1.2 Medien und Reagenzien für die Zellkultur

Tabelle 4-1 Medien und Reagenzien für die Zellkultur

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller/Lieferant</i>
Dulbecco`s Modified Eagle Medium mit Glutamax-I (D-MEM)	Invitrogen GmbH
Dulbecco`s Phosphate Buffered Saline (D-PBS)	Invitrogen GmbH
Fötale Kälberserum (FKS) Herkunft: Südamerika, Batch No. 40F6245K	Invitrogen GmbH
Nicht-essentielle Aminosäuren (MEM NEAA)	Invitrogen GmbH
Gentamicin (50 mg/ml)	Invitrogen GmbH
Trypsin-EDTA (0,25 %)	Invitrogen GmbH
Recovery Cell Culture Freezing Medium	Invitrogen GmbH

4.1.3 Material und Geräte für die Zellkultur

Tabelle 4-2 Material und Geräte für die Zellkultur

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller/Lieferant</i>
Zählkammer (Neubauer-improved: Kammertiefe 0,1 mm, gemäß DIN 12874)	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG
Zellkulturflasche Cellbind (25 cm ²) mit Filterkappe	Corning B.V.
Zellkulturflaschen Nunclon (83 cm ²) mit Filterkappe	Nunc GmbH & Co. KG
Kryoröhrchen, 1,8 ml	Nunc GmbH & Co. KG
PP-Reaktionsgefäße, 0,4 ml	Greiner Bio-One GmbH
PP-Reaktionsgefäße, 1,5 ml	Greiner Bio-One GmbH
PP-Röhrchen, 15 ml, steril	Greiner Bio-One GmbH
PP-Röhrchen, 50 ml, steril	Greiner Bio-One GmbH
Pipetten, 10 ml, steril	Greiner Bio-One GmbH
Pipetten, 25 ml, steril	Greiner Bio-One GmbH
Multiwell-Platten, CellStar 6 well, TC, steril	Greiner Bio-One GmbH
Multiwell-Platten, 12 well, PS	Corning B.V.
Mikroplatten, 96 well	Greiner Bio-One GmbH
Mikroplatten UV-Star, 96 well	Greiner Bio-One GmbH
Transwell Inserts Nr. 3401, Polycarbonatmembran, Porengröße 0,4 µm	Corning B.V.
Transwell-Clear Inserts Nr. 3460, Polyesteremembran, Porengröße 0,4 µm	Corning B.V.

4.1.4 Antikörper und Hilfsstoffe für die Immunfluoreszenz

Tabelle 4-3 Antikörper und Hilfsstoffe für die Immunfluoreszenz

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller/Lieferant</i>
Alexa Fluor 555 Donkey anti-goat IgG (H+L)	Molecular Probes
Alexa Fluor 555 Donkey anti-rabbit IgG (H+L)	Molecular Probes
Alexa Fluor 488 Phalloidin	Molecular Probes
Rinder Serum Albumin (BSA) Fraktion V	Paesel + Lorei Pharma GmbH
DABCO (1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Glycergel Mounting Medium	Dako Deutschland GmbH
Glycerol, p.a.	Carl Roth GmbH & CO. KG

Goat anti-human MCT1	Santa Cruz Biotechnology Inc.
Eselnormalserum	Dianova GmbH
Paraformaldehyd	Carl Roth GmbH & CO. KG
Rabbit anti-human MCT1	Acris Antibodies GmbH
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH

4.1.5 Verwendete Puffer und Lösungen für die Immunfluoreszenz

Tabelle 4-4 Verwendete Puffer und Lösungen für die Immunfluoreszenz

Bezeichnung	Zusammensetzung
Waschpuffer	D-PBS
Fixierlösung: Paraformaldehyd 4 %	PFA 4 g Aqua bidest. 100 ml
Antikörper-Verdünnungslösung (Standard Blocking Solution)	BSA 1.0 % Triton X-100 0.2 % in PBS pH 7.4
Primär- und Sekundärantikörper	Alle Verdünnungen in Antikörper-Verdünnungslösung
Eselnormalserum	10 % in Antikörper-Verdünnungslösung
DAPI-Stammlösung	DAPI 200 µg Aqua bidest. 1 ml Erhaltene Lösung 1:2 mit Glycerin mischen
DAPI-Färbelösung zur Kernfärbung (1 µg/ml)	DAPI-Stammlösung 10 µl AK-Verdünnungslösung 1990 µl
Alexa Fluor 488 Phalloidin	Stammlösung* 5 µl D-PBS 200 µl <i>*nach Herstellerangaben</i>

4.1.6 Wirkstoffe

Tabelle 4-5 Wirkstoffe

Substanz	Hersteller/Lieferant
Benzoessäure, p.a.	Merck KGaA
CHC (α -Cyano-4-hydroxycinnamat), purum	Fluka
Fluorescein-Natrium	Fluka
Ibuprofen (Racemat)	Knoll Pharmaceuticals

Propranolol Hydrochlorid, purum	Fluka
Natriumazid purum, p.a.	Fluka
Verapamil Hydrochlorid, Minimum 99,0 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH

4.1.7 Lösungsmittel und Chemikalien

Tabelle 4-6 Lösungsmittel und Chemikalien

<i>Substanz</i>	<i>Hersteller/Lieferant</i>
<i>Lösungsmittel für die HPLC</i>	
Acetonitril (gradient grade)	Mallinckrodt Baker B.V.
Methanol (gradient grade)	Mallinckrodt Baker B.V.
<i>Certipur pH-Kalibrierungsstandards</i>	
Certipur Pufferlösung pH 4,01	Merck KGaA
Certipur Pufferlösung pH 7,00	Merck KGaA
Certipur Pufferlösung pH 9,00	Merck KGaA
<i>Sonstige Chemikalien</i>	
Calciumchlorid	Merck KGaA
D(+)-Glucose	Merck KGaA
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck KGaA
Kaliumchlorid	Merck KGaA
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaA
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck KGaA
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Merck KGaA
Natriumchlorid	Merck KGaA
HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure)	Fluka
MES (4-Morpholino-ethansulfonsäure)	Merck KGaA
<i>ortho</i> -Phosphorsäure 85 % (m/m)	Merck KGaA
Titrisol für 1000 ml 0,1 N NaOH	Merck KGaA
Titrisol für 1000 ml 1,0 N NaOH	Merck KGaA

4.1.8 Geräte zur allgemeinen Verwendung und Verbrauchsmaterial*Tabelle 4-7 Geräte zur Allgemeinen Verwendung und Verbrauchsmaterial*

<i>Gerät</i>	<i>Hersteller/Lieferant</i>
Waage Mettler AE 200	Mettler-Toledo GmbH
Waage Mettler XP205 Delta Range	Mettler-Toledo GmbH
Sicherheitswerkbank HERAsafe, Klasse 2, Typ H	Heraeus / Kendro
CO ₂ -Brutschrank	WTB Binder Labortechnik GmbH
Zentrifuge Megafuge 1.0 R	Heraeus / Kendro
Eppendorf Research Pipetten (10, 20, 100, 200 und 1000 µl) mit Eppendorf Pipettenspitzen	Eppendorf GmbH
Multipette plus	Eppendorf GmbH
Combitips plus für Multipette, 10 ml	Eppendorf GmbH
Combitips plus für Multipette, 10 ml, steril	Eppendorf GmbH
Pipettierhilfe Eppendorf Easypet 4420	Eppendorf GmbH
Pipettierhilfe pipetus-akku	Hirschmann GmbH & Co. KG
Petrischale Steriplan 150/30 mm	Schott Instruments GmbH
Parafilm M	Brand GmbH & Co. KG
Objektträger	Menzel Gläser GmbH & Co. KG
Deckgläser (18 x 18 mm)	Menzel Gläser GmbH & Co. KG
Inverses Mikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss MicroImaging GmbH
Plattenreader BioTek SynergyHT mit Software KC4 V3.4	BioTek Instruments GmbH
UV-VIS Spektrophotometer UV mini 1240	Shimadzu GmbH
Halbmikroosmometer	Knauer GmbH
S20 SevenEasy pH-Meter	Mettler-Toledo GmbH
EVOM (Epitheliales Voltohmmeter)	World Precision Instruments Inc.
Magnetrührer IKAMAG RCT (heizbar)	Janke & Kunkel GmbH & Co. KG - IKA-Labortechnik
Magnetrührer Heidolph MR 3001 K (heizbar)	Heidolph GmbH & Co. KG
Laborrührgerät Heidolph RZR 2051	Heidolph GmbH & Co. KG
Stuart Vortex Mixer SA8 (Orbitalschüttler)	Barloworld Scientific
Vakuum Filtereinheit, Glas	Sartorius AG

Membranfilter 0,2 µm, RC vliesverstärkt, d = 47 mm	Sartorius AG
Ultraschallbad Bandelin Sonorex Super RK 510 H	Bandelin GmbH & Co. KG
Schüttelwasserbad 1083	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH
Koch-Kolben	Büchi Labortechnik GmbH
Umkehrosmose-Anlage Hemo-RO	Millipore GmbH
Muldestor	Wagner & Munz GmbH
Tiefkühltruhe (-70 °C)	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH
Gefrierschrank (-30 °C) Siemens Öko Plus	Siemens AG
Kühl- und Gefrierkombination Liebherr Premium	Liebherr GmbH

4.1.9 Fluoreszenzmikroskopie

Zur Fluoreszenzmikroskopie wird das aufrechte Mikroskop Zeiss Axiomager Z.1 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH) verwendet. Das Mikroskop ist mit der hoch auflösenden Kamera AxioCam HRc zur digitalen Bilddokumentation und der ApoTome-Einheit zur Erstellung optischer Schnitte von Fluoreszenzpräparaten mit der Methode der „strukturierten Beleuchtung“ ausgestattet (Abbildung 4-1). Anhand der zugehörigen Imaging Software (AxioVision Rel. 4.5) und einem integrierten, kalibrierten Bildanalyse-System können alle Aufnahmeparameter der AxioCam gesteuert und die erhaltenen Aufnahmen skaliert werden.

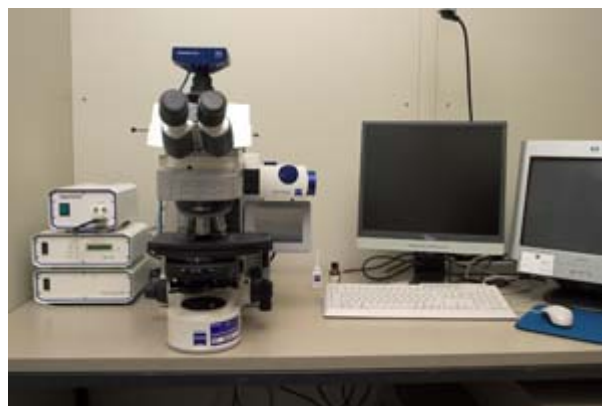


Abbildung 4-1 Gesamtansicht des aufrechten Mikroskops Axiomager Z.1 einschließlich Computer und Monitoren

Das Mikroskop ist weiterhin mit drei verschiedenen Filtersets für die Fluoreszenzmikroskopie ausgerüstet, die die parallele Visualisierung der bis zu dreifach fluoreszenzmarkierten Präparate ermöglichen (Tabelle 4-8).

Tabelle 4-8 Übersicht über die Filtersets

<i>Filterset Nummer</i>	<i>Klassischer Marker</i>	<i>Exzitation [nm]</i>	<i>Strahlenteiler [nm]</i>	<i>Emission [nm]</i>
49	DAPI	335-338	395	420-470
38	Green Fluorescent Protein	450-490	495	500-550
43 HE	DSRed	538-562	570	570-640

4.1.10 HPLC-UV – Apparativer Aufbau

Tabelle 4-9 HPLC-UV – Apparativer Aufbau

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller/Lieferant</i>
HPLC Pumpe LC10-AS	Shimadzu GmbH
HPLC Autosampler SIL-9A	Shimadzu GmbH
UV-VIS Detector SPD-6A	Shimadzu GmbH
Communications Bus Module CBM-101	Shimadzu GmbH
HPLC-Säule CC 250 Nucleosil 100-5 C18	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG
HPLC-Säule CC125 Nucleosil 100-5 C18	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG
Vorsäulen CC 8/4 Nucleosil 100-5 C18	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG
Software Class LC-10	Shimadzu GmbH

4.1.11 Datenverarbeitung

4.1.11.1 Hardware

Pentium IV, 3.06 GHz, 512 MB RAM, 60 GB Festplatte

4.1.11.2 Software

Tabelle 4-10 Liste der verwendeten Software

<i>Software</i>	<i>Hersteller / Lieferant</i>
Adobe Photoshop 5.0	Adobe Systems GmbH
Carl Zeiss AxioVision Rel. 4.5	Carl Zeiss MicroImaging GmbH
Corel Graphics Suite 11	Corel Corp.
GraphPad Prism 4	GraphPad Software, Inc.
ISIS Draw 4.5	MDL Information Systems GmbH
Microsoft Excel XP 2002	Microsoft GmbH
Microsoft PowerPoint XP 2002	Microsoft GmbH
Microsoft Word XP 2002	Microsoft GmbH

4.2 KULTIVIERUNG DER CACO-2/TC7 ZELLEN

4.2.1 Allgemeine Kultivierung der Caco-2/TC7 Zellen

Sämtliche Arbeitsschritte im Zusammenhang mit der Zellkultur werden unter einer Sicherheitswerkbank ausgeführt, da eine aseptische Arbeitsweise unbedingt erforderlich ist.

Die Kultivierung der Caco-2/TC7 Zellen erfolgt in Zellkulturflaschen in einem Brutschrank bei 37 °C, 95 % relativer Feuchtigkeit und 5 % CO₂-Sättigung. Zur Bevorratung sind Passagen der Caco-2/TC7 Zellen in flüssigem Stickstoff (-196 °C) gelagert. Zur Präkultivierung wird ein Kryoröhrchen der gewünschten Passage aus diesem entnommen und aufgetaut. Zur effektiveren Anzucht der frisch aufgetauten Zellen wird für diese Präkultur stets eine 25 cm² CellBind Zellkulturflasche verwendet. Für alle weiteren Subkulturen werden Zellkulturflaschen mit 83 cm² Wachstumsfläche eingesetzt.

Als Wachstumsmedium wird D-MEM verwendet, das mit 10 % fötalem Kälberserum, 1 % nicht-essentiellen Aminosäuren und 0,1 % Gentamicin angereichert wird. Das

Medium wird routinemäßig dreimal pro Woche gewechselt, außerdem 24 Stunden nach dem Auftauen bzw. dem Passagieren der Zellen zur Entfernung nicht lebensfähiger und damit nicht adhärenter Zellen.

Die Subkultivierung im wöchentlichen Rhythmus bei ca. 80 % Konfluenz dient der Vermeidung der Ausdifferenzierung der Zellen. Hierfür wird das Wachstumsmedium entfernt, die Zellen werden zweimal mit 5 ml D-PBS gewaschen und anschließend durch Zusatz von 0,0625 % Trypsin / 0,0095 % EDTA vom Boden der Zellflasche abgelöst. Nach 5 min bei 37 °C wird die Trypsinierung durch Zugabe von Wachstumsmedium gestoppt. Die Zellsuspension wird in ein 50 ml PP-Röhrchen überführt und für 5 min bei 1300 rpm zentrifugiert. Im Anschluss wird der Überstand verworfen und das Zellpellet in 10 ml Medium resuspendiert. Ein Tropfen der Suspension wird entnommen mit Hilfe einer Zählkammer die Anzahl der Zellen ermittelt. In einer Verdünnung von 1×10^4 Zellen/ml kann die Zellsuspension nun für die Subkultur in einer neuen 83 cm² Zellkulturflasche oder in einer Aussaatdichte von 6×10^4 Zellen/cm² für die Subkultur in Transwell-Einsätzen bzw. auf Deckgläsern eingesetzt werden.

Bei Bedarf können Zellen zur Kryokonservierung in flüssigem Stickstoff separiert werden. Zu diesem Zweck wird das Zellpellet, das nach dem Zentrifugieren erhalten wurde, in einem angemessenen Volumen eiskalten Einfriermediums resuspendiert und zu aliquoten Teilen in Kryoröhrchen pipettiert. Diese Kryoröhrchen werden unverzüglich in eine mit Eis befüllte Styroporbox überführt und in dieser 24 Stunden bei -70 °C tiefgefroren. Anschließend werden die Kryoröhrchen aus der Styroporbox entnommen und in flüssigen Stickstoff transferiert.

Grundsätzlich ist zu beachten, dass sich die Zellen hinsichtlich ihrer Eigenschaften bei fortschreitender Subkultivierung verändern können (Artursson, 1991, Briske-Anderson et al., 1997). Deshalb wurden im Rahmen dieser Arbeit nur Caco-2/TC7 Zellen der Passagen # 34 - 47 verwendet.

4.2.2 Kultivierung für die *in vitro* Permeationsstudien

Für die Permeationsstudien werden Transwells, so genannte Filter-Kammer-Systeme, verwendet. Diese bestehen aus einer 12-well-Platte und 12 mm Transwell-Einsätzen mit einer Polycarbonatmembran von 0,4 μm Porengröße (Abbildung 4-2).

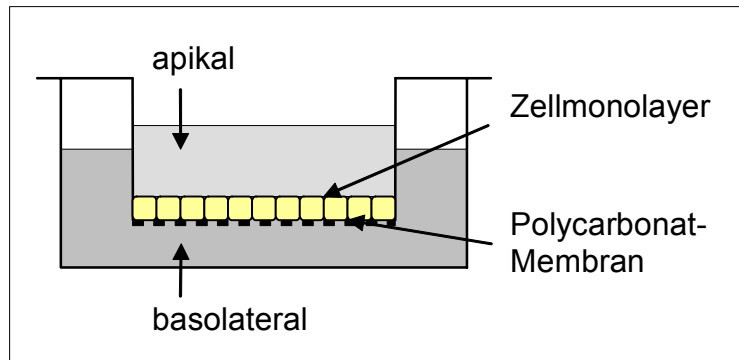


Abbildung 4-2 Schemazeichnung des Transwell-Systems

Das Volumen der apikalen Kammer (die dem Darmlumen zugewandte Seite) beträgt 0,5 ml, das der basolateralen Kammer (die der Serosa bzw. den Blutgefäßen zugewandte Seite) 1,5 ml. Die Caco-2/TC7 Zellen werden direkt auf die Polycarbonatmembran ausgesät (4.2.1) und beide Kompartimente werden mit Wachstumsmedium ergänzt. Das Medium wird nach 24 h und anschließend dreimal pro Woche gewechselt.

4.2.3 Kultivierung für die Immunchemie

Für die immunchemischen Experimente werden Deckgläser in die Vertiefungen von 6-Well-Platten eingebracht und Caco-2/TC7 Zellen auf diesen, wie in Kapitel 4.2.1 beschrieben, ausgesät. Jedes Well wird mit 3 ml Wachstumsmedium befüllt. Das Medium wird 24 h nach Aussaat und anschließend dreimal pro Woche gewechselt. Die Zellen werden an Tag 21 - 28 nach der Aussaat verwendet.

4.3 DIE CACO-2/TC7 ZELLKULTUR ALS *IN VITRO* PERMEATIONSMODELL

4.3.1 Durchführung der Permeationsstudien

Nach der Aussaat auf die mikroporöse Filtermembran der Transwell-Einsätze (4.2.2) wachsen die Caco-2/TC7 Zellen innerhalb von 21 Tagen zu dichten, polarisierten und ausdifferenzierten Monolayern heran. Die Permeationsstudien werden je nach Dichtigkeit der Monolayer an Tag 21 - 28 nach Aussaat durchgeführt (4.3.2).

4.3.1.1 Transportpuffer

Alle Permeationsstudien werden in physiologischer Pufferlösung nach Hank durchgeführt. Die Zusammensetzung ist in Tabelle 4-11 angegeben. Entsprechend dem angestrebten pH-Wert wird die jeweilige Puffersubstanz ausgewählt: HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure) (20 mM) ist in der Zellkultur weitverbreitet, um pH-Werte von 6,8 - 8,2 einzustellen; MES (4-Morpholino-ethan-sulfonsäure) (10 mM) ist im Bereich von pH 5,5 - 6,7 gebräuchlich (Ingels und Augustijns, 2003). Die erforderlichen Substanzen werden in destilliertem Wasser gelöst, der entsprechende pH-Wert wird mit Natriumhydroxid-Lösung oder *ortho*-Phosphorsäure eingestellt und die Osmolalität bestimmt (300 ± 25 mosmol/kg).

Tabelle 4-11 Zusammensetzung von Hank's Puffer

Substanz	Menge (g/l)
Calciumchlorid	0,14
Kaliumchlorid	0,40
Kaliumdihydrogenphosphat	0,06
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	0,10
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	0,10
Natriumchlorid	8,00
Di-Natriumhydrogenphosphat-Heptahydrat	0,09
D-Glucose	1,00
HEPES oder	5,07
MES	2,13

4.3.1.2 Permeationsstudien am Transwell-System

Alle Transportexperimente werden in Richtung der Absorption (apikal nach basolateral, AP-BL) und der Sekretion (basolateral nach apikal, BL-AP) durchgeführt.

Zu Beginn eines Experiments wird zunächst das Kulturmedium aus beiden Kammern der Transwells abgesaugt, danach werden diese zweimal mit temperiertem Hank's Puffer gespült. Beim Spülen richtet sich die Temperatur des Puffers nach den angewandten Versuchsbedingungen, in der Regel also 37 °C. Bei Permeationsstudien bei 4 °C wird Puffer von Raumtemperatur verwendet, um eine schrittweise Anpassung an die Versuchsbedingungen zu erzielen. Nach dem Spülvorgang werden die Zellmonolayer 30 min lang im Schüttelwasserbad bei der entsprechenden Temperatur äquilibriert, wobei auf die Einhaltung der Kammervolumina (0,5 ml apikal, 1,5 ml basolateral) zu achten ist. Bei Experimenten mit den Inhibitoren Verapamil oder Natriumazid werden diese schon bei der Äquilibrierung in beiden Kammern zugesetzt.

Um ein Experiment zu starten, werden im Anschluss an die Vorinkubationszeit beide Kammern der Transwells leer gesaugt und mit Puffer- bzw. Arzneistofflösung befüllt (Abbildung 4-3). Die Versuche werden im temperierten Schüttelwasserbad durchgeführt, das sich mit einer Geschwindigkeit von 85 min⁻¹ bewegt. Nach 15, 30, 60, und 120 min werden im jeweiligen Akzeptor-Kompartiment Proben (200 µl) gezogen. Das entnommene Volumen wird durch temperierten Transportpuffer sofort wieder ersetzt. Darüber hinaus wird die Startkonzentration bestimmt und ebenso die verbleibende Konzentration im Donorkompartiment am Versuchsende, anhand derer die Wiederfindung der eingesetzten Arzneistoffkonzentration überprüft wird. Die Proben werden direkt im Anschluss an den Versuch analysiert (4.6.1) oder bei -20 °C bis zur Analyse eingefroren. Bei allen Transportexperimenten wird auf die Einhaltung von 'sink'-Bedingungen geachtet. Eine Übersicht über sämtliche Versuchsbedingungen findet sich in Tabelle 4-12. Die jeweils verwendeten Wirkstoffkonzentrationen finden sich bei der detaillierten Beschreibung des jeweiligen Experiments in Kapitel 3.

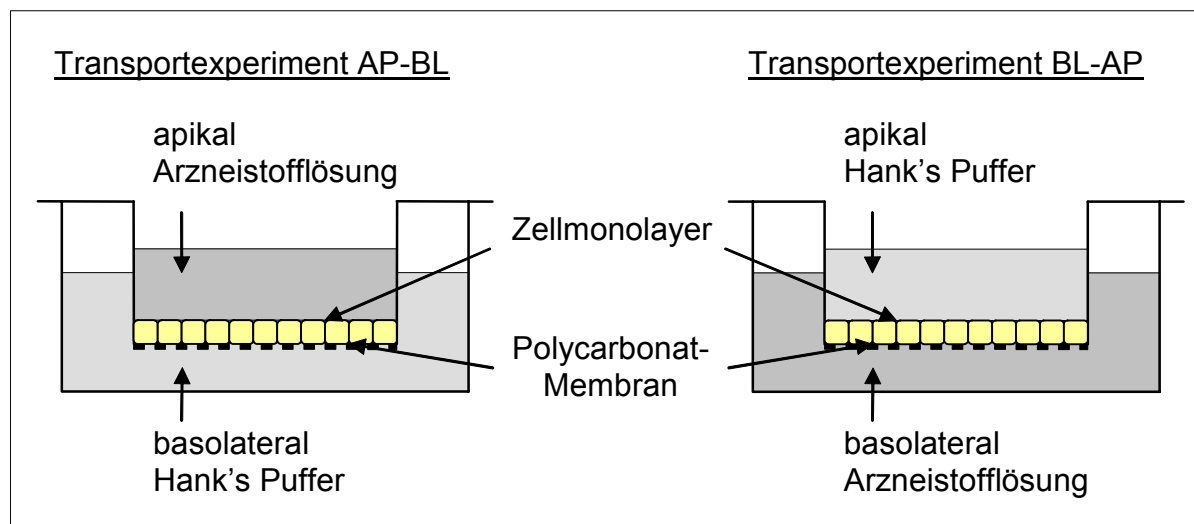


Abbildung 4-3 Versuchsanordnung für Transportexperimente in Richtung AP-BL (Absorption) und BL-AP (Sekretion)

Tabelle 4-12 Versuchsbedingungen für die Permeationsstudien

Experiment	Donor-Kompartiment		Akzeptor-Kompartiment	
	Arzneistofflösung	Temp. pH	Arzneistofflösung	Temp. pH
Standard, 37 °C	Arzneistofflösung	37 °C 7,4	Hank's Puffer	37 °C 7,4
Standard, 4 °C	Arzneistofflösung	4 °C 7,4	Hank's Puffer	4 °C 7,4
pH-Gradient	Arzneistofflösung	37 °C 6,0	Hank's Puffer	37 °C 7,4
Inverser pH-Gradient	Arzneistofflösung	37 °C 7,4	Hank's Puffer	37 °C 6,0
Inhibition durch Verapamil	Arzneistofflösung + Verapamil	37 °C 7,4	Hank's Puffer + Verapamil	37 °C 7,4
Inhibition durch Natriumazid	Arzneistofflösung + Natriumazid	37 °C 7,4	Hank's Puffer + Natriumazid	37 °C 7,4
Inhibition durch Benzoessäure	Arzneistofflösung + Benzoessäure	37 °C 7,4	Hank's Puffer	37 °C 7,4
Inhibition durch CHC	Arzneistofflösung + CHC	37 °C 7,4	Hank's Puffer	37 °C 7,4

4.3.1.3 Ermittlung des apparenten Permeationskoeffizienten (P_{app})

Der apparente Permeationskoeffizient (P_{app}) ist ein gebräuchlicher Parameter zur Beurteilung der Durchlässigkeit (Permeabilität) eines Zellmonolayers für eine bestimmte Substanz und damit ihres Absorptionsverhaltens am entsprechenden

Epithel. Der P_{app} wird durch Auswertung der Permeationsstudien unter Anwendung von Gleichung 2 berechnet (Artursson et al., 1996).

$$P_{app} = \frac{dc}{dt} \cdot \frac{V}{A \cdot c_0} \quad [\text{cm/s}] \quad \text{Gleichung 2}$$

Hierbei ist dc/dt [$\mu\text{g ml}^{-1} \text{s}^{-1}$] der Substanzfluss über den Monolayer. Dieser entspricht der Steigung, die aus der Regressionsgeraden des anfangs linearen Anteils der kumulierten Arzneistoffkonzentration über der Zeit erhalten wird. V ist das Volumen im Akzeptorkompartiment (0,5 ml AP bzw. 1,5 ml BL), A die Fläche des Zellmonolayers (1,13 cm^2) und c_0 die Ausgangskonzentration im Donorkompartiment [$\mu\text{g/ml}$].

4.3.2 Integrität der Zellmonolayer

Die Integrität der Zellmonolayer ist ein wichtiges Qualitätsmerkmal, denn nur mit dichten und somit unversehrten Zellmonolayern können valide Ergebnisse aus den Permeationsstudien erhalten werden. Deshalb wird die Integrität vor und nach jedem Transportexperiment überprüft, wobei die beiden im Folgenden beschriebenen Methoden zum Einsatz kommen. Zellmonolayer, die die geforderten Qualitätskriterien nicht erfüllen, werden nicht für Permeationsstudien verwendet.

4.3.2.1 Transepithelialer elektrischer Widerstand (TEER)

Das Zellwachstum kann durch Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes (TEER), also des Widerstandes gegenüber dem Ionenfluss über den Zellmonolayer, überprüft werden. Da der Ionenfluss durch die Zellmembran im Vergleich mit jenem durch die tight junctions sehr gering ausfällt, stellt der TEER ein Maß für die Dichtigkeit der tight junctions dar (Artursson et al., 1996).

Gemessen wird dieser Widerstand mit einem Volttohmmeter (Abbildung 4-4 A) mit entsprechend gestalteten „chopstick“-Elektroden (Abbildung 4-4 B). Unter Berücksichtigung der Temperaturabhängigkeit des TEER wird die Widerstandsmessung am Transwell-System direkt nach dem Wechsel des auf 37 °C temperierten Wachstumsmediums durchgeführt.

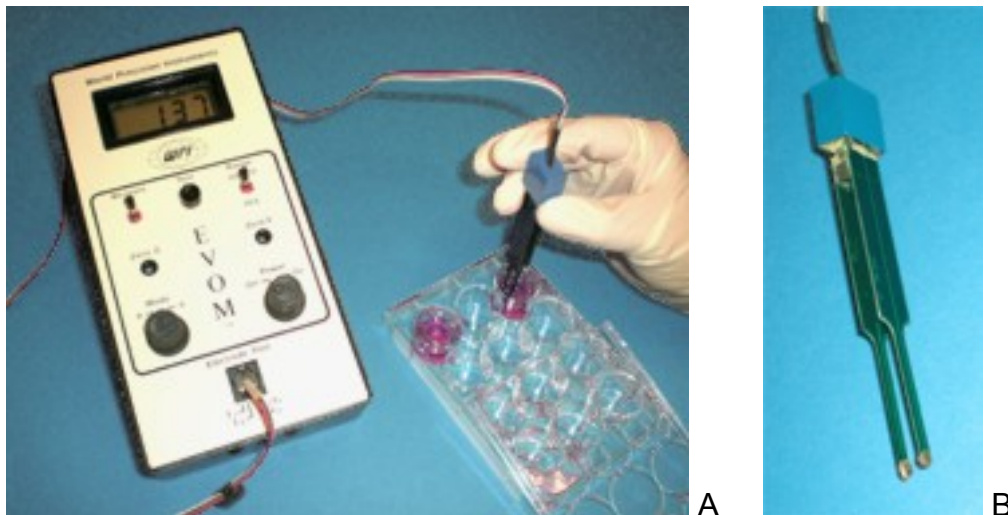


Abbildung 4-4 Messung des TEER mit Hilfe des EVOM Volttohmmeters (A) und vergrößerte Abbildung der „chopstick“-Elektroden (B).

Zur Berechnung des TEER-Werts muss zuerst der effektive Widerstand des Zellmonolayers als Differenz des Widerstands des unbewachsenen Polycarbonatfilters ($\sim 130 \Omega$) und des tatsächlichen Messwerts ermittelt werden. Außerdem geht die Fläche des Filters bzw. des Zellmonolayers ($1,13 \text{ cm}^2$) in die Berechnung ein (Gleichung 3) (Tavelin 2002).

$$\text{TEER} = (\text{Messwert} - 130) \cdot 1,13 \text{ } [\Omega \cdot \text{cm}^2] \quad \text{Gleichung 3}$$

Beobachtet man den typischen Verlauf des TEER-Werts nach der Aussaat der Zellen, so ist dieser zu Beginn sehr niedrig, steigt dann schnell an und erreicht bei Konfluenz nach ca. 10 - 14 Tagen sein Maximum (Awadallah 2003). In der Regel werden in unserem Labor TEER-Werte von $190\text{-}240 \Omega \text{ cm}^2$ für Zellmonolayer der Passagen # 34 - 47 erreicht.

Der TEER wird als Auswahlkriterium für die Zellmonolayer eingesetzt. So werden im Rahmen der vorliegenden Arbeit nur Zellmonolayer für Permeationsstudien verwendet, bei denen zu Versuchsbeginn effektive Widerstände $\geq 200 \Omega$ bzw. TEER-Werte $\geq 226 \Omega \text{ cm}^2$ ermittelt werden. Dieser Grenzwert wird in Anlehnung an Awadallah (2003) als Qualitätsstandard festgelegt.

4.3.2.2 Fluorescein-Natrium als hydrophiler Marker

Die Permeation hydrophiler und nicht aktiv transportierter Moleküle ist auf die passiv parazelluläre Route begrenzt. Somit können diese Markermoleküle zur Überprüfung der Dichtigkeit von Zellmonolayern herangezogen werden (Artursson et al., 1996). Im Anschluss an jedes Transportexperiment wird daher die Unversehrtheit der Zellmonolayer mit Fluorescein-Natrium als hydrophiler Markersubstanz bestimmt, denn diese Substanz liegt bei pH 7,4 deprotoniert, also negativ geladen, vor (Abbildung 4-5).

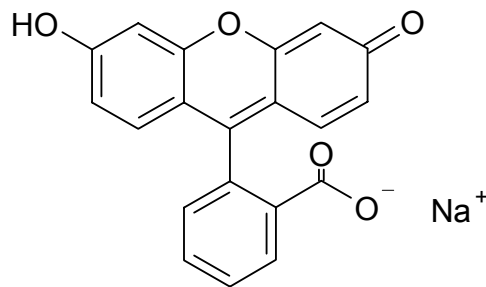


Abbildung 4-5 Fluorescein-Natrium

Bei der Integritätsüberprüfung mit Fluorescein-Natrium werden die Transwells in Analogie zu den Transportexperimenten (4.3.1.2.) basolateral mit 1,5 ml Hank's Puffer und apikal mit 0,5 ml einer Lösung von 100 µg/ml Fluorescein-Natrium in Hank's Puffer, jeweils auf pH 7,4 eingestellt, befüllt. Nach 60 min wird im Akzeptorkompartiment eine Probe gezogen und in einer 96 Well-Platte mit dem Plattenreader (4.6.1.5) fluorimetrisch analysiert.

Bei integren Zellen darf der Grenzwert von $1 \cdot 10^{-6}$ cm/s für den apparenten Permeationskoeffizienten (Artursson et al., 1996) nicht überschritten werden. Dies entspricht einer Konzentration von 0,26 µg/ml Fluorescein-Natrium im Akzeptorkompartiment nach 60 min.

4.4 METHODEN DER IMMUNFLUORESZENZ

4.4.1 Grundlagen

Die Immunfluoreszenz macht Proteine mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Antikörpern sichtbar und kann daher sinngemäß mit dem Begriff „Antikörper-Färbung“ beschrieben werden. Sie ist eine von mehreren verschiedenen Färbemethoden aus der Immunchemie.

In der Immunfluoreszenz kommen unterschiedliche Färbetechniken zur Anwendung, unter anderem die 2-Schritt indirekte und die 3-Schritt indirekte Methode. Bei der im Rahmen dieser Arbeit angewandten Färbetechnik handelt es sich um die 2-Schritt indirekte Methode (Abbildung 4-6). Hierbei wird das darzustellende Antigen, in diesem Fall das humane MCT1-Protein, im ersten Schritt durch einen unkonjugierten Primärantikörper erkannt. Im zweiten Schritt bindet ein fluoreszenzmarkierter Sekundärantikörper spezifisch an den Primärantikörper. Dieser dient schließlich der indirekten fluoreszenzmikroskopischen Visualisierung des Zielantigens (Boenisch 2006). Hierbei ist zu beachten, dass der Sekundärantikörper gegen die Immunglobuline derjenigen Spezies gerichtet sein muss, aus der der Primärantikörper stammt (4.4.3.2.).

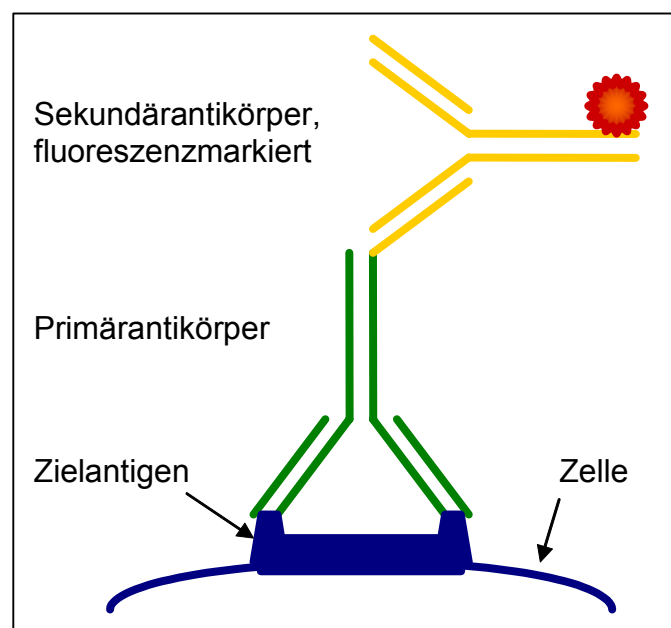


Abbildung 4-6 Schematische Darstellung der 2-Schritt indirekten Methode der immunfluorimetrischen Färbetechniken

4.4.2 Auswahl geeigneter Träger für die Zellmonolayer im Rahmen der immunchemischen Färbungen

Um die fluoreszenzmikroskopische Begutachtung der hergestellten Präparate zu ermöglichen, müssen die Zellmonolayer auf einem transparenten Träger herangezogen werden. Die für die Permeationsstudien verwendeten Transwells mit Polycarbonatmembran sind nicht transparent und folglich ungeeignet. Als Alternative kommen Transwells mit einer klaren Polyestermembran oder Glasdeckgläser in Frage.

In Transwells mit Polyestermembran werden die Caco-2 Zellen wie in Transwells mit Polycarbonatmembran kultiviert (4.2.2.). Auch aus Gründen der Handhabung bieten sich diese Membranen an. Bereits bei den ersten Färbeversuchen wurde jedoch eine starke Eigenfluoreszenz der Polyestermembranen festgestellt, die die Detektion der eigentlichen Zielstrukturen und damit eine weitere Verwendung dieser Transwells in der Fluoreszenzmikroskopie unmöglich macht.

Auf Glas adhären die Caco-2/TC7 Zellen ebenso gut wie auf den genannten Membranstrukturen oder auf der Plastikoberfläche (Polystyrol) der Zellkulturflaschen, so dass sich die Kultivierung der Zellen auf Deckgläsern (4.2.3.) problemlos gestaltet. Bei der Verwendung von Deckgläsern können Eigenfluoreszenz oder sonstige Störfaktoren bei der Mikroskopie weitgehend ausgeschlossen werden, so dass diese als optimale Träger für die Zellmonolayer in der Immunfluoreszenz ausgewählt werden.

4.4.3 Auswahl der Antikörper, Seren und weiteren Markersubstanzen

Eine Übersicht über alle Antikörper, Seren und weiteren Markermoleküle, die zur Visualisierung des MCT1-Proteins und der Hintergrundfärbungen verwendet wurden, sind in Tabelle 4-13 zusammengestellt. In den folgenden Abschnitten wird diese Auswahl näher erläutert.

Tabelle 4-13 Immunchemisches Setup in der Übersicht

Normalserum	Eselnormalserum	
Primärantikörper	goat anti-human MCT1 (Santa Cruz Biotechnology)	rabbit anti-human MCT1 (QED Bioscience)
Sekundärantikörper	Alexa 555- donkey anti-goat IgG (H+L)	Alexa 555- donkey anti-rabbit IgG (H+L)
Kernfärbung	DAPI	
F-Actin Färbung	Alexa 488-Phalloidin	

4.4.3.1 Auswahl der Primärantikörper

Der Primärantikörper muss das humane MCT1-Protein bzw. eine Sequenz aus diesem als Antigen erkennen. Außerdem soll seine Spezifität gewährleistet sein. Um diesen Anforderungen zu genügen, werden im Idealfall Primärantikörper ausgewählt, die bereits in der Immunchemie verwendet wurden und dabei eine spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion mit dem Zielantigen unter Beweis gestellt haben. Neben dem bei Caco-2/BBe Zellen eingesetzten Primärantikörper von Alpha Diagnostics International Inc. (ADI, San Antonio, Texas, USA) sind die beiden im Folgenden genannten kommerziell erhältlich.

Der Antikörper goat anti-human MCT1 (C20) von Santa Cruz Biotechnology ist ein gereinigter polyklonaler Antikörper aus der Ziege und gegen ein C-terminales Peptid des humanen MCT1 gerichtet. Er wurde bereits in der Immunchemie verwendet, allerdings nicht an Caco-2 Zellen. Nachteilig ist hier das für diesen Antikörper empfohlene Fixierungsmittel Methanol, das durch eine mögliche Dehydratisierung der Zellen als ungünstig eingestuft werden muss.

Der Antikörper rabbit anti-human MCT1 (aa 3-14) von QED Bioscience ist ein gegen ein N-terminales Peptid des humanen MCT1 gerichteter Antikörper aus dem Kaninchen. Für die Anwendung in Immunoblots wird dieser Antikörper zwar empfohlen, es gibt jedoch keine Erfahrung in der Immunfluoreszenz. Er wurde dennoch ausgewählt, um ein Abgleichen der Färbeergebnisse mit dem erstgenannten Antikörper zu ermöglichen. Eine Fixierung mit 4 % Paraformaldehyd anstelle von Methanol soll etabliert und die Ergebnisse beider Primärantikörper sollen miteinander verglichen werden.

4.4.3.2 Auswahl der Sekundärantikörper

Der Sekundärantikörper muss jeweils gegen die Immunglobuline derjenigen Spezies gerichtet sein, aus der der Primärantikörper stammt. Darüber hinaus sollte der Sekundärantikörper mit der gewünschten Fluoreszenzmarkierung verfügbar sein (4.4.3.5). Da der Primärantikörper von Santa Cruz Biotechnology aus der Ziege stammt, wird ein aus dem Esel stammender Sekundärantikörper, der gegen Immunglobuline der Ziege gerichtet ist (donkey anti-goat IgG (H+L)), ausgewählt. Entsprechend stammt der Sekundärantikörper, der gegen den Primärantikörper von QED Bioscience gerichtet ist, ebenfalls aus dem Esel, ist jedoch gegen die Immunglobuline des Kaninchens gerichtet (donkey anti-rabbit IgG (H+L)) (Tabelle 4-13).

4.4.3.3 Blockierung unspezifischer Färbung

Die Antikörper-Verdünnungslösung, die neben PBS und Triton X-100 1 % BSA enthält (Tabelle 4-4), wird als Standard Blocking Solution eingesetzt und dient der Absättigung von freien Protein-Bindungsstellen und damit der Reduzierung unspezifischer Färbungen. Diese unspezifische Färbung soll außerdem durch die gezielte Blockierung mit den Sekundärantikörpern entsprechendem Normalserum verhindert werden. Da die ausgewählten Sekundärantikörper beide aus dem Esel stammen, wird jeweils Eselnormals Serum verwendet. Kontrollexperimente ohne Primärantikörper zeigten keine Färbungen dieser Präparate.

4.4.3.4 Hintergrundfärbung

Die Hintergrundfärbung der immunchemischen Präparate soll eine räumliche Orientierung sowohl über den Zellmonolayer hinweg als auch innerhalb einzelner Zellen gewährleisten, um definierte Aussagen über die Lokalisation des MCT1 zu ermöglichen (2.2.2). Hierfür werden zum einen die Zellkerne mit DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid) markiert. Zum anderen wird F-Actin in der Zelle lokalisiert, um so die dem Darmlumen zugewandte Seite der Zellen eindeutig zuordnen zu können (2.2.1).

Die Markierung der Zellkerne geschieht durch die spezifische Bindung von DAPI an AT-Basenpaare und Interkalation in GC-reiche Regionen der DNA. Die blaue Farbe

von DAPI ist für die Arbeit am Fluoreszenzmikroskop vorteilhaft, da es nur eine sehr geringe Überlappung zwischen DAPI und dem grün fluoreszierenden Marker Alexa 488 und dem rot fluoreszierenden Marker Alexa 555 gibt (Tabelle 4-14).

Phalloidin wird aus dem Weißen Knollenblätterpilz (*Amanita phalloides*) isoliert und bindet selektiv an F-Actin. Durch Kopplung des Fluoreszenzfarbstoffs Alexa 488 (Tabelle 4-14) an das Phalloidin lässt sich folglich F-Actin in der Zelle visualisieren. Bei sämtlichen Anfärbungen der Actinfilamente wird zur Fixierung der Zellmonolayer 4 % PFA verwendet, da Methanol F-Actin während des Fixierungsprozesses zerstören kann (Molecular Probes, 2006).

4.4.3.5 Auswahl der Fluoreszenzfarbstoffe

Die Fluoreszenzfarbstoffe sollen in erster Linie mit den verfügbaren Filtersets (4.4.8., Tabelle 4-8) des Mikroskops detektierbar sein. Grundsätzlich ist darauf zu achten, dass bei Mehrfachfärbungen die Exzitations- und Emissions-Spektren der ausgewählten Farbstoffe nicht überlappen, so dass die getrennte Detektion möglich ist. Wünschenswert sind darüber hinaus Fluoreszenzmarker mit intensiver, möglichst pH-unabhängiger Fluoreszenz und vor allem hoher Photostabilität. Aus den genannten Gründen werden die in Tabelle 4-14 genannten Fluoreszenzfarbstoffe ausgewählt.

Tabelle 4-14 Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe

Farbstoff	Konjugiert an	Zielantigen	Exzitation [nm]	Emission [nm]	Farbe
DAPI	---	Zellkern (DNA)	358	463	Blau
Alexa 488	Phalloidin	F-Actin	493	520	Grün
Alexa 555	Sekundär-antikörper	humaner MCT1, indirekt	553	568	Rot

4.4.4 Optimierung der Konzentrationen der Antikörper und Fluoreszenzmarker

Um aussagekräftige Färbeergebnisse zu bekommen, müssen optimal verdünnte Antikörper benutzt werden. Bei der 2-Schritt indirekten Methode werden zwei Antikörperlösungen verwendet. Die optimale Verdünnung für jeden Antikörper wird durch eine Schachbrett-Titration entsprechend Tabelle 4-15 bestimmt. Zur Gewinnung eines ersten Überblicks über die ausgewählten Verdünnungen werden die Präparate 1 - 3 angefertigt und begutachtet.

Tabelle 4-15 Schema der Schachbrett-Titration

		<i>Primärantikörper</i>			
		<i>1:50</i>	<i>1:100</i>	<i>1:150</i>	<i>1:200</i>
Sekundärantikörper	1:1000	4a	4b		
	1:2000	4c	1		
	1:5000			2	
	1:10000				3

Die optimale Kombination der Verdünnungen kann man an dem Präparat erkennen, das die stärkste spezifische Anfärbung und den geringsten Hintergrund (unspezifisch, durch Überfärbung) aufweist. Die nach Tabelle 4-15 angefärbten Präparate 2 und 3 sind deutlich zu schwach angefärbt, während Präparat 1 dem gesuchten Verdünnungsbereich bereits näher kommt. In einem nachfolgenden Experiment entsprechend der Verdünnungskombinationen 4a, 4b und 4c wird bei Präparat 4a die intensivste Färbung ohne Hintergrund festgestellt und die damit als Optimum festgelegt. In einem weiteren Versuch unter Verwendung der Antikörper-Verdünnungen nach 4a, kombiniert mit einer zusätzlichen Kernfärbung mit DAPI und einer F-Actin-Färbung mit Phalloidin, sind alle drei Farben von hoher Intensität, und Hintergrundfärbungen sind nicht auszumachen.

Diese Prozedur wird für beide Antikörpersets in der beschriebenen Form durchgeführt. Es wird jeweils eine Verdünnung von (1:50) für den Primärantikörper und von (1:1000) für den Sekundärantikörper als optimale Konzentrationen ermittelt.

4.4.5 Fixierungsmethoden

Die Fixierung dient der Konservierung der Zellmonolayer in möglichst natürlichem Zustand und auf reproduzierbare Weise (Farmilo und Stead, überarbeitet durch Atwood, 2006). Ein ideales Fixierungsmedium soll daher die Zellmorphologie des Präparats sowie die fraglichen Epitope erhalten, außerdem schnell in die Zellen eindringen und keine Autofluoreszenz zeigen.

Fixative erfüllen ihre schützende Funktion, indem sie Proteine durch Koagulation und/oder durch chemische Quervernetzung denaturieren. Zur Fixierung der Caco-2/TC7-Zellmonolayer werden zwei verschiedene Fixierungsagenzien angewandt und verglichen: 100 % Methanol (Lagerung bei -20 °C, Zellfixierung 10 min bei 4 °C) und 4 % Paraformaldehyd (PFA) (10 min bei Raumtemperatur). Paraformaldehyd ist ein sehr gebräuchliches Fixativ. Es reagiert mit basischen Aminosäuren und führt damit zu Quervernetzungen. Das bedeutet, dass die Struktur zytoplasmatischer Proteine nur unerheblich verändert wird, dass die Permeabilität für Makromoleküle jedoch relativ gering ist. Daher müssen mit PFA fixierte Zellen permeabilisiert werden, um Antikörpern den Zugang zu intrazellulären Proteinen zu ermöglichen. Im Gegensatz dazu stellt die Fixierung mit Methanol, die über die Ausfällung von Proteinen wirkt, die einfachste Methode dar. Eine Permeabilisierung ist hier nicht notwendig, jedoch besteht die Gefahr, dass Lipide und lösliche Proteine aus der Zelle extrahiert werden. Als weiteren Nachteil der Lösemittelfixierung ist die mögliche Dehydratisierung der Zellen zu nennen.

Zur Permeabilisierung wird die Antikörper-Verdünnungslösung (Standard Blocking solution) grundsätzlich mit 0,2 % Triton X-100 versetzt (Tabelle 4-4), obwohl dies nur für PFA-fixierte Präparate unabdingbar ist.

Die Fixierdauer ist eine weitere wichtige Variable: bei zu langer Fixierzeit können Epitope geschädigt werden, während bei zu kurzer Fixierung die zelluläre Struktur eventuell nicht ausreichend konserviert wird. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine Dauer von 10 min als optimale Fixierzeit experimentell ermittelt.

4.4.6 Eindecken der Präparate

Der abschließende Schritt einer jeden immunocytochemischen Färbeprozedur ist das „Eindecken“, also die Fixierung des gefärbten Präparats auf dem Objektträger (Abbildung 4-7). Da diese Fixierung möglichst dauerhaft sein soll, ist ein Aushärten des Eindeckmediums wünschenswert. Des Weiteren soll ein Ausbleichen des Präparates verhindert werden, was durch Zusatz eines „Antifade“-Reagenzes wie DABCO (1,4-Diazabicyclo-[2.2.2]-octan) erreicht werden kann. Beide Forderungen werden durch das folgende Eindeckmedium erfüllt:

Eindeckmedium Glycergel/DABCO:

Glycergel	15 ml
DABCO	390 mg

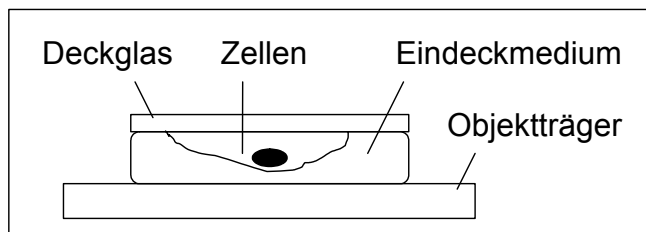


Abbildung 4-7 Schemazeichnung eines eingedeckten Präparates im Querschnitt

Die in Glycergel/DABCO eingedeckten Präparate härten über Nacht im Kühlschrank vollständig aus und können anschließend mikroskopisch betrachtet werden.

Als Alternative kann eine Mischung aus Glycerin/PBS (9+1) und DABCO verwendet werden. Da diese jedoch nicht aushärtet, sollte das Präparat zum Schutz mit Nagellack versiegelt werden (Abbildung 4-8).

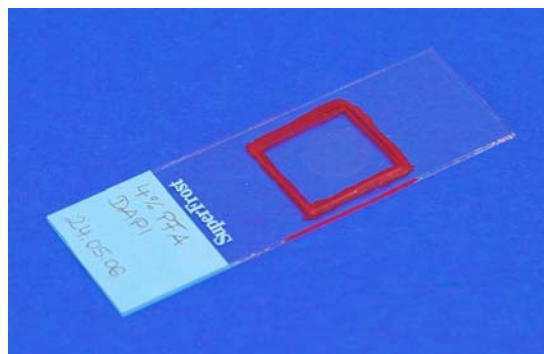


Abbildung 4-8 Beispiel eines in Glycerin/PBS eingedeckten und mit Nagellack versiegelten Präparates

4.4.7 Durchführung der immunchemischen Färbungen

Das detaillierte Färbeprotokoll kann dem Anhang (7.1) entnommen werden.

Der Ablauf der Färbeprozedur sieht eine vierstündige Einwirkzeit des Primärantikörpers vor. Um zu verhindern, dass das Präparat während dieser Zeit austrocknet, wird eine spezielle Feuchtekammer entwickelt (Abbildung 4-9). Diese besteht aus einer Petrischale, die mit einem haushaltsüblichen und mit destilliertem Wasser befeuchteten Schwammtuch ausgelegt ist. Die Antikörper-Lösung wird auf ein in die Petrischale passendes Stück Parafilm pipettiert, das Deckglas mit der bewachsenen Seite nach unten vorsichtig aufgelegt und die Kammer verschlossen.

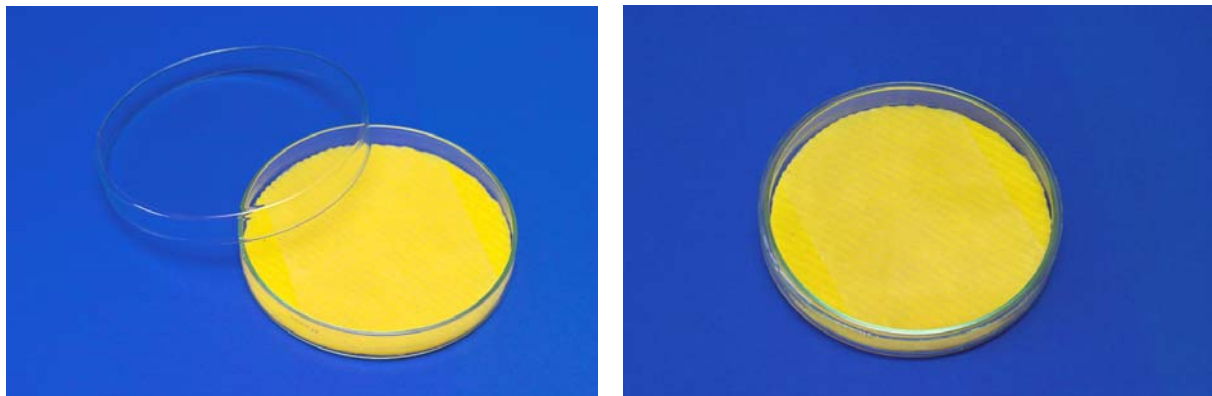


Abbildung 4-9 Feuchtekammer, offen (Bild links) und geschlossen (Bild rechts).

4.4.8 Fluoreszenzmikroskopie

Die eingedeckten Präparate werden in einem abgedunkelten Raum mit Hilfe des aufrechten Mikroskops AxioImager Z.1 unter Verwendung der entsprechenden Filtersets und der ApoTome-Einheit (4.1.9) fluoreszenzmikroskopisch betrachtet. Optische Schnitte werden in der Regel aus Z-Stapeln aus 10-20 Einzelschnitten bei 1 μm Z-Schnittdicke erstellt. Die Auswahl der jeweiligen Einstellungen richtet sich dabei nach der Qualität des Präparats hinsichtlich der Planarität des fixierten Zellmonolayers und der Intensität des Fluoreszenzsignals. Bei Z-Schnitten $< 1 \mu\text{m}$ besteht die Gefahr eines zu raschen Ausbleichens der Präparate.

4.5 KOCHKOLBEN UND VERTEILUNGSKOEFFIZIENT

4.5.1 Bestimmung des Verteilungskoeffizienten V_k

Der Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient V_k von Ibuprofen wird durch Ausschütteln im Scheidetrichter experimentell ermittelt. In Analogie zu den Permeationsstudien dient Hank's Puffer pH 7,4 und 6,0 als wässrige Phase.

Eine photometrisch auswertbare Ibuprofen-Lösung (in Hank's Puffer) wird so hergestellt, dass nach Lambert-Beer mit einer Absorption von 0,5 - 0,8 gerechnet werden kann. Die Ausgangsabsorption A_0 der Ibuprofen-Lösung wird UV-spektrophotometrisch bei 264 nm bestimmt. Genau 50 ml wässrige, octanolgesättigte, Ibuprofenhaltige Pufferphase und 50 ml puffergesättigtes Octanol werden im Schütteltrichter ausgeschüttelt. Sobald sich die Phasentrennung wieder einstellt, wird die Absorption A_{Ende} nach der Verteilung bestimmt. Der Verteilungskoeffizient berechnet sich aus den gefundenen Absorptionen nach Gleichung 4:

$$V_k = \frac{A_0 - A_{\text{Ende}}}{A_{\text{Ende}}} \quad \text{Gleichung 4}$$

Die Bestimmung des Verteilungskoeffizienten wird für jeden pH-Wert dreimal durchgeführt. Mittelwert und Standardabweichung werden berechnet.

4.5.2 Bestimmung des Verteilungsverhaltens mit Hilfe des Koch-Kolbens

Der Koch-Kolben (Abbildung 4-10) ist ein von der Rosano-Schulman-Apparatur abgeleitetes Resorptionsmodell. Mit Hilfe von drei Phasen wird der Übertritt eines Arzneistoffes von einer wässrigen Phase in eine andere wässrige Phase durch eine "Membran" hindurch simuliert. Die Besonderheit dieses Kolbens ist in der durchbrochenen, gewölbten Scheidewand zu sehen, die die Ausbildung des Dreiphasensystems (Abbildung 4-10: (A) Donorphase mit Arzneistoff = künstlicher Darmsaft; (B) organische Phase = Membranphase; (C) Akzeptorphase = künstliches Blut) ermöglicht.

Ausgehend von Hank's Puffer pH 7,4 bzw. 6,0 im Donorsystem und Hank's Puffer pH 7,4 auf der Akzeptorseite wird das Resorptionsverhalten von Ibuprofen bestimmt.

Zur Beschickung des Kolbens werden 40,0 ml einer Ibuprofen-Lösung in Hank's Puffer pH 7,4 bzw. 6,0 vorsichtig als Phase A in den Kolben pipettiert. Anschließend werden ebenfalls 40,0 ml Puffer pH 7,4 als Phase C auf die andere Seite der Scheidewand eingefüllt. Dann erfolgt die Überschichtung mit 80,0 ml n-Octanol. Der Kolben wird in einem auf 37 °C temperierten Wasserbad durch einen Motor in Drehung versetzt (40 U/min). Der ursprünglich nur in Phase A gelöste Arzneistoff wird nun, entsprechend seinem Verteilungskoeffizienten, in die Octanolphase B übergehen. Von der Octanolphase aus findet gleichzeitig ein Übertritt nach C statt. Aus den beiden wässrigen Phasen werden nach 5, 10, 15, 20, 30, 45 und 75 Minuten Proben gezogen. Die erhaltenen Probenlösungen werden photometrisch vermessen und der Konzentrationsverlauf des Arzneistoffes in Prozent in allen Phasen graphisch über der Zeit dargestellt.

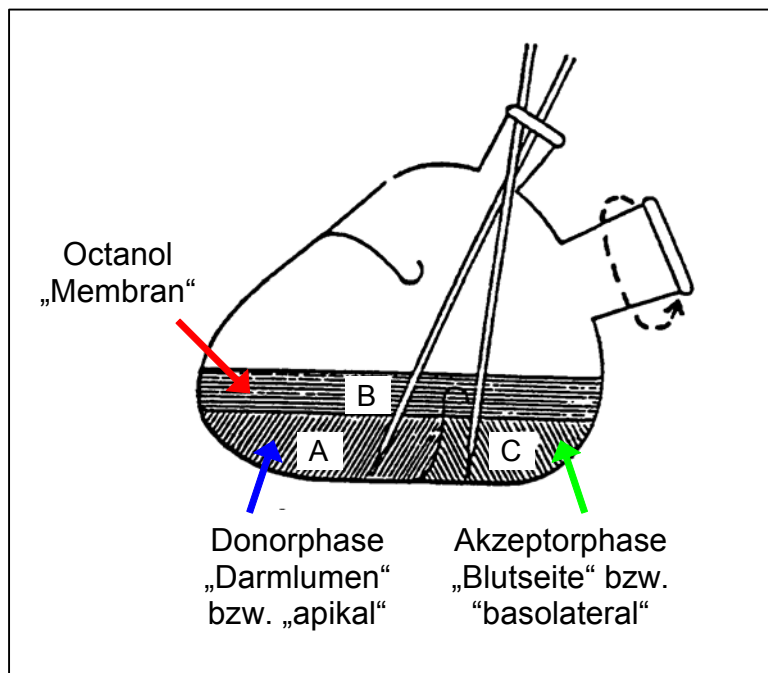


Abbildung 4-10 Der Koch-Kolben

4.6 ANALYTISCHE UND STATISTISCHE METHODEN

4.6.1 Analytische Methoden

Für alle Kalibrierlösungen und Verdünnungen wird Hank's Puffer pH 7,4 als Lösungsmittel verwendet.

4.6.1.1 Validierung der analytischen Methoden

Die Validierung der einzelnen analytischen Methoden wird anhand der Vorgaben der ICH Guidances for Industry ICH-Q2A, Text on Validation of Analytical Procedures (März 1995), und ICH-Q2B, Validation of Analytical Procedures: Methodology (November 1996), durchgeführt. Aus diesen Guidances gehen die im Folgenden beschriebenen Qualitätsmerkmale hervor.

Spezifität

Die Spezifität der spektrophotometrischen Methoden wird durch die Auswahl einer geeigneten Messwellenlänge gewährleistet. Dazu wird das Absorptionsspektrum des Arzneistoffs zwischen 200 und 350 nm am Plattenreader aufgenommen. Im Bereich der Fluorimetrie ist ein spezifischer Filter hinsichtlich Anregungs- und Emissionswellenlänge auszuwählen.

Linearität

Allen verwendeten quantitativen analytischen Methoden liegen lineare Kalibrierungen zugrunde. Die Kalibriergeraden für HPLC-Methoden werden aus mindestens sechs äquidistanten Konzentrationen des Analyten, die jeweils sechsmal vermessen werden, erstellt. Für die quantitativen Bestimmungen mit Hilfe des Plattenreaders wurden bei jedem Versuch mindestens sechs äquidistante Konzentrationen jeweils dreimal auf die verwendete 96-Well-Platte aufpipettiert und daraus die Kalibrierung berechnet. Zur Überprüfung der Güte der linearen Anpassung werden das Bestimmtheitsmaß r^2 aus den Werten der linearen Regression und die Residuen der Kalibrierfunktion in y-Richtung herangezogen.

Richtigkeit

Nach ICH drückt die Richtigkeit einer analytischen Methode die Übereinstimmung eines gefundenen Werts mit einem als wahr akzeptierten Wert aus. Sie wird nachgewiesen, indem für 3 verschiedene Konzentrationen aus dem niedrigen, mittleren und hohen Kalibrierungsbereich je 3 Lösungen separat hergestellt und vermessen werden. Aus den erhaltenen Messwerten werden dann anhand der zuvor ermittelten Kalibrierung die Konzentrationen errechnet und diese als Prozent der jeweils erwarteten Konzentration angegeben. Eine mittlere Wiederfindung von 98 - 102 % soll erreicht werden.

Systempräzision

Die Systempräzision ist ein Maß für die Streuung von Analyseergebnissen. Sie kann gezeigt werden, indem eine Lösung 6-mal vermessen wird. Es werden die Standardabweichung und die relative Standardabweichung berechnet. Die Streuung der erhaltenen Ergebnisse soll nicht über 1 % liegen.

Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Nach ICH ist die Nachweisgrenze einer analytischen Methode die niedrigste Konzentration des Analyten in einer Probe, die zwar noch detektiert aber nicht notwendigerweise als ein exakter Wert quantifiziert werden kann. Die Bestimmungsgrenze ist jene Konzentration, bei der der Analyt in einer Probe mit einer vorher festgelegten Ergebnisunsicherheit quantifiziert werden kann. Beide Grenzen werden aus der Steigung der Kalibriergeraden und der Reststandardabweichung s_y berechnet.

4.6.1.2 HPLC-Methoden zur Bestimmung von Ibuprofen

Für die quantitative Bestimmung von Ibuprofen wird eine HPLC-UV-Methode, jedoch zwei Kalibrierungen in unterschiedlichen Konzentrationsbereichen verwendet, da bei den Permeationstudien mit der niedrigsten Ausgangskonzentration von 10 mg/100 ml Ibuprofen eine Bestimmung in einem niedrigeren Konzentrationsbereich als bei der bereits bestehende Kalibrierung erforderlich wurde. Bei hohen Ibuprofen Konzentrationen werden alle Proben soweit verdünnt, dass diese innerhalb des vorgegebenen Kalibrierbereichs liegen.

Tabelle 4-16 HPLC Methodenbeschreibung für Ibuprofen

Fließmittel	Acetonitril / 20 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,0 (25:75)
Flussrate	1,5 ml/min
Injektionsvolumen	20 µl
HPLC-Säule	CC125 Nucleosil 100-5 C18
Vorsäule	CC 8/4 Nucleosil 100-5 C18
Retentionszeit	ca. 4 min
Absorbance	0,08
Detektion	221 nm

Tabelle 4-17 HPLC Kalibrierparameter für Ibuprofen Messbereich A

Messbereich	1,00 - 60,20 mg/100 ml
Anzahl Kalibrierproben	48
Anzahl Freiheitsgrade	46
Kalibrierfunktion	$y = 32049 x + 13499$
Bestimmtheitsmaß	$r^2 = 0,9996$
Nachweisgrenze	1,358 mg/100 ml
Bestimmungsgrenze	4,115 mg/100 ml
Richtigkeit	99,88 % mittlere Wiederfindungsrate - 1,22 % maximale Abweichung
Systempräzision	0,34 % relative SD

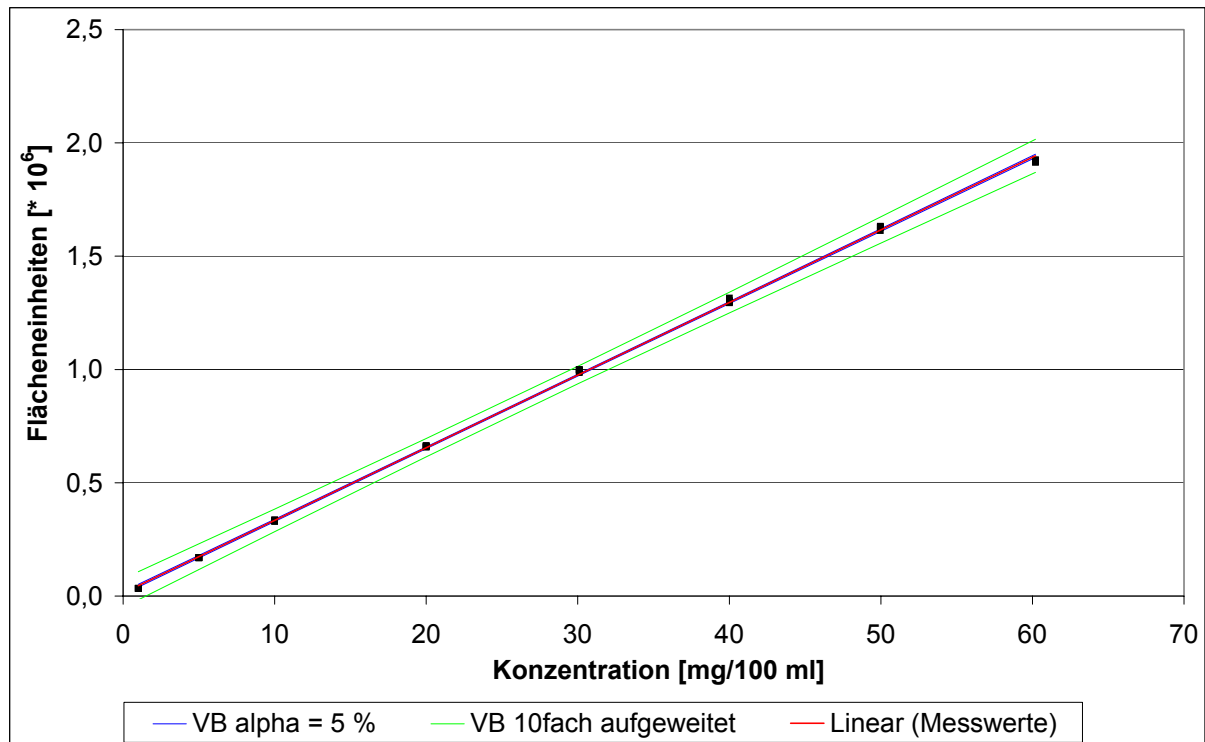


Abbildung 4-11 Kalibriergerade für Ibuprofen Messbereich A
(1,00 - 60,20 mg/100 ml)

Die Rohdaten zur Ermittlung von Richtigkeit und Systempräzision können Tabelle 7-1 und Tabelle 7-2 (Anhang) entnommen werden, ebenso der Residuenplot (Abbildung 7-1) und das Spektrum von Ibuprofen (Abbildung 7-5).

Tabelle 4-18 HPLC Kalibrierparameter für Ibuprofen Messbereich B

Messbereich	1,02 - 12,14 mg/100 ml
Anzahl Kalibrierproben	42
Anzahl Freiheitsgrade	40
Kalibrierfunktion	$y = 32357 x + 3318,3$
Bestimmtheitsmaß	$r^2 = 0,9982$
Nachweisgrenze	0,550 mg/100 ml
Bestimmungsgrenze	1,667 mg/100 ml
Richtigkeit	99,81 % mittlere Wiederfindungsrate 1,99 % maximale Abweichung
Systempräzision	1,51 % relative SD

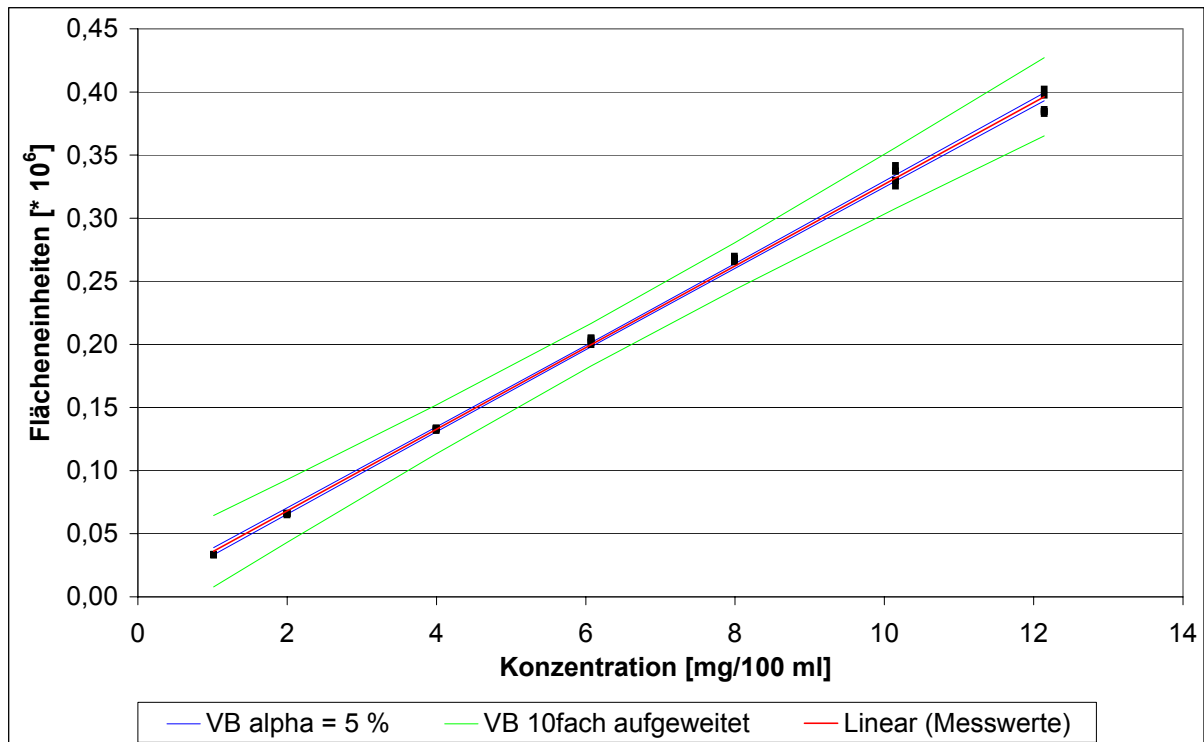


Abbildung 4-12 Kalibriergerade für Ibuprofen Messbereich B
(1,02 - 12,14 mg/100 ml)

Die Rohdaten zur Ermittlung von Richtigkeit und Systempräzision können Tabelle 7-3 und Tabelle 7-4 (Anhang) entnommen werden, ebenso der Residuenplot (Abbildung 7-2) und das Spektrum von Ibuprofen (Abbildung 7-5).

4.6.1.3 HPLC-Methode zur Bestimmung von Benzoesäure

Tabelle 4-19 Methodenbeschreibung und Kalibrierparameter für Benzoesäure

<i>Methode</i>	
Fließmittel	Methanol / 25 mM KH ₂ PO ₄ pH 3,0 (45:55)
Flussrate	0,8 ml/min
Injektionsvolumen	20 µl
HPLC-Säule	CC 250 Nucleosil 100-5 C18
Vorsäule	CC 8/4 Nucleosil 100-5 C18
Retentionszeit	ca. 11 min
Absorbance	0,08
Detektion	230 nm
<i>Kalibrierparameter</i>	
Messbereich	0,30 - 15,01 mg/100 ml

Anzahl Kalibrierproben	48
Anzahl Freiheitsgrade	46
Kalibrierfunktion	$y = 126009 x + 2017,9$
Bestimmtheitsmaß	$r^2 = 0,9993$
Nachweisgrenze	0,461 mg/100 ml
Bestimmungsgrenze	1,398 mg/100 ml
Richtigkeit	100,96 % mittlere Wiederfindungsrate 2,67 % maximale Abweichung
Systempräzision	0,98 % relative SD

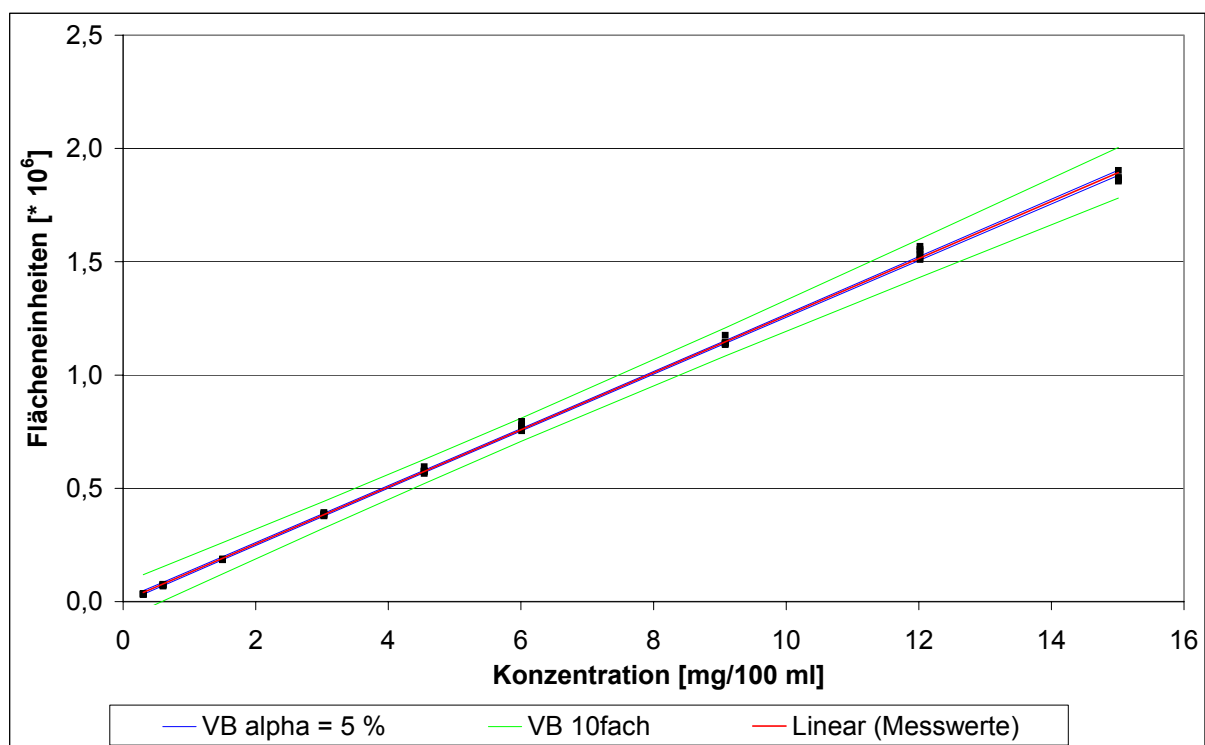


Abbildung 4-13 Kalibriergerade für Benzoesäure

Die Rohdaten zur Ermittlung von Richtigkeit und Systempräzision können Tabelle 7-5 und Tabelle 7-6 (Anhang) entnommen werden, ebenso der Residuenplot (Abbildung 7-3) und das Spektrum von Benzoesäure (Abbildung 7-6).

4.6.1.4 UV-spektrophotometrische Methode zur Bestimmung von Propranolol

Zur quantitativen Bestimmung von Propranolol wird der Plattenreader (BioTek SynergyHT) verwendet. Bei jedem Versuch werden acht äquidistante Konzentrationen von Propranolol in Hank's Puffer jeweils dreimal auf die beim jeweiligen Versuch verwendete 96-Well-Platte aufpipettiert und daraus die Kalibrierung berechnet. Zur Absicherung der Methode wurde einmalig eine komplette Methodvalidierung durchgeführt (Tabelle 4-20).

Für Propranolol werden 236 nm als Messwellenlänge gewählt. Bei Experimenten in Anwesenheit von Verapamil oder Benzoesäure muss die Wellenlänge auf 292 nm angepasst werden, um nicht im Bereich überlappender Spektren zu messen (Spektren siehe Anhang Abbildung 7-7, Abbildung 7-8 und Abbildung 7-6).

Tabelle 4-20 Methodenbeschreibung und Kalibrierparameter für Propranolol

<i>Methodenbeschreibung</i>	
<i>Methodenbeschreibung</i>	
Reading Type	End Point
Detection Method	Absorbance, UV 236 nm
Read Mode	Normal
Plate	Greiner 96 flat bottom
Shaking	Intensity: low Duration: 10 s
<i>Kalibrierparameter</i>	
Messbereich	0,562 - 29,58 µg/ml
Anzahl Kalibrierproben	48
Anzahl Freiheitsgrade	46
Kalibrierfunktion	$y = 0,0305 x + 0,0105$
Bestimmtheitsmaß	$r^2 = 0,9996$
Nachweisgrenze	0,673 µg/ml
Bestimmungsgrenze	2,040 µg/ml
Richtigkeit	99,79 % mittlere Wiederfindungsrate - 2,51% maximale Abweichung
Systempräzision	0,76 % relative SD

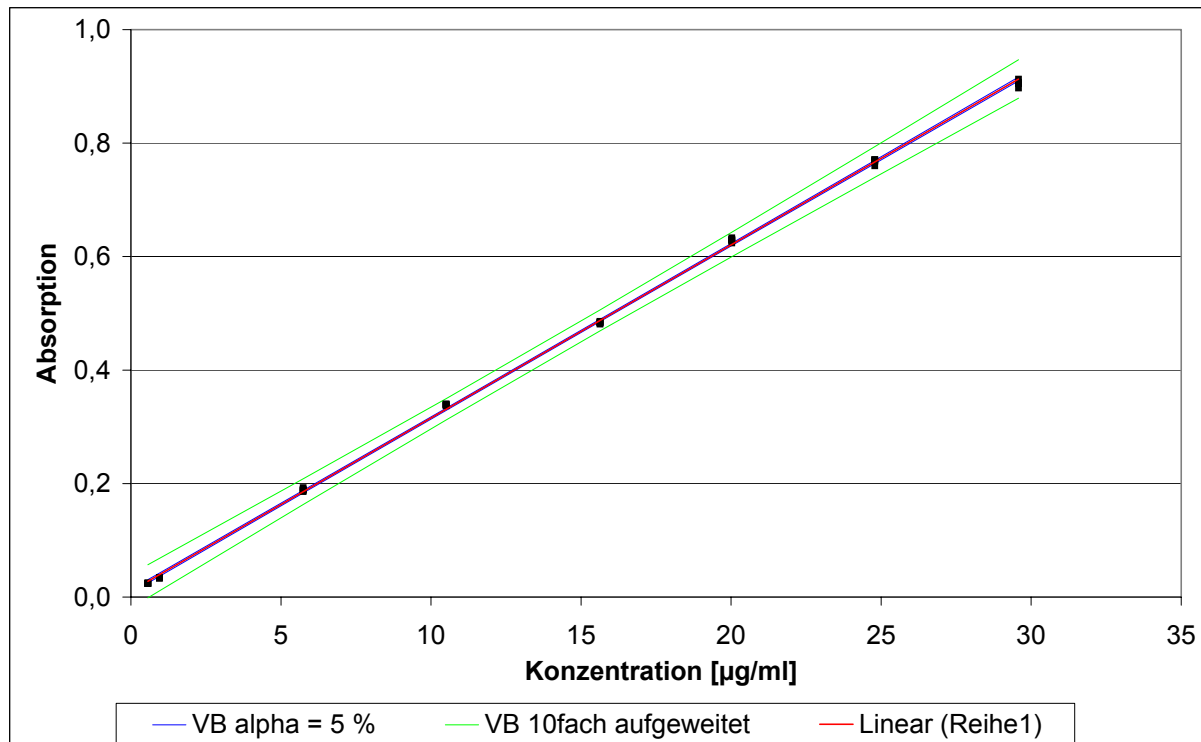


Abbildung 4-14 Kalibriergerade für Propranolol

Die Rohdaten zur Ermittlung von Richtigkeit und Systempräzision können Tabelle 7-7 und Tabelle 7-8 (Anhang) entnommen werden, ebenso der Residuenplot (Abbildung 7-4) und die Spektren von Propranolol, Verapamil und Benzoesäure (Abbildung 7-7, Abbildung 7-8 und Abbildung 7-6).

4.6.1.5 Fluoreszenzspektroskopische Methode zur Bestimmung von Fluorescein-Natrium

Zur quantitativen Bestimmung von Fluorescein-Natrium wird der Plattenreader (Bio-Tek SynergyHT) verwendet. Bei jedem Versuch werden sieben äquidistante Konzentrationen im Bereich von 0,01 - 4,00 µg/ml Fluorescein-Natrium in Hank's Puffer pH 7,4 jeweils dreimal auf die zur Probenanalyse des jeweiligen Versuchs verwendete 96 Well-Platte aufpipettiert und daraus die Kalibrierung berechnet. Auf eine komplette Methodvalidierung wird verzichtet, da diese Methode im Arbeitskreis bereits etabliert ist. Aus diesem Grund findet sich an dieser Stelle nur die Beschreibung der Methode.

Tabelle 4-21 Methodenbeschreibung für Fluorescein-Natrium

<i> Methode</i>	
Reading Type	End Point
Detection Method	Fluorescence
Filters	Excitation 485 nm Emission 528 nm Optics Position: Top
Plate	Greiner 96 flat bottom
Shaking	Intensity: low Duration: 10 s

4.6.2 Statistische Methoden

Alle Transportexperimente werden mindestens an zwei Transwells parallel durchgeführt und jeweils an zwei Passagen wiederholt. Alle immunchemischen Färbungen werden jeweils mindestens dreimal durchgeführt. Sämtliche Daten sind als Mittelwert \pm SD angegeben. Vergleiche mehrerer Stichproben werden mittels ANOVA durchgeführt, gefolgt von einem Newman-Keuls Test; $p < 0,05$ wird als signifikant betrachtet. In Diagrammen werden signifikante Unterschiede mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Aufklärung der Mechanismen der intestinalen Absorption des Modellarzneistoffs Ibuprofen unter besonderer Berücksichtigung einer möglichen Beteiligung des Monocarboxylat-Transporters 1 (MCT1). Als *in vitro* Modell für das gastrointestinale Epithel steht der Subklon TC7 der Caco-2 Zelllinie zur Verfügung. Die zelluläre Lokalisierung des MCT1-Proteins in den Caco-2/TC7 Zellen soll als Interpretationsgrundlage für die pharmakokinetischen Ergebnisse dienen. Darauf aufbauend sollen die Mechanismen des Ibuprofen-Transports anhand von Erkenntnissen aus Permeationsstudien, die an Zellmonolayern im Transwell-System durchgeführt werden, beurteilt werden.

Einführung in die Problemstellung

Ausgangspunkt ist die Notwendigkeit, detaillierte Kenntnisse über die intestinale Absorption von Arzneistoffen zu erlangen. Diese sind zunehmend erforderlich, um den wachsenden biopharmazeutischen Herausforderungen durch neue Wirkstoffe entsprechend gegenüberzutreten zu können. Ein Aufschluss über die am Transport des Modellarzneistoffs Ibuprofen beteiligten Mechanismen soll anhand von Permeationsstudien an Caco-2/TC7 Zellen gewonnen werden. Aufgrund widersprüchlicher Angaben in der Literatur hierzu steht die Frage im Mittelpunkt, ob eine rein passive Permeation von Ibuprofen vorliegt oder ob ein aktiver Transportmechanismus, möglicherweise der Cotransport mit Protonen über den MCT1, involviert ist. Die zelluläre Distribution des MCT1 in den Caco-2/TC7 Zellen ist für die Interpretation der pharmakokinetischen Ergebnisse von Bedeutung und soll daher bestimmt werden. Zwar gibt es Berichte über die Verteilung des MCT1 aus Studien an humanen Darmabschnitten und auch aus Caco-2/BBe Zellen. Im Caco-2 Subklon TC7 wurde die Lokalisation des MCT1 bisher jedoch noch nicht gezeigt. Daher soll eine immunchemische Methode zur Visualisierung des MCT1 etabliert werden. Hierbei werden zwei Primärantikörper eingesetzt, von denen einer in der Immunfluoreszenz bisher noch nicht verwendet wurde, und deren Eignung beurteilt.

Lokalisierung des MCT1

Der erste Teil der vorliegenden Arbeit befasst sich mit dem immunchemischen Nachweis und der zellulären Lokalisierung des MCT1-Proteins in Caco-2/TC7 Zellen.

Die angewendete Methode der Immunfluoreszenz ist die so genannte 2-Schritt indirekte Färbung. Diese besteht im ersten Schritt aus der Erkennung des humanen MCT1 als Antigen durch einen spezifischen Primärantikörper. Im zweiten Schritt bindet ein fluoreszenzmarkierter Sekundärantikörper an den Primärantikörper, so dass im Anschluss eine Detektion und Bewertung immunpositiver Bereiche mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie möglich ist.

Es werden zwei verschiedene Primärantikörper ausgewählt, zum einen der Antikörper goat anti-human MCT1 von Santa Cruz Biotechnology und zum anderen der Antikörper rabbit anti-human MCT1 von QED Bioscience. Deren Eignung wird verglichen, da der erstgenannte Primärantikörper mit Methanol fixiert werden soll, was durch die Dehydratisierungsgefahr jedoch kritisch zu bewerten ist. Letzterer hingegen wurde nach dem aktuellen Kenntnisstand bisher nur in Immunoblots, nicht aber in immunocytochemischen Studien eingesetzt, so dass dieser Primärantikörper seine Eignung in dieser Anwendung erst noch unter Beweis stellen muss. Beide Primärantikörper sind gegen unterschiedliche, aber in beiden Fällen cytosolisch lokalisierte Sequenzen des MCT1 gerichtet und werden jeweils mit einem korrespondierenden Alexa 555-konjugierten Sekundärantikörper markiert. Eine Hintergrundfärbung, bestehend aus der Färbung der Zellkerne und der Visualisierung des hauptsächlich in der Bürstensaummembran lokalisierten F-Actin, ermöglicht die räumliche Orientierung innerhalb der Zellen und über den Zellmonolayer hinweg. Sie bildet damit die Basis für die Beurteilung der Verteilung des MCT1 in den Caco-2/TC7 Zellen.

In ersten Versuchen wird anhand der Färbung der Zellkerne und des MCT1 mit beiden Sets aus Primär- und Sekundärantikörpern eine Bewertung zweier Fixierungsmethoden durchgeführt. Die Fixierung mit Methanol, das für die Verwendung des Antikörpers von Santa Cruz Biotechnology empfohlen wird, und die Fixierung mit 4 % Paraformaldehyd, einem sehr gängigen Fixierungsmittel, werden miteinander verglichen. Es ergeben sich zwei wesentliche Ergebnisse. Erstens zeigen die Färbeargebnisse bei beiden Fixierungsmethoden nur geringfügig unterschiedliche Ausprägungen, die wahrscheinlich auf die verschiedenen zugrunde liegenden Fixierungsmechanismen zurückzuführen sind. Zweitens sind die für den MCT1 immunpositiven Bereiche bei beiden verwendeten Primärantikörpern auf eine Seite der Zellen begrenzt und ergeben vergleichbare Resultate.

Die Untersuchung der exakten Lokalisation des MCT1 in den Caco-2/TC7 Zellen erfolgt anhand der Dreifachfärbung von Zellkernen, F-Actin und der Visualisierung des MCT1-Proteins. Da die Möglichkeit besteht, dass Methanol F-Actin depolymerisiert, wird für diese Dreifachfärbungen ausschließlich 4 % PFA als Fixierungsmittel verwendet. Für beide verwendeten Antikörpersets resultiert eine Färbung nahe der für F-Actin immunopositiven Bereiche und somit auf der apikalen Zellseite in der Bürstensaumregion, außerdem in der lateralen Plasmamembran dieses Teils der Zelle. In anderen Bereichen der Zellen sind keine immunopositiven Ergebnisse zu beobachten. Es gelingt also, die Lokalisation bzw. Distribution des MCT1 in den Caco-2/TC7 Zellen eindeutig aufzuzeigen. Hierdurch stellen beide verwendeten Primärantikörper, insbesondere der Antikörper rabbit anti-human von QED Bioscience, der zuvor noch nicht in derartigen Untersuchungen eingesetzt wurde, ihre Nützlichkeit in der immunchemischen Visualisierung des MCT1 unter Beweis.

Permeationscharakteristik von Ibuprofen an Caco-2/TC7 Zellen

Im zweiten Teil dieser Arbeit werden Permeationsstudien an Transwells durchgeführt, um die am Ibuprofen-Transport beteiligten Mechanismen aufzuklären. Insbesondere die Rolle des MCT1 soll in diesem Zusammenhang beurteilt werden. Propranolol dient in seiner Eigenschaft als Modellarzneistoff für rein passiv transzelluläre Permeation als Vergleichssubstanz.

Konzentrationsabhängige Permeationsexperimente im Bereich von 100 - 1600 µg/ml bzw. 0,5 - 8,0 mM Ibuprofen zeigen sinkende Permeationskoeffizienten bei Konzentrationen ab einem Schwellenwert von 2 mM. Dieses Verhalten, das in Richtung der Sekretion (BL-AP) stärker ausgeprägt ist als in Richtung der Absorption (AP-BL), ist ein deutlicher Hinweis auf eine Sättigung des Ibuprofen-Transports und damit auf einen zugrunde liegenden Carrier-vermittelten Transport.

Bei 4 °C ist im Falle einer Beteiligung aktiver Mechanismen am Arzneistofftransport trotz einer temperaturbedingt verminderten passiven Diffusion und einer Rigidisierung der Zellmembran mit einer entsprechenden Verminderung der Permeationskoeffizienten zu rechnen. Da die Ergebnisse von Ibuprofen und Propranolol einen Rückgang der P_{app} -Werte um einen ähnlichen Anteil zeigen, ist ein Rückschluss auf das Mitwirken eines aktiven Mechanismus offensichtlich nicht möglich. Da die verbleibende Restpermeation in jedem Falle durch passive Diffusion zu erklären ist, kann diese Komponente der Ibuprofen-Permeation jedoch bestätigt werden. Das

erhaltene konzentrationsabhängige Profil der Permeationskoeffizienten von Ibuprofen bei 4 °C zeigt innerhalb des schon bei 37 °C betrachteten Konzentrationsbereichs einen ähnlichen Verlauf, jedoch um etwa die Hälfte reduzierte P_{app} -Werte. Der Effekt der Sättigung des Transports im höheren Konzentrationsbereich ist also auch bei 4 °C zu sehen.

Bei Versuchsbedingungen von 4 °C ist in Anwesenheit des metabolischen Inhibitors Natriumazid eine eindeutige Reduktion der Permeationskoeffizienten von Ibuprofen zu erkennen. Dies weist auf die Beteiligung primär oder sekundär aktiver Mechanismen sowohl an der Absorption als auch an der Sekretion von Ibuprofen hin. Ein Einfluss des P-gp Substrats Verapamil auf den Transport von Ibuprofen ist bei beiden untersuchten Transportrichtungen nicht zu beobachten. Aufgrund dieser Ergebnisse ist die Beteiligung eines P-gp-vermittelten Effluxes unwahrscheinlich, so dass ein anderer Transportmechanismus, möglicherweise der MCT1, für den auswärts gerichteten Transport von Ibuprofen verantwortlich sein muss.

Der Einfluss eines pH-Gradienten (AP pH 6,0 / BL pH 7,4) und des entsprechenden inversen pH-Gradienten auf die Permeation von Ibuprofen wird untersucht, da die pH-Abhängigkeit des MCT1-vermittelten Transports bekannt ist. In beide Transportrichtungen ergibt sich für Ibuprofen bei pH 6,0 im Donor- und pH 7,4 im Akzeptorkompartiment ein bis zu 2,5-facher Anstieg der P_{app} -Werte. In entgegengesetzter Richtung, d. h. von Seiten des höheren pH-Werts, ist die Permeation auf ein Minimum reduziert. Aufgrund der Tatsache, dass bei Propranolol ein annähernd identischer Effekt bei allerdings umgekehrten pH-Verhältnissen auftritt, wird deutlich, dass die pH-Abhängigkeit bei beiden Arzneistoffen in erster Linie auf die pH-Verteilungstheorie und in Verbindung damit auf die pK_a -Werte beider Substanzen zurückzuführen ist. Dieser Zusammenhang wird durch die experimentelle Ermittlung der Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten beider Arzneistoffe und das Verteilungsverhalten von Ibuprofen im Kochkolben bei entsprechenden pH-Verhältnissen bestätigt. Im Umkehrschluss bedeutet dieses Ergebnis jedoch nicht, dass nicht trotzdem ein pH- bzw. Protonen-abhängiger Mechanismus am Transport von Ibuprofen beteiligt sein kann. Dieser ist jedoch aufgrund der schwach sauren Eigenschaften von Ibuprofen und dessen entsprechender pH-abhängiger Verteilung in diesem Experiment nicht zu erkennen.

Die Beurteilungsgrundlage für einen möglichen Transport von Ibuprofen über MCT1 soll der Einsatz von Benzoesäure, einem bekannten Substrat dieses Carriers, schaffen. Hierzu wird die Permeation von Ibuprofen (4 mM) in Gegenwart von sechs verschiedenen Benzoesäure-Konzentrationen von 0,1 - 100 mM untersucht. In beide Permeationsrichtungen wird die konzentrationsabhängige Hemmung des Transports von Ibuprofen durch Benzoesäure gezeigt, wobei dieser Effekt ab etwa äquimolarer Konzentration eintritt. Die EC_{50} -Werte werden mit Hilfe einer mathematischen Anpassung nach der Methode des „One site competition“-Fittings zu 12,3 mM (AP-BL) bzw. 14,0 mM (BL-AP) Benzoesäure berechnet. In einem nachfolgenden Experiment gelingt es weiterhin zu zeigen, dass der durch den pH-Gradienten (pH 6,0 / 7,4) um ein vielfaches gesteigerte Permeationskoeffizient von Ibuprofen (4 mM) in Anwesenheit von Benzoesäure (ebenfalls 4 mM) signifikant reduziert wird. Auf Basis dieser Ergebnisse wird von einer Beteiligung des MCT1 am Transport von Ibuprofen ausgegangen. Einen Beweis für diesen Sachverhalt soll die Untersuchung des Einflusses des kompetitiven MCT1-Inhibitors α -Cyano-4-hydroxycinnamat (CHC) auf den Transport von Ibuprofen liefern. Jedoch zeigt die Anwesenheit von CHC (5 mM) in diesen Permeationsstudien keinen Effekt auf die P_{app} -Werte von Ibuprofen, weder in Absorptions- noch in Sekretionsrichtung. Um diese Ergebnisse besser beurteilen zu können, wird die Funktionstüchtigkeit des eingesetzten CHC in einem entsprechenden Experiment mit Benzoesäure überprüft. Die Permeationskoeffizienten von Benzoesäure (4 mM und 2 mM) werden bestimmt und mit denen unter Einfluss von CHC (5 mM) verglichen. Überraschenderweise ist jedoch auch bei Benzoesäure unabhängig von der Permeationsrichtung und der eingesetzten Konzentration kein Einfluss durch CHC auszumachen. Da speziell im Fall von Benzoesäure der H^+ -abhängige, Carrier-vermittelte Transport über MCT1 mehrfach demonstriert wurde, kann kaum eine Erklärung für die gefundenen Resultate unter CHC-Einfluss gefunden werden. Nahe liegend wäre die biologische Inaktivität der eingesetzten Charge CHC. Eine andere Erklärung für das Versagen des CHC-Hemmeffekts ist möglicherweise die Überlagerung des Carrier-vermittelten Anteils durch die passive Permeation. Wie die Ergebnisse der Immunfluoreszenz-Untersuchungen zeigen, wird der MCT1 ausschließlich auf der apikalen Zellseite exprimiert, wobei dieser, je nach Umgebungsbedingungen, in beide Transportrichtungen funktioniert. Die Passage des Arzneistoffs durch die basolaterale Membran kann daher nur passiv transzellulär oder durch die dortige Beteiligung eines weiteren Transporters geschehen. Es ist

daher denkbar, dass die passive Permeation, die dann auch auf der apikalen Seite möglich sein muss, den aktiven Anteil überwiegt und dessen Hemmung daher nicht erkannt werden kann.

Schlussfolgerungen

Die Lokalisation des MCT1-Proteins im Bereich des Bürstensaums und in der lateralen Plasmamembran der apikalen Zellseite wird durch eine erfolgreich etablierte immunchemische Methode mit anschließender fluoreszenzmikroskopischer Visualisierung gezeigt. Dabei stellen zwei Primärantikörper, von denen einer bis dahin noch nicht in der Immunfluoreszenz verwendet wurde, ihre Nützlichkeit in dieser Anwendung unter Beweis. Die gewonnenen Erkenntnisse dienen der Interpretation der pharmakokinetischen Daten von Ibuprofen. Es wird gezeigt, dass die Permeationsscharakteristik von Ibuprofen durch eine passive Komponente, die einen großen Anteil an der Gesamtpermeation ausmacht, gekennzeichnet ist. Von der Beteiligung aktiver Mechanismen am Transport in beide Richtungen ist zusätzlich auszugehen, wobei der Efflux nicht durch P-gp gesteuert wird. Die kompetitive Hemmung des Ibuprofen-Transports durch das MCT1-Substrat Benzoesäure liefert einen starken Hinweis auf die Beteiligung des MCT1. Aufgrund der Protonen-abhängigen Steigerbarkeit der Ibuprofen-Permeation und der Möglichkeit, diese wiederum durch Benzoesäure zu hemmen, wird von einer Beteiligung des MCT1 am Transport von Ibuprofen ausgegangen. Die Caco-2/TC7 Zellen haben sich in der vorliegenden Arbeit zum wiederholten Male als wertvolles *in vitro* Modell in der Aufklärung des intestinalen Arzneistofftransports und bei der funktionellen Beschreibung der hierbei beteiligten Mechanismen erwiesen.

6 LITERATURVERZEICHNIS

Alberts, B.; Bray, D.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. und Walter, P.
„Lehrbuch der molekularen Zellbiologie“
3. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim (2005)

Amidon, G. L.; Lennernäs, H.; Shah, V. P. und Crison, J. R.
“A theoretical basis for a biopharmaceutics drug classification: the correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability”
Pharm. Res., **12**, 413-420 (1995)

Anderle, P.; Huang, Y. und Sadée, W.
“Intestinal membrane transport of drugs and nutrients: genomics of membrane transporters using expression microarrays”
Eur. J. Pharm. Sci., **21**, 17-24 (2004)

Artursson, P.
“Epithelial transport of drugs in culture. I: a model for studying the passive diffusion of drugs over intestinal absorptive (Caco-2) cells”
J. Pharm. Sci., **79** (6), 476-482 (1990)

Artursson, P.
“Cell cultures as models for drug absorption across the intestinal mucosa”
Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst., **8**, 305-330 (1991)

Artursson, P.; Karlsson, J.; Ocklind, G. und Schipper, N.
“Studying transport processes in absorptive epithelia”
Epithelial Cell Culture, Oxford, UK, 111-133 (1996)

Artursson, P.; Palm, K. und Luthman, K.
“Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport”
Adv. Drug Deliv. Rev., **46**, 27-43 (2001)

Awadallah, B.
“Stereospezifität des aktiven Arzneistofftransports: Modelluntersuchungen an Caco-2/TC-7-Zellen und quantitative Enantiomerenbestimmung mittels Kapillarelektrophorese“
Dissertation, Eberhard-Karls-Universität, Tübingen (2003)

Borchardt, R. T.

“The application of cell culture systems in drug discovery and development”

J. Drug Target., **3**, 1779-182 (1995)

Balimane, P. V.; Patel, K.; Marion, A. und Chong, S.

“Utility of 96 well Caco-2 cell system for increased throughput of P-gp screening in drug discovery”

Eur. J. Pharm. Biopharm., **58**, 99-105 (2004)

Boenisch, T.

„Färbemethoden – Detektionssysteme“ in „Handbuch Immunchemische Färbemethoden“

3. Auflage, Dako Deutschland GmbH, Hamburg, 34-42 (2006)

Briske-Anderson, M. J.; Finley, J. W. und Newman, S. M.

„The influence of culture time and passage number on the morphological and physiological development of Caco-2 cells“

Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **214** (3), 248-257 (1997)

Buyse, M.; Sitaraman, S. V.; Liu, X.; Bado, A. und Merlin, D.

“Luminal leptin enhances CD147/MCT-1-mediated uptake of butyrate in the human intestinal cell line Caco2-BBE”

J. Biol. Chem., **277** (31), 28182-28190 (2002)

Caro, I.; Boulenc, X.; Rousset, M.; Meunier, V.; Bourrié, M.; Julian, B.; Joyeux, H.; Roques, C.; Berger, Y.; Zweibaum, A. und Fabre, G.

“Characterisation of a newly isolated Caco-2 clone (TC-7), as a model of transport processes and biotransformation of drugs”

Int. J. Pharm., **116**, 147-158 (1995)

Carrière, V.; Lesuffleur, T.; Barbat, A.; Rousset, M.; Dussaulx, E.; Costet, P.; de Wazières, I.; Beaune, P. und Zweibaum, A.

“Expression of cytochrome *P*-450 3A in HT29-MTX cells and Caco-2 clone TC7”

FEBS Letters, **355**, 247-250 (1994)

Chantret, I.; Rodolosse, A.; Barbat, A.; Dussaux, E.; Brot-Laroche, E.; Zweibaum, A. und Rousset, M.

„Differential expression of sucrase-isomaltase in clones isolated from early and late passages of the cell line Caco-2: evidence for glucose-dependent negative regulation”

J. Cell. Sci., **107**, 213-225 (1994)

Choi, J.-S.; Jin, M. J. und Han, H.-K.

“Role of monocarboxylic acid transporters in the cellular uptake of NSAIDs”

J. Pharm. Pharmacol., **57**, 1185-1189 (2005)

Cogburn, J. N.; Donovan, M. G. und Schasteen, C. S.

“A model of human small intestinal absorptive cells. 1. Transport barrier”

Pharm. Res., **8** (2), 210-216 (1991)

Cuff, M. A.; Lambert, D.W. und Shirazi-Beechey, S: P.

“Substrate-induced regulation of the human colonic monocarboxylate transporter, MCT1”

J.Physiol., **539** (2), 361-371 (2002)

Davies, N. M.

“Clinical pharmacokinetics of ibuprofen. The first 30 years”

Clin. Pharmacokinet., **34** (2), 104-154 (1998)

Deuticke, B.

„Monocarboxylate transport in erythrocytes“

J. Membrane Biol., **70**, 89-103 (1982)

Emoto, A.; Ushigome, F.; Koyabu, N.; Kajiya, H.; Okabe, K.; Satoh, S.; Tsukimori, K.; Nakano, H.; Ohtani, H. und Sawada, Y.

“H⁺-linked transport of salicylic acid, an NSAID, in the human trophoblast cell line BeWo”

Am. J. Physiol. Cell Physiol., **282**, C1064-C1075 (2002)

Enerson, B. E. und Drewes, L. R.

“Molecular features, regulation and function of monocarboxylate transporters: implications for drug delivery”

J. Pharm. Sci., **92** (8), 1531-1544 (2003)

Englund, G; Rorsman, F.; Rönnblom, A.; Karlbom, U.; Lazarova, L.; Grasjö, J.; Kindmark, A. und Artursson, P.

“Regional levels of drug transporters along the human intestinal tract: co-expression of ABC and SLC transporters and comparison with Caco-2 cells”

Eur. J. Pharm. Sci., **29**, 269-277 (2006)

Farmilo, A. J. und Stead, R. S., überarbeitet durch Atwood, K. N.

„Fixierung“ in „Handbuch Immunchemische Färbemethoden“

3. Auflage, Dako Deutschland GmbH, Hamburg, 23-29 (2006)

Fogh, J.; Fogh, M. und Orfeo, T.

„One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice“

J. Natl. Cancer Inst., **59**, 221-226 (1997)

Garcia, C. K.; Brown, M. S.; Pathak, R. K. und Goldstein, J.L.

“cDNA cloning of MCT2, a second monocarboxylate transporter expressed in different cells than MCT1”

J. Biol. Chem., **270** (4), 1843-1849 (1995)

Gill, R. K.; Saksena, S.; Alrefai, W. A.; Sarwar, Z.; Goldstein, J. L.; Carroll, R. E.; Ramaswamy, K. und Dudej, P. K.

“Expression and membrane localisation of MCT isoforms along the length of the human intestine”

Am. J. Physiol. Cell Physiol., **289**, C846-C852 (2005)

Grès, M.-C.; Julian, B.; Bourrié, M.; Meunier, V.; Roques, C.; Berger, M.; Boulenc, X.; Berger, Y. und Fabre, G.

“Correlation between oral drug absorption in humans, and apparent drug permeability in TC-7 cells, a human epithelial intestinal cell line: comparison with the parental Caco-2 cell line”

Pharm. Res., **15** (5), 726-733 (1998)

FDA Guidance for Industry

“Waiver of *in vivo* bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system”

CDER/FDA (2000)

www.fda.gov/cder/guidance/3618fnl.htm

Halestrap, A. P. und Meredith, D.

“The SLC16 gene family – from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond”

Eur. J. Physiol., **447**, 619-628 (2004)

Halestrap A. P. und Price, N. T.

“The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation”

Biochem. J., **343**, 281-299 (1999)

Harig, J. M.; Ng, E. K.; Dudeja, P. K.; Brasitus, T. A.; und Ramaswamy, K.

“Transport of *n*-butyrate into human colonic luminal membrane vesicles”

Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol., **271**, G415-G422 (1996)

Haughton, E.; Clifford, M. N. und Sharp, P.

“Monocarboxylate transporter expression is associated with the absorption of benzoic acid in human intestinal cells”

J. Sci. Food Agric., **87**, 239-244 (2007)

Hidalgo, I. J.; Raub, T. J.; und Borchardt, R. T.

„Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for the intestinal epithelial permeability“

Gastroenterology, **96**, 736-749 (1989)

Hilgers, A. R.; Conradi, A. R. und Burton, P.S.

„Caco-2 cell monolayers as a model for drug transport across the intestinal mucosa“

Pharm. Res., **7**, 902-910 (1990)

Hillgren, K. M.; Kato, A. und Borchardt, R. T.

„*In vitro* systems for studying intestinal drug absorption“

Med. Res. Rev., **15**, 83-109 (1995)

ICH-Q2A

“Guideline for Industry: Text on Validation of Analytical Procedures”

www.fda.gov/cder/guidance/index.htm (1995)

ICH-Q2B

“Guidance for Industry: Validation of Analytical Procedures: Methodology”

www.fda.gov/cder/guidance/index.htm (1996)

Itagaki, S.; Gopal, E.; Zhuang, L.; Fei, y.-J.; Miyauchi, S.; Prasad, P. D. und Ganapathy, V.

“Interaction of ibuprofen and other structurally related NSAIDs with the sodium-coupled monocarboxylate transporter SMCT1(SLC5A8)”

Pharm. Res., **23** (6), 1209-1216 (2006)

Ingels, F. M. und Augustijns, P. F.

“Biological, pharmaceutical, and analytical considerations with respect to the transport media used in the absorption screening system, Caco-2”

J. Pharm. Sci., **92** (8), 1545-1558 (2003)

Kido, Y.; Tamai, I.; Okamoto, M.; Suzuki, F. und Tsuji, A.

“Functional clarification of MCT1-mediated transport of monocarboxylic acids at the blood-brain barrier using *in vitro* cultured cells and *in vivo* BUI studies”

Pharmaceutical Research, **17** (1), 55-62 (2000)

Konishi, Y.

„Transepithelial transport of microbial metabolites of quercetin in intestinal Caco-2 cell monolayers”

J Agric Food Chem., **53** (3), 601-607 (2004)

Korjamo, T.; Honkakoski, P.; Toppinen, M.-R.; Niva, S.; Reinisalo, M.; Palmgrén, J. J. und Mönkkönen, J.

“Absorption properties and P-glycoprotein activity of modified Caco-2 cell lines”

Eur. J. Pharm. Sci., **26**, 266-279 (2005)

Laitinen, L.; Kangas, H.; Kaukonen, A. M.; Hakala, K.; Kotiaho, T.; Kostainen, R. und Hirvonen, J.

“N-in-one permeability studies of heterogeneous sets of compounds across Caco-2 cell monolayers”

Pharm. Res., **20** (2), 187-197 (2003)

Lambert, D. W.; Wood, I. S.; Ellis, A. und Shirazi-Beechey, S. P.

“Molecular changes in the expression of human colonic nutrient transporters during the transition from normality to malignancy”

Int. J. Cancer, **86**, 1262-1269 (2002)

Lee, K. J.; Johnson, N.; Castelo, J.; Sinko, P. J.; Grass, G.; Holme, K. und Lee, Y.-H.
“Effect of experimental pH on the in vitro permeability in intact rabbit intestines and Caco-2 monolayer”

Eur. J. Pharm. Sci., **25**, 193-200 (2005)

Le Ferrec, E.; Chesne, C.; Artursson, P.; Brayden, D.; Fabre, G.; Gires, P.; Guillou, F.; Rousset, M.; Rubas, W. und Scarino, M.-L.

“*In vitro* models of the intestinal barrier”

ATLA, **29**, 649-668 (2001)

Legen, I. und Kristl, A.

„pH and energy dependent transport of ketoprofen across rat jejunum in vitro”

Eur. J. Pharm. Biopharm., **56**, 87-94 (2003)

Legen, I.; Žakelj, S. und Kristl, A.

„Polarised transport of monocarboxylic acid type drugs across rat jejunum in vitro: the effect of mucolysis and ATP-depletion”

Int. J. Pharm., **256**, 161-166 (2003)

Lipinski, C. A.

„Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability”

J. Pharmacol. Toxicol. Methods, **44** (1), 235-249 (2000)

Loo, T. W.; Bartlett, C. und Clarke, D. M.

“The drug-binding pocket of the human multidrug resistance P-glycoprotein is accessible to the aqueous medium”

Biochemistry, **43**, 12081-12089 (2004)

Martin, H.-J.

“Charakterisierung von schwerlöslichen Arzneistoff-Nanopartikeln hergestellt durch das RESS-Verfahren zu Verbesserung der Bioverfügbarkeit”

Dissertation, Eberhard-Karls-Universität, Tübingen (2003)

Molecular Probes

“Phallotoxins”

Manual and Product insert, MP 00354, **04.01.2006**

- Neuhoff, S.; Ungell, A. L.; Zamora, I. und Artursson, P.
"pH-Dependent passive and active transport of acidic drugs across Caco-2 cell monolayers"
Eur. J. Pharm. Sci., **25**, 211-220 (2005)
- Ogihara, T.; Tamai, I.; Takanaga, H.; Sai, Y. und Tsuji; A.
"Stereoselective and carrier-mediated transport of monocarboxylic acids across Caco-2 cells"
Pharm. Res., **13**, 1828-1832 (1996)
- Palmgrén, J. J.; Mönkkönen, J.; Jukkola, E.; Niva, S. und Auriola, S.
"Characterization of Caco-2 cell monolayer drug transport properties by cassette dosing using UV/fluorescence HPLC"
Eur. J. Pharm. Biopharm., **57**, 319-328 (2004)
- Peterson, M. D. und Mooseker M. S.
"Characterization of the enterocyte-like brush border cytoskeleton of the C2_{BBE} clones of the human intestinal cell line, Caco-2"
J. Cell Sci., **102**, 581-600 (1992)
- Poole, R. C. und Halestrap, A.P.
"Transport of lactate and other monocarboxylates across mammalian plasma membranes"
Am. J. Physiol. Cell Physiol., **264**, C761-C782 (1993)
- Potthast, H.; Dressman, J. B.; Junginger, H. E.; Midha, K. K.; Oeser, H.; Shah, V. P.; Vogelpoel, H. und Barends, D. M.
"Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: ibuprofen"
J Pharm Sci., **94** (10), 2121-2131 (2005)
- Raeissi, S. D.; Guo, Z.; Dobson, G. L.; Artursson, P. und Hidalgo, I.J.
"Comparison of CYP3A activities in an subclone of Caco-2 cells (TC7) and human intestine"
Pharm. Res., **14** (8), 1019-1025 (1997)
- Raeissi, S.D.; Hidalgo, I.J.; Segura-Aguilar, J und Artursson, P.
„Interplay between CYP3A4-mediated metabolism and polarized efflux of terfenadine and its metabolites in intestinal epithelial Caco-2 (TC7) cell monolayers"
Pharm. Res., **16** (5), 625-632 (1999)

Rasenack, N. und Müller, B. W.

„Poorly water-soluble drugs for oral delivery – a challenge for pharmaceutical development“

Pharm. Ind., **67** (3), 323-326 (2005)

Ritzhaupt, A.; Wood, I. S.; Ellis, A.; Hosie, K. B. und Shirazi-Beechey, S. P.

“Identification and characterization of a monocarboxylate transporter (MCT1) in pig and human colon: its potential to transport L-lactate as well as butyrate”

J. Physiol., **513** (3), 719-732 (1998 a)

Ritzhaupt, A.; Ellis, A.; Hosie, K. B. und Shirazi-Beechey, S. P.

“The characterization of butyrate transport across pig and human colonic luminal membrane”

J. Physiol., **507** (3), 819-830 (1998 b)

Shore, P.A.; Brodie, B.B.; Hogben, C.A.M.

“The gastric secretion of drugs: a pH partition hypothesis.”

J. Pharmacol. Exp. Ther., **119**, 361-369 (1957)

Steffansen, B; Nielsen, C. U.; Brodin, B.; Eriksson, A. H.; Andersen, R. und Frokjaer, S.

„Intestinal solute carriers: an overview of trends and strategies for improving oral drug absorption“

Eur. J. Pharm. Sci., **21**, 3-16 (2004)

Takagi, M.; Taki, Y.; Sakane, T.; Nadai, T.; Sezaki, H.; Oku, N. und Yamashita, S.

“A new interpretation of salicylic acid transport across the lipid bilayer: implications of pH-dependent but not carrier-mediated absorption from the gastrointestinal tract”

J. Pharmacol. Exp. Ther., **285** (3), 1175-1180 (1998)

Takanaga, H.; Tamai, I. und Tsuji, A.

“pH-Dependent and carrier-mediated transport of salicylic acid across Caco-2 cells”

J. Pharm. Pharmacol., **46**, 567-570 (1994)

Tamai, I.; Takanaga, H.; Maeda, H.; Sai, Y.; Ogihara, T.; Higashida, H. und Tsuji, A.

“Participation of a proton-cotransporter, MCT1, in the intestinal transport of monocarboxylic acids”

Biopharm. Biophys. Res. Commun., **214** (2), 482-489 (1995)

Tamai, I.; Sai, A.; Ono, A.; Kido, Y.; Yabuuchi, H.; Takanaga, H.; Satoh, E.; Ogihara, T.; Amano, O.; Izeki, S. und Tsuji; A.

“Immunohistochemical and functional characterization of pH-dependent intestinal absorption of weak organic acids by the monocarboxylic acid transporter MCT1”

J. Pharm. Pharmacol., **51**, 1113-1121 (1999)

Tavelin, S.; Grasjö, J.; Taipalensuu, J.; Ocklind, G. und Artursson, P.

“Applications of epithelial cell culture in studies of drug transport” in “Epithelial cell culture protocols”

Methods in molecular biology, **188**, Claire Wise, Humana Press, Totowa, NJ (2002)

Thews, G. und Vaupel, P.

„Vegetative Physiologie“

5. Auflage, Springer, Heidelberg (2005)

Tsuji, A.; Takanaga, H.; Tamai, I. und Terasaki, T.

“Transcellular transport of benzoic acid across Caco-2 cells by a pH-dependent and carrier-mediated transport mechanism”

Pharm. Res., **11**, 30-37 (1994)

Tsuji, A. und Tamai, I.

“Carrier-mediated intestinal transport of drugs”

Pharm. Res., **13** (7), 963-977 (1996)

Wilson, G.; Hassam, J. F.; Dix, C. J.; Williamson, I.; Shah, R.; Mackay, M. und Artursson, P.

“Transport and permeability properties of human Caco-2 cells; an *in vitro* model of the intestinal epithelial cell barrier”

J. Cont. Rel., **11**, 25-40 (1990)

7 ANHANG

7.1 IMMUNCHEMISCHES FÄRBEPROTOKOLL

Fixierung

- Zellen kurz mit PBS (37 °C) waschen
- Inkubation für 10 min in vorgekühltem Methanol (-20 °C) bei 4 °C
oder
- Inkubation für 10 min in 4 % PFA bei RT
- 2 x 5 min in PBS waschen (RT)

Immunfluoreszenz

- Präinkubation mit 500 µl 10 % Eselnormalserum in Antikörper-Verdünnungs-
lösung für 30 min
- Nicht spülen; Deckglas aus dem Well nehmen und abtupfen

Die Inkubation mit Primärantikörper wird in der Feuchtekammer (Abbildung 4-9) durchgeführt:

- Inkubation mit 150 µl Primärantikörper (1:50 in Antikörper-Verdünnungslösung) auf dem Orbitalschüttler (4 Stunden bei RT)
- 3 x 5 min in PBS waschen
- mit 450 µl Sekundärantikörper (1:1000 in Antikörper-Verdünnungslösung) in der 6 Well-Platte für 1 Stunde inkubieren (dunkel)
 - ➔ **donkey anti goat IgG-Alexa 555** für MCT1 Primär-Antikörper von Santa Cruz
 - ➔ **donkey anti rabbit IgG-Alexa 555** für MCT1 Primär-Antikörper von Acris/QED
- 3 x 5 min in PBS waschen
- Zur Kernfärbung mit 500 µl DAPI (1 µg/ml) für 1 min inkubieren (dunkel)
- 2 x 5 min in PBS waschen
- Zur F-Actin-Färbung mit 205 µl Phallotoxin für 1 min inkubieren (dunkel)
- 2 x 5 min in PBS waschen
- 5 min mit 4 % PFA nachfixieren
- 3 x 5 min waschen

- in Glycergel-DABCO eindecken
- bei 4 °C dunkel lagern

Sämtliche im Färbeprotokoll aufgeführten Lösungen finden sich in Tabelle 4-4.

7.2 HPLC-UV ANALYTIK VON IBUPROFEN, METHODEN A UND B

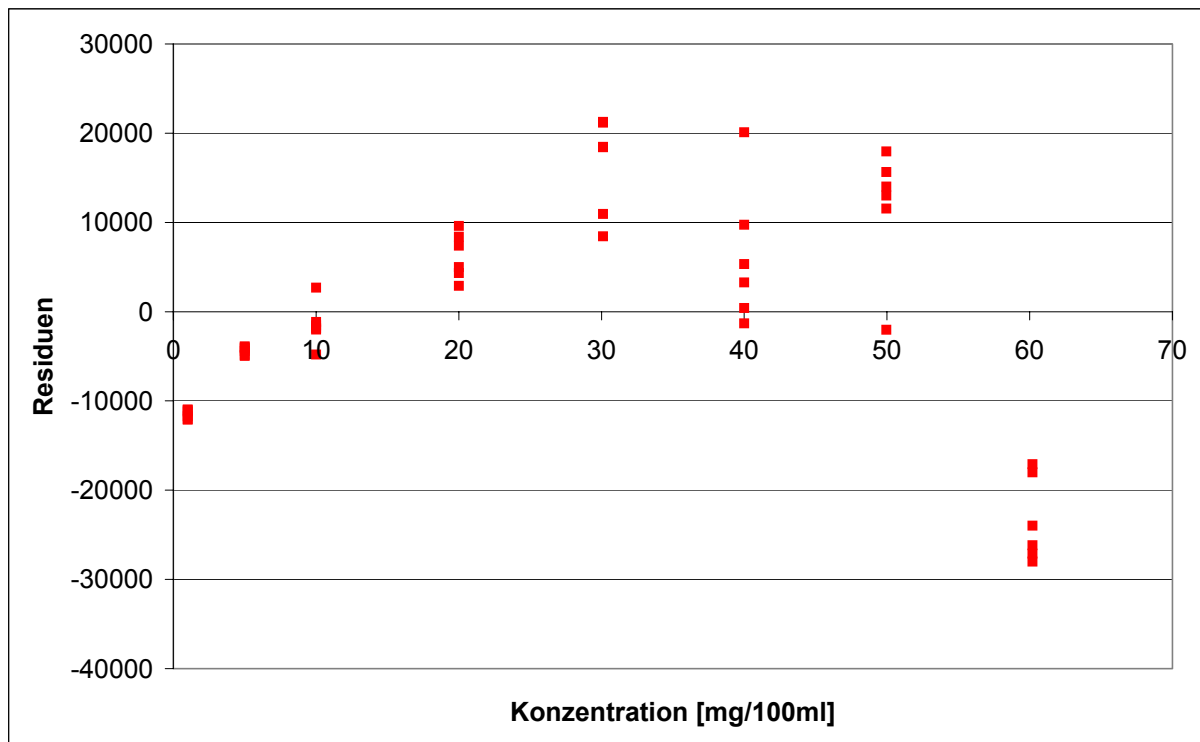


Abbildung 7-1 Residuenplot für Ibuprofen Messbereich A (1,00 - 60,20 mg/100 ml)

Tabelle 7-1 Richtigkeit für Ibuprofen Messbereich A (1,00 - 60,20 mg/100 ml)

Soll [mg/100 ml]	55,05	30,02	10,11
Ist [mg/100 ml]	55,27	29,85	9,99
	55,15	29,88	10,17
	55,13	29,95	10,12
Mittelwert [mg/100 ml]	55,19	29,89	10,09
SD [mg/100 ml]	0,08	0,05	0,10
relative SD [%]	0,14	0,16	0,95
Wiederfindung [%]	100,25	99,58	99,83
mittlere Wiederfindung [%]		99,88	
mittlere relative SD [%]		0,42	

Tabelle 7-2 Systempräzision für Ibuprofen Messbereich A
(1,00 - 60,20 mg/100 ml)

Soll-Konzentration [mg/100 ml]	Ist-Konzentration [mg/100 ml]
30,02	29,85
	29,88
	29,95
	29,75
	30,05
	29,94
	Mittelwert
SD	0,10
relative SD	0,34 %

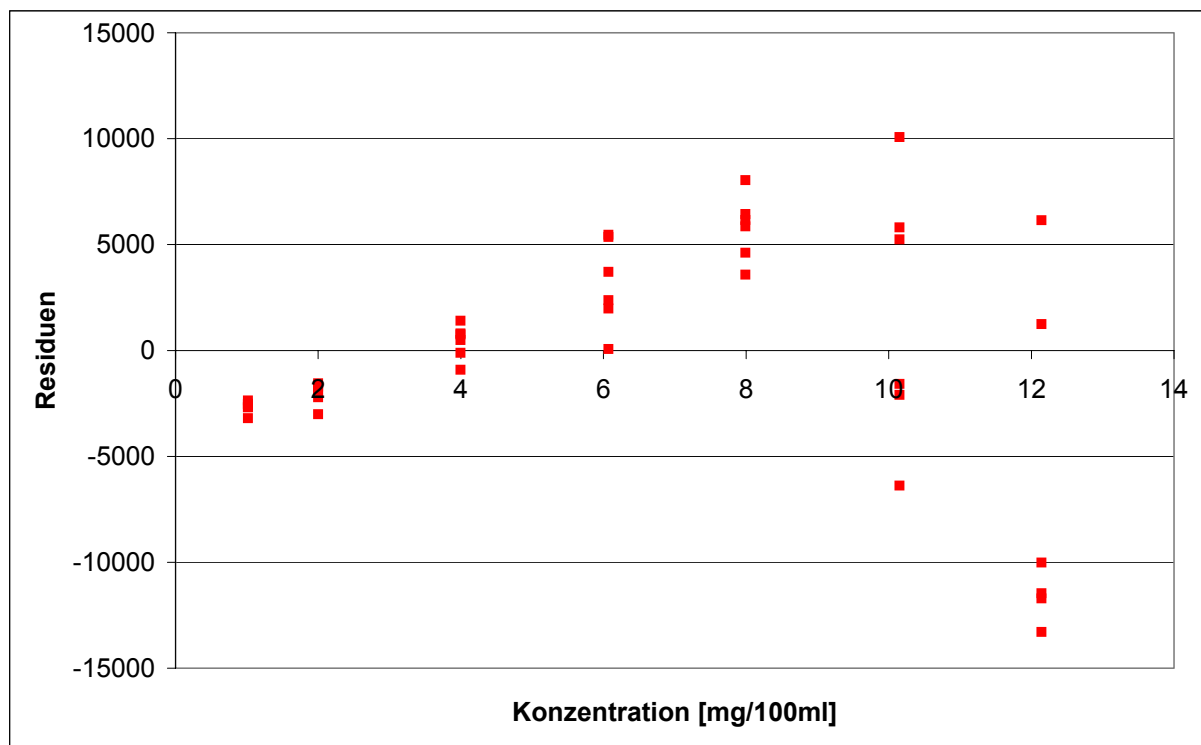


Abbildung 7-2 Residuenplot Ibuprofen Messbereich B (1,02 - 12,14 mg/100 ml)

Tabelle 7-3 *Richtigkeit für Ibuprofen Messbereich B (1,02 - 12,14 mg/100 ml)*

Soll [mg/100 ml]	10,30	6,02	2,06
Ist [mg/100 ml]	10,27	5,79	2,10
	10,22	5,94	2,07
	10,37	5,99	2,10
Mittelwert [mg/100 ml]	10,29	5,91	2,09
SD [mg/100 ml]	0,08	0,10	0,02
relative SD [%]	0,78	1,75	0,74
Wiederfindung [%]	99,86	98,08	101,49
mittlere Wiederfindung [%]		99,81	
mittlere relative SD [%]		1,09	

Tabelle 7-4 *Systempräzision für Ibuprofen Messbereich B
(1,02 - 12,14 mg/100 ml)*

Soll-Konzentration [mg/100 ml]	Ist-Konzentration [mg/100 ml]
6,02	5,79
	5,94
	5,99
	5,97
	6,05
	6,01
Mittelwert	5,96
SD	0,09
relative SD	1,51 %

7.3 HPLC-UV ANALYTIK VON BENZOESÄURE

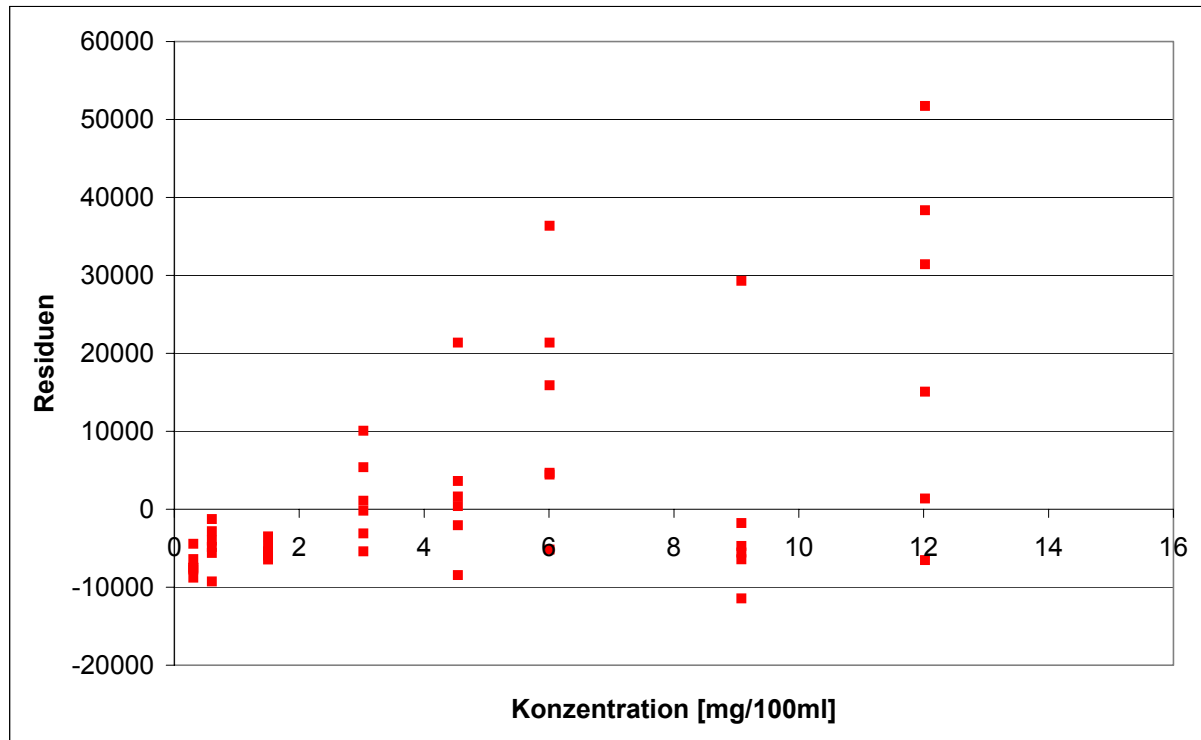


Abbildung 7-3 Residuenplot für Benzooesäure

Tabelle 7-5 Richtigkeit für Benzooesäure

Soll [mg/100 ml]	12,23	6,120	2,450
Ist [mg/100 ml]	12,21	6,24	2,44
	12,23	6,23	2,52
	12,07	6,27	2,49
Mittelwert [mg/100 ml]	12,17	6,25	2,48
SD [mg/100 ml]	0,09	0,02	0,04
relative SD [%]	0,70	0,30	1,45
Wiederfindung [%]	99,53	102,06	103,00
mittlere Wiederfindung [%]		100,96	
mittlere relative SD [%]		0,82	

Tabelle 7-6 Systempräzision für Benzoesäure

Soll-Konzentration [mg/100 ml]	Ist-Konzentration [mg/100 ml]
6,12	6,20
	6,22
	6,19
	6,15
	6,05
	6,18
	Mittelwert
SD	0,06
relative SD	0,98 %

7.4 UV-ANALYTIK VON PROPRANOLOL

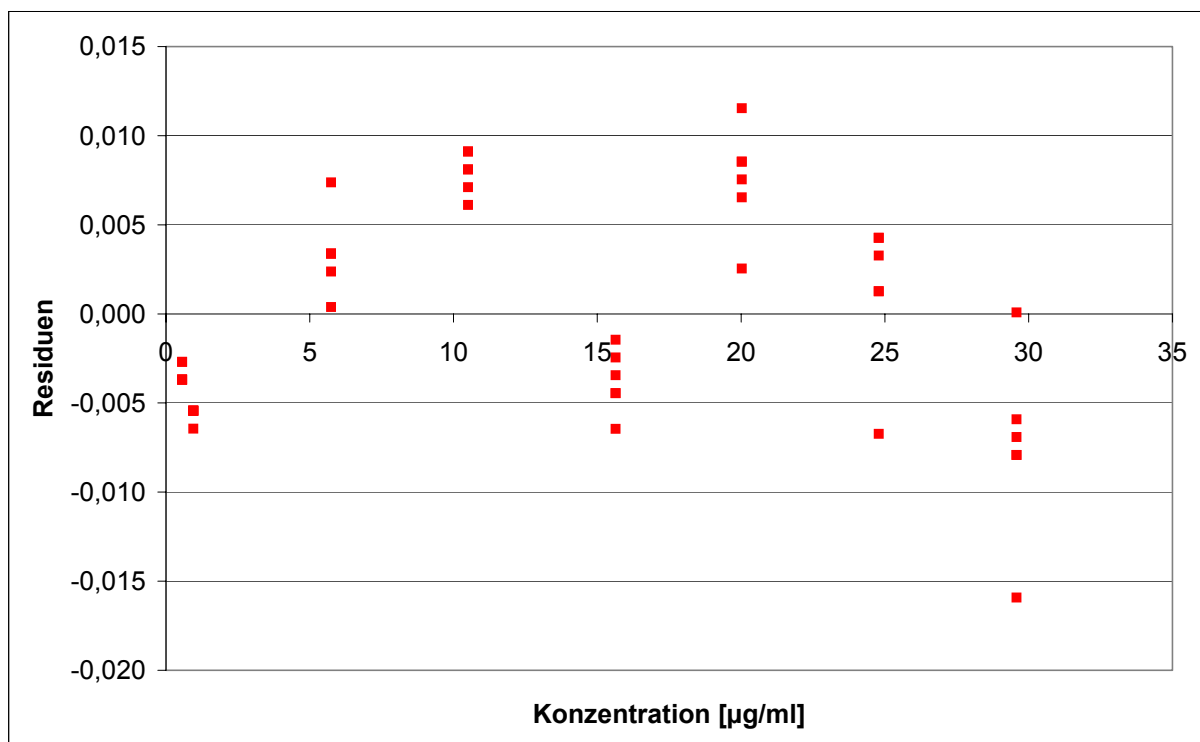


Abbildung 7-4 Residuenplot für Propranolol

Tabelle 7-7 Richtigkeit für Propranolol

Soll [mg/100 ml]	24,04	12,97	3,99
Ist [mg/100 ml]	23,57	13,29	4,08
	23,64	13,10	3,89
	23,60	13,03	3,98
Mittelwert [mg/100 ml]	23,60	13,10	3,98
SD [mg/100 ml]	0,03	0,13	0,10
relative SD [%]	0,14	1,01	2,39
Wiederfindung [%]	98,18	101,31	99,88
mittlere Wiederfindung [%]		99,79	
mittlere relative SD [%]		1,18	

Tabelle 7-8 Systempräzision für Propranolol

Soll-Konzentration [$\mu\text{g/ml}$]	Ist-Konzentration [$\mu\text{g/ml}$]
12,99	13,35
	13,13
	13,13
	13,10
	13,10
	13,10
Mittelwert	13,15
SD	0,10
relative SD	0,76 %

7.5 UV-SPEKTREN UND STRUKTURFORMELN

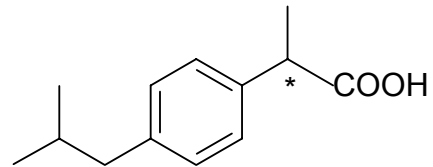
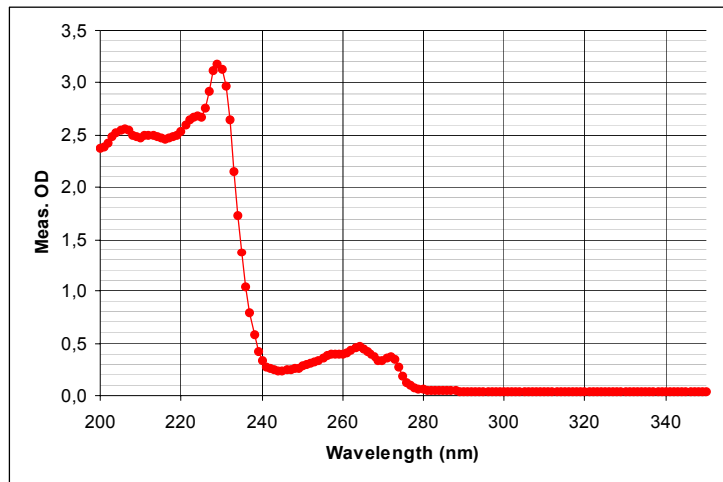


Abbildung 7-5 Spektrum und Struktur von Ibuprofen

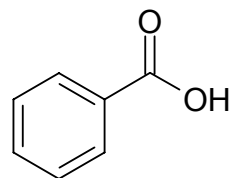
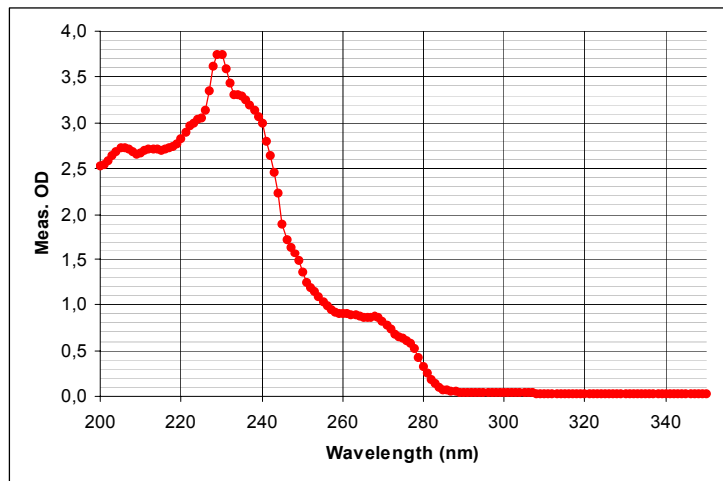


Abbildung 7-6 Spektrum und Struktur von Benzoesäure

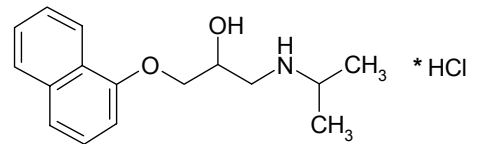
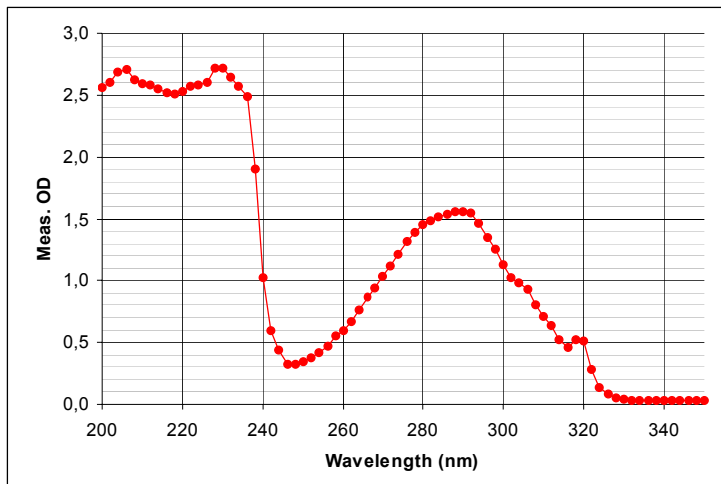


Abbildung 7-7 Spektrum und Struktur von Propranolol HCl

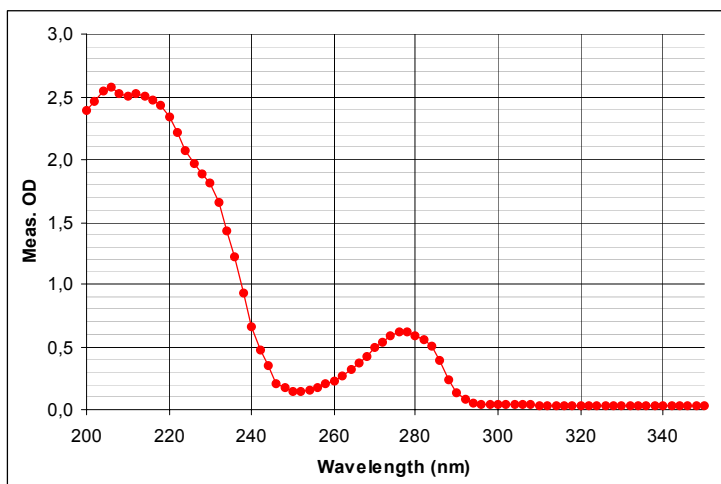


Abbildung 7-8 Spektrum von Verapamil

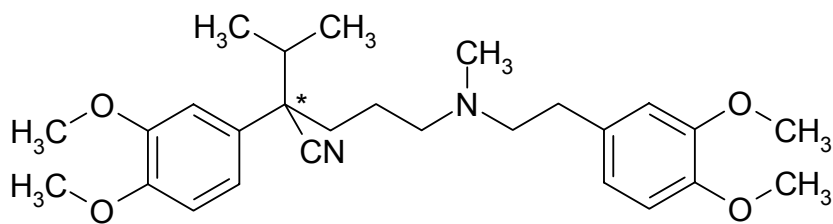


Abbildung 7-9 Struktur von Verapamil

7.6 FIRMENVERZEICHNIS

Acris Antibodies GmbH, Im Himmelreich 11, D-32120 Hiddenhausen

Adobe Systems GmbH, Georg-Brauchle-Ring 58, D-80992 München

Bandelin GmbH & Co. KG, Heinrichstraße 3-4, D-12207 Berlin

Barloworld Scientific, Beacon Road, Stone, Staffordshire, ST15 0SA, UK

BioTek Instruments GmbH, Kocherwaldstr. 34, D-74177 Bad Friedrichshall

Büchi Labortechnik GmbH, Am Porscheplatz 5, D-45127 Essen

Carl Roth GmbH & Co. KG, Schoemperlenstr. 1-5, D-76185 Karlsruhe

Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Königsallee 9-21, D-37081 Göttingen

Corel Corp., Edisonstraße 6, D-85716 Unterschleißheim

Corning B.V., Koolhovenlaan 12, 1119 NE Schiphol-Rijk, NL

Dako Deutschland GmbH, Hamburger Str. 181, D-22083 Hamburg

Dianova GmbH, Mittelweg 176, D-20148 Hamburg

Eppendorf GmbH; Peter-Henlein-Str. 2, D-50389 Wesseling-Berzdorf

Fluka (siehe Sigma-Aldrich Chemie GmbH)

GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Schulze-Delitzsch-Straße 4,
D-30938 Burgwedel

GraphPad Software, Inc., 11452 El Camino Real, #215, San Diego, CA 92130 USA

Greiner Bio-One GmbH, Maybachstraße 2, D-72636 Frickenhausen

Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Walpersdorfer Str. 12, D-91126 Schwabach

Heraeus / Kendro (siehe Thermo Electron Corp. (Kendro))

Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Hauptstr.7-15, D-74246 Eberstadt

IKA Werke GmbH & Co. KG, Janke und Kunkel Straße 10, D-79217 Staufen

Invitrogen GmbH, Emmy-Noether Strasse 10, D-76131 Karlsruhe

Janke & Kunkel GmbH & Co. KG - IKA Labortechnik (siehe IKA)

Knauer GmbH, Hegauer Weg 38, 14163 Berlin

Knoll Pharmaceuticals, Main Road, Beeston, Nottingham NG9 1AD, England

Liebherr GmbH, Memminger Straße 77, D-88411 Ochsenhausen

Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Neumann-Neander-Str. 6-8, D-52355 Düren

Mallinckrodt Baker B.V., Teugseweg 20, P.O. Box 1, 7400 AA Deventer, NL

MDL Information Systems GmbH, Theodor-Heuss-Allee 108, D-60486 Frankfurt

Menzel Gläser GmbH & Co. KG, Saarbrückener Straße 248, D-38116 Braunschweig

Merck KGaA, Frankfurter Str. 250, D-64293 Darmstadt

Mettler-Toledo GmbH, Ockerweg 3, D-35396 Gießen

Microsoft Deutschland GmbH, Konrad-Zuse-Straße 1, D-85716 Unterschleißheim

Millipore GmbH, Am Kronberger Hang 5, D-65824 Schwalbach

Molecular Probes (siehe Invitrogen GmbH)

Nunc GmbH, Hagenauer Str. 21A, D-65203 Wiesbaden

Packard Bell B.V., Nieuweweg 279, 6600 AH Wijchen, NL

Paesel + Lorei Pharma GmbH, Im Freihafen 8, D-47138 Duisburg

Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Am Wöllerspfad 4, D-97922 Lauda-Königshofen

Santa Cruz Biotechnology Inc., Bergheimer Str. 89-2, D-69115 Heidelberg

Sartorius AG, Weender Landstrasse 94-108, D-37075 Goettingen

Schott Instruments GmbH, Hattenbergstraße 10, D-55122 Mainz

Shimadzu GmbH, Albert-Hahn-Str. 6-10, D-47269 Duisburg

Siemens AG, Wittelsbacherplatz 2, D-80312 München

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Eschenstr. 5, D-82024 Taufkirchen

Thermo Electron Corp. (Kendro), Robert-Bosch-Straße 1, D-63505 Langenselbold

Wagner & Munz GmbH Deutschland, In der Rosenau 4, 81829 München

World Precision Instruments Inc., Liegnitzer Str. 15, D-10999 Berlin

WTB Binder Labortechnik GmbH, Postfach 102, 78502 Tuttlingen

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren:

Ammon, Döring, Drews, Gauglitz, Großmann, Häfelinger, Hanack, Heide, Ihringer, Kovar, Laufer, Lindner, Nagel, Pommer, Ruth, Safayhi, Schmidt, Schultz, Wahl, Wankmüller.

LEBENS LAUF

16.08.1978	Geboren in Reutlingen
1989 - 1998	Kepler-Gymnasium Tübingen Allgemeine Hochschulreife im Juni 1998
Oktober 1998 - September 2002	Studium der Pharmazie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
August 2001 - September 2001	Internship am University of Kentucky Chandler Medical Center in Lexington, Kentucky, USA
August 2000	1. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
September 2002	2. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
November 2002 - April 2003	Pharmaziepraktikum in der Bären Apotheke in Tübingen
Mai 2003 - Oktober 2003	Pharmaziepraktikum bei der Merck KGaA in Darmstadt
Dezember 2003	3. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung Approbation zur Apothekerin
seit Januar 2004	Wissenschaftliche Angestellte am Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen Beginn der Dissertation „Arzneistoffabsorption in Caco-2/TC7 Zellen: Ibuprofen und der Monocarboxylat-Transporter 1 (MCT1)“ unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. M. A. Wahl
seit Februar 2004	Teilnahme an der Weiterbildung zur Fachapothekerin für Arzneimittelinformation

