

Aus der Klinik für Anästhesie, Intensiv-, Notfall- und Schmerzmedizin
(Direktor Univ.- Prof. Dr. med. Klaus Hahnenkamp)
der Universitätsmedizin der Universität Greifswald

**Untersuchungen zum OATP- abhängigen Transport
der Opiode Fentanyl und Sufentanil
sowie die Generierung von stabil transfizierten Zelllinien mithilfe
des Flp-In™ Systems**

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung des akademischen

Grades

Doktor der Medizin
(Dr. med.)

der

Universitätsmedizin

der

Universität Greifswald

2023

vorgelegt von:

Corinna Lara Ellen Hofmann

geb. am: 21.04.1995

in: Hamburg

Wissenschaftlicher Vorstand / Dekan: Prof. Dr. med. Karlhans Endlich

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. Mladen V. Tzvetkov

2. Gutachter: Herr Prof. Dr. Klaus Hahnenkamp

3. Gutachter: Frau Prof. Dr. Barbara M. Bröker

Ort, Raum: Greifswald, C_DAT, Felix-Hausdorff-Str. 3, SR 1

Tag der Disputation: 07.03.2024

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-------------|
| Abkürzungsverzeichnis | IV |
| Abbildungsverzeichnis | VI |
| Tabellenverzeichnis | VIII |
| 1 Einleitung: Die Bedeutung von Opioiden in der Anästhesiologie | 1 |
| 1.1 Bedeutung der Transportproteine | 3 |
| 1.2 Arzneistoffmetabolismus der Opioide | 6 |
| 1.2.1 Fentanyl | 10 |
| 1.2.2 Sufentanil | 12 |
| 1.3 Hintergrund | 13 |
| 2 Aufgabenstellung | 14 |
| 2.1 Effekt der Opioide Fentanyl & Sufentanil auf OATP | 14 |
| 2.2 Generierung eines <i>in vitro</i> -Zellmodells für die Überexpression von OATP1A2 durch stabile Transfektion mittels Flp-In™-System | 15 |
| 3 Methoden | 16 |
| 3.1 Verwendete Zellen | 16 |
| 3.2 Zellkultivierung T-REX™-293 | 16 |
| 3.2.1 Mykoplasmen-rT-PCR von T-REX™-293 Zellen | 17 |
| 3.3 Zellkultivierung HEK-pQCXIN | 18 |
| 3.3.1 Mykoplasmen-Schnelltest von HEK-pQCXIN::OATP Zellen | 19 |
| 3.3.2 Mykoplasmen-rT-PCR von HEK-pQCXIN::OATP Zellen | 20 |
| 3.4 Bakterienkultivierung | 20 |
| 3.5 Molekularbiologische Methoden | 22 |
| 3.5.1 Gelelektrophorese mit Ethidiumbromid / SYBR® Safe DNA Gel Stain | 22 |
| 3.5.2 Gelextraktion | 23 |
| 3.5.3 Isolation von Plasmid-DNA mittels alkalischer Lyse (Mini-Präp) | 23 |
| 3.5.4 Isolation von Plasmid DNA mittels Festphasenextraktion (Midi-Präp) | 24 |
| 3.5.5 Plasmid-DNA Kontrollverdau | 26 |
| 3.5.6 Mikrovolumen-Proteinkonzentrationsbestimmung | 26 |
| 3.6 Klonierungsmethoden | 27 |
| 3.6.1 PCR | 27 |
| 3.6.2 Präparativer Restriktionsverdau | 28 |
| 3.6.3 Ligation und Dialyse | 29 |
| 3.6.4 Transformation von Plasmiden in <i>E. coli</i> | 30 |
| 3.6.5 Sequenzanalyse | 30 |
| 3.6.6 DNA Validierung nach stabiler Transfektion | 31 |
| 3.6.7 RNA Validierung nach stabiler Transfektion | 35 |
| 3.7 Generierung stabil transfizierter T-REX™-pcDNA5/FRT::OATP1A2 | 37 |
| 3.7.1 Plasmidherstellung | 38 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 3.7.2 | Transiente Transfektion..... | 40 |
| 3.7.3 | Stabile Transfektion von T-REx™-Zellen..... | 41 |
| 3.7.4 | Funktionskontrolle stabil transfizierter Zellen..... | 42 |
| 3.7.5 | OATP1A2- Färbung nach stabiler Transfektion | 42 |
| 3.8 | Transportversuche mit OATP | 44 |
| 3.8.1 | Versuchsvorbereitungen für Funktionskontrollen, Kompetitions- und Aufnahmeversuche | 44 |
| 3.8.2 | OATP-Funktionskontrolle mit ³ H-markiertem Referenzsubstrat | 45 |
| 3.8.3 | OATP1A2-Funktionskontrolle mit Fluoreszenz | 46 |
| 3.8.4 | Kompetitionsassays | 46 |
| 3.8.5 | Aufnahmeassay-Screening | 50 |
| 3.8.6 | Zeit- und konzentrationsabhängige Aufnahmeassays | 51 |
| 3.8.7 | LC-MS/MS-Analytik..... | 51 |
| 3.8.8 | Proteinbestimmung | 53 |
| 4 | Ergebnisse..... | 55 |
| 4.1 | Effekt der Opiode Fentanyl & Sufentanil auf OATP..... | 55 |
| 4.1.1 | Funktionskontrollen von HEK-pQCXIN::OATP1A2 und -1B1..... | 55 |
| 4.1.2 | Funktionskontrolle mit fluoreszierendem Substrat als Alternative zu radioaktivem Substrat..... | 56 |
| 4.1.3 | Kompetitionsassay mit Fentanyl und Sufentanil | 57 |
| 4.1.3.1 | Fentanyl beeinflusst OATP1A2 in Kompetitionsassays..... | 57 |
| 4.1.3.2 | Kein Effekt auf OATP1B1 in Kompetitionsassays | 59 |
| 4.1.4 | Aufnahmeassay-Screening von Fentanyl in HEK-pQCXIN::OATP1A2 | 60 |
| 4.2 | Generierung stabil transfizierter T-REx™-pcDNA5/FRT::OATP1A2 | 62 |
| 4.2.1 | Klonierungsstrategie pcDNA5/FRT::OATP1A2 Variante 1..... | 62 |
| 4.2.1.1 | pcDNA5/FRT::OATP1A2: Insert in umgekehrter Orientierung | 62 |
| 4.2.1.2 | Transiente Transfektion von Variante 1 | 63 |
| 4.2.2 | Klonierungsstrategie pcDNA5/FRT::OATP1A2 Variante 2..... | 64 |
| 4.2.2.1 | Transiente Transfektion von Variante 2 | 66 |
| 4.2.3 | Transfektionen mit pcDNA5/FRT::OATP1A2 Variante 3..... | 67 |
| 4.2.3.1 | Transiente Transfektion..... | 67 |
| 4.2.3.2 | Stabile Transfektion..... | 68 |
| 4.2.4 | Validierung: Nachweis von OATP1A2 in stabil transfizierten T-REx™-293..... | 69 |
| 4.2.4.1 | Validierungs-PCR bestätigen erfolgreiche Transfektion & Integration..... | 70 |
| 4.2.4.2 | Sequenzierung: Keine strukturellen Fehler nachweisbar | 73 |
| 4.2.4.3 | Quantitative Echtzeit-PCR bestätigt OATP1A2-Expression | 73 |
| 4.2.4.4 | Immunfluoreszenz-Färbung: Kein OATP1A2 in Zellmembranen..... | 73 |
| 4.2.5 | Fazit: Generierung T-REx™-pcDNA5/FRT::OATP1A2 | 75 |
| 5 | Diskussion und Ausblick..... | 76 |
| 5.1 | Effekt der Opiode Fentanyl & Sufentanil auf OATP..... | 76 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 5.2 | Funktionskontrolle mit Rhodamin-123 als Alternative zu radioaktiv-markierter Referenzsubstanz | 81 |
| 5.3 | Generierung stabil transfizierter T-REx™-pcDNA5/FRT::OATP1A2 mittels Flp-In™-System zur Erzeugung von stabilen Zelllinien mit definierter Kopienzahl der OATP1A2-Sequenz..... | 82 |
| 6 | Zusammenfassung..... | 93 |
| 7 | Literatur | 95 |
| 8 | Anhang..... | 105 |
| 8.1 | Material | 105 |
| 8.1.1 | Verwendete Zellen und Bakterien..... | 105 |
| 8.1.2 | Chemikalien und Kits..... | 105 |
| 8.1.3 | Substrate..... | 108 |
| 8.1.4 | Medien, Puffer..... | 108 |
| 8.1.5 | Primer | 110 |
| 8.1.6 | Plasmide | 111 |
| 8.1.7 | Laborgeräte..... | 111 |
| 8.1.8 | Software und Datenbanken | 114 |
| 8.1.9 | Verbrauchsmaterial | 114 |
| 8.2 | Weitere Ergebnisse | 117 |
| 8.2.1 | pcDNA5/FRT::OATP1A2 (Variante 1): Validierung und Umklonierung | 117 |
| 8.2.2 | Funktionskontrolle nach stabiler Transfektion von Variante 3 | 119 |
| 8.2.3 | Immunfluoreszenz weiterer Klone stabil transfizierter T-REx™-pcDNA5/FRT::OATP1A2 | 120 |
| 8.2.4 | Sequenzierungen pcDNA5/FRT::OATP1A2 (Variante 3) in T-REx™-293..... | 124 |
| 8.2.5 | Sequenzierungen pQXCIN::OATP1A2 | 126 |
| 8.2.6 | Vergleich pQCXIN und pcDNA5/FRT | 129 |

Abkürzungsverzeichnis

| Abkürzung | Erläuterung |
|-----------------|--|
| A. bidest. | doppelt destilliertes Wasser (<i>Aqua bidestillata</i>) |
| A. dest. | destilliertes Wasser (<i>Aqua destillata</i>) |
| ACN | Acetonitril |
| AG | Arbeitsgruppe |
| AL | Arbeitslösung |
| BSA | Bovines-Serum-Albumin |
| BSP | Bromsulfophthalein |
| cAMP | cyclisches Adenosinmonophosphat |
| cDNA | komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>) |
| CE | Energie zur 1./2. Fragmentierung |
| CMV | Zytomegalie-Virus |
| CO ₂ | Kohlenstoffdioxid |
| DAPI | 4',6-Diamidin-2-phenylindol |
| ddNTP | Didesoxynukleosidtriphosphat |
| DMEM | <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>) |
| dNTP | Desoxynukleosidtriphosphat |
| DP | <i>declustering potentiation</i> |
| DPBS | <i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i> |
| E. coli | <i>Escherichia coli</i> |
| E3S | Esteron-3-sulfat |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| FCS | Fetales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>) |
| Flp | Flippase |
| FRT | <i>Flp recombination target</i> |
| gDNA | genomische DNA |
| GDP | Guanosindiphosphat |
| GFP | grün fluoreszierendes Protein |
| GOI | Gen von Interesse (<i>gene of interest</i>) |
| G-Protein | GTP-bindendes Protein |
| GTP | Guanosintriphosphat |
| HEK-293 | <i>Human embryonal kidney cells 293</i> |
| HPLC | Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>) |
| i.v. | intravenös |
| Inh. | Inhibitor |
| IP | Inkubationspuffer |
| IRES | interne ribosomale Eintrittsstelle (<i>internal ribosomal entry site</i>) |
| IS | interner Standard |
| K _m | Michaelis-Menten Konstante |
| LB-Medium | <i>Lysogeny broth medium</i> |
| LC-MS/MS | <i>Liquid-Chromatographie-Massenspektrometrie/ Massenspektrometrie (liquid chromatography with tandem mass spectrometry)</i> |
| M | Molekulargewichtsmarker |
| MCS | <i>multiple cloning site</i> |
| Mol. wt. | <i>Molecular weight</i> , Molekülmasse |

| | |
|----------------|---|
| MSV | <i>Mouse sarcoma virus</i> |
| MW | Mittelwert |
| n | Anzahl |
| OATP | Organo-Anion-Transporter (<i>Organic-anion-transporting polypeptide</i>) |
| P/S | Penicillin/Streptomycin |
| PBS | <i>Phosphate buffered saline</i> |
| PCR | Polymerase Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>) |
| PDL | Poly-D-Lysin |
| Q ₁ | Molekulargewicht |
| Q ₃ | Tochterion/ Fragment |
| RIPA | Radio-Immunpräzipitationsassay (<i>Radioimmunoprecipitation assay buffer</i>) |
| RNA | Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>) |
| RNase | Ribonuclease |
| RT | Raumtemperatur |
| rT | reverse Transkriptase |
| SD | Standardabweichung (<i>standard deviation</i>) |
| SL | Stammlösung |
| SLC | <i>solute carrier</i> |
| SP | Substratpuffer |
| TBE | Tris/Borat/EDTA |
| TBP | TATA-Box-bindendes Protein (<i>TATA-box binding protein</i>) |
| TEA | Tetraethylammonium |
| üN-Kultur | Übernachtkultur |

Physikalische und biologische Einheiten

| | |
|------------------|--|
| x g | x-fache der Erdbeschleunigung g _n (9,897 m/s ²) |
| °C | Grad Celsius |
| bp | Basenpaar (<i>base pairs</i>) |
| Ci | 1 Mikrocurie = 3,7·10 ¹⁰ Becquerel (= 37 GBq) |
| C _T | Schwellenwertzyklus (<i>cycle threshold</i>) |
| g | Gramm |
| kB | Kilobasen = 10 ³ Basenpaare |
| kg/mol | molare Masse (M) |
| L | Liter |
| M | Molar = Stoffmengenkonzentration = mol/L |
| mA | Milliampere = 10 ⁻³ Ampere |
| min | Minute |
| mol | Stoffmenge (n): 1 mol = 6.02214076* 10 ²³ Teilchen |
| rpm | Umdrehung pro Minute (<i>revolutions per minute</i>) |
| s | Sekunde |
| U | Enzymeinheit (<i>units</i>) |
| V | Volt |
| V _{max} | maximale Transportgeschwindigkeit |

SI-Präfixe

| Symbol | Name | Wert |
|--------|-------|-------------------|
| k | kilo | 10 ³ |
| m | milli | 10 ⁻³ |
| μ | micro | 10 ⁻⁶ |
| n | nano | 10 ⁻⁹ |
| p | pico | 10 ⁻¹² |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1: Schematisches Modell des <i>rocker-switch</i> -Mechanismus für den OATP-Transport | 5 |
| Abbildung 2: Lokalisationen von OATP. | 6 |
| Abbildung 3: Übersicht der zur Schmerzbehandlung eingesetzten Analgetika..... | 7 |
| Abbildung 4: Schematische Darstellung des μ -Rezeptors..... | 8 |
| Abbildung 5: μ -Opioidrezeptor-vermittelte G-Proteinaktivierung..... | 8 |
| Abbildung 6: Strukturformel Loperamid. | 9 |
| Abbildung 7: Loperamid, ein Substrat von OATP1A2. | 10 |
| Abbildung 8: Strukturformeln Fentanyl und Sufentanil..... | 11 |
| Abbildung 9: Verwendete Mykoplasmen-Schnelltestsysteme..... | 19 |
| Abbildung 10: Exemplarische Darstellung der Gelelektrophorese nach Mykoplasmen-rT-PCR | 20 |
| Abbildung 11: Versuchsaufbau Midi-Präp..... | 25 |
| Abbildung 12: Schematische Darstellung der Validierungs-PCR..... | 32 |
| Abbildung 13: Klonierungsschema mit dem Flp-In™-System..... | 38 |
| Abbildung 14: Ablauf Herstellung Plasmid pcDNA5/FRT::OATP1A2. | 39 |
| Abbildung 15: Funktionsprinzip des Kompetitionsassays | 47 |
| Abbildung 16: Kompetitionsassay Versuchsaufbau | 48 |
| Abbildung 17: Pipettierschema Verdünnungsreihe Fentanyl | 48 |
| Abbildung 18: Pipettierschema Verdünnungsreihe Sufentanil | 49 |
| Abbildung 19: Funktionsprinzip des Aufnahmeassay-Screenings | 50 |
| Abbildung 20: Aufnahmeassay-Screening Versuchsaufbau | 51 |
| Abbildung 21: Funktionskontrollen HEK-pQCXIN::OATP1A2..... | 55 |
| Abbildung 22: Funktionskontrollen HEK-pQCXIN::OATP1B1 | 56 |
| Abbildung 23: Funktionskontrolle mit Rhodamin-123 | 57 |
| Abbildung 24: Kompetitionsassays Fentanyl/OATP1A2 | 58 |
| Abbildung 25: Kompetitionsassays Sufentanil/OATP1A2..... | 58 |
| Abbildung 26: Kompetitionsassays Fentanyl/OATP1B1 | 59 |
| Abbildung 27: Kompetitionsassays Sufentanil/OATP1B1 | 60 |
| Abbildung 28: LC-MS/MS-Messung Aufnahmeassay-Screening Fentanyl | 61 |
| Abbildung 29: Aufnahmeassay-Screening Fentanyl | 61 |
| Abbildung 30: Funktionskontrolle T-REx™-pcDNA5/FRT::OATP1A2 (Variante 1)... | 64 |

| | |
|--|-----|
| Abbildung 31: Herstellung von pcDNA5/FRT::OATP1A2 (Variante 2) | 65 |
| Abbildung 32: Kontrollverdau pcDNA5/FRT::OATP1A2 (Variante 2)..... | 65 |
| Abbildung 33: Funktionskontrolle T-REx™-pcDNA5/FRT::OATP1A2 (Variante 2)... | 66 |
| Abbildung 34: Plasmidkarte pcDNA5/FRT::OATP1A2 Variante 3 | 67 |
| Abbildung 35: Funktionskontrolle T-REx™-pcDNA5/FRT::OATP1A2 (Variante 3)... | 68 |
| Abbildung 36: Funktionskontrolle nach stabiler Transfektion..... | 69 |
| Abbildung 37: Kontrolle der korrekten Integration von pcDNA5/FRT::OATP1A2 in T-REx™-293..... | 72 |
| Abbildung 38: Immunfluoreszenz von T-REx™-pcDNA5/FRT::OATP1A2 | 74 |
| Abbildung 39: Expressionsvektoren zur Untersuchung von Transportern. | 83 |
| Abbildung 40: Kontrollverdau pcDNA5/FRT::OATP1A2 (Variante 1)..... | 117 |
| Abbildung 41: EcoRV-Verdau: Genabschnitt OATP1A2 & Vektor pcDNA5/FRT | 117 |
| Abbildung 42: KpnI-Verdau: Genabschnitt OATP1A2 & Vektor pcDNA5/FRT..... | 118 |
| Abbildung 43: Funktionskontrolle weiterer Klone nach stabiler Transfektion | 119 |
| Abbildung 44: Immunfluoreszenz weiterer Klone der stabil transfizierten T-REx™- pcDNA5/FRT::OATP1A2 | 120 |
| Abbildung 45: Immunfluoreszenz weiterer Klone der stabil transfizierten T-REx™- pcDNA5/FRT::OATP1A2 | 121 |
| Abbildung 46: Immunfluoreszenz weiterer Klone der stabil transfizierten T-REx™- pcDNA5/FRT::OATP1A2 | 122 |
| Abbildung 47: Immunfluoreszenz weiterer Klone der stabil transfizierten T-REx™- pcDNA5/FRT::OATP1A2 | 123 |
| Abbildung 48: 1. Sequenzierung T-REx™-pcDNA5/FRT::OATP1A2 (Variante 3).. | 124 |
| Abbildung 49: 2. Sequenzierung T-REx™-pcDNA5/FRT::OATP1A2 (Variante 3).. | 124 |
| Abbildung 50: 3. Sequenzierung T-REx™-pcDNA5/FRT::OATP1A2 (Variante 3).. | 124 |
| Abbildung 51: 4. Sequenzierung T-REx™-pcDNA5/FRT::OATP1A2 (Variante 3).. | 125 |
| Abbildung 52: 1. Sequenzierung Plasmid pcDNA5/FRT::OATP1A2 (Variante 3) ... | 125 |
| Abbildung 53: 2. Sequenzierung Plasmid pcDNA5/FRT::OATP1A2 (Variante 3) ... | 126 |
| Abbildung 54: 1. Sequenzierung Plasmid pQCXIN::OATP1A2..... | 127 |
| Abbildung 55: 2. Sequenzierung Plasmid pQCXIN::OATP1A2..... | 127 |
| Abbildung 56: 3. Sequenzierung Plasmid pQCXIN::OATP1A2..... | 128 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tabelle 1: Relative analgetische Potenz der klinisch relevanten Opiode | 1 |
| Tabelle 2: Pharmakokinetische Eigenschaften für Fentanyl und Sufentanil. | 12 |
| Tabelle 3: Verhältnis der Verdünnung beim Splitten für T75-Flaschen..... | 17 |
| Tabelle 4: Rezeptur HEK-Zellkulturmedium..... | 18 |
| Tabelle 5: Pipettierschema Mykoplasmen-rT-PCR | 20 |
| Tabelle 6: PCR-Konditionen Mykoplasmen-PCR | 20 |
| Tabelle 7: Rezeptur LB-Medium | 21 |
| Tabelle 8: Rezeptur 1x TBE-Puffer | 22 |
| Tabelle 9: Rezeptur TAE-Puffer..... | 23 |
| Tabelle 10: Ansatz Plasmid-DNA-Kontrollverdau | 26 |
| Tabelle 11: Plasmid-DNA Kontrollverdau: Enzyme und Puffer | 26 |
| Tabelle 12: Klonierungsstrategien | 27 |
| Tabelle 13: Pipettierschema Master Mix für eine PCR | 28 |
| Tabelle 14: Konditionen Gradient-PCR..... | 28 |
| Tabelle 15: PCR-Konditionen | 28 |
| Tabelle 16: Ansatz Restriktionsverdau | 29 |
| Tabelle 17: Präparativer Restriktionsverdau: Enzyme und Puffer | 29 |
| Tabelle 18: Drei Ansätze für Ligation von Vektor & OATP1A2 | 30 |
| Tabelle 19: Ansatz Sequenzierungs-PCR | 31 |
| Tabelle 20: Konditionen Sequenzierungs-PCR | 31 |
| Tabelle 21: Ansatz Hygromycin PCR | 33 |
| Tabelle 22: Konditionen Hygromycin-PCR | 33 |
| Tabelle 23: Ansatz GOI-PCR..... | 33 |
| Tabelle 24: Konditionen GOI-PCR..... | 33 |
| Tabelle 25: Ansatz Multiple-Integrations-PCR | 34 |
| Tabelle 26: Konditionen Multiple- Integrations-PCR | 34 |
| Tabelle 27: Primer DNA-Validierungs-PCR | 34 |
| Tabelle 28: Ansatz PCR-Probenaufreinigung..... | 34 |
| Tabelle 29: Verdünnung RNA-Proben | 35 |
| Tabelle 30: Ansatz Master Mix cDNA-Synthese..... | 36 |
| Tabelle 31: cDNA-Synthese <i>Cycler</i> -Konditionen | 36 |
| Tabelle 32: <i>real-time</i> PCR Ansätze für TPB und OATP1A2 | 36 |

| | |
|---|-----|
| Tabelle 33: Rezeptur 10x Inkubationspuffer | 44 |
| Tabelle 34: Rezeptur Lysispuffer I (Transportversuche) | 45 |
| Tabelle 35: Versuchsbedingungen Kompetitionsassay und Funktionskontrollen | 45 |
| Tabelle 36: Verwendete Substrate der LC-MS/MS-Analytik | 52 |
| Tabelle 37: Ansatz Kalibrationsfunktion | 52 |
| Tabelle 38: Messparameter der LC-MS/MS-Analyse | 53 |
| Tabelle 39: Verdünnungsreihe für die Kalibration der Proteinbestimmung | 53 |
| Tabelle 40: Übersicht aller getesteten Klone T-REx™-pcDNA5/FRT::OATP1A2 | 70 |
| Tabelle 41: Primer Sequenzierungs-PCR | 110 |
| Tabelle 42: Primer Validierungs-PCR | 110 |
| Tabelle 43: Weitere PCR-Primer | 111 |
| Tabelle 44: Vergleich der Eigenschaften von pQCXIN und pcDNA5/FRT | 129 |

1 Einleitung: Die Bedeutung von Opioiden in der Anästhesiologie

Opioide sind in der Anästhesiologie allgegenwärtig. Sie stellen einen wichtigen Teil der Medikation einer Narkose für Operationen dar, bei denen die drei Substanzgruppen Hypnotika, Analgetika und Muskelrelaxantien unterschieden werden. Analgetika wie die Opioide finden auch in der akuten und chronischen Schmerztherapie Anwendung. Opioide sind zentral wirksame Schmerzmittel und daher die effizientesten Substanzen zur Analgesie [1]. Die verschiedenen Vertreter der Opioide werden nach Wirkstärke, das heißt nach der analgetischen Potenz, mit der Referenzsubstanz Morphin, Wirkstärke 1, verglichen. Sufentanil ist mit einer analgetischen Potenz von 1.000 das stärkste in der Humanmedizin verwendete Opioid-Analgetikum und wird daher in der Anästhesie und Intensivmedizin beispielsweise als Schmerzmittel zur Einleitung und Aufrechterhaltung einer Narkose und auch epidural zur postoperativen Analgesie eingesetzt, ebenso wie Fentanyl mit einer Potenz von 100, siehe Tabelle 1. [2–4]

Tabelle 1: Relative analgetische Potenz der klinisch relevanten Opioide im Vergleich zu Morphin, modifiziert nach Ippolito *et al.* (2016) [2]

| Analgetikum | Relative analgetische Potenz |
|--------------------|-------------------------------------|
| Sufentanil | 500 - 1.000 |
| Remifentanil | 500 - 750 |
| Fentanyl | 100 |
| Alfentanil | 25 |
| Morphin | 1 |
| Piritramid | 0,75 |

Zwar kennt man diese Substanzen im medizinischen Alltag schon lange und ist sich der möglichen Wirkung und Nebenwirkungen bewusst, allerdings zeigen sich diese nicht bei jedem Patienten auf die gleiche Art und Weise. Zwei Patienten, welche das gleiche Opioid-Analgetikum erhalten, können unterschiedlich ausgeprägte Nebenwirkungen erleiden oder benötigen gegebenenfalls unterschiedliche Mengen, um eine vergleichbare Wirkung zu erzielen. Um Patienten eine individuelle und bestmögliche Therapie gewährleisten zu können, ist es wichtig zu untersuchen, wie diese Variabilität in der Wirkung und den Nebenwirkungen von Opioiden zustande kommt. [5,6] Opioide werden über unterschiedlichste Applikationsformen in den Körper aufgenommen, wie zum Beispiel parenteral, transdermal, intranasal sowie transmukosal und gelangen letztendlich über die Blutbahn an ihre Wirkorte [2], wie zum Beispiel Schmerzbahnen im Rückenmark, Hirnnervenkerne und Organe in der Peripherie [1]. Nach intravenöser Gabe befinden sich nur 15 % des verabreichten Opioids in gelöster Form im Blut,

da 85 % der Dosis an Plasma- und Organeiwieße binden. Der Anteil des im Blut gelösten Opioids in ionisierter Form beträgt 90 %. Da jedoch nur nicht-ionisierte Formen die Blut-Hirn-Schranke überwinden können, erreicht nur 1 % der initialen Dosis das zentrale Nervensystem. Mit jedem Zyklus des Blutkreislaufes passieren die applizierten Opiode die Leber, in der sie metabolisiert und eliminiert werden. Der überwiegende Anteil des Opioids wird auch von anderen proteinreichen Organen wie zum Beispiel der Niere, der Lunge, der Haut und dem Fettgewebe aufgenommen und gespeichert. Bei einem Konzentrationsabfall im Blutplasma werden die Opiode aus diesen Speichern wieder an das Blut abgegeben und können somit wieder zur Vermittlung der Wirkung beitragen. [1] Bei enteraler Gabe werden die Opiode jedoch vor Erreichen des großen Blutkreislaufes sowohl enzymatisch im Darm durch Glucuronidierung metabolisiert als auch über die Pfortader in die Leber geleitet, weshalb es zu einem First-Pass-Effekt, also einer Wirkminderung, kommt [7].

Auf dem Weg zu den genannten Wirkorten müssen verschiedenste körpereigene Barrieren überwunden werden, beispielsweise die Endothelschicht von Blutgefäßen oder die Blut-Hirn-Schranke sowie Zellmembranen von organspezifischen Zellen wie den Leberzellen [7]. Eine mögliche Ursache für die inter- und intraindividuelle Variabilität in Wirkung und Nebenwirkung der Opiode sind individuelle Unterschiede in der Ausstattung mit Transportern, welche für den Transport von Opioiden zum Beispiel über die Blut-Hirn-Schranke verantwortlich sind [5]. Für die in dieser Arbeit untersuchten *organic anion transporter polypeptides* (OATP) konnte bereits eine solche individuelle Ausstattung in menschlichen Leberzellen nachgewiesen werden [8]. OATP, welche auch an der Blut-Hirn-Schranke vertreten sind [9], wurden bereits als Transporter einiger Opiode nachgewiesen [10,11]. Unter Kenntnis der persönlichen Ausstattung könnte die Therapie mit Opioiden gegebenenfalls individuell angepasst werden. Bei vielen Medikamenten ist solch eine personalisierte Anwendung aufgrund von molekulargenetischen Tests bereits möglich. Eine aktuelle Liste der für personalisierte Medizin zugelassenen Medikamente ist unter vfa.de/personalisiert abrufbar. [12] Die inter- und intraindividuelle Variabilität von Opioiden wird jedoch durch viele Faktoren beeinflusst. Einen bereits bekannten Faktor stellen Cytochrome P-450 (CYP-Enzyme) für die interindividuelle Variabilität der Wirkung von Medikamenten dar. Vertreter dieser Enzyme katalysieren die Metabolisierung vieler Substanzen in der Leber in polare Metaboliten, welche von der Niere ausgeschieden werden können [13,14]. Eine der bedeutendsten Subfamilien CYP3A ist für die Metabolisierung einer

großen Anzahl von Medikamenten verantwortlich. So katalysiert CYP3A4 neben der Biotransformation einiger Opioide wie Fentanyl und Sufentanil auch die von Nifedipin, Midazolam und Erythromycin. Bei gleichzeitiger Applikation dieser Substanzen sind Wechselwirkungen möglich. Tateishi, Krivoruk *et al.* (1996) konnten zeigen, dass die Metabolisierung von Fentanyl und Sufentanil dosisabhängig von Erythromycin inhibiert wird. [14] Aufgrund gehemmter Metabolisierung verlängert sich die Zeit, in der diese Opioide ihre Wirkungen und Nebenwirkungen vermitteln. Die Aktivität der CYP-Enzyme ist jedoch nicht nur von der Konkurrenz verschiedener Substrate abhängig, sondern auch von äußeren Einflüssen wie Rauchen oder Diät und individuellen genetischen Polymorphismen dieser Enzyme. Je nach Enzymaktivität werden Patienten in *poor-*, *intermediate-*, *extensive-* und *ultrarapid-metabolizer* eingeteilt. Die individuelle Enzymvariation aufgrund verschiedener Mutationen kann durch die vermehrte, verminderte oder sogar fehlende Enzymaktivität Auswirkungen auf die Verweildauer der Arzneimittel im Organismus haben, die durch das betreffende CYP-Enzym katalysiert werden. [13]

1.1 Bedeutung der Transportproteine

Im Rahmen der Absorption, der Verteilung, dem Metabolismus sowie der Ausscheidung von Arzneimitteln leisten Transportproteine zur Überwindung der körpereigenen Barrieren auf dem Weg zum Zielort einen wichtigen Beitrag [15]. Hydrophile Moleküle können die Lipiddoppelschichten von biologischen Barrieren nur überqueren, wenn sie sehr klein und ungeladen sind. Größere und geladene hydrophile Arzneimittel können diese Membranen über Transporter überwinden. [7] Bisher konnten über 400 Transportproteine ermittelt werden, welche zwei großen Familien zugeordnet werden: Transporter mit *ATP-binding-cassette* (ABC-Transporter) und SLC-Transporter (*solute carrier*) [7,16]. ABC-Transporter werden in die Gruppen A-G eingeteilt und sind im menschlichen Organismus vor allem als Effluxpumpen aktiv, das heißt sie transportieren aktiv ATP-abhängig Substrate gegen einen Konzentrationsgradienten. Zu den bedeutendsten Vertretern der ABC-Transporter in der Pharmakokinetik von Arzneimitteln zählen MDR (zum Beispiel *multidrug resistance gene-1*, P-Glykoprotein (ABCB1)), verschiedene MRP's (*multidrug resistance-associated protein*) sowie BCRP (*breast cancer resistance protein*). [7] P-Glykoprotein (p-Gp) wurde initial für die Interaktion mit vielen Pharmaka der Antitumorthherapie verantwortlich gemacht. Mittlerweile ist bekannt, dass P-Gp den ATP-abhängigen Effluxtransport vieler Medikamente über

biologische Barrieren ermöglicht. [16] Unter anderem erfolgt durch p-GP ein Effluxtransport von Loperamid über die Blut-Hirn-Schranke [7,11], weshalb Loperamid, trotz seiner Verwandtschaft mit Opioiden, nicht zentral wirksam ist [1]. BCRP limitiert die Passage von Substraten über die Blut-Hirn-Schranke, die Blut-Hoden-Schranke sowie die Maternale-fetale-Barriere. Des Weiteren reguliert BCRP die Sekretion von Vitaminen in die Muttermilch. [16] SLC-Transporter kommen als Symporter oder Antiporter vor. Als Symporter transportieren sie ein Substrat zusammen mit einem positiv geladenen Co-Substrat. Dieser sekundär aktive Transport wird angetrieben durch den elektrochemischen Gradienten des Co-Substrates über der Membran, welcher von der $\text{Na}^{2+}/\text{K}^{+}$ -ATPase aufgebaut wird. Antiporter transportieren zwei Substrate im Austausch gegeneinander. [7] Zu dieser Superfamilie wird die humane SLC22A Familie gezählt, welche die *organic cation transporter* (OCT) und *organic anion transporter* (OAT) umfasst [9,16]. Während OCT vor allem organische Kationen transportieren, zählen zu den Substraten der OAT kleine organische Anionen [9]. Eine weitere Gruppe der SLC-Transporterfamilie stellen die *organic anion transporter polypeptides* (OATP) dar. Sie wurden zunächst von dem *HUGO Gene Nomenclature Committee* (HGNC) unter der Gruppe SLC21 zusammengefasst, jedoch später umbenannt in die heutige Subfamilie OATP/SLCO. OATP einer Familie mit einer über 40 %igen Übereinstimmung der Aminosäuresequenz werden in die Gruppen OATP1-6 unterteilt. Unter diesen Subfamilien werden OATP mit einer über 60 %igen übereinstimmenden Aminosäuresequenz mit Buchstaben weiter differenziert: zum Beispiel OATP1A, OATP1B, OATP1C. Wenn diesen Untergruppen mehrere Transportproteine zugehörig sind, werden diese fortlaufend nummeriert: OATP1A1, OATP1A2, OATP1A3. Zur Subfamilie der OATP/SLCO gehören ebenfalls Proteine aus Maus und Ratte, welche im Gegensatz zu humanen OATP (beispielsweise OATP1A2) mit kleinen Buchstaben gekennzeichnet werden, zum Beispiel Oatp1a1. [9,17] Alle Transporter der SLC-Subfamilie sind aus 12 Transmembrandomänen (TMD) mit einem intrazellulären Endstück aufgebaut. Als Aufnahmetransporter transportieren sie natrium-unabhängig große organische Anionen, aber auch neutrale oder kationische Substanzen. [9,18] Leuthold *et al.* (2008) postuliert einen erhöhten Substrattransport in extrazellulär saurem Milieu (pH 6,5) durch die Protonierung basischer Aminosäuren der humanen OATP1A2 und 1B3 sowie einen Antiport durch HCO_3^- [19,20]. Des Weiteren wurde bereits ein Glutathion-vermittelter Transport beschrieben [21,22]. Substrate sind meist größer als 350 Dalton und amphipatisch [9], das heißt sowohl

hydrophil als auch lipophil, wie zum Beispiel verschiedene Statine oder Valsartan, aber auch endogene Substanzen wie Gallensäuren, Bilirubin oder Schilddrüsenhormone [17,23]. Der genaue Transportmechanismus konnte noch nicht abschließend aufgeklärt werden (Stand 04/2023) [9,24]. Evolutionär sind OATP mit der *major-facilitator*-Superfamilie (MFS) verwandt, deren Aufbau und Funktion besser erforscht ist. Die Anordnung der TMD der OATP zueinander ist noch unbekannt. Die Bedeutung der großen extrazellulären Region zwischen Helix 9 und 10, welche aus 11 disulfidgebundenen Cysteinresten besteht, konnte bereits nachgewiesen werden. Untersuchungen nach Haenggi *et al.* (2005) zeigten, dass eine Mutation eines einzigen Cysteinrestes die Transportfunktion der OATP maßgeblich reduziert. [25,26] Die Untersuchungen von Meier-Abt *et al.* lassen einen *rocker-switch*-Transportmechanismus vermuten, siehe Abbildung 1.

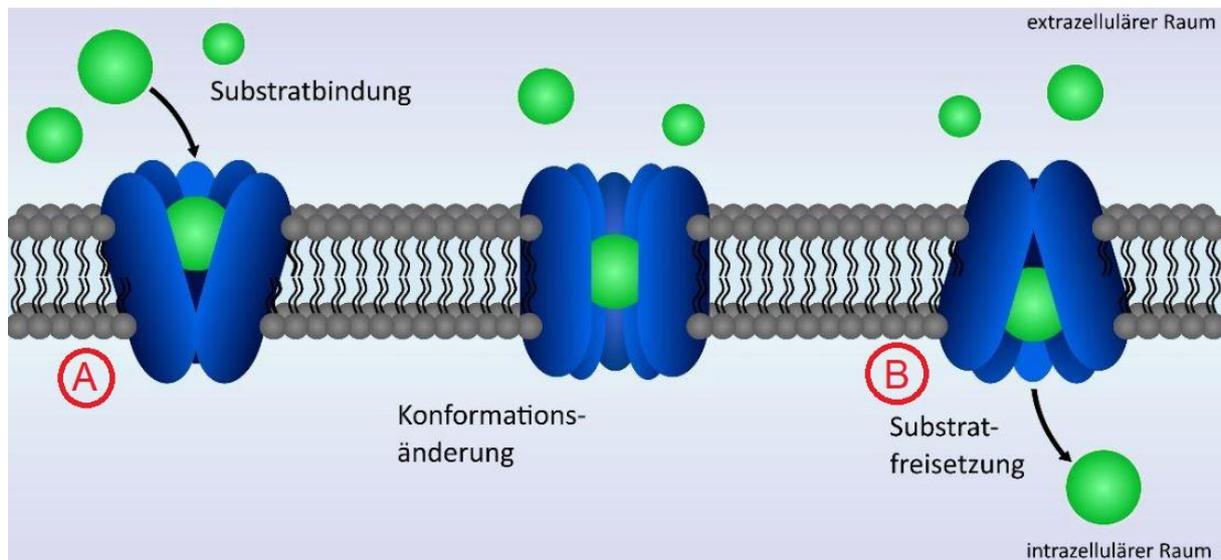


Abbildung 1: Schematisches Modell des *rocker-switch*-Mechanismus für den OATP-Transport. Modifiziert nach Hagen P. (2018) [27], Wechsel zwischen Zustand A, mit der offenen Substratbindungsstelle Richtung Extrazellulärraum und Zustand B mit geöffneter Bindungsstelle in Richtung Intrazellulärraum. Die Konformitätsänderung erfolgt durch Substratbindung. Nach Dislokation des Substrates in den Intrazellulärraum kehrt der Transporter in den Zustand A zurück.

Hierbei kann das Transportprotein zwei Wechselkonformationen ähnlich einem Wippschalter einnehmen, eine nach innen und eine nach außen gerichtete. Durch diesen Wechsel ist jederzeit nur eine Bindungsstelle auf einer Seite der Membran in der positiv geladenen Pore zugänglich. Der Konformationswechsel erfolgt durch eine Substratbindung des Transportproteins. [25,27,28] Bisher sind 11 verschiedene OATP beim

Menschen bekannt, von denen OATP1A2, OATP1B1, OATP1B3 und OATP2B1 am besten untersucht sind [23]. OATP1A2 sind an vielen Lokalisationen im Körper zu finden. Als Teil der Blut-Hirn-Schranke werden sie von Endothelzellen der Kapillaren luminal exprimiert sowie auch in der Niere in der apikalen Membran von Nephronen gebildet [9]. Außerdem sind sie in duodenalen Enterozyten [29] sowie in Cholangiozyten der Leber zu finden [9]. OATP1B1 und OATP1B3 werden in der basolateralen Membran von Hepatozyten ausgebildet [30], wobei OATP1B1 im gesamten Leberläppchen und OATP1B3 vor allem an der Zentralvene zu finden sind [9]. Weitere Lokalisationen von OATP sind in Abbildung 2 dargestellt [31].

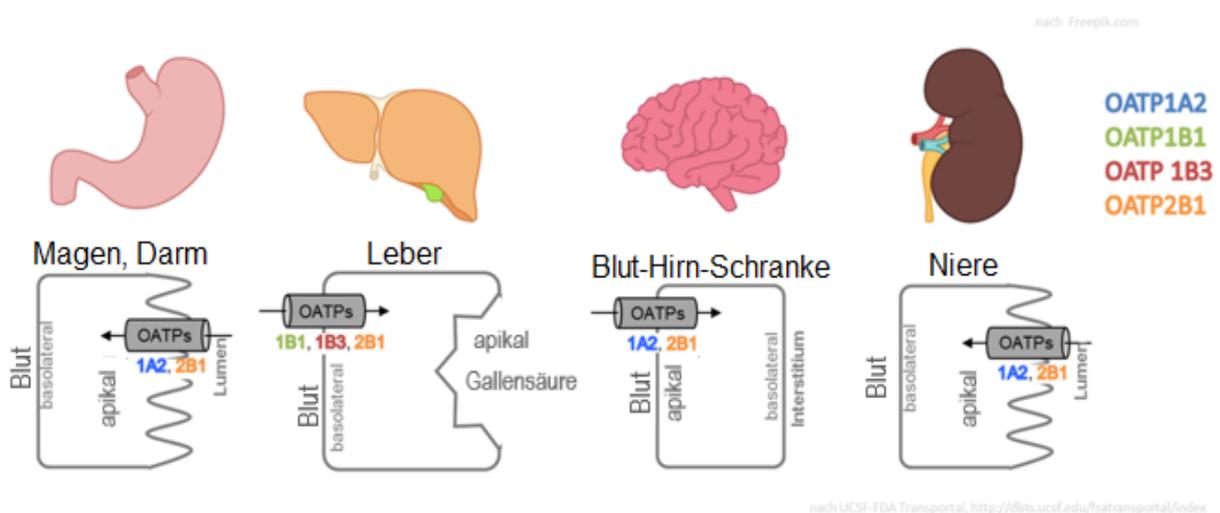


Abbildung 2: Lokalisationen von OATP. Modifiziert nach Bült M. (2017) [31] und <http://transportal.compbio.ucsf.edu/index/> und freepik.com

1.2 Arzneistoffmetabolismus der Opioide

In der Anästhesiologie unterscheidet man peripher und zentral wirksame Analgetika, siehe Abbildung 3 [1]. Während periphere Analgetika die Signalkaskaden der Schmerzentstehung in der Peripherie unterbinden, bewirken zentrale Analgetika, wie Opioide, hauptsächlich eine verminderte Schmerzwahrnehmung durch Bindung spezifischer Opioidrezeptoren im zentralen Nervensystem. Allerdings wird Analgesie auch durch Opioidrezeptoren in der Peripherie vermittelt, weshalb stattdessen besser in Opioid- und Nichtopioide-Analgetika unterschieden werden sollte [7]. Der Ursprung aller Opioide ist das Opium, welches aus Schlafmohn gewonnen werden kann und unter anderem Morphin, Codein und Thebain enthält. Aus dem natürlichen Opium extrahierte Derivate werden als Opiate bezeichnet, synthetische Abkömmlinge

hingegen als Opiode. Der menschliche Organismus ist in der Lage Endorphine, morphinähnliche Substanzen, selbst herzustellen und zur Schmerzunterdrückung zu nutzen. Wenn dies allerdings nicht ausreicht, kommen in der Schmerztherapie exogen zugeführte Opiode zum Einsatz. All diese Substanzen bewirken dabei durch Rezeptorbindung an Schmerzbahnen im Rückenmark, höheren Zentren und Hirnnervenkernen sowie in der Peripherie an Organen eine Hyperpolarisation, welches eine erneute Aktivierung der Zelle sowie eine Weiterleitung von nozizeptiven Reizen verhindert. [1]

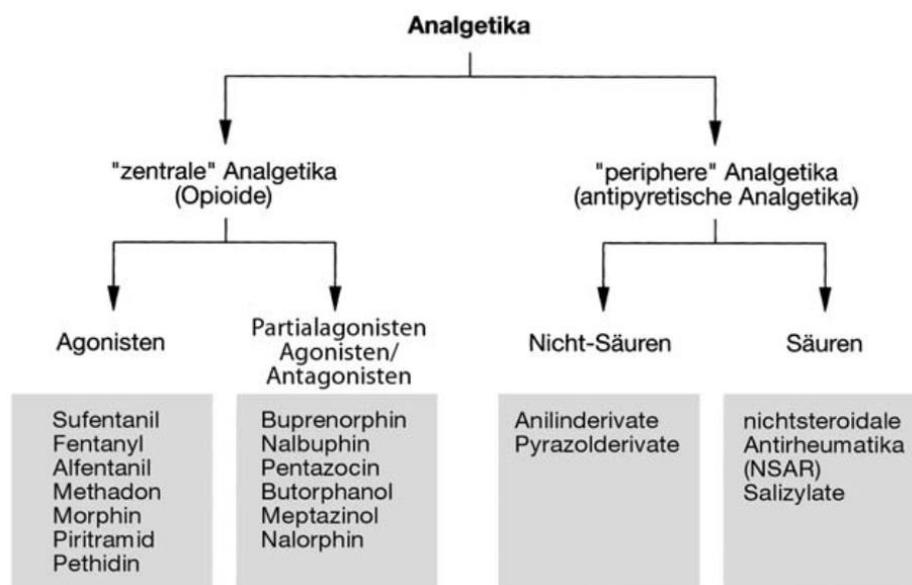


Abbildung 3: Übersicht der zur Schmerzbehandlung eingesetzten Analgetika. [1]

Opioidrezeptoren, siehe Abbildung 4, zeigen einen heptahelikalen Aufbau und vermitteln ihre Signaltransduktion über heterotrimere G-Protein-gekoppelte Rezeptoren [7]. Sie spalten bei Bindung eines Liganden ein inhibitorisches G-Protein (G_i) ab [1]. Diese Proteine bestehen aus 3 Untereinheiten, der α_i - Untereinheit, welche im Ruhezustand Guanosindiphosphat (GDP) gebunden hat, sowie einer β - und γ - Untereinheit. Durch die Ligandenbindung wird ein Austausch von GDP zu Guanosintriphosphat (GTP) an der α_i - Untereinheit vorgenommen. Die α_i - Untereinheit deaktiviert eine intrazelluläre Adenylatcyclase, wodurch kein cAMP mehr gebildet wird und folglich die intrazelluläre Signalkaskade unterbrochen ist. [4,32]

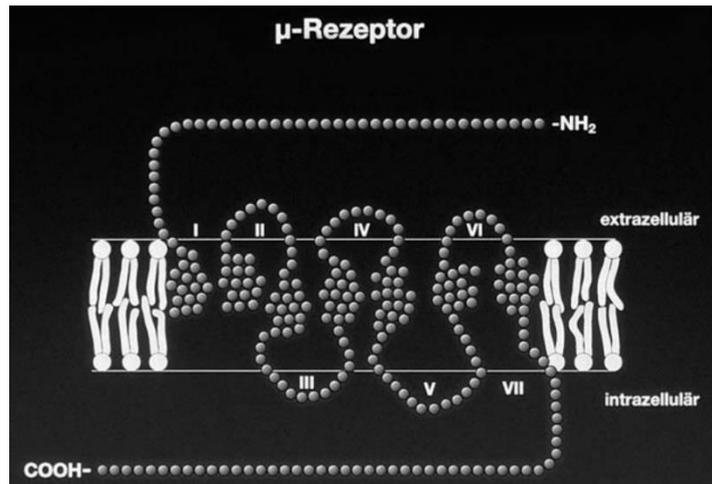


Abbildung 4: Schematische Darstellung des μ -Rezeptors mit 7 Transmembrandomänen. [1] Mit einem extrazellulären N-terminalen Ende (oben) und einem intrazellulären C-terminalen Ende (unten)

Die Hyperpolarisation, welche eine erneute Erregbarkeit der Zelle verhindert, entsteht durch eine G-Protein-vermittelte Blockade des Ca^{2+} -Einstroms sowie vermehrten K^{+} -Ausstrom, siehe Abbildung 5. Die hyperpolarisierte Nervenzelle kann durch die Opioidwirkung keine exzitatorischen Transmitter ausschütten, wodurch eine nozizeptive Erregungsleitung unterbrochen ist. Je größer die Affinität und damit die Bindungsstärke des Opioids zum Rezeptor sowie die intrinsische Aktivität ist, desto höher ist die analgetische Wirkung. [1]

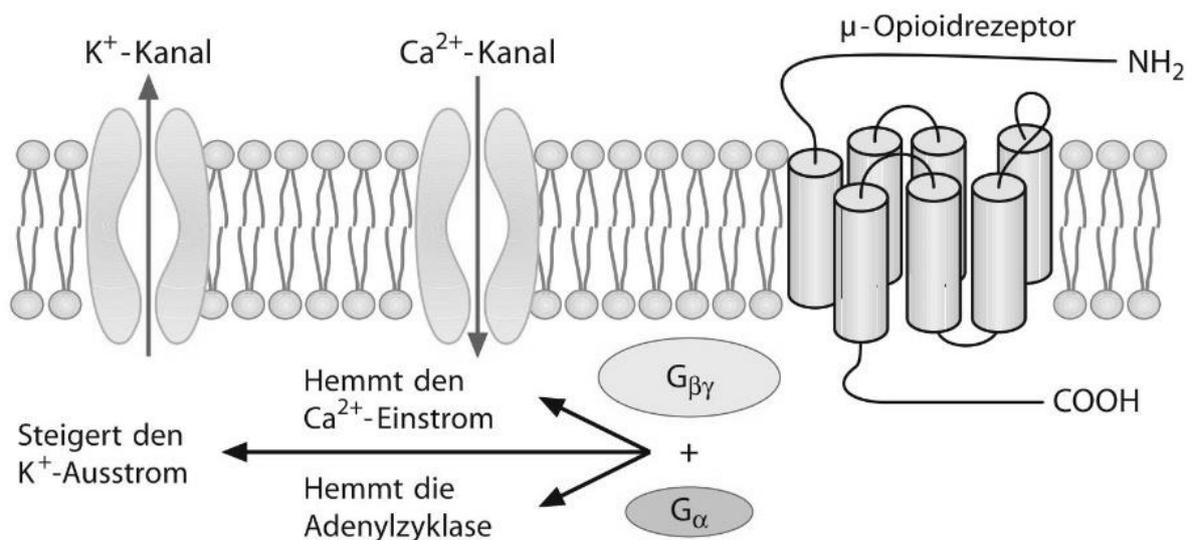


Abbildung 5: μ -Opioidrezeptor-vermittelte G-Proteinaktivierung [4]

Die intrinsische Aktivität ist die Eigenschaft, eine Konformationsänderung des Rezeptors zu bewirken. Opioidrezeptoren werden in die Untergruppen μ , κ , δ unterteilt [7]. Durch unterschiedliche Wechselwirkungen der Opioide mit den Subgruppen können verschiedene Wirkungen und Nebenwirkungen auftreten [1]. So können Analgetika wie Morphin, Sufentanil und Fentanyl durch ihre Wechselwirkung mit μ -Opioidrezeptoren eine Analgesie, Atemdepression, Abhängigkeitsentwicklung, Bradykardie, Hypothermie, Miosis sowie Gallengangkontraktion, Harnverhalt und Diurese auslösen [1,7]. Durch Bindung an Opioidrezeptoren in der Area postrema können Opioide Emesis und Nausea auslösen. Eine opioidinduzierte Atemdepressionen oder ein akutes Entzugssyndrom können durch die Gabe des Antagonisten Naloxon abgewendet werden. Naloxon bindet dieselben Rezeptoren, jedoch ohne eine Konformationsänderung sowie eine opioidähnliche Wirkung auszulösen. Neben den bereits genannten Wirkungen können hochpotente Opioide wie Sufentanil und Fentanyl auch das retikuläre Wachsystem beeinflussen und somit eine hyposedative Wirkung entfalten, welche zu Wirkbeginn eine Narkoseeinleitung auch ohne zusätzliches Hypnotikum möglich macht. [1] Kontraindiziert sind Opioide aufgrund ihrer diversen Nebenwirkungen bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen, Gallen-, Nierenkoliken, eingeschränkter Atemfunktion und Schädel-Hirn-Traumata [7]. Im folgenden Kapitel werden die Opioide Fentanyl und Sufentanil, welche strukturell mit dem Opioid Loperamid verwandt sind, genauer erläutert. Die Strukturformel von Loperamid wird in Abbildung 6 dargestellt. Fentanyl und Sufentanil können sich im Gegensatz zu Loperamid im zentralen Nervensystem anreichern und dieses beeinflussen. Loperamid wird nach Aufnahme in die Endothelzellen der Hirnkapillaren durch den Effluxtransporter p-Gp zurück ins Blut transportiert, sodass es nur peripher wirkt und zur Antiobstipation eingesetzt wird [7].

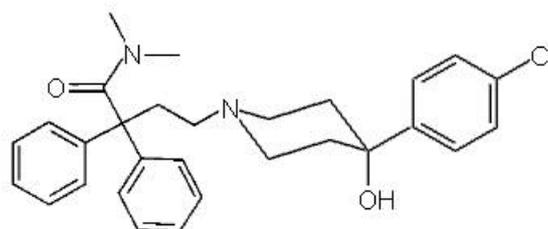


Abbildung 6: Strukturformel Loperamid. Modifiziert nach Buchholz M. und Wengst. J. [33]

Loperamid wurde bereits in Vorarbeiten der AG der Klinik für Anästhesiologie der Universitätsmedizin Greifswald als kompetitiver Inhibitor der Substrataufnahme in verschiedenen OATP sowie als Substrat von OATP1A2, OATP1B1 und OATP2B1 (IC_{50} : 0,2 –3 μ M) nachgewiesen, siehe Abbildung 7 [11]. Es gibt zu Fentanyl und Sufentanil bisher wenige Untersuchungen. Im Rahmen dieser Arbeit soll daher erforscht werden, ob diese Opioide OATP beeinflussen und gegebenenfalls selbst Substrate darstellen.

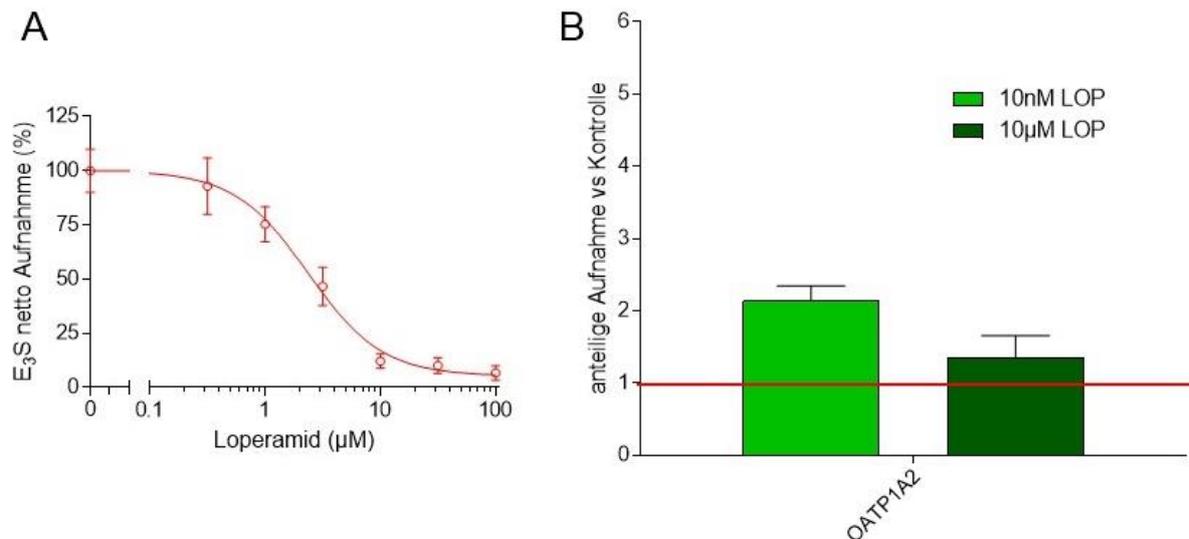


Abbildung 7: Loperamid, ein Substrat von OATP1A2. IC_{50} = 2,8 μ M, A: Kompetitionsassay mit HEK-pQCXIN::OATP1A2 (n = 8; MW \pm SD), B: Aufnahmeassay, Normalisierung der Daten auf die Aufnahme in die Kontrollzellen HEK-pQCXIN, Aufnahme in die Kontrollzellen = 1 (n = 4; MW \pm SD) [10,11].

1.2.1 Fentanyl

Fentanyl, siehe Abbildung 8, ist ein synthetisches Opioid mit einer 70- bis 100-fachen analgetischen Potenz verglichen mit Morphin und wird daher bei Tumorschmerzen, bei Schmerzen durch Verletzungen oder Operationen angewandt [34]. Im Gegensatz zu anderen Opioiden wird ein geringeres Auftreten von Obstipation beobachtet [35]. Es weist eine hohe Lipophilie auf, weshalb es in der klinischen Anwendung parenteral, transdermal, intranasal sowie transmukosal appliziert werden kann [4]. Gourlay, Kowalski et al. (1988) postulieren für Fentanyl in der postoperativen Schmerztherapie eine minimale effektiv-schmerzlindernde Konzentration im Blut zwischen 0,23 und 1,18 ng/ml [36].

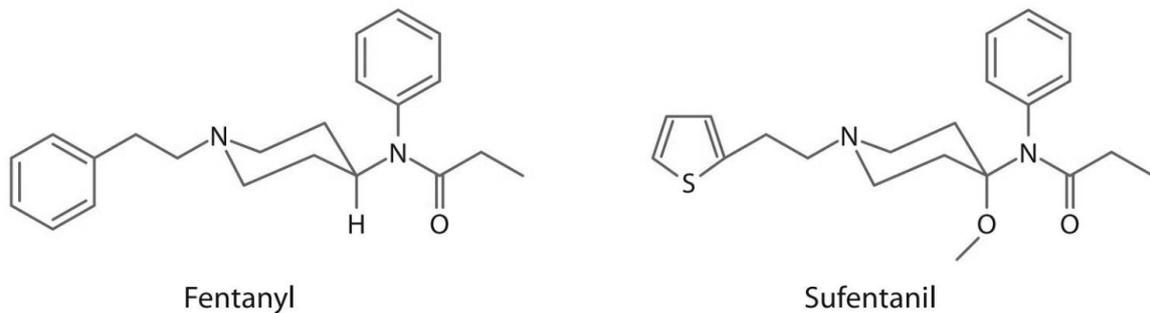


Abbildung 8: Strukturformeln Fentanyl und Sufentanil [4]

Morphin, ein verwandtes Opioid, kann bei intravenöser oder lokaler Gabe eine Mastzelldegranulation auslösen und so über eine Histaminfreisetzung Hypotension, lokale Rötung, Juckreiz und Ödeme verursachen. Eine solche relevante Histaminfreisetzung durch Fentanyl ist nicht zu beobachten. [4] Durch die hohe Lipidlöslichkeit kann Fentanyl die Blut-Hirn-Schranke leicht passieren und erreicht somit schon 5 min nach i.v.-Gabe seine zentrale maximale Wirkung als selektiver μ -Opioidrezeptoragonist. Außerdem wird die Substanz aufgrund seiner Lipophilie schnell ins Fettgewebe umverteilt, wodurch bei Sättigung der Gewebe die Wirkdauer etwa der Eliminationshalbwertszeit von 3 - 4 Stunden entspricht, siehe Tabelle 2. [7] Fentanyl wird zum Großteil in der Leber durch CYP3A4 und -3A5 mittels N-Dealkylierung zu Norfentanyl metabolisiert und ist daher auch für die Anwendung bei Patienten mit Niereninsuffizienz geeignet [14,35]. Bei gleichzeitiger Gabe mit CYP3A4 Inhibitoren oder Induktoren, kann die Metabolisierung von Fentanyl beeinflusst werden, weshalb die Dosis anzupassen ist sowie auf Nebenwirkungen geachtet werden sollte [37]. Die Ausscheidung der nach der Metabolisierung inaktiven Metaboliten sowie weniger als 10 % des intakten Fentanyl-Moleküls erfolgt über Urin und Stuhlgang [38]. Kontraindiziert ist Fentanyl nach Operationen am Gallengangsystem, bei respiratorischer Insuffizienz und obstruktiven Atemwegserkrankungen, Leberversagen sowie im Rahmen bekannter Unverträglichkeiten gegen Fentanyl, verwandte Substanzen oder gegen jene die hilfsweise für Verabreichung verwendet werden wie zum Beispiel Natriumchlorid oder Natriumhydroxid [37].

1.2.2 Sufentanil

Sufentanil, siehe Abbildung 8, ist ein Thiamylderivat von Fentanyl [4], hat im Vergleich eine um den Faktor 4,4 höhere μ -Rezeptoraffinität und erreicht dadurch eine stärkere Analgesie und hyposedative Wirkung [1]. Sufentanil weist eine 1.000-fache analgetische Potenz verglichen mit Morphin auf [2]. Die Applikation erfolgt parenteral oder transmukosal zur Allgemeinanästhesie sowie epidural in der Lokalanästhesie [39]. Seine Eliminationshalbwertszeit, siehe Tabelle 2, ist aufgrund der hohen Plasma-eiweißbindung und geringeren Gewebegängigkeit sowie einer hohen hepatischen Extraktionsrate deutlich kürzer im Vergleich zu Fentanyl [4], weshalb es zur postoperativen Anwendung weniger geeignet ist [39]. Durch die ebenfalls hohe Lipidlöslichkeit kann Sufentanil die Blut-Hirn-Schranke sehr schnell passieren. [4] Die Metabolisierung insbesondere zu Norsufentanil und N-Phenylpropanamid erfolgt wie bei Fentanyl mittels N- Dealkylierung durch CYP3A4 in der Leber, aber auch in Enterozyten des Dünndarms [14,38]. Ein Teil der Metabolisierung erfolgt allerdings auch über O-Demethylation zu Demethylsufentanil, welches ein Restaktivität von 10 % im Vergleich zu Sufentanil aufweist. Die Ausscheidung der Metaboliten erfolgt über den Urin. [38] Kontraindiziert ist Sufentanil bei Erkrankungen, bei denen eine Dämpfung der Atmung vermieden werden sollte und bei Überempfindlichkeit gegen den Wirkstoff, weitere Inhaltsstoffe oder gegen verwandte Opioide. In der Stillzeit kann das Stillen 24 Stunden nach der Verabreichung von Sufentanil wieder fortgeführt werden. Bezüglich der Applikationsform ist eine intravenöse Gabe bei akuten hepatischen Porphyrien und eine epidurale Verabreichung bei schweren Blutungen, Schock, Sepsis, Infektionen im Injektionsbereich sowie bei Gerinnungsstörungen und Behandlung mit Antikoagulanzen nicht indiziert. [3]

Tabelle 2: Pharmakokinetische Eigenschaften für Fentanyl und Sufentanil. Modifiziert nach Ippolito et al. (2016) [2]

| | Fentanyl | Sufentanil |
|---------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Maximaler Wirkeffekt | 4 – 5 min | 3 min |
| Wirkdauer | 20 – 30 min | 30 min |
| Clearance | 13 ml/kg/min | 13 ml/kg/min |
| Fettlöslichkeit | 816 | 1750 |
| Proteinbindung | 84,40 % | 92 % |
| Eliminationshalbwertszeit | 220 min | 64 min |
| Initialdosierung | 1 – 5 μ g/kg KG i.v. | 0,3 – 1 μ g/kg KG i.v. |
| Dosierung zur Aufrechterhaltung | 0,5 – 2,5 μ g/kg KG i.v. | 0,1 – 0,5 μ g/kg KG i.v. |

Die Angabe der Fettlöslichkeit erfolgt als Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient.

1.3 Hintergrund

In der AG der Klinik für Anästhesiologie der Universitätsmedizin Greifswald konnte Loperamid, ein strukturverwandtes Opioid von Fentanyl und Sufentanil, sowohl als nicht-selektiver Inhibitor von Aufnahmetransportern der *organic anion transporting polypeptides*-Familie (OATP) als auch als Substrat des Aufnahmetransporters OATP2B1 ermittelt werden ($K_m = 3 \mu\text{M}$, $v_{\text{max}} = 48 \text{ pmol} / \text{mg Protein} \times \text{min}$) [10]. Im Rahmen dieser Arbeit soll geprüft werden, ob Fentanyl und Sufentanil ebenfalls die Aktivität von Vertretern der OATP-Transporterfamilie beeinflussen können. Zur Untersuchung von Transportern gibt es bereits mehrere Modelle. Hierzu werden speziell klonierte *human embryonic kidney cells*, kurz HEK-Zellen, verwendet, welche die zu untersuchenden Transporter überexprimieren. Die in dieser Arbeit verwendeten HEK-pQCXIN::OATP1A2-Zellen wurden durch M. Keiser bereitgestellt. Zur Herstellung dieser wurde die SLCO1A2-Gensequenz (NM_134431.3) in den Expressionsvektor pcDNA3.1(+) (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Germany) eingebracht und wiederum in den retroviralen Vector pQCXIN (Takara Bio Europe/Clontech, *Saint-Germain-en-Laye*, Frankreich) kloniert. Das entstandene Plasmid pQCXIN::OATP1A2 wurde mithilfe des „Retroviraler Gentransfer und Expressions-Kit“ (Takara Bio Europe/Clontech, *Saint-Germain-en-Laye*, Frankreich) in HEK-293-Zellen stabil transfiziert. [40] Die verwendeten HEK-OATP1B1 Zellen wurden am Institut für Pharmakologie der Universität Greifswald generiert und validiert. Dazu wurde OATP1B1 (NM_006446.4) in den retroviralen Expressionsvektor pQCXIN (Clontech, *Saint-Germain-en-Laye*, Frankreich) eingebracht und in HEK-293-Zellen transfiziert. [41] Die Integration des Gens von Interesse erfolgt bei diesem Expressionsmodell an einem willkürlichen Platz in der Wirtszelle, wodurch die Expression und Funktionalität beeinflusst werden könnte. Da pQCXIN-stabil-transfizierte Zellen mit zunehmender Zeit in Kultur eine fluktuierende oder abnehmende Funktionalität zeigten, soll im Rahmen dieser Arbeit ein alternatives Zellmodell mit dem Plasmid pcDNA5/FRT::OATP erarbeitet werden, um Zelllinien mit einer langfristig stabileren und reproduzierbareren Überexpression von OATP zu erhalten.

2 Aufgabenstellung

Opioide werden in der Medizin insbesondere in der Anästhesie vielfältig eingesetzt. Dabei ist eine Variabilität in der Wirkung und in der Ausprägung der Nebenwirkungen bei jedem einzelnen Patienten zu beobachten [5,6], welche unter anderem durch die individuelle Ausstattung an Transportproteinen jedes Patienten begründet sein könnte. Grundlegend ist die Identifikation der am Opioidtransport beteiligten Transportproteine, welche die analgetische Wirkung an den Opioidrezeptoren im zentralen Nervensystem vermitteln. Damit Opioide ihren Wirkort erreichen, müssen sie diverse biologische Barrieren unter anderem mithilfe von Transportproteinen überwinden. Als erstes Ziel dieser Arbeit soll die Affinität von Fentanyl und Sufentanil zu OATP untersucht werden, um herauszufinden, ob OATP am Transport von diesen Opioiden beteiligt sind oder diesen beeinflussen. Ein *in vitro*-Zellmodell mit dem Expressionsvektor pcDNA5/FRT, ein bereits bekanntes Modell zur Untersuchung von Transportproteinen, soll in dieser Arbeit entwickelt werden. Vorarbeiten der AG der Klinik für Anästhesiologie der Universitätsmedizin Greifswald zeigten, dass Zellen mit dem bisher genutzten Expressionsvektor mit pQCXIN mit zunehmender Zeit in Kultur eine fluktuierende oder abnehmende Funktionalität aufwiesen. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist die Erarbeitung eines alternativen Zellmodells zur Generierung einer Zelllinie mit einer langfristig stabileren und reproduzierbareren Überexpression von OATP.

2.1 Effekt der Opioide Fentanyl & Sufentanil auf OATP

Fentanyl, Sufentanil und Loperamid sind strukturverwandte Opioide. In bisherigen Untersuchungen der AG der Klinik für Anästhesiologie der Universitätsmedizin Greifswald konnte Loperamid als nicht-selektiver Inhibitor von diversen Aufnahmetransportern der OATP-Familie sowie als Substrat des Aufnahmetransporters OATP2B1 ermittelt werden [10]. Aufgrund dieser Daten stellt sich die Frage, ob strukturverwandte Medikamente mit dem Strukturelement Piperidin wie Fentanyl und Sufentanil [39,42] ebenfalls eine Affinität zu OATP aufweisen und deren Substrataufnahme beeinflussen. Trotz der hohen Lipophilie beider Opioide, welche einen hohen Anteil an Diffusion bei der Passage von Zellmembranen vermuten lässt [4], könnte unter anderem eine Beteiligung von OATP an der Passage der Blut-Hirn-Schranke die inter- und intraindividuelle Variabilität in der Wirkung und den Nebenwirkungen erklären. Auch Elkiweri, Zhang *et al.* (2009) postulierten einen

aktiven Transport von Fentanyl durch OATP [43]. Zur Ermittlung der Affinität von Fentanyl und Sufentanil zu OATP sollen nach vorheriger Funktionskontrolle der HEK-Zelllinien (stabil transfiziert mit pQCXIN::OATP1A2, -1B1) Wettbewerbsversuche durchgeführt werden. Bei Nachweis einer Konkurrenz sollen Aufnahmeversuche erfolgen, um zu untersuchen, ob diese Opiode auch Substrate der getesteten OATP darstellen. Bei gegebenem Transport sind zeit- und konzentrationsabhängige Aufnahmeversuche zur Ermittlung von K_m und v_{max} vorgesehen. Die Funktionskontrolle mit Fluoreszenz Rhodamin-123 soll parallel zur Funktionskontrolle mit 3H -markiertem Referenzsubstrat bei den Aufnahmeassay-Screenings als nicht-radioaktive Alternative testweise angewandt werden. [44]

2.2 Generierung eines *in vitro*-Zellmodells für die Überexpression von OATP1A2 durch stabile Transfektion mittels Flp-In™-System

Die Herstellung reproduzierbarer Zellen mit einer gleichbleibend hohen Überexpression des OATP1A2-Transporters ist Ziel der Generierung eines OATP1A2-überexprimierenden Zellmodells mithilfe eines Expressionsvektors des Flp-In™-Systems (Invitrogen). Das Flp-In™-System wird in Abschnitt 3.7 näher erläutert. Die Untersuchungen zu diesem Teil der Arbeit erfolgen in Zusammenarbeit mit der AG von Prof. Dr. Mladen V. Tzvetkov des Institutes für Pharmakologie der Universität Greifswald. Zur Herstellung stabil transfizierter T-REx™-pcDNA5/FRT::OATP1A2 Zellen sollen durch 3 verschiedene Klonierungsstrategien 2 Varianten des Plasmides pcDNA5/FRT::OATP1A2 erzeugt werden, siehe Tabelle 12. Ausgehend von Vorarbeiten des Institutes für Pharmakologie der Universität Greifswald soll die cDNA von OATP1A2 in einen pcDNA™5/FRT Vektor hineinkloniert und somit die Plasmide pcDNA5/FRT::OATP1A2 Variante 1 und 2 erstellt werden. Es sollen transiente und stabile Transfektionen mit diesen neu klonierten Plasmiden, sowie einem bereitgestellten Plasmid pcDNA5/FRT::OATP1A2 (Variante 3) durchgeführt werden. Des Weiteren ist eine Validierung der stabil transfizierten T-REx™-pcDNA5/FRT::OATP1A2 mittels verschiedener PCR, Fluoreszenz-Mikroskopie sowie Sequenzierung geplant.

3 Methoden

3.1 Verwendete Zellen

In den *in vitro*-Modellen zur Untersuchung der Affinität der Opiode Fentanyl und Sufentanil zu den Transportern der OATP-Familie werden stabil transfizierte HEK-pQCXIN::OATP1A2, -1B1 Zellen sowie als Kontrollzellen HEK-pQCXIN verwendet. Diese Zellen wurden am Institut für Pharmakologie der Universität Greifswald aus HEK-293-Zellen generiert und validiert [41]. Sie exprimieren eine große Anzahl an Transportproteinen und weisen Signalwege ähnlich der natürlichen Situation auf. Die 293-human embryonic kidney cells (HEK-293-Zellen) sind menschliche embryonale Nierenzellen. Zu untersuchende Proteine sind entweder bereits in der HEK-293-Zelle enthalten oder können mittels Kotransfektion eines Hilfsproteins eingebracht werden. Somit sind diese Zellen für die Untersuchung pharmakologischer Eigenschaften von vielen Transportern oder Rezeptoren geeignet. HEK-293 Zellen wachsen zuverlässig und gleichartig für etwa 20-30 Passagen, bevor ihre Morphologie, Wachstumsrate und Transfektionsstabilität nachlässt. Gesunde HEK-293-Zellen wachsen schnell und neigen dazu, Gruppen zu bilden, weshalb sie rechtzeitig gesplittet werden müssen. [45] Die Arbeiten mit den Zellkulturen werden stets unter der Sicherheitswerkbank durchgeführt, um Kontaminationen zu vermeiden.

Für die Generierung des *in vitro*-Zellmodells für die Überexpression von OATP1A2 mit dem Expressionsvektor pcDNATM5/FRT werden Flp-InTM T-RExTM-293 Zellen verwendet, welche von HEK-293-Zellen abstammen. [46] Diese Zellen sind durch den Hersteller bereits mit dem Vektor pFRT/lacZeo vortransfiziert und enthalten eine einfach integrierte Flp Recombination Target- Sequenz (FRT) sowie das lacZ-ZeocinTM Fusionsgen. Dieses vermittelt die ZeocinTM-Resistenz und die β -Galaktosidase-Aktivität und wird durch den *SV40 early promotor* kontrolliert. [47] Eine Auflistung der verwendeten Zellen befindet sich im Anhang in Abschnitt 8.1.1.

3.2 Zellkultivierung T-RExTM-293

Auftauen von T-RExTM-pcDNA5/FRT::OATP1A2

Die kryokonservierten Zellen werden aus dem Gefrierbehälter entnommen und im Wasserbad aufgetaut. Die Zellsuspension wird aus dem Kryoröhrchen in 5 ml DMEM (10 % FCS; 1 % P/S) aufgenommen und 3 min bei 700 x g und RT zentrifugiert.

Das Medium wird entfernt, das Zellpellet in 6 ml neuem Medium resuspendiert und die Zellsuspension in eine T25-Zellkulturflasche überführt. Die Zellen werden bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchte inkubiert.

Einfrieren von T-REx™-pcDNA5/FRT::OATP1A2

Die Zellen werden mittels Pipette mit Medium aus dem Well oder aus der Flasche vom Boden abgelöst und die Zellsuspension vollständig in ein Falcon überführt. Das Well/ die Flasche wird mit 2 ml warmem DPBS gespült und dieses ebenfalls in das Falcon gegeben. Nach 3 min Zentrifugation bei 300 x g wird der Überstand entfernt. Das Zellpellet wird in 1 ml warmem FCS (10 % DMSO) aufgenommen und in das Kryoröhrchen überführt, welches im Gefrierbehälter bei -80 °C für einen Tag gelagert wird. Langfristig werden die kryokonservierten Zellen in Stickstoff gelagert.

Splitten von Zellkulturen von T-REx™-293

Der Überstand wird entfernt und die Zellen werden in 10 ml DMEM (4,5 g/L D-Glucose, L-Glutamin, Pyruvate (*Thermo Fisher*); 10 % FCS; 1 % P/S) aufgenommen. Je nach Konfluenz werden die Zellen in bestimmten Verhältnissen in neuem Medium weitergeführt, siehe Tabelle 3. Somit entstehen beispielsweise bei dem Verhältnis von 1 : 2 aus einer Zellkultur zwei neue Zellkulturen. Durch eine Nord-Süd/Ost-West-Bewegung werden die Zellen verteilt.

Tabelle 3: Verhältnis der Verdünnung beim Splitten für T75-Flaschen

| Verhältnis | Zellsuspension [ml] | neues Medium [ml] |
|------------|---------------------|-------------------|
| 1 : 2 | 5 | 15 |
| 1 : 3 | 3,3 | 16,7 |
| 1 : 4 | 2,5 | 17,5 |
| 1 : 5 | 2 | 18 |
| 1 : 6 | 1,6 | 18,3 |
| 1 : 7 | 1,4 | 18,6 |
| 1 : 8 | 1,25 | 18,75 |
| 1 : 9 | 1,11 | 18,89 |

3.2.1 Mykoplasmen-rT-PCR von T-REx™-293 Zellen

Jede Zellkultur wurde zur Qualitätssicherung einmal pro Monat mittels Mykoplasmen-rT-PCR von dem Institut für Pharmakologie der Universität Greifswald auf Mykoplasmen-Kontamination untersucht.

3.3 Zellkultivierung HEK-pQCXIN

Auftauen von HEK-pQCXIN::OATP

Die bei -80 °C gelagerten Zellen werden nach der Entnahme auf Trockeneis gelagert. In eine T25-Zellkulturflasche werden 5 ml HEK-Medium (Ansatz siehe Tabelle 4) vorgelegt. Die im Wasserbad bei 37 °C aufgetauten Zellen werden in 7-10 ml PBS aufgenommen und 2 min bei 4 °C und 1.800 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird entfernt, das Pellet in 5 ml HEK-Nährmedium homogenisiert und in die T25-Zellkulturflasche überführt. Die Zellen werden bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchte inkubiert.

Tabelle 4: Rezeptur HEK-Zellkulturmedium

| Zutaten | Konzentration/ Menge |
|-------------------------------------|----------------------|
| FKS Sera Plus | 10 % |
| L-Glutamin 200 mM | 2 mM |
| MEM NEAA | 2 nM |
| MEM-Medium <i>with Earles Salts</i> | 500 ml |

Plasmocin-Behandlung von HEK-pQCXIN::OATP

Um einer Kontamination mit Mykoplasmen vorzubeugen, wird an Tag 1 nach dem Auftauen 1 ml vom Überstand der Zellkultur abgenommen sowie 10 µl Plasmocin / 10 ml Nährmedium in die Zellkulturflasche gegeben. An Tag 4 nach dem Auftauen erfolgt erneut eine Probenabnahme und ein Splitten der Zellkultur ohne Plasmocin-Behandlung. Die zweite Plasmocin-Behandlung sowie ein weiteres Splitten der Zellkultur folgen an Tag 7 nach dem Auftauen. Anschließend wird alle 14 Tage eine Mykoplasmen-Kontrolle durchgeführt.

Splitten von Zellkulturen von HEK-pQCXIN::OATP

Sind die Zellen konfluent, müssen sie gesplittet werden, um das weitere Wachstum der Zellen zu ermöglichen. Der Zellkulturüberstand wird entfernt und die Zellen mit 2,5 ml / T25-Flasche oder 5 ml / T75-Flasche PBS (DPBS w/o Ca, Mg) gewaschen. Die Waschlösung wird entfernt. Die Zellen werden mit 1 ml Trypsin vom Flaschenboden gelöst. Zum Abstoppen der Enzymreaktion werden die Zellen in 9 ml HEK-Medium homogenisiert und je nach Konfluenz in bestimmten Verhältnissen in neuem Medium weitergeführt, siehe Tabelle 3. Je nach gewähltem Verhältnis wird der angegebene Anteil der 10-ml-Zellsuspension mit neuem HEK-Medium inklusive 0,5 mg/ml Geneticin (G-418) aufgefüllt. Um einen hierdurch überdeckten

Bakterienbefall zu vermeiden, wird Geneticin (G-418) erst mit der zweiten Plasmocin-Behandlung zugegeben.

Für das Umsetzen beim Wechsel der Zellkulturflaschen werden die Zellen wie beim Splitten gewaschen, trypsinisiert und in HEK-Medium homogenisiert. Je nach Konfluenz werden die Zellen gemäß Tabelle 3 in HEK-Medium mit 0,5 mg/ml Geneticin (G-418) weitergeführt.

Einfrieren von HEK-pQCXIN::OATP Zellen

Die Zellen werden wie beim Splitten gewaschen und trypsinisiert sowie homogenisiert in 15-ml-Falcons überführt. Die Zellsuspension wird auf $1,5 \times 10^6$ Zellen / ml mit PBS verdünnt. Nach der Zentrifugation für 1,5 min bei 4 °C und 1.800 rpm wird der Überstand entfernt und mit eisgekühltem Einfriermedium (FKS; 10 % DMSO) resuspendiert. Es wird 1 ml Zellsuspension á $1,5 \times 10^6$ Zellen / ml Einfriermedium auf Kryoröhrchen verteilt, welche im Gefrierbehälter bei -80 °C für einen Tag gelagert werden. Langfristig werden die kryokonservierten Zellen in Stickstoff gelagert.

3.3.1 Mykoplasmen-Schnelltest von HEK-pQCXIN::OATP Zellen

Der Mykoplasmen-Nachweis wurde nach Herstellerangaben zunächst mit dem „*Mycoplasma Detection Kit- Quick Test*“ (Biotool LCC) durchgeführt. Mangels Verfügbarkeit wurde später das „*MycoBlue Mycoplasma Detector*“ (Vazyme Biotech Co.) verwendet. Beispiele für Ergebnisse der genannten Tests sind in Abbildung 9 aufgeführt.

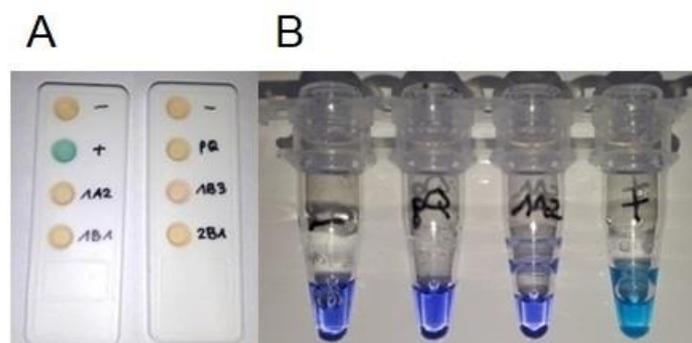


Abbildung 9: Verwendete Mykoplasmen-Schnelltestsysteme. A: *Mycoplasma Detection Kit- Quick Test* (Biotool LCC), B: *MycoBlue Mycoplasma Detector* (Vazyme Biotech Co.)

3.3.2 Mykoplasmen-rT-PCR von HEK-pQCXIN::OATP Zellen

Die Mykoplasmen-rT-PCR erfolgt nach den Herstellerangaben des *PCR Mycoplasma Test Kit I/C* (PromoCell). Nach der Probenvorbereitung können diese eine Woche bei 2-8 °C oder langfristig bei -20 °C gelagert werden. Die Reaktionslösungen werden nach dem Pipettierschema aus Tabelle 5 mit den im Kit enthaltenen Zutaten angesetzt. Die Reaktionsansätze werden im *T100™ Thermal Cycler* (Bio-Rad Laboratories) gemäß Tabelle 6 inkubiert. Die Auswertung erfolgt über eine Gelelektrophorese mit *SYBR® Safe DNA Gel Stain*. Fällt die Mykoplasmen-rT-PCR für eine Zellgruppe positiv aus, wie zum Beispiel 1B3 in Abbildung 10, wird diese Zellkultur mit Lysispuffer I (Transportversuche) versetzt und verworfen.

Tabelle 5: Pipettierschema Mykoplasmen-rT-PCR von HEK-pQCXIN::OATP Zellen

| Zutat | Probe | Positiv-Kontrolle | Negativ-Kontrolle |
|--------------------|----------|-------------------|-------------------|
| Rehydrationspuffer | 23 µl | 23 µl | 23 µl |
| Probe | 2 µl (1) | - | - |
| DNA freies Wasser | - | 2 µl | - |
| Frisches Medium | - | - | 2 µl |

Tabelle 6: PCR-Konditionen Mykoplasmen-PCR

| Grad [°C] | Zeit |
|-----------|-------|
| 95 | 2 min |
| 94 | 30 s |
| 55 | 30 s |
| 72 | 40 s |

} 40 x

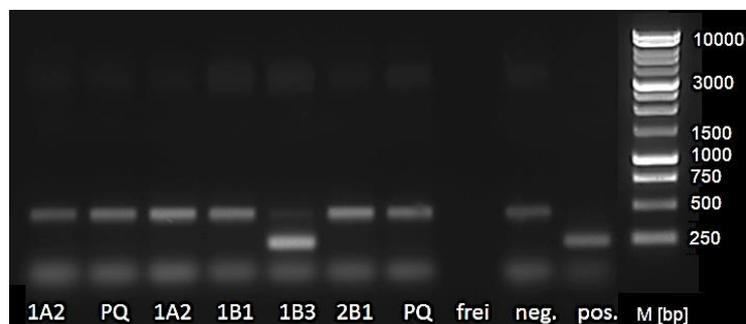


Abbildung 10: Exemplarische Darstellung der Gelelektrophorese nach Mykoplasmen-rT-PCR mithilfe des *PCR Mycoplasma Test Kit I/C* (PromoCell): Eine Mykoplasmenkontamination liegt bei Sichtbarkeit einer Bande bei 250 bp (hier 1B3) vor. Ein negatives Testergebnis zeigt eine Bande von 500 bp.

3.4 Bakterienkultivierung

Zur Vervielfältigung von Plasmiden werden *One Shot® TOP10 Electrocomp™* E. coli verwendet. Die Transformation von Plasmiden in Bakterien wird in Abschnitt 3.6.4 erläutert. Diese können mit entsprechenden molekularbiologischen Methoden

(siehe Abschnitt 3.5) extrahiert und weiterverarbeitet werden. Die folgenden Arbeiten mit den Bakterien werden unter der Sicherheitswerkbank durchgeführt. Die Bakterien werden in LB-Medium (Flüssigkultur) oder auf Agarplatten mit Ampicillin kultiviert.

Herstellung von LB-Medium

LB-Medium dient den Bakterien als Nährlösung. Die Zutaten werden entsprechend Tabelle 7 angesetzt, autoklaviert und bei 4 °C gelagert.

Tabelle 7: Rezeptur LB-Medium

| Zutaten | Menge |
|-------------|----------|
| Trypton | 10 g |
| Hefeextrakt | 5 g |
| NaCl | 5 g |
| A. bidest. | 1.000 ml |

Herstellung von Agarplatten

Es werden 4,2 g Agar in 300 ml LB-Medium gelöst und autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf unter 60 °C werden 200 µg/ml Ampicillin (Stock: 50 mg/ml in Wasser gelöst) hinzugegeben. Die fertige Lösung wird in Petrischalen gegossen und verfestigt sich bei Raumtemperatur. Die Lagerung erfolgt bei 4 °C.

Anzucht auf Agarplatten

Bei -80 °C gelagerte E. coli Bakterien werden zur Anzucht auf Agarplatten mit Ampicillin mit einer sterilen Pipettenspitze durch einmaliges Eintauchen in das unaufgetaute Bakteriensuspension ausplattiert. Die Agarplatten werden über Nacht im Inkubator bei 37 °C gelagert. Sie werden mit Parafilm umwickelt und sind einen Monat bei 4 °C haltbar.

Flüssigkulturen ansetzen

Von der Agarplatte werden zwei 5-ml-Flüssigkulturen angesetzt. Je ein Klon wird mit einer sterilen Pipettenspitze von der Agarplatte aufgenommen und in ein Falcon mit 5 ml LB-Medium und Ampicillin (1 : 500) gegeben. Alternativ können die Bakterien direkt aus der -80 °C Lagerung in die Flüssigkultur gebracht werden. Die Flüssigkulturen werden mit gelöstem Deckel im 45° Winkel bei 250 rpm über Nacht (14-16 Stunden) inkubiert.

Glycerolstock herstellen

Ausgehend von einer Flüssigkultur werden 600 µl 50 %iges Glycerol steril in ein Reaktionsgefäß vorgelegt und 600 µl der Bakterienübernachtskultur hinzugegeben. Die Lagerung erfolgt bei -80 °C.

3.5 Molekularbiologische Methoden

3.5.1 Gelelektrophorese mit Ethidiumbromid / SYBR® Safe DNA Gel Stain

Mithilfe der Gelelektrophorese können DNA-Fragmente beispielsweise nach einem Kontroll- oder Restriktionsverdau (siehe Abschnitt 3.5.5 und 3.6.2) unter ultraviolettem Licht in Form von Banden sichtbar gemacht werden. Um die Anzahl der Basenpaare des DNA-Fragmentes, also die Fragmentgröße, einschätzen zu können, wird ein Molekulargewichtsmarker verwendet, dessen Fragmentgrößen bekannt sind. Dies macht einen Vergleich verschiedener Fragmente hinsichtlich der ungefähren Anzahl der Basenpaare sowie der DNA-Menge möglich. Im Rahmen dieser Arbeit werden zwei Gelelektrophorese-Verfahren angewandt, welche im Folgenden erläutert werden.

Gelelektrophorese mit Ethidiumbromid

Für ein 0,8 %iges Agarosegel wird die Agarose mit 100 ml 1x TBE-Puffer (Tabelle 8) und 50 µg Ethidiumbromid angesetzt. Das Gel wird in einem Gelschlitten unter dem Abzug gegossen. Als Kontrolle werden 10 µl von der unverdauten Plasmid-DNA sowie 2 µl *DNA Loading Dye* vermengt. Die verdauten Proben werden ebenfalls mit 2 µl *DNA Loading Dye* versetzt. Die Elektrophoresekammer mit dem Gel wird mit ausreichend 1x TBE-Puffer gefüllt. Es werden 12 µl jeder Probe und der Kontrolle aufgetragen sowie 6 µl 1-kB-Molekulargewichtsmarker. Der Gellauf wird bei 120 V und 80-90 mA 30-45 min durchgeführt.

Tabelle 8: Rezeptur 1x TBE-Puffer (pH 8,3)

| Zutaten | Konzentration |
|--------------------|---------------|
| Borsäure | 100 mM |
| EDTA-Natrium | 3 mM |
| TRIS, Trizma® Base | 100 mM |

Gelelektrophorese mit SYBR® Safe DNA Gel Stain

Mit einer Verdünnung von 1 : 10.000 werden *SYBR® Safe DNA Gel Stain* und 1 g Agarose in 100 ml TAE-Puffer, siehe Tabelle 9, gelöst. Die Agaroselösung wird

luftblasenfrei in den Gelschlitzen gegossen. Das ausgehärtete Gel wird in die mit TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt. Analog zur Gelelektrophorese mit Ethidiumbromid werden die PCR-Proben sowie die Positiv- bzw. Negativ-Kontrolle und ein 1-kB-Molekulargewichtsmarker auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt für 136 min bei 80 V. Die Auswertung am „Octopus QPLEX“ wird mit der Software „Intras“ und folgenden Einstellungen durchgeführt: *GDye100 LED-blue, Stage 1, Bining 1x1, automatic shutter time.*

Tabelle 9: Rezeptur TAE-Puffer (pH 8)

| Zutaten | Konzentration |
|------------------------------------|---------------|
| Ethylendiamintetraessigsäure, EDTA | 1 mM |
| Tris HCL > 99,9 % | 40 mM |

Mit Essigsäure auf pH 8 einstellen.

3.5.2 Gelextraktion

Zur Herstellung der Varianten 1 + 2 von pcDNA5/FRT::OATP1A2 werden im Rahmen dieser Arbeit die DNA-Fragmente von Interesse aus dem Agarosegel nach erfolgter Gelelektrophorese extrahiert, welche zuvor mittels präparativem Restriktionsverdau hergestellt wurden. Der Gelabschnitt mit der DNA-Bande wird mit einem Skalpell unter ultraviolettem Licht ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die enthaltene DNA aus dem Gelfragment wird am „QIA cube“ nach Herstellerangaben extrahiert.

3.5.3 Isolation von Plasmid-DNA mittels alkalischer Lyse (Mini-Präp)

Um Plasmide nach der Vervielfältigung aus den Bakterien einer Flüssigkultur zu isolieren wird eine Mini-Präparation (Mini-Präp) durchgeführt. Werden größere Mengen an Plasmiden beispielsweise für eine Transfektion in Zellen benötigt, wird eine Midi-Präparation (siehe Abschnitt 3.5.4) bevorzugt. Im Rahmen dieser Arbeit wird die Mini-Präparation zur Isolation der Plasmide pcDNA™5/FRT sowie pcDNA5/FRT::OATP1A2 Variante 0 - 3 in Vorbereitung auf die transiente Transfektion verwendet.

Die Plasmid-DNA wird mittels alkalischer Lyse aus den Bakterien extrahiert und durch Reinigung mit Chloroform/Isoamylalkohol und Isopropanol von dem Bakteriengenom isoliert. Die folgenden Arbeitsschritte werden unter der Sicherheitswerkbank durchgeführt. Zur Sicherung der Klone werden diese vorab mit je 4 µl der üN-Kulturen (5 ml)

auf Agarplatten mit Ampicillin ausplattiert. Die üN-Kulturen (5 ml) werden bei 2.500 x g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen, das entstandene Pellet in 250 µl Resuspensionspuffer P1 (50 nM Tris HCl, 10 nM EDTA, 100 µg/ml RNase A; pH 8) und in ein neues 2-ml-Reaktionsgefäß überführt. Alle folgenden Arbeitsschritte werden außerhalb der Sicherheitswerkbank durchgeführt. Für die alkalische Lyse werden 250 µl Lysispuffer P2 (200 nM NaOH, 1 % SDS/Natriumlaurylsulfat) hinzugegeben und 6-8 Mal vorsichtig invertiert. Zum Abstoppen der alkalischen Lyse werden 350 µl Neutralisationspuffer P3 (Kaliumacetat 3 M; pH 5,5) zugegeben und der Inhalt 6-8 Mal kräftig invertiert. Dabei fällt ein weißes Präzipitat aus. Das Reaktionsgefäß wird nun 10 min in der „Heraeus Pico21“ bei 21.100 x g und RT zentrifugiert. Der Überstand wird ohne Reste des Pellets in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Unter dem Abzug werden 500 µl Chloroform-Isoamylalkohol (Verhältnis 24 : 1) hinzugegeben. Diese Emulsion wird kräftig geschüttelt und 10 min in der „Heraeus Pico21“ bei 21.100 x g und RT zentrifugiert. Unter dem Abzug werden 700 µl der oberen Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt, 650 µl eisgekühltes Isopropanol zugegeben, ohne die Interphase zu berühren und der Inhalt durch kräftiges Schütteln gemischt. Die Probe wird 10-15 min auf Eis gestellt und für 15 min in der „Himac CT15 RE“ bei 21.500 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen. Das Pellet wird mit 750 µl 70 %igem Ethanol gewaschen und das Zentrifugieren in der „Himac CT15 RE“ wiederholt. Der Überstand wird abpipettiert und der Waschvorgang sowie das Zentrifugieren unter gleichen Bedingungen wiederholt. Nach Abpipettieren des Überstandes wird das Pellet bei 37 °C im Heizblock mit geöffnetem Gefäßdeckel etwa 30 min getrocknet. Das Pellet wird in 50 µl autoklaviertem Wasser gelöst und 30 min bei 37 °C im Heizblock inkubiert. Die Lagerung der extrahierten Plasmid-DNA erfolgt kurzfristig bei 4 °C und längerfristig bei -20 °C.

3.5.4 Isolation von Plasmid DNA mittels Festphasenextraktion (Midi-Präp)

Da für stabile Transfektionen größere Mengen an Plasmiden benötigt werden, wird zur Isolation der Plasmide aus Bakterien in Flüssigkultur eine Midi-Präparation (Midi-Präp) durchgeführt. Die Midi-Präp wird im Rahmen dieser Arbeit zur Isolation der Plasmide pcDNA5/FRT, pGFP-tpz und pQCXIN:OATP1A2 sowie pcDNA5/FRT::OATP1A2 Variante 1 - 3 in Vorbereitung auf die stabile Transfektion angewendet.

Ausgehend von einer bakteriellen 5 ml-Flüssigkultur wird die Bakterienhauptkultur (ca. 30 ml) durch Verdünnen von 1 : 1000 mit LB-Medium und 100 µg/ml Ampicillin (Stock: 50 mg/ml in Wasser gelöst) in autoklavierten Flaschen angesetzt und 12-16 Stunden bei 37 °C und 245 rpm mit angelösten Deckeln inkubiert. An Tag 2 folgt die Plasmidisolierung mit dem „Qiagen Plasmid Plus Midi Kit (100)“. Es wird das Protokoll des Instituts für Pharmakologie Universität Greifswald verwendet. Aufgrund einzelner Abweichungen zu den Herstellerangaben des verwendeten Kits wird der Ablauf im Folgenden kurz erläutert. Unter der Sicherheitswerkbank wird die Bakterienhauptkultur in ein 50 ml Falcon überführt und bei 4700 rpm für 20 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 2 ml Puffer P1 (RNase A, steril) resuspendiert. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgen außerhalb der Sicherheitswerkbank. Die Lysereaktion erfolgt gemäß Herstellerangaben des verwendeten Kits. Das Bakterienlysat wird in den *QIAfilter cartridge*, siehe Abbildung 11, gegeben, 3 min bei RT inkubiert, mit dem Kolben langsam durch den Filter gedrückt und in einem 50 ml-Falcon gesammelt. Zu dem Lysat werden 2 ml Puffer BB hinzugegeben, 4-6 Mal invertiert und die Flüssigkeit auf die Säule in den Aufsatz (*tube extender*) gegeben, welche an die Vakuumpumpe angeschlossen ist, siehe Abbildung 11. Wenn das Lysat alle Säulen durchlaufen hat, werden je 0,7 ml Puffer PE hinzugegeben und die Säulen ohne Deckel 1 min bei 13.000-16.000 g bei RT zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen und das Zentrifugieren wiederholt. Nach Überführen der Säule in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß werden 100 µl Puffer EB hinzugegeben, die Lösung für 5 min bei RT inkubiert und anschließend erneut 1 min bei 13.000-16.000 g bei RT zentrifugiert. Die Konzentration der Plasmid-DNA wird mittels NanoDrop Spektralphotometer ermittelt. Die Lagerung erfolgt bei -20 °C.



Abbildung 11: Versuchsaufbau Midi-Präp. A: *QIAfilter cartridge*, B: Biometra MP86 Membran Vakuumpumpe mit VM20 Vacuum Manifold, C: Aufbau des Säulenaufsatzes

3.5.5 Plasmid-DNA Kontrollverdau

Ein enzymatischer Kontrollverdau dient der Verifizierung des Plasmidaufbaus und der Größe. Die Enzyme erkennen jeweils spezifische Basenabfolgen, an denen eine Durchtrennung der DNA-Sequenz erfolgt. Je nach verwendetem Enzym entstehen dabei ein oder mehrere Fragmente. Im Rahmen dieser Arbeit wird ein Plasmid-DNA-Kontrollverdau von den Plasmiden pcDNA5/FRT::OATP1A2 Variante 1 und 2, pcDNA5/FRT, pGFP-tpz und pcDNA5/FRT::hOCT1_FLAG durchgeführt.

Der Kontrollverdau erfolgt stets mit einem Verdauansatz je Enzym. Die Ansätze werden entsprechend der Tabelle 10 für jede Probe hergestellt. Je nach verwendetem Enzym werden spezifische Puffer benötigt, siehe Tabelle 11. Je Probe werden 9 µl Ansatz mit 1 µl DNA-Probe versetzt und für eine Stunde im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Anschließend wird eine Gelelektrophorese mit Ethidiumbromid durchgeführt.

Tabelle 10: Ansatz Plasmid-DNA-Kontrollverdau je Probe

| Zutaten | Master Mix |
|-----------------|------------|
| Puffer | 1 µl |
| <i>A. dest.</i> | 7 µl |
| Enzym | 1 µl |
| Gesamt | 9 µl |

Tabelle 11: Plasmid-DNA Kontrollverdau: Enzyme und Puffer

| Enzym | Puffer |
|-------------------|--------------|
| HindIII (10 U/µL) | Puffer R |
| EcoRI (10 U/µL) | Puffer EcoRI |
| Bam HI (20 U/µL) | NEBuffer 3.1 |

3.5.6 Mikrovolumen-Proteinkonzentrationsbestimmung

Um beispielsweise vor einer Transformation von Plasmiden in Bakterien oder vor einer Transfektion von Plasmiden in Zellen die Höhe des DNA-Gehalts in der jeweiligen Probe zu quantifizieren, werden Mikrovolumen-Proteinkonzentrationsbestimmungen durchgeführt. Die Messung der Proteinkonzentration erfolgt nach Herstellerangaben des *NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer* mit der zugehörigen PC-Software „ND1000V3.8.1“ und wird in ng/µl angegeben.

3.6 Klonierungsmethoden

Zur Herstellung stabil transfizierter T-REx™-pcDNA5/FRT::OATP1A2 werden im Rahmen von drei Klonierungsstrategien zwei Plasmide hergestellt, siehe Tabelle 12. Zur Generierung dieser Plasmide werden die im Folgenden dargestellten Methoden angewendet.

Tabelle 12: Klonierungsstrategien

| Bezeichnung | Klonierungsstrategien | Quelle |
|--------------------------------|---|--|
| pcDNA5/FRT::OATP1A2 Variante 1 | Umklonierung pcDNA5/FRT::OATP1A2 Variante 0 | AG Prof. Dr. M. Tzvetkov, A. Bauer, Institut für Pharmakologie der Universität Greifswald |
| pcDNA5/FRT::OATP1A2 Variante 2 | Vektor von pcDNA5/FRT::hOCT1_FLAG + Insert OATP1A2 aus Variante 1 | Im Rahmen dieser Arbeit erstellt. |
| pcDNA5/FRT::OATP1A2 Variante 3 | Vorgefertigtes Plasmid | Prof. Dr. Y. Hagos, Göttingen |

3.6.1 PCR

Im Rahmen dieser Arbeit wird im Vorfeld der PCR von pcDNA5/FRT::OATP1A2 (Variante 0) mit den Primern OATP1A2_EcoRV_rev und OATP1A2_KpnI_for eine Gradient-PCR zur Ermittlung der idealen Annealing-Temperatur (Primerhybridisierung) durchgeführt. Die Durchführung einer Sequenzierungs-PCR im Rahmen einer Sequenzanalyse wird im Abschnitt 3.6.5 gesondert erläutert.

Für die Gradient-PCR werden zwei 50 µl Master Mix entsprechend Tabelle 13 mit dem *KOD Hot Start DNA Polymerase Kit* (Sigma) angesetzt. Die KOD Polymerase wird als letzte hinzugegeben. Je Ansatz werden 12 nummerierte Reaktionsgefäße bereitgestellt. Die Proben-DNA wird den beiden Master Mix zugegeben und je 10 µl von beiden Ansätzen (+Q/-Q) werden in die jeweilige Reaktionsgefäß-Reihe pipettiert. Dabei sind nur die Reaktionsgefäße (RG's) der Nummern 1, 4, 6, 8, 12 zu befüllen. Die PCR wird unter den in Tabelle 14 dargestellten PCR-Konditionen durchgeführt. Mittels Gelelektrophorese mit Ethidiumbromid wird das PCR-Ergebnis ausgewertet.

Nach Ermittlung der optimalen Annealing-Temperatur von 55 °C wird eine PCR von pcDNA5/FRT::OATP1A2 (Variante 0) mit den Primern OATP1A2_EcoRV_rev und OATP1A2_KpnI_for durchgeführt. Es werden zwei 50 µl -Q Master Mix entsprechend Tabelle 13 (Master Mix 2) angesetzt, 2 µl DNA zugegeben und je 25 µl Master Mix (-Q) in Reaktionsgefäße pipettiert. Die PCR wird unter den in Tabelle 15 dargestellten

PCR-Konditionen durchgeführt. Mittels Gelelektrophorese mit Ethidiumbromid wird das PCR-Ergebnis beurteilt.

Tabelle 13: Pipettierschema Master Mix für eine PCR

| Zutaten | Master Mix 1 (+Q) | Master Mix 2 (-Q) |
|---------------------------|-------------------|-------------------|
| <i>A. dest.</i> | 19,3 µl | 31,3 µl |
| Q-Solution (Qiagen) | 12 µl | 0 µl |
| 10x KOD Buffer | 6 µl | 6 µl |
| dNTPs (2 mM) | 6 µl | 6 µl |
| MgSO ₄ (25 mM) | 2,45 µl | 2,45 µl |
| 5'-Primer (10 µM) | 1,5 µl | 1,5 µl |
| 3'-Primer (10 µM) | 1,5 µl | 1,5 µl |
| KOD Polymerase | 1,25 µl | 1,25 µl |
| Gesamtvolumen | 50 µl | 50 µl |
| DNA Probe | 2 µl | 2 µl |

Tabelle 14: Konditionen Gradient-PCR

| Grad [°C] | Zeit |
|-----------------|--------|
| 95 | 2 min |
| 95 | 30 s |
| 50 (RG's 1,2) | 30 s |
| 53,2 (RG's 3,4) | 30 s |
| 58 (RG's 5,6) | 30 s |
| 61,8 (RG's 7,8) | 30 s |
| 70 (RG's 11,12) | 30 s |
| 72 | 2 min |
| 72 | 10 min |

} 35x

Tabelle 15: PCR-Konditionen

| Phase | Grad [°C] | Zeit |
|-------------------|-----------|--------|
| Denaturierung | 95 | 2 min |
| Denaturierung | 95 | 30 s |
| Annealing | 55 | 30 s |
| Elongation | 72 | 2 min |
| Finale Elongation | 72 | 10 min |

} 35x

3.6.2 Präparativer Restriktionsverdau

Der Präparative Restriktionsverdau wird im Zuge der Herstellung der Plasmide pcDNA5/FRT::OATP1A2 Variante 1 und 2 verwendet, um die OATP1A2-Gensequenz zu isolieren und den Expressionsvektor auf die Insertion von OATP1A2 vorzubereiten. Eine detaillierte Beschreibung der Plasmidherstellung beider Varianten ist in Abschnitt 3.7.1 aufgeführt.

Je nach verwendetem Enzym werden die Ansätze für das Insert und den Vektor entsprechend Tabelle 16 und Tabelle 17 vorbereitet und mindestens 2 Stunden im Brutschrank bei 37 °C oder über Nacht inkubiert. Es werden nochmals 2 µl des Enzyms hinzugegeben und die Ansätze für weitere 2 Stunden im Brutschrank bei 37 °C oder

über Nacht inkubiert. Es werden eine Gelelektrophorese, sowie eine Gelextraktion der interessierenden Banden durchgeführt.

Tabelle 16: Ansatz Restriktionsverdau

| Zutaten | Ansatz Insert | Ansatz Vektor |
|---------------------------------|---------------|---------------|
| PCR-DNA | 42 µl* | 20 µl* |
| Puffer | 5 µl | 5 µl |
| autoklaviertes H ₂ O | 0 µl | 22 µl |
| Restriktionsenzym | 3 µl | 3 µl |
| Gesamt | 50 µl | 50 µl |

*Maximal mögliches Volumen + mit H₂O auf 50 µl auffüllen

Tabelle 17: Präparativer Restriktionsverdau: Enzyme und Puffer

| Enzym | Puffer |
|-----------------|---------------|
| EcoRV (10 U/µL) | Buffer R |
| KpnI (10 U/µL) | Buffer KpnI |
| SacI (10 U/µL) | Unique Buffer |

3.6.3 Ligation und Dialyse

Im Rahmen dieser Arbeit werden zur Generierung der Plasmide pcDNA5/FRT::OATP1A2 Variante 1 und 2 der Expressionsvektor und der gewünschte Genabschnitt OATP1A2 mittels Ligation durch eine DNA-Ligase zusammengesetzt.

Der Ligation von DNA-Fragmenten zu einem Plasmid geht ein präparativer Restriktionsverdau voraus, siehe Abschnitt 3.6.2. Das Reaktionsgefäß mit dem Insert (OATP1A2) wird 7 min bei 60 °C geöffnet unter Vakuum zentrifugiert. Nach Überprüfung des verbliebenen Volumens kann nochmals 2 min zentrifugiert werden. Die Proben werden 5 min auf Eis gestellt. Mit einem 2 µl Tropfen aus dem jeweiligen Reaktionsgefäß wird das Kondenswasser von dessen Wand abgenommen, damit sich die komplette DNA am Boden des Gefäßes befindet. Zur Vorbereitung der Ligation wird eine Mikrovolumen-Proteinkonzentrationsbestimmung durchgeführt. Die Ligationsansätze werden gemäß Tabelle 18 hergestellt, 10 min bei RT inkubiert und anschließend 20 min auf Eis gestellt. Die 20-µl-Ansätze der Ligation werden auf weißes Filterpapier (Merck) übertragen, welches auf der Oberfläche des *A. dest.* schwimmt. Nach 30 min wird der Tropfen vom Filterpapier in ein neues Reaktionsgefäß überführt und auf Eis gestellt.

Tabelle 18: Drei Ansätze für Ligation von Vektor & OATP1A2

| Zutaten | 3:1 - Ansatz | Maximalansatz | Negativkontrolle |
|------------------|--------------|---------------|------------------|
| Ligase Puffer | 4 µl | 4 µl | 4 µl |
| Vektor | 1 µl | 1 µl | 1 µl |
| Insert | 5 µl | 14 µl* | ∅ |
| H ₂ O | 9 µl | ∅ | 14 µl |
| Ligase | 1 µl | 1 µl | 1 µl |

* Maximal mögliches Volumen + mit H₂O auf 20 µl auffüllen

3.6.4 Transformation von Plasmiden in *E. coli*

Zur Vervielfältigung werden Plasmide im Rahmen dieser Arbeit in *One Shot® TOP10 Electrocomp™* *E. coli*-Bakterien transformiert. Die folgenden Arbeitsschritte werden an der Sicherheitswerkbank durchgeführt. Für die Transformation mittels Elektroschock wird aus der 40 µl-Stammlösung der bei -80 °C gelagerten *E. coli* Bakterien durch Zugabe von 120 µl Wasser eine Arbeitslösung hergestellt. Von der Arbeitslösung werden 40 µl in eine Elektroporationsküvette pipettiert, 1 µl der Ligationlösung hinzugefügt und durch auf- und abpipettieren gemischt. Durch leichtes Klopfen können Luftblasen entfernt werden. Die Elektroschockbehandlung erfolgt nach Herstellerangaben (Biorad) mit 2,5 kV, 25 µF und 200 Ω. Es werden 800 µl 1x LB-Medium unter der Sicherheitswerkbank in die Küvette hinzugegeben und diese 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Bakterien werden auf Agarplatten mit Ampicillin in den verschiedenen Volumina 50, 100, 200 µl ausgesät und in Flüssigkulturen überführt (siehe Abschnitt 3.4).

3.6.5 Sequenzanalyse

Im Zuge der Generierung von stabil transfizierten T-REx™-pcDNA5/FRT::OATP1A2 und der Plasmidherstellung mit verschiedenen Klonierungsstrategien (siehe Tabelle 12) werden die Plasmide pcDNA5/FRT::OATP1A2 Variante 0 und 3 sowie pQCXIN::OATP1A2 sequenziert. Des Weiteren wurde eine Sequenzierung der DNA der stabil transfizierten T-REx™-pcDNA5/FRT::OATP1A2 im Rahmen der DNA-Validierung durchgeführt.

In Vorbereitung für eine Sequenzierungs-PCR werden zur Herstellung der Sephadex-Säule 35 mg *Sephadex G50 superfine* in die Wells einer 96er Filterplatte (*MultiScreen-HV*, 0,45 µm, transparent, nicht steril; Merck) verteilt. Pro Well werden 300 µl *A. bidest.* aufgetragen. Die Säule soll circa 3 Stunden quellen. Überschüssiges Wasser wird durch Zentrifugation über 5 min bei 700 g und RT entfernt. Es wird nochmals 150 µl *A. bidest.* pro Well aufgetragen und die Säule für 30 min quellen gelassen.

Überschüssiges Wasser wird durch Zentrifugation über 5 min bei 700 g und RT entfernt.

Sequenzierungs-PCR

Es wird das *Big Dye® Sequenz Kit (Applied Biosystems)* verwendet. Vor der Sequenzanalyse wird die DNA durch eine PCR mit individuellen Primern vervielfältigt, siehe Tabelle 41. Die PCR wird je Probe gemäß Tabelle 19 angesetzt und erfolgt zu den in Tabelle 20 dargestellten Konditionen. Nach der PCR werden zu jeder PCR-Reaktion 35 µl *A. bidest.* hinzugegeben, das Gesamtvolumen auf die Sephadex Platte gegeben und diese bei 650 x g für 5 min bei RT zentrifugiert. Das aufgereinigte Sequenzierungsprodukt wird in einer neuen 96-Well Platte gesammelt. Leere Wells werden mit 40 µl Wasser gefüllt. Die Sequenzanalyse erfolgt im Rahmen dieser Arbeit mit dem *3500xL Genetic Analyzer*. Zur Auswertung der Sequenzierungsdaten werden die Programme *ApE-A plasmid Editor v. 2.0.61*, *Clone Manager 9*, *Gap 5 (Staden package)* und *SnapGene* verwendet.

Tabelle 19: Ansatz Sequenzierungs-PCR

| Zutaten | Volumen [µl] |
|---------------------|--------------|
| DMSO | 0,25 |
| Primer (µM) | 0,5 |
| <i>Big Dye®</i> | 1 |
| <i>A. bidest.</i> | 2,25 |
| DNA (ca. 300 µg/ml) | 1 |
| Gesamt | 5 |

Tabelle 20: Konditionen Sequenzierungs-PCR

| Phase | Grad [°C] | Zeit |
|-----------------------|-----------|-----------|
| Denaturierung | 94 | 2 min |
| Denaturierung | 96 | 15 s |
| Primer-hybridisierung | 56,5 | 15 s |
| Elongation | 60 | 4 min |
| Finale Elongation | 72 | 7 min |
| Kühlung | 8 | unendlich |

} 25x

3.6.6 DNA Validierung nach stabiler Transfektion

DNA Isolation

Zur DNA-Validierung der im Rahmen dieser Arbeit generierten stabil transfizierten T-REx™-pcDNA5/FRT::OATP1A2 wird die DNA isoliert und in verschiedenen Validierungs-PCR, siehe Abbildung 12, weiter untersucht.

Hierzu werden Aliquote der Zellkulturen parallel zum Splitten der Zellen abgenommen. Das Splitten der Zellen wird entsprechend Abschnitt 3.2 und mit der Hinzugabe von 100 µg/ml Hygromycin durchgeführt. Von der Zellsuspension wird ein 2-ml-Aliquot abgenommen, welches 3 min bei 300 x g und RT zentrifugiert wird. Nach dem Entfernen des Überstandes wird das Pellet bei -80 °C eingefroren. Die DNA-

Isolation aus dem Pellet erfolgt nach Herstellerangaben mit dem *DNeasy Blood and Tissue Kit* (Qiagen). Vor der Lagerung bei -20 °C wird die Konzentration der extrahierten DNA gemessen, siehe Abschnitt 3.5.6.

Validierungs-PCR

Zur Validierung der DNA der stabil transfizierten Zellen werden drei PCR-Verfahren, Hygromycin-PCR (PCR 1), *Gene-of-interest*-PCR (GOI-PCR, PCR 2), Multiple-Integrations-PCR (PCR 3) angewandt, siehe Abbildung 12. Bei der Hygromycin-PCR wird für einen erfolgreichen Nachweis der Hygromycin-Gensequenz ein Amplikon der Länge 614 bp erwartet [48]. Die GOI-PCR vervielfältigt den unter PCR 2 dargestellten Bereich. Für das zu erwartende Amplikon mit dem Vektor pcDNATM5/FRT und dem integrierten wird eine Länge von OATP1A2 3402 bp berechnet. Mithilfe der Multiplen-Integrations-PCR ist es möglich, transfizierte FlpInTM-Klone herauszufiltern, die lediglich eine Kopie des integrierten Plasmids enthalten. Es wird auf mehrfach eingefügte Sequenzen getestet, indem der Abschnitt zwischen der FRT-Sequenz nach dem Startcodon und der Hygromycin-Sequenz amplifiziert wird. Für die 3. PCR wird ein Amplikon von 214 bp erwartet.

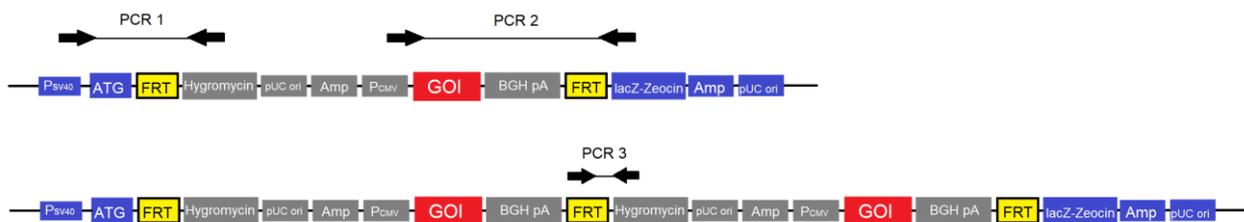


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Validierungs-PCR. PCR 1: Hygromycin-PCR, PCR 2: GOI-PCR, PCR 3: Multiple-Integrations-PCR, Rot + Grau: Plasmid pcDNA5/FRT:OATP1A2, Blau: Genom T-RExTM-293

Für alle PCR werden jeweils Master Mixe, siehe Tabelle 21, Tabelle 23, Tabelle 25, für die Anzahl der Proben, 2 Kontrollen und eine Reserve mit den entsprechenden Primern aus Tabelle 27 angesetzt. Für die Hygromycin-PCR werden je Probe 2 µl unverdünnte DNA mit 18 µl des Master Mixes homogenisiert und anschließend eine PCR zu den in Tabelle 22 dargestellten Konditionen durchgeführt.

Für eine Gelelektrophorese werden 20 µl Hygromycin-PCR-Probe und 4 µl 10x Saccharose sowie ein 1-kB-Molekulargewichtsmarker auf ein 0,8 %iges Agarosegel aufgetragen.

Tabelle 21: Ansatz Hygromycin PCR

Aus dem *KOD Hot Start DNA Polymerase KIT*:
10x Buffer, dNTPs (2 mM), MgSO₄

| Zutat | Volumen [µl] |
|---------------------------------------|--------------|
| Probenanzahl | 1 |
| <i>A. bidest.</i> | 6,8 |
| 5x Q-solution (Qiagen) | 4,4 |
| 10x Buffer | 2,2 |
| dNTPs (2 mM) | 2,2 |
| MgSO ₄ (25 mM) | 0,9 |
| 5'-Primer (P _{SV40}) 100 µM | 0,5 |
| 3'-Primer (Hyg_r2) 100 µM | 0,5 |
| HotStart KOD Polymerase | 0,5 |
| Total | 18 |
| gDNA unverdünnt | 2 |

Tabelle 22: Konditionen Hygromycin-PCR

| Grad [°C] | Zeit |
|-----------|-----------|
| 95 | 2 min |
| 95 | 30 s |
| 64 | 30 s |
| 72 | 1 min |
| 72 | 10 min |
| 8 | unendlich |

} x 35

Für die GOI-PCR werden je Probe 3 µl unverdünnte DNA mit 25 µl des Master Mixes homogenisiert und anschließend eine PCR zu den in Tabelle 24 dargestellten Konditionen durchgeführt. Für die Auswertung mittels Gelelektrophorese werden 10 µl GOI-PCR-Probe, 2 µl 10x Saccharose sowie ein 1-kB-Molekulargewichtsmarker auf ein 0,8 %iges Agarosegel aufgetragen. Die restliche PCR-Probe wird bei -20°C gelagert.

Tabelle 23: Ansatz GOI-PCR

| Zutat | Volumen [µl] |
|-------------------------------------|--------------|
| Probenanzahl | 1 |
| <i>A. bidest.</i> | 9,3 |
| 5x Q-Solution (Qiagen) | 5,6 |
| 10x ExpandLong_Buffer1 | 2,8 |
| dNTPs (2 mM) | 4,5 |
| MgSO ₄ (25 mM) | 1,5 |
| 5'-Primer (LacZ) 10 µM | 0,5 |
| 3'-Primer (P _{CMV}) 10 µM | 0,5 |
| ExpandLong Polymerase Mix | 0,3 |
| Total | 25 |
| gDNA unverdünnt | 3 |

Tabelle 24: Konditionen GOI-PCR

| Grad [°C] | Zeit |
|-----------|-----------|
| 94 | 2 min |
| 96 | 10 s |
| 60 | 20 s |
| 68 | 5 min |
| 68 | 7 min |
| 8 | unendlich |

} x 35

Für die Multiple-Integrations-PCR werden je Probe 1 µl unverdünnte DNA mit 10 µl des Master Mixes homogenisiert und eine PCR zu den in Tabelle 26 dargestellten Konditionen durchgeführt. Die Auswertung erfolgt mittels Gelelektrophorese mit 11 µl PCR-Sonde, 2 µl 10x Saccharose sowie einem 100-bp-Molekulargewichtsmarker auf einem 1,5 %igen Agarosegel. Erwartet wird eine Bande bei 214 bp.

Tabelle 25: Ansatz Multiple-Integrations-PCR

| Zutat | Volumen [µl] |
|---|--------------|
| Probenanzahl | 1 |
| 2x QIAGEN Master Mix | 5,5 |
| 5x Q-solution (Qiagen) | 2,2 |
| 10x Primer Mix (2 µM je Primer P _{FRT_f} / P _{Hyg_r2}) | 1,1 |
| A. bidest. | 1,2 |
| Total | 10 |
| gDNA unverdünnt | 1 |

Tabelle 26: Konditionen Multiple-Integrations-PCR

| Grad [°C] | Zeit |
|-----------|--------|
| 95 | 15 min |
| 94 | 30 s |
| 58 | 90 s |
| 72 | 2 min |
| 72 | 10 min |

} x 35

Tabelle 27: Primer DNA-Validierungs-PCR

| Name Primer | Primersequenzen (5'-3') | Amplikon Größe [bp] | PCR |
|--------------------|----------------------------|---------------------|----------------------|
| P _{SV40} | AGCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGG | 614 | Hygromycin |
| Hyg_r2 | ACGCCCTCCTACATCGAAGCTGAAA | | |
| LacZ | CCTTCCTGTAGCCAGCTTTCATCAA | 3402 (OATP1A2) | GOI |
| P _{CMV} | CCATGGTGTATGCGGTTTTGGCAGTA | | |
| P _{FRT_f} | AATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCC | 214 | Multiple Integration |
| Hyg_r2 | ACGCCCTCCTACATCGAAGCTGAAA | | |

Sequenzierung zur DNA-Validierung nach stabiler Transfektion

Für die Sequenzierung werden die GOI-PCR Proben der Klone T-REX™-pcDNA5/FRT::OATP1A2 aufgereinigt. Der Ansatz, entsprechend Tabelle 28 hergestellt, wird eine Stunde bei 37 °C und 15 min bei 80 °C inkubiert. Die Lagerung erfolgt bis zur Sequenzierung bei -20 °C. Die Sequenzierung wird gemäß Abschnitt 3.6.5 durchgeführt.

Tabelle 28: Ansatz PCR-Probenaufreinigung je Probe

| Zutat | Volumen [µl] |
|--|--------------|
| SAP (<i>Shrimp alkaline phosphatase</i>) | 2 |
| Exol | 0,3 |
| 10x SAP Puffer | 0,7 |
| PCR Produkt | 18 |

3.6.7 RNA Validierung nach stabiler Transfektion

RNA Isolation

Um zu verifizieren, ob von den im Rahmen dieser Arbeit generierten stabil transfizierten T-REx™-pcDNA5/FRT::OATP1A2 eine RNA aus der OATP1A2-Gensequenz generiert wird, wird die RNA isoliert und mittels quantitativer Echtzeit-PCR analysiert.

Das Abnehmen der Aliquote erfolgt analog zur Vorgehensweise der DNA-Isolation, Abschnitt 3.6.6. Die RNA-Isolation wird nach Herstellerangaben mit dem *RNeasy Plus Mini Kit* durchgeführt. Vor der Lagerung bei -20 °C wird die Konzentration der extrahierten RNA photometrisch gemessen, siehe Abschnitt 3.5.6.

Genexpressionsanalyse mittels quantitativer Echtzeit-PCR

Um die Genexpression des OATP1A2 mit dem *Applied Biosystems™ TaqMan® Assay* messen zu können, erfolgt eine cDNA-Synthese. Die RNA-Proben werden entsprechend Tabelle 29 auf 50 ng/µl verdünnt. Dabei wird zuerst das Wasser vorgelegt und anschließend die RNA-Probe hinzugegeben. Es wird ein Master Mix für die cDNA-Synthese für die Anzahl der Proben und eine Reserve gemäß Tabelle 30 angesetzt.

Tabelle 29: Verdünnung RNA-Proben

| Probe | Konzentration [ng/µl] | Volumen [µl] für 500 ng RNA | H ₂ O [µl] |
|------------|-----------------------|-----------------------------|-----------------------|
| pcDNA5/FRT | 163,98 | 3,049152336 | 6,95084766 |
| KI-2 | 333,94 | 1,49727496 | 8,50272504 |
| KI-3 | 396,2 | 1,261988894 | 8,73801111 |
| KI-4 | 588,64 | 0,849415602 | 9,1505844 |
| KI-5 | 526,51 | 0,949649579 | 9,05035042 |
| KI-6 | 533,42 | 0,937347681 | 9,06265232 |
| KI-8 | 371,49 | 1,34593125 | 8,65406875 |
| KI-9 | 270,4 | 1,849112426 | 8,15088757 |
| KI-10 | 445,18 | 1,123141201 | 8,8768588 |
| KII-1 | 601,21 | 0,83165616 | 9,16834384 |
| KII-2 | 445,59 | 1,122107767 | 8,87789223 |
| KII-4 | 437,98 | 1,141604639 | 8,85839536 |
| KII-6 | 177,7 | 2,813731007 | 7,18626899 |
| KII-10 | 601,62 | 0,831089392 | 9,16891061 |

Tabelle 30: Ansatz Master Mix cDNA-Synthese

| Zutat | Volumen [μ l] |
|--|--------------------|
| Probenanzahl | 1 |
| 10x RT-Buffer | 2 |
| 25x dNTP Mix (100 mM) | 0,8 |
| 10x RT Random Hexamers | 2 |
| <i>Multiscribe reverse transcriptase</i> | 1 |
| RNase Inhibitor | 1 |
| Nuclease-freies H ₂ O | 3,2 |

Zu der verdünnten RNA (50 ng/ μ l) werden je 10 μ l Master Mix gegeben. Die cDNA-Synthese erfolgt unter den in Tabelle 31 aufgeführten *Cycling*-Konditionen. Für die Messung der Genexpression in Dreifachbestimmung am *QuantStudio 12K Flex* werden gemäß Tabelle 32 ein Master Mix für das *Housekeeping gene* TBP und ein Master Mix für OATP1A2 entsprechend der Probenanzahl angesetzt.

Tabelle 31: cDNA-Synthese *Cycler*-Konditionen

| Phase | Temperatur [$^{\circ}$ C] | Zeit [min] |
|---------|----------------------------|------------|
| 1 | 25 | 10 |
| 2 | 37 | 120 |
| 3 | 85 | 5 |
| Kühlung | 8 | unendlich |

Tabelle 32: *real-time* PCR Ansätze für TPB und OATP1A2

| Zutaten TBP-Ansatz (<i>housekeeping gene</i>) | Zutaten OATP1A2-Ansatz | Volumen [μ l] für n = 1 |
|---|---|------------------------------|
| 2 x <i>TaqMan</i> [®] Gene Expression Master Mix | 2 x <i>TaqMan</i> [®] Gene Expression Master Mix | 5 |
| <i>A. bidest.</i> | <i>A. bidest.</i> | 3,5 |
| 20 x <i>TaqMan</i> [®] assay (TBP) | 20 x <i>TaqMan</i> [®] assay (OATP1A2) | 0,5 |
| cDNA | cDNA | 1 |
| Total je Ansatz | | 10 |

Es werden je 9 μ l des Master Mixes in Reaktionsgefäße vorgelegt, mit 1 μ l cDNA homogenisiert und in eine 96-Well-Platte pipettiert, welche mit einer transparenten Folie abgeklebt wird. Zur Auswertung der Messergebnisse des *QuantStudio 12K Flex* werden zunächst die Mittelwerte der C_T-Werte (*cycle threshold*) berechnet. Der C_T-Wert gibt die Anzahl der benötigten PCR-Zyklen an, welche zur Vervielfältigung der markierten cDNA benötigt wird, um ein Fluoreszenzsignal zu erzeugen [49]. Die Berechnung von Delta-C_T erfolgt nach der Formel: $\Delta CT = GOI CT - House\ keeping CT$. Nach der Ermittlung des Mittelwertes ΔC_T wird

$\Delta\Delta C_T$ wie folgt berechnet: $\Delta\Delta CT = Probe \Delta CT - Mittelwert\ Kontrollgruppe \Delta CT$.
 $\Delta\Delta C_T$ wird umgerechnet: $\frac{1}{2^{\Delta\Delta CT}} = 2^{-\Delta\Delta CT}$. Ein hoher $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Wert entspricht einem niedrigen C_T -Wert, sowie einer hohen Anfangskonzentration von mRNA und einer hohen Genexpression des untersuchten Gens.

3.7 Generierung stabil transfizierter T-RExTM-pcDNA5/FRT::OATP1A2

In der vorliegenden Arbeit werden Flp-InTM T-RExTM-293 Zellen zur Generierung von stabil transfizierten T-RExTM-pcDNA5/FRT::OATP1A2 verwendet. Dieses System erleichtert die stabile Transfektion von Zelllinien, welche das Flp-InTM- System nutzen, durch Integration und Expression des transfizierten Gens an einer spezifischen Stelle im Genom, der FRT-Sequenz.

Flp-InTM T-RExTM-293 Zellen stammen von *293-human embryonic kidney cells* ab und enthalten herstellerbedingt durch eine Vortransfektion mit dem Vektor pFRT/lacZeo eine einfach integrierte *Flp-recombination-target*- Sequenz (FRT) und das lacZ-ZeocinTM-Fusionsgen, siehe Abbildung 13. Dieses vermittelt die ZeocinTM-Resistenz und die β -Galaktosidase-Aktivität und wird durch den *SV40 early promotor* kontrolliert. Der Expressionsvektor pcDNATM5/FRT, welcher das zu untersuchende Gen, eine Hygromycin-Resistenz und eine FRT-Sequenz beinhaltet, wird mittels stabiler Transfektion in die Zelle eingebracht. Seine Expression wird durch einen CMV-Promotor (*human cytomegalovirus immediate-early promoter*) reguliert. Die Integration dieses Vektors wird durch die Cotransfektion eines dritten Vektors pOG44 ermöglicht, welcher unter Kontrolle des humanen CMV-Promotors die Flp-Rekombinase codiert. Die FRT-Sequenz im Genom der Wirtszelle dient dem Enzym als Bindungsstelle, was das Einfügen des zu transfizierenden Gens mittels *site-specific DNA-recombination* an dieser Stelle ermöglicht. Das Hygromycin-Resistenzgen und das gewünschte Gen werden nach der Transfektion exprimiert, während der Leserahmen der Zeocin-Resistenz und der β -Galaktosidase-Aktivität unterbrochen ist und nun nicht mehr abgelesen wird. Erfolgreich transfizierte Klone können über die Hygromycin-Resistenz selektiert und kultiviert werden. [47]

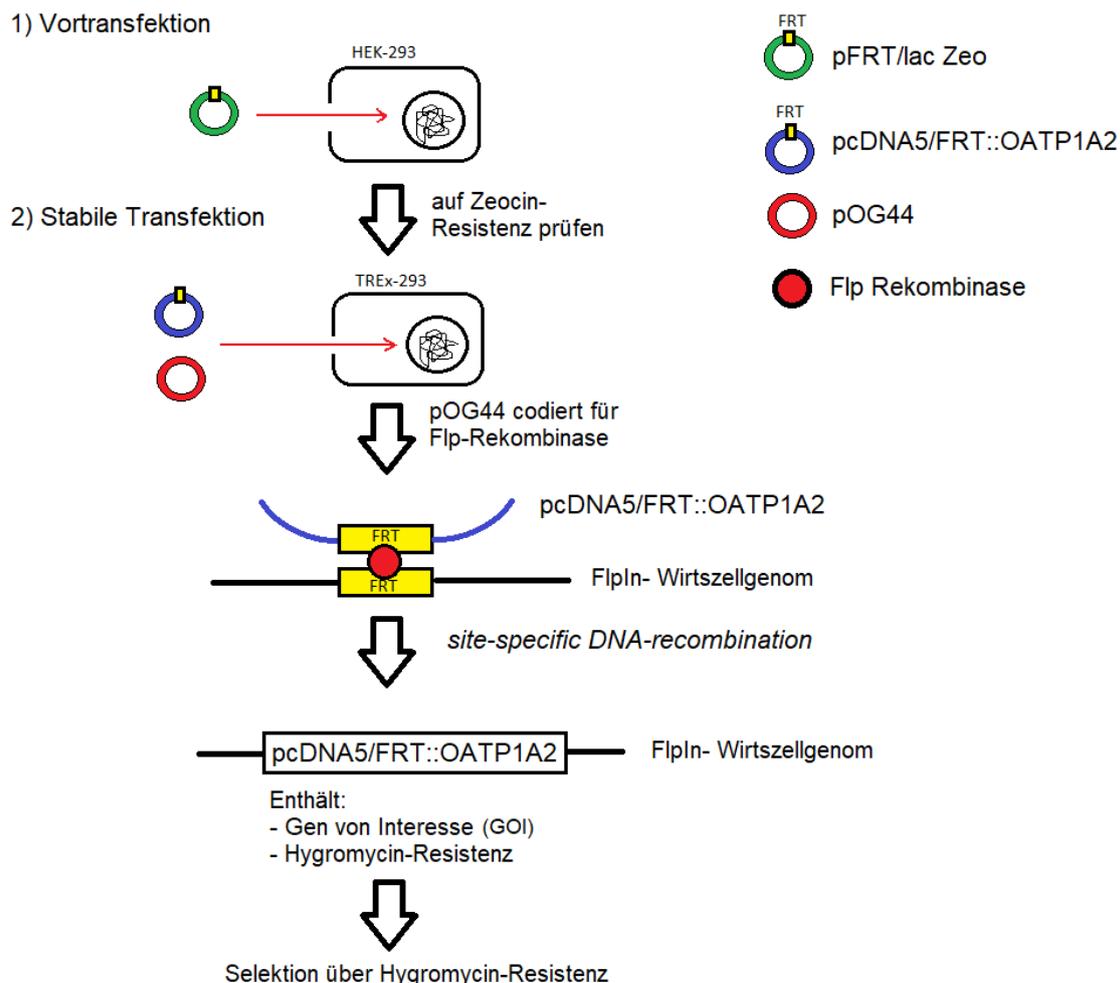


Abbildung 13: Klonierungsschema mit dem Flp-In™-System am Beispiel von pcDNA5/FRT::OATP1A2 in T-REx™-293

3.7.1 Plasmidherstellung

Zur Generierung stabil transfizierter T-REx™-pcDNA5/FRT::OATP1A2 werden im Rahmen verschiedener Klonierungsstrategien zwei Plasmide hergestellt, siehe Tabelle 12. Als Ausgangspunkt wird das Plasmid pcDNA5/FRT::OATP1A2 (Variante 0) aus nicht veröffentlichten Arbeiten des Instituts für Klinische Pharmakologie der Universität Greifswald verwendet. Der Ablauf der Plasmidherstellung ist in Abbildung 14 dargestellt. Der gewünschte Genabschnitt OATP1A2 wird mittels PCR aus dem Plasmid extrahiert und nach einer Gelelektrophorese und Gelextraktion isoliert. Für Variante 1 wird pcDNA™5/FRT als Vektor mittels alkalischer Lyse, Gelelektrophorese und Gelextraktion separiert. Zur Herstellung von Variante 2 wird der Vektor von pcDNA5/FRT::hOCT1_FLAG isoliert. Der extrahierte Genabschnitt sowie der leere Vektor werden durch einen präparativen

Restriktionsverdau mit EcoRV (Variante 1) / SacI (Variante 2) und KpnI auf die Ligation vorbereitet. Es wird eine Ligation des Vektors mit dem OATP1A2-Genabschnitt und eine Dialyse des neuen Plasmids sowie eine Transformation in *E. coli* Bakterien mittels Elektroporation durchgeführt. Zur Kontrolle von Variante 1 erfolgt eine PCR mit den Primern aus Tabelle 43, eine Plasmidisolierung mittels alkalischer Lyse sowie ein Plasmid-DNA-Verdau mit HindIII und BamHI. Die Klone mit den besten Ergebnissen werden mit den Primern aus Tabelle 41 sequenziert, um mögliche Fehler in der Basenabfolge von pcDNA5/FRT::OATP1A2 (Variante 1) zu erkennen. Variante 2 von pcDNA5/FRT::OATP1A2 wird mittels Kontrollverdau mit HindIII, BamHI und EcoRI überprüft.

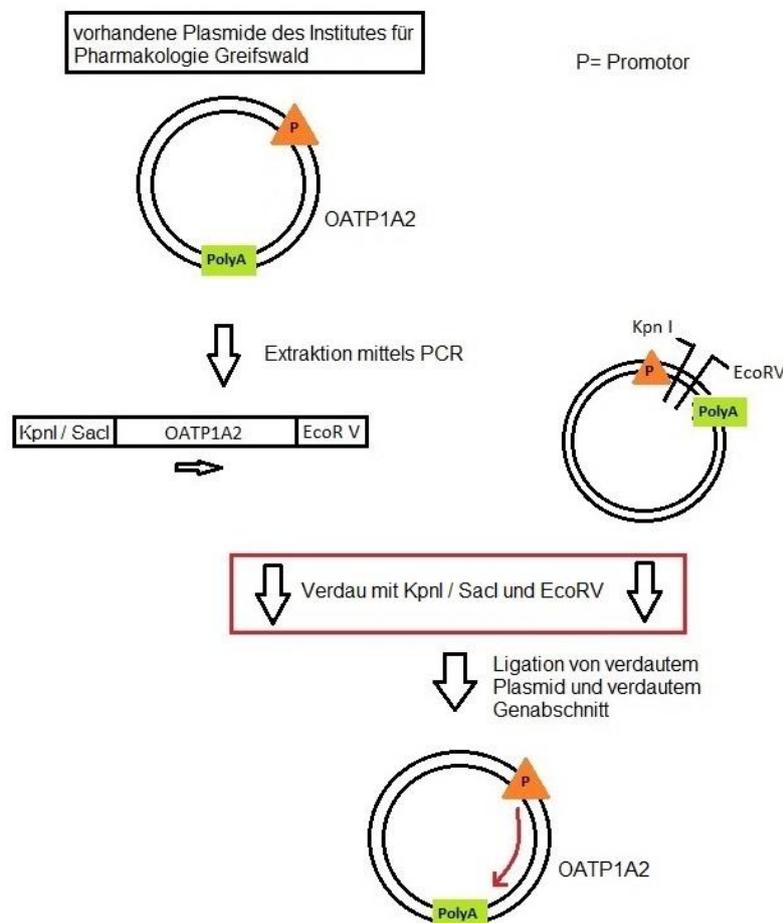


Abbildung 14: Ablauf Herstellung Plasmid pcDNA5/FRT::OATP1A2. Extraktion des Inserts für Variante 1 mit KpnI + EcoRV, für Variante 2 mit SacI + EcoRV

3.7.2 Transiente Transfektion

In der vorliegenden Arbeit wird die transiente Transfektion zur Generierung von T-REx™-293-pcDNA5/FRT::OATP1A2-Zellen verwendet, welche im Anschluss auf ihre Funktionalität im Wettbewerbsversuch überprüft werden. Zur Überprüfung der Transfektionseffizienz wird das Plasmid mit dem zu untersuchenden Gen gemeinsam mit pGFP-tpz transfiziert. Als Negativkontrolle werden in separaten Wells pcDNA5/FRT, pcDNA5/FRT::hOCT1_FLAG und als Positivkontrolle pQCXIN::OATP1A2 verwendet. Am Tag 1 werden 5×10^5 T-REx™-293 Zellen/Well auf einer Poly-D-Lysin beschichteten 12-Well Platte (siehe Abschnitt 3.7.4) wie folgt ausgesät. Die T-REx™-293 Zellen wurden von dem Institut für Pharmakologie der Universität Greifswald zur Verfügung gestellt. Nach dem Entfernen des Nährmediums aus den Zellkulturflaschen werden die Zellen mit 3,5 ml *TrypLE™ Express* je T75- Zellkulturflasche 3 min bei 37 °C inkubiert. Die Zellsuspension wird in ein 50-ml-Falcon überführt und 3 min bei 300 x g zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wird in 12 ml DMEM (4,5 g/L D-Glucose, L-Glutamin, Pyruvate (*Thermo Fisher*); 10 % FCS; 1 % P/S) resuspendiert. Die Zellzählung wird gemäß Herstellerangaben am *CASY Cell Counter & Analyzer* mit 200 µl Zellsuspension durchgeführt. Entsprechend der Zellzahlbestimmung wird die Zellsuspension auf 6×10^5 Zellen/ml verdünnt und nach Vereinzeln durch auf- und abpipettieren in die Wells gegeben. Die Zellen werden durch Nord-Süd-/Ost-West Bewegungen im Well verteilt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am Tag 2 erfolgt die transiente Transfektion bei 70-90 % Konfluenz der Zellen. Für Ansatz 1 werden pro Well 6,25 µl *Lipofectamine® 2000 Reagent* in 50 µl *pure DMEM* (4,5 g/L D-Glucose, L-Glutamin, Pyruvate (*Thermo Fisher*)) pipettiert. Die weiteren Ansätze werden je zu transfizierender Plasmid-DNA vorbereitet. Es werden pro Well 2 µg Plasmid-DNA in 50 µl *pure DMEM* (4,5 g/L D-Glucose, L-Glutamin, Pyruvate (*Thermo Fisher*)) pipettiert. Nach 5 min Inkubationszeit aller Ansätze bei RT werden 0,5 µg pGFP-tpz pro Gesamtanzahl der Wells zu Ansatz 1 hinzugegeben und gemixt. Anteilig werden je 50 µl Lipofectamin/pGFP-tpz/DMEM-Mix zu 50 µl des jeweiligen Plasmid-DNA/DMEM-Mix pipettiert und 20 min bei RT inkubiert. Bevor die Transfektionslösung auf die Zellen gegeben wird, werden diese einmal mit 1 ml DMEM/10 % FBS pro Well gewaschen und mit 0,9 ml DMEM/10 % FBS pro Well versetzt. Tropfenweise werden 100 µl Transfektionslösung pro Well hinzugegeben und durch Nord-Süd/Ost-West-Bewegungen verteilt. Sechs Stunden nach der Transfektion erfolgt ein Mediumwechsel zu DMEM (4,5 g/L D-Glucose, L-Glutamin, Pyruvate

(*Thermo Fisher*); 10 % FCS; 1 % P/S). An Tag 3 kann die Transfektionseffizienz mikroskopisch mittels GFP-Signal überprüft werden. Zur Funktionskontrolle der transient transfizierten Zellen wird an Tag 4 ein Wettbewerbsversuch in 12-Well-Platten durchgeführt, siehe Abschnitt 3.8.4.

3.7.3 Stabile Transfektion von T-REx™-Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit wird das Plasmid pcDNA5/FRT::OATP1A2 (Variante 3) zur Generierung von T-REx™-293-pcDNA5/FRT::OATP1A2-Zellen stabil in T-REx™-293-Zellen transfiziert. Alle Arbeiten erfolgen steril unter der Sicherheitswerkbank. An Tag 0 werden 1×10^6 T-REx™293-Zellen pro Well in 6-Well-Platten ausgesät und 24 Stunden bei 37 °C inkubiert, siehe Abschnitt 3.7.2. Abweichend zum Protokoll der transienten Transfektion werden die Wells nicht mit Poly-D-Lysin vorbehandelt. Die Zellen wurden von dem Institut für Pharmakologie der Universität Greifswald zur Verfügung gestellt. Für die stabile Transfektion an Tag 1 werden pro Well zwei 1,5 ml Reaktionsgefäße mit je 100 µl *pure DMEM* vorbereitet. Für Ansatz 1 werden pro Well 3,6 µg pOG44 und 0,4 µg des Plasmids mit dem zu untersuchenden Gen zu den 100 µl *pure DMEM* hinzugeben. Für Ansatz 2 werden pro Well 12 µl *FuGene6* in das 2. Reaktionsgefäß zu den 100 µl *pure DMEM* pipettiert. Nach 5 min Inkubationszeit bei RT werden beide Ansätze vermengt und 15 min bei RT inkubiert. Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit DMEM (10 % FCS) werden pro Well 1,8 ml DMEM (10 % FCS) vorgelegt. Tropfenweise werden je Well 200 µl DNA-Fugene6-Mix verteilt und die Zellen über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am Folgetag wird ein Mediumwechsel zu DMEM (10 % FCS; 1 % P/S) durchgeführt. An Tag 3 erfolgt der Transfer in 100-mm-Petrischalen. Es werden je 18 ml DMEM (10 % FCS; 1 % P/S) in Petrischalen vorgelegt, die Zellen in 2 ml DMEM (10 % FCS; 1 % P/S) homogenisiert und in die Petrischalen gegeben. Die Selektion der erfolgreich transfizierten Klone erfolgt an Tag 4 durch Zugabe von Hygromycin B (300 µg/ml). An Tag 9 erfolgt ein Medienwechsel mit DMEM (10 % FCS; 1 % P/S) mit Zusatz von Hygromycin B (300 µg/ml). Die ersten Klone sind 10 Tage nach der 1. Hygromycin-Behandlung zu erwarten. Diese werden in 12-Well-Platten transferiert. Es werden 2 ml DMEM (10 % FCS; 1 % P/S) und Hygromycin B (100 µg/ml) pro Well vorgelegt und der Zellkulturüberstand entfernt. Zügig werden die Klone einzeln von unten nach oben auf der Petrischale mittels 3-5 µl Medium aus dem Well abgelöst, durch 5-6 Mal auf- und abpipettieren in die Pipette aufgenommen und in das entsprechende Well überführt. Bei 70 %iger Konfluenz werden die Zellen in 6-Well-Platten umgesetzt.

Hierzu werden 3-4 ml DMEM (10 % FCS; 1 % P/S) sowie 100 µg/ml Hygromycin B pro Well vorgelegt, das verbrauchte Medium entfernt, die Zellen mit frischem Medium aus den alten Wells abgelöst und in die größeren Wells überführt. Bei Haufenbildung müssen die Zellen mit einer Pipette vereinzelt werden. Bei 70 %iger Konfluenz in der 6 Well-Platte erfolgt der Transfer in T25-Zellkulturflaschen. Die Zellen werden mit 100 µg/ml Hygromycin B weiterbehandelt.

3.7.4 Funktionskontrolle stabil transfizierter Zellen

Die Funktionskontrolle zur Validierung von T-REx™-293 nach stabiler Transfektion mit pcDNA5/FRT::OATP1A2 mit Aufnahme von Referenzsubstrat (E3S) erfolgt entsprechend Abschnitt 3.8.2. Es werden 600.000 Zellen pro Well ausgesät.

Aussäen von T-REx™-293

Die Zellen werden auf Poly-D-Lysin beschichteten Platten ausgesät. Zur Beschichtung werden 24-Well-Platten mit 0,5 ml Poly-D-Lysin (2 mg/ml, Mol. wt. 1.000-5.000) je Well 20 min bei 37 °C inkubiert. Nach dem Entfernen der Poly-D-Lysin-Lösung trocknen die Platten 5 min unter der Sterilbank. Das Medium wird aus der Zellkulturflasche entfernt und die Zellen werden mit 3,5 ml *TrypLE™ Express* je 75 cm² Zellkulturflasche bei 37 °C inkubiert. Nach 3 min werden 10 ml frisches DMEM (10 % FCS; 1 % P/S) hinzugegeben, um die Enzymreaktion zu stoppen. Die Zellsuspension wird in ein 50-ml-Falcon transferiert und bei 300 x g für 3 min zentrifugiert. Das Zellpellet wird in 12 ml Medium resuspendiert und ein Aliquot von 200 µl abgenommen, welches zur Bestimmung der Zellzahl am *CASY Cell Counter & Analyzer* verwendet wird. Die Zellzählung erfolgt nach Herstellerangaben. Basierend auf der Zellzählung wird die Zellsuspension auf eine Konzentration von 6×10^5 Zellen/ml verdünnt. Die Zellsuspension wird zu je 1 ml pro Well auf die 12-Well Platte gegeben und mittels Nord-Süd/Ost-West-Bewegungen im Well verteilt.

3.7.5 OATP1A2- Färbung nach stabiler Transfektion

Für die Färbung von OATP1A2 in T-REx™-pcDNA5/FRT::OATP1A2 werden im Rahmen dieser Arbeit der Antikörper SLCO1A2 von *Assay Biotechnology Company* sowie ein Zweitantikörper *Alexa Fluor® 488 goat anti-rabbit IgG (Thermo Fisher Scientific)* verwendet. Um die Zellmembran über die Natrium-Kalium-ATPase darstellen zu können, werden die Zellen ebenfalls mit dem Erstantikörper *mouse anti-Na⁺/K⁺-ATPase (Santa Cruz)* und dem Zweitantikörper *Alexa Fluor® 568 goat anti-mouse IgG* gefärbt.

An Tag 0 werden Zellen in 12-Well Platten mit Deckgläsern ausgesät, siehe Abschnitt 3.2. Die Fixierung der Zellen auf den Deckgläsern sowie die 1. Antikörperbehandlung erfolgen an Tag 3. Für die 1. Antikörperbehandlung wird 1x PBS mit 0,4 % *Tween*®20 (Roth) angesetzt. Der 1. Antikörper-Ansatz zur Zellfärbung wird mit 25 µl/ Deckgläschen berechnet und die beiden oben genannten Erstantikörper 1 : 50 mit PBS/ 10 % FCS-Mix verdünnt. Die Zellen werden drei Mal mit 1x PBS 5 min auf einer Schüttelplatte gewaschen. Nach dem Entfernen des PBS wird 1 ml Ethanol pro Well zum Fixieren der Zellen auf dem Deckgläschen hinzugegeben und diese 10-15 min bei -20 °C gelagert. Die Zellen werden erneut drei Mal 5 min mit 1x PBS gewaschen und das PBS entfernt. Es wird 1 ml Tween- PBS-Mix pro Well aufgetragen und 10 min bei RT inkubiert. Die Zellen werden drei Mal mit 1x PBS 10 min auf eine Schüttelplatte gestellt und das PBS entfernt. Pro Well werden 1 ml 1x PBS (10 % FCS) pipettiert, die Zellen mindestens 1 Stunde bei RT dunkel inkubiert und die Lösung entfernt. Auf jedes Deckgläschen werden 24 µl Antikörper-Mix gegeben, dies mit Parafilm abgedeckt und über Nacht bei RT dunkel inkubiert. An Tag 4 wird der Parafilm entfernt und die Zellen werden drei Mal 10 min mit 1x PBS auf eine Schüttelplatte gestellt. Der 2. Antikörper-Ansatz zur Zellfärbung wird mit 25 µl/ Deckgläschen berechnet. Die oben genannten Zweitantikörper werden 1 : 200 (*goat anti-rabbit IgG*) und 1 : 100 (*goat anti-mouse IgG*) mit PBS/ 10 % FCS-Mix verdünnt eingesetzt. Nach dem Entfernen des PBS werden 24 µl Antikörper-Mix auf jedes Deckgläschen gegeben, diese mit neuem Parafilm abgedeckt und 1 Stunde dunkel bei RT inkubiert. Die Zellen werden drei Mal mit 1x PBS 10 min auf einer Schüttelplatte gewaschen und anschließend dunkel gestellt. Zum Transfer der Deckgläser auf die Objektträger werden 15 µl *Roti*®-Mount *FluorCare DAPI* (Carl Roth GmbH) je Klon auf die Objektträger getropft. Die Zellen werden einmal mit *A. dest.* gewaschen und die Deckgläser mittels Pinzette mit dem Zellrasen nach oben auf ein Filterpapier gelegt. Die Deckgläser werden mit dem Zellrasen nach unten auf dem Tropfen auf dem Objektträger platziert und dunkel bei 4 °C gelagert. Die Färbung kann einige Tage später mikroskopisch beurteilt werden.

3.8 Transportversuche mit OATP

3.8.1 Versuchsvorbereitungen für Funktionskontrollen, Kompetitions- und Aufnahmeversuche

Plattenbeschichtung mit Poly-D-Lysin

Für die Plattenbeschichtung mit *Poly-D-lysine hydrobromide* (Mol. wt. 70.000-150.000) werden mit einer *Multistep*-Pipette je 200 µl einer 0,5 %igen PDL-PBS-Lösung pro Well aufgetragen und die Platten für 2 Stunden im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Das Poly-D-Lysin wird entfernt und die Platten mit angeschrägtem Deckel 30 min unter der Sicherheitswerkbank getrocknet. Nach 15 min Inkubation bei 37 °C und kurzem Abkühlen werden die Platten steril in Tüten verpackt bei 4 °C gelagert.

Aussäen von HEK-pQCXIN::OATP

Die Zellkulturen werden mit 5 ml/T75-Flasche *DPBS w/o Ca, Mg* gewaschen, mit 1 ml Trypsin abgelöst und in 9 ml HEK-Medium in ein Falcon transferiert. 10 µl Zellsuspension werden zu 10 µl Trypanblaulösung gegeben. Hiervon werden 10 µl in die Testplatte für die Zellzählung am *Countess™ automated cell counter* gegeben. Die Zellzählung wird drei Mal durchgeführt. Je nach Versuch und Wachstumsverhalten in den Zellkulturen (Kompetitions-/ Aufnahmeassay) werden 120.000 - 200.000 Zellen pro Well in 1 ml Zellansatz ausgesät. Je nach Konfluenz kann ein Teil der Zellen mit geeigneter Verdünnung weitergeführt werden, siehe Tabelle 3. Die Zellkulturen und die 24-Well-Platten mit den ausgesäten Zellen werden bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchte inkubiert.

Inkubationspuffer (IP)

Die bei -20 °C gelagerte 10x IP-Stammlösung, siehe Tabelle 33, wird 1 : 10 mit *A. bidest.* verdünnt. Der IP wird bei 4 °C gelagert.

Tabelle 33: Rezeptur 10x Inkubationspuffer (pH 7,30-7,32)

| Zutaten | Konzentration [nM] |
|--|--------------------|
| CaCl ₂ (94/96 %) | 1,5 |
| D-(+)Glucose, minimum 99,5 % | 5 |
| HEPES Pufferan | 12,5 |
| Kaliumchlorid | 5 |
| Kaliumphosphat monobasisch (KH ₂ PO ₄) | 1 |
| Magnesiumsulfat Heptahydrat (MgSO ₄ *7H ₂ O) | 1,2 |
| Natriumchlorid | 142 |

Mit NaOH/HCl auf pH 7,30-7,32 einstellen.

Lysispuffer I (Transportversuche)

A. *bidest.* wird mit den Zutaten aus Tabelle 34 angesetzt. Der Lysispuffer muss regelmäßig auf Trübung und Bewuchs kontrolliert werden und wird bei 4 °C gelagert.

Tabelle 34: Rezeptur Lysispuffer I (Transportversuche) (pH 7,9-8,1)

| Zutaten | Konzentration |
|-----------------------|---------------|
| Natriumchlorid | 50 nM |
| Sodiumdeoxycholate | 0,5 % |
| Tris-HCL 121,14 g/mol | 25 mM |
| Triton® X-100 | 0,5 % |

Mit konzentrierter HCL auf pH 7,9-8,1 einstellen.

3.8.2 OATP-Funktionskontrolle mit ³H-markiertem Referenzsubstrat

OATP-Funktionskontrollen werden im Rahmen dieser Arbeit sowohl zur Validierung von stabil transfizierten HEK-pQCXIN::OATP und T-REx™-pcDNA5/FRT::OATP1A2 als auch zur Kontrolle des Funktionserhalts stabil transfizierter HEK-pQCXIN::OATP-Zellen im Rahmen von Kompetitionsversuchen und Aufnahmeassay-Screenings durchgeführt. Hierzu werden 120.000 Zellen/ Well einer 24-Well-Platte ausgesät. Zur Überprüfung der Funktionalität werden Kontrollzellen und zu untersuchende Zellen jeweils mit ³H-radioaktiv markiertem Referenzsubstrat mit und ohne Inhibitor inkubiert. Diese Funktionskontrolle erfolgt in Zwei- oder Dreifachbestimmung, siehe Abbildung 16. Es werden pro Funktionskontrolle 2 Inkubationslösungen hergestellt. Diese werden mit 200 µl pro Well einer 24-Well-Platte und 400 µl pro Well einer 12-Well-Platte und zusätzlich 10 % Reserve berechnet. Als Inkubationslösung 1 wird reiner Substratpuffer (SP) verwendet. Zur Herstellung des SP wird Inkubationspuffer mit dem Transportprotein zugehörigen Referenzsubstrat, siehe Tabelle 35, angesetzt. Für Inkubationslösung 2 wird SP mit dem Transportprotein zugehörigen Inhibitor versetzt, siehe Tabelle 35. Ausgleichend zum in DMSO gelösten Naringin wird bei den OATP1A2-Funktionskontrollen 0,5 % DMSO zur Inkubationslösung 2 (Substratpuffer ohne Inhibitor) hinzugeben. Der weitere Ablauf gleicht dem der Kompetitionsassays.

Tabelle 35: Versuchsbedingungen Kompetitionsassay und Funktionskontrollen

| Transporter | Referenzsubstrat | ³ H-Referenzsubstrat | Inhibitor |
|-------------|------------------|---------------------------------|-------------------|
| OATP1A2 | 1 µM E3S | 0,05 µM ³ H-E3S | 500 µM Naringin |
| OATP1B1 | 0,04 µM BSP | 0,01 µM ³ H-BSP | 500 µM Rifampicin |

3.8.3 OATP1A2-Funktionskontrolle mit Fluoreszenz

In den Aufnahmeassay-Screenings wird die Funktionskontrolle zur Prüfung des Funktionserhalts stabil transfizierter HEK-pQCXIN::OATP1A2-Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin-123 als Alternative zur Funktionskontrolle mit radioaktiv-markiertem Referenzsubstrat getestet.

Die Zellen werden in 24-Well-Platten mit je 3 Wells pro Klon und der Kontrollzelllinie HEK-pQCXIN ausgesät. Am Versuchstag wird das Medium entfernt und die Zellen einmal mit warmem PBS gewaschen. Ein Well je Klon wird mit 200 µl Inkubationslösung (1 µM Rhodamin-123; 0,05 % Naringin (OATP1A2-Inhibitor)) behandelt. In die übrigen Wells werden 200 µl Inkubationslösung (1 µM Rhodamin-123; 0,05 % DMSO) pipettiert. Nach 10 min Inkubation bei 37 °C wird die Inkubationslösung entfernt und die Zellen werden drei Mal mit kaltem PBS gewaschen. Zum Lysieren der Zellen werden 300 µl RIPA pro Well 4-5 Mal auf- und abpipettiert. 100 µl der Zellsuspension werden luftblasenfrei in schwarze 96-Well-Platten überführt. Die Extinktionsmessung erfolgt am *Tecan infinite M200 Microplate Reader* bei einer anregenden Wellenlänge von 485 nm und einer gemessenen Emission bei 550 nm.

3.8.4 Kompetitionsassays

Für die Transportversuche werden die stabil transfizierten HEK-pQCXIN::OATP1A2/1B1 sowie die Kontrollzellen HEK-pQCXIN auf je einer mit Poly-D-Lysin beschichteten 24-Well-Platte ausgesät, siehe Abschnitt 3.8.1. Je nach Wachstumsverhalten in den Zellkulturen werden 120.000 - 160.000 Zellen pro Well in 1 ml Zellansatz ausgesät. Die Zellkulturplatte der Kontrollzellen wird im Kompetitionsversuch analog zur Platte der OATP-überexprimierenden Zellen behandelt. Wie in Abbildung 15 dargestellt wird für die Kontrollzellen sowie die inhibierten Zellen infolge des fehlenden bzw. inhibierten Transporters eine geringe Substrataufnahme erwartet. Aufgrund eines geringen Anteils an Diffusion des Substrates in die Zellen ist eine geringe Substrataufnahme auch in den Kontrollzellen bzw. in den inhibierten Zellen zu sehen. Die OATP-transfizierten Zellen sollten eine höhere Substrataufnahme zeigen sowie eine reduzierte Aufnahme in Anwesenheit des Opioids, sofern eine Interaktion bzw. Kompetition am jeweiligen Transporter vorliegt. Die Konzentration des Opioids bzw. des Inhibitors, welche zu einer halbmaximalen Hemmung führt, wird als mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) angegeben. Bei der halbmaximalen Hemmung wird die Hälfte des radioaktiv-markierten Substrates

vom Rezeptor verdrängt. Eine hohe IC_{50} und somit hohe Opioid-Konzentrationen weisen auf eine niedrige Transporteraffinität hin und umgekehrt. [1] Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Software *GraphPad Prism 8* für die Berechnung der IC_{50} verwendet.

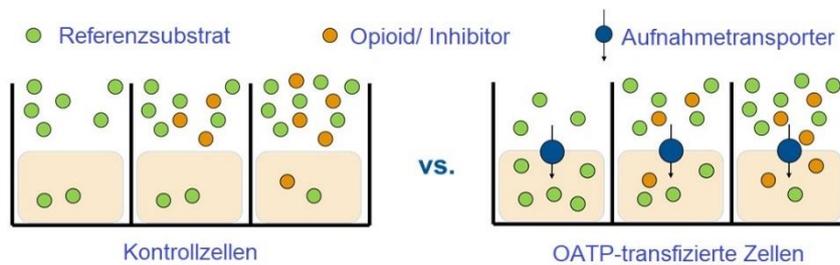


Abbildung 15: Funktionsprinzip des Wettbewerbsassays [10]

Inkubationslösungen für Wettbewerbsversuche

Alle Substratkonzentrationen sowie die Wells zur Funktionskontrolle werden in Dreifachbestimmung/Versuch getestet, siehe Abbildung 16. Der Substratpuffer (SP) für zwei Zellkulturplatten pro Versuch (OATP; Kontrollzelle) wird mit Inkubationspuffer und die dem Transportprotein zugehörigen Referenzsubstrat, siehe Tabelle 35, hergestellt. Hierzu wird von 200 μ l / Well einer 24-Well-Platte und 400 μ l / Well einer 12-Well-Platte und zusätzlich 10 % Reserve ausgegangen. Es werden pro Wettbewerbsversuch 3 Inkubationslösungen hergestellt. Für Inkubationslösung 1 wird reiner SP für die Funktionskontrolle für 3 Wells/ 24-Well-Platte benötigt, wie in Abbildung 16 dargestellt. Für Inkubationslösung 2 wird SP mit dem Transportprotein zugehörigen Inhibitor, siehe Tabelle 35, für weitere 3 Wells/ 24-Well-Platte versetzt. Für die Inkubationslösung 3 (SP + Opiat) werden die Opiate für die jeweiligen Verdünnungsreihen (6 Konzentrationen) nach den in Abbildung 17 und Abbildung 18 dargestellten Pipettierschemata in das erste von sechs Reaktionsgefäßen vorgelegt. Sufentanil (172,2 μ M) ist herstellerbedingt in Methanol gelöst. Für die Verdünnungsreihe von Fentanyl wird eine Arbeitslösung von 100 mM aus Fentanylcitrat durch Lösen in Methanol hergestellt. Ausgleichend zum in DMSO gelösten Naringin (OATP1A2-Inhibitor), wird bei den OATP1A2-Versuchen 0,5 % DMSO zur Inkubationslösung 1 (Substratpuffer ohne Inhibitor) hinzugeben. Der Substratpuffer wird entsprechend den Pipettierschemata aus Abbildung 17 und Abbildung 18 in die 6 Reaktionsgefäße zu dem bereits vorgelegten Opioid pipettiert

und die Verdünnungsreihe hergestellt. Die Inkubationslösungen werden bis zum Versuchsstart bei -20 °C gelagert.

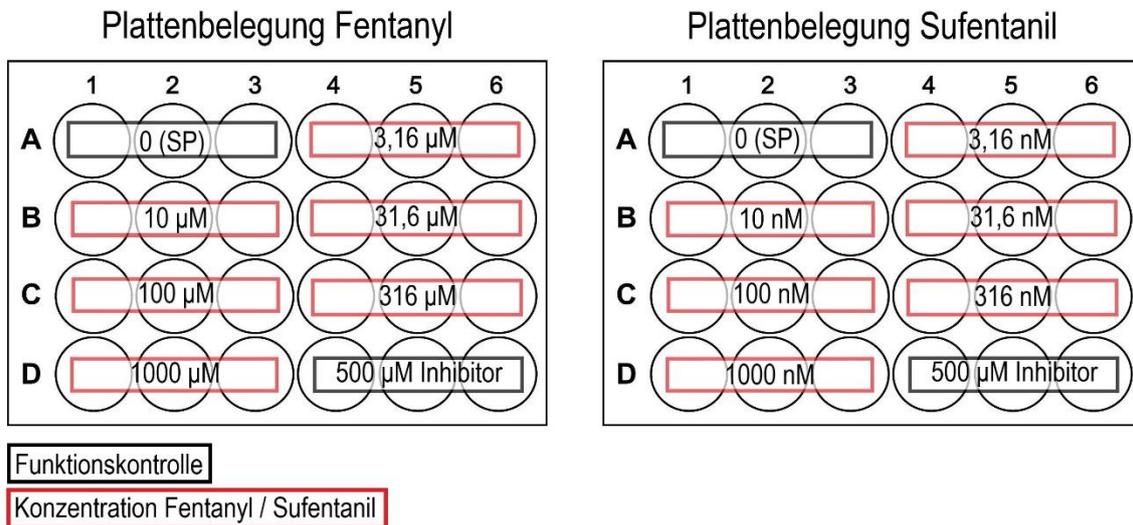


Abbildung 16: Kompetitionsassay Versuchsaufbau. Inhibitor OATP1A2: Naringin, Inhibitor OATP1B1: Rifampicin, modifiziert nach der 24-Well-Vorlage von Sigma-Aldrich [50]

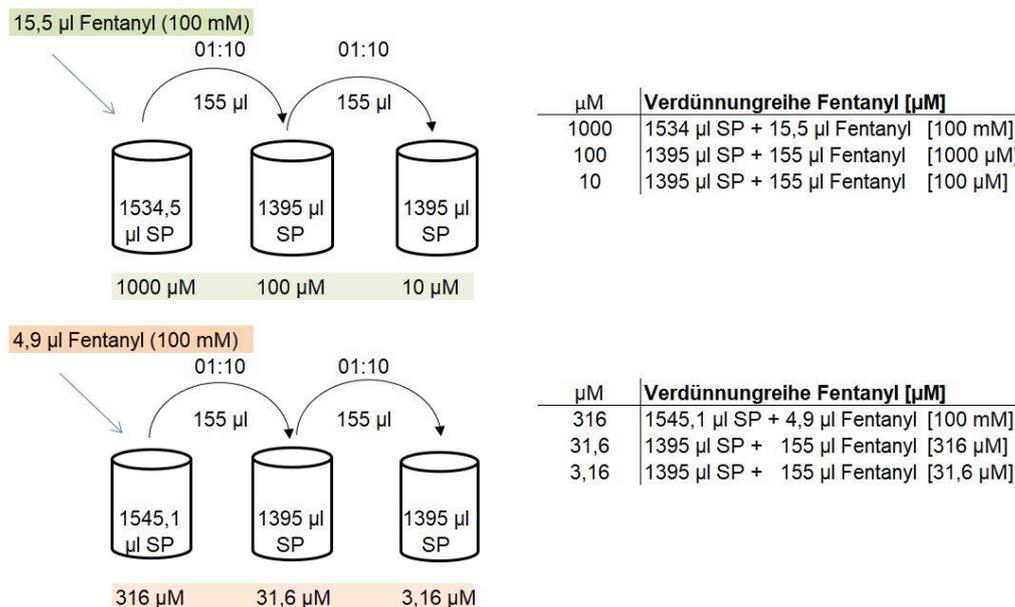
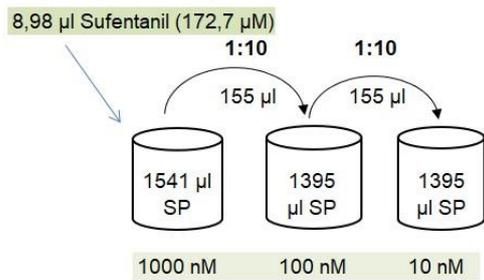
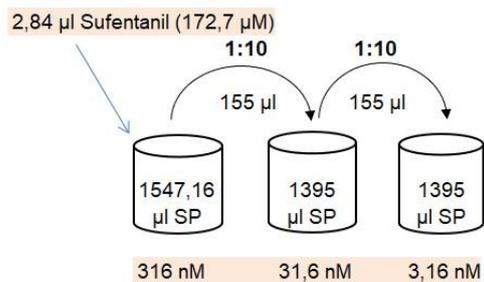


Abbildung 17: Pipettierschema Verdünnungsreihe Fentanyl für zwei 24-Well-Platten (OATP; Kontrollzelle)



| nM | Verdünnungsreihe Sufentanil [µM] |
|------|--|
| 1000 | 1541 µl SP + 8,98 µl Sufentanil [172,7 µM] |
| 100 | 1395 µl SP + 155 µl Sufentanil [1000 nM] |
| 10 | 1395 µl SP + 155 µl Sufentanil [100 nM] |



| nM | Verdünnungsreihe Sufentanil [µM] |
|------|---|
| 316 | 1547,16 µl SP + 2,84 µl Sufentanil [172,7 µM] |
| 31,6 | 1395 µl SP + 155 µl Sufentanil [316 nM] |
| 3,16 | 1395 µl SP + 155 µl Sufentanil [31,6 nM] |

Abbildung 18: Pipettierschema Verdünnungsreihe Sufentanil für zwei 24-Well (OATP; Kontrollzelle)

Versuchsdurchführung

Die Inkubationslösungen werden im Schüttler auf 37 °C erwärmt und vor der Verwendung kurz gevortext. Die 24-Well-Platten werden bis zum Auftragen der Inkubationslösungen im Inkubator bei 37 °C warm gehalten.

Bei Versuchsbeginn wird die Zellkultur mit IP gewaschen und anschließend 200 µl/Well Inkubationslösung auf die Wells gegeben. Nach 5 min Inkubation bei 37 °C wird die radioaktive Lösung entfernt und die Zellen zum Abstoppen der Reaktion drei Mal mit 0,5 ml/Well kaltem IP gewaschen. Mittels Multistep-Pipette werden 500 µl Lysispuffer I (Transportversuche) pro Well hinzugegeben und die Platte für 30 min auf die Schüttelplatte gestellt. Zur vollständigen Lyse der Zellen werden diese mit einer Mehrkanalpipette 20-Mal auf- und abpipettiert. Ein Teil des homogenisierten Zelllysats wird zur Proteinbestimmung gemäß Abschnitt 3.8.8 verwendet. Mittels Flüssigszintillationsmessung kann die Konzentration von radioaktiv markiertem Referenzsubstrat (³H-E3S/ -BSP) im Zelllysats bestimmt werden. Da für die jeweilige Referenzsubstanz ein Transport durch OATP1A2/ -1B1 bekannt ist, kann von einer Änderung der Transportrate auf einen Einfluss durch die Testsubstanz (Opioid) geschlossen werden. Für die Szintillationsmessung werden entsprechend der Anzahl der Wells 2-ml-Reaktionsgefäße mit je 1 ml Szintillationsflüssigkeit *Rotiszint Eco Plus* befüllt, 100 µl Zelllysats hinzugegeben und der Inhalt gevortext. Vor der Messung

werden die Reaktionsgefäße für 30 min auf der Schüttelplatte geschüttelt. Die Messung erfolgt am *Wallac 1409 Liquid scintillation counter* gemäß Herstellerangaben.

3.8.5 Aufnahmeassay-Screening

Im Rahmen dieser Arbeit werden Aufnahmeassay-Screenings nur mit OATP1A2-transfizierten Zellen durchgeführt, weil in vorangegangenen Kompetitionsassays dieser Arbeit keine Konkurrenz durch Fentanyl und Sufentanil für OATP1B1 nachgewiesen werden konnte. Die zelluläre Aufnahme des unmarkierten Opioids wird in An- bzw. Abwesenheit des Aufnahmetransporters untersucht. Das Funktionsprinzip ist in Abbildung 19 dargestellt. Es zeigt, dass auch die Kontrollzellen eine geringe Menge Substrat/Opioid über Diffusion aufnehmen. Bei einer 1,5-fach höheren Aufnahme des Opioids in die OATP-transfizierte Zellen im Vergleich zur Kontrollzelle wird das Opioid als Substrat des getesteten OATP bezeichnet. Die Opioidaufnahme sowohl durch Diffusion als auch transportbedingt wird mittels LC-MS/MS gemessen.

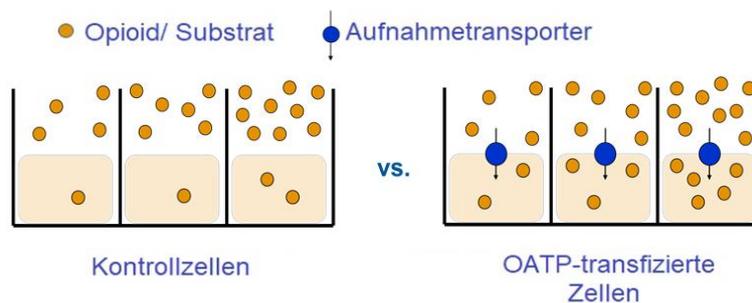


Abbildung 19: Funktionsprinzip des Aufnahmeassay-Screenings [51]

Es werden 2 – 4 Tage vor dem Versuch 200.000 Zellen in 24-Well-Platten ausgesät, siehe Abschnitt 3.8.1. Zu jeder Platte mit Transporter-überexprimierenden Zellen wird eine Platte mit Kontrollzellen ohne Transporter zu gleichen Bedingungen behandelt. Parallel werden Funktionskontrollen auf separaten Zellkulturplatten mit und ohne Inhibitor mit radioaktiv markiertem Referenzsubstrat (gemäß Abschnitt 3.8.2) und mit Fluoreszenz (gemäß Abschnitt 3.8.3) durchgeführt. Der Ansatz der 6 Inkubationslösungen wird bei einer 24-Well-Platte mit 200 µl / Well und 10 % Reserve berechnet. Der Aufnahmeversuch erfolgt in Dreifachbestimmung (3 Wells / Versuchsbedingung / Versuch). Das Substrat, das Opioid von Interesse, wird in drei Konzentrationen verwendet (Fentanyl: 0,1 µM, 1 µM, 10 µM), siehe Abbildung 20. Die Inkubationslösungen 1-3 enthalten IP und Opioid in den entsprechenden

Konzentrationen. Die Inkubationslösungen 4-6 enthalten 500 μM Naringin (OATP1A2-Inhibitor) zusätzlich zum IP und zum Opioid. Ausgleichend zum in DMSO gelösten Naringin (OATP1A2-Inhibitor) wird bei den OATP1A2-Aufnahmeversuchen 0,5 % DMSO zu den Inkubationslösungen 1-3 (IP + Opioid) hinzugeben.

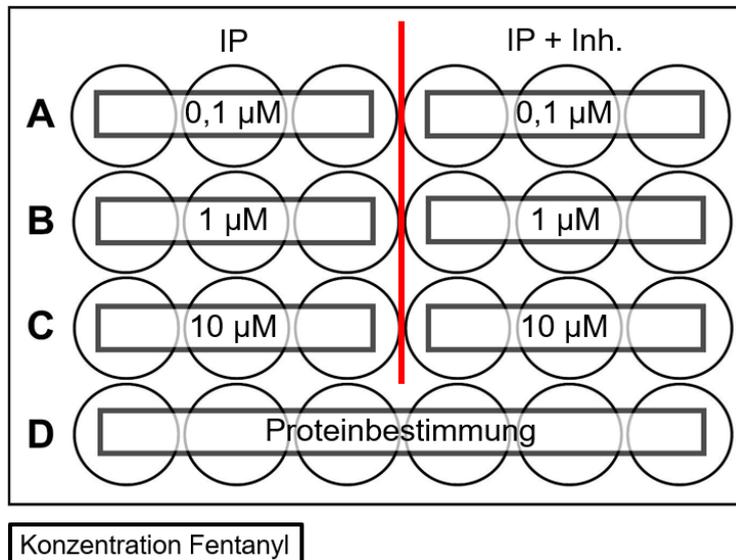


Abbildung 20: Aufnahmeassay-Screening Versuchsaufbau. Inhibitor OATP1A2: Naringin, modifiziert nach der 24-Well-Vorlage von Sigma-Aldrich [51]

Nach dem Entfernen des Zellkulturmediums und einmaligem Waschen mit 37 °C warmem IP werden die Zellen mit den Inkubationslösungen in den drei unterschiedlichen Opioidkonzentrationen 5 min bei 37 °C inkubiert. Die Lösungen werden entfernt und die Zellen drei Mal mit eisgekühltem PBS gewaschen. Die Platten werden bis zur LC-MS/MS-Messung – in Frischhaltefolie eingeschlagen – kurzfristig bei -20 °C oder langfristig bei -80 °C gelagert.

3.8.6 Zeit- und konzentrationsabhängige Aufnahmeassays

Aufgrund der Ergebnisse der Aufnahmeassay-Screenings, siehe 4.1.4, werden keine zeitabhängigen oder konzentrationsabhängigen Aufnahmeversuche durchgeführt.

3.8.7 LC-MS/MS-Analytik

Im Vorfeld der LC-MS/MS-Messungen für die Aufnahmeassay-Screenings wird eine Analytik für Fentanyl mit dem in Tabelle 36 aufgeführten Internen Standard entwickelt.

Tabelle 36: Verwendete Substrate der LC-MS/MS-Analytik

| Analyt | Interner Standard | Konzentration Interner Standard [μM] | Lysispuffer II |
|----------|-------------------|---|--------------------------|
| Fentanyl | Dextromethorphan | 10 | 80 % ACN + 20 % A. dest. |

Zur Vorbereitung der Messung werden 500 μl Lysispuffer II (LC-MS/MS-Analytik), siehe Abschnitt 3.8.1, in jedes Well gegeben. Der hierzu verwendete Lysispuffer II (LC-MS/MS-Analytik), siehe Tabelle 36, enthält 10 μM Dextromethorphan als internen Standard. Es werden mindestens 400 μl von dem Lysat jeder Probe in ein 1,5-ml- Reaktionsgefäß übertragen. Nach 15 min Zentrifugation bei 16.000 x g und RT werden 350 μl des klaren Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß übertragen. Des Weiteren wird eine Kalibrationsfunktion beginnend mit dem Lysispuffer II (LC-MS/MS-Analytik) gemäß Tabelle 37 angesetzt. Für den Ansatz der Fentanyl-Verdünnungsreihe werden 33 μl Fentanyl-SL (10 μM) für K8 in 633 μl Lysispuffer II (LC-MS/MS-Analytik) pipettiert. Fortlaufend wird nun die für die Verdünnungsreihe angegebene Menge in das nächste Reaktionsgefäß überführt, beginnend mit 167 μl von K8 zu K7, 333 μl von K7 zu K6 usw.. Abschließend werden 350 μl von K1-K8 in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Ansätze der Proben und der Kalibrationsfunktion werden für 1-2 Stunden bei 40 °C und einem Druck von 2 bar reduziert. Der Rückstand wird in 200 μl 0,1 %iger Ameisensäure resuspendiert und 15 s gevortext. Nach 5 min Zentrifugation bei 16.000 x g werden 90 μl in ein Messvial mit Insert überführt. Die Messung erfolgt am *API 4000 QTRAP*® Massenspektrometer sowie dem *Nexera X2 series HPLC*-System zu den in Tabelle 38 aufgeführten Konditionen.

Tabelle 37: Ansatz Kalibrationsfunktion

| Kalibrationsfunktion | Fentanyl [nM] | Lysispuffer II [μl] | Fentanyl-Verdünnungsreihe [μl] | | Total [μl] |
|----------------------|---------------|----------------------------------|---|-----|-------------------------|
| K1 | 0,1 | 400 | K1 | 100 | 500 |
| K2 | 0,5 | 300 | K2 | 300 | 600 |
| K3 | 1 | 640 | K3 | 160 | 800 |
| K4 | 5 | 330 | K4 | 330 | 660 |
| K5 | 10 | 664 | K5 | 166 | 830 |
| K6 | 50 | 333 | K6 | 333 | 666 |
| K7 | 100 | 666 | K7 | 167 | 833 |
| K8 | 500 | 633 | SL-Fentanyl | 33 | 666 |

Tabelle 38: Messparameter der LC-MS/MS-Analyse

| Analyt | Masse-ladungs-übergang [m/z] | Retentionszeit [min] | Interner Standard (IS) | Masse-ladungs-übergang des IS [m/z] | Retentionszeit des IS [min] | Organische Lösung in mobiler Phase (AcN) | Flow rate [µl/min] |
|----------|------------------------------|----------------------|------------------------|-------------------------------------|-----------------------------|--|--------------------|
| Fentanyl | 338,5> 105,2 | 4,51 | Dextromethorphan | 272> 215,171 | 4,24 | 20 % | 700 |

3.8.8 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgt im Rahmen der Funktionskontrollen, der Kompetitionsassays und der Aufnahmeassay-Screenings. Dazu werden abgestorbene Zellen durch Waschschriffe mit dem Überstand entfernt. In den Funktionskontrollen und Kompetitionsassays geschieht dies vor der Zelllyse. In den Aufnahmeassay-Screenings sind 6 separate Wells für die Proteinbestimmung vorgesehen, siehe Abbildung 20. Eine Verdünnungsreihe wird entsprechend Tabelle 39 erstellt. Die BSA-Lösung wird mit dem *Pierce™ BCA Protein Assay Kit* nach Herstellerangaben angesetzt. Aus der im Kit enthaltenen BSA-Stammlösung (Reagent A 2 mg/ml) wird eine mit Lysispuffer I (Transportversuche) verdünnte Arbeitslösung (0,2 mg/ml) angesetzt.

Tabelle 39: Verdünnungsreihe für die Kalibration der Proteinbestimmung

| Probe | cBSA (ng/µl) | BSA-Lösung | Lysispuffer I |
|----------|--------------|------------|---------------|
| Leerwert | 0 | 0 | q.s. |
| K1 | 10 | 3 µl AL | 57 µl |
| K2 | 15 | 4,5 µl AL | 55,5 µl |
| K3 | 20 | 6 µl AL | 54 µl |
| K4 | 30 | 9 µl AL | 51 µl |
| K5 | 40 | 1,2 µl SL | 58,8 µl |
| K6 | 60 | 1,8 µl SL | 58,2 µl |
| K7 | 80 | 2,4 µl SL | 57,6 µl |
| K8 | 120 | 3,6 µl SL | 56,4 µl |
| K9 | 160 | 4,8 µl SL | 55,2 µl |
| K10 | 240 | 7,2 µl SL | 52,8 µl |
| K11 | 320 | 9,6 µl SL | 50,4 µl |

Auf eine 96-Well-Platte werden je 25 µl der angesetzten Kalibratoren K1-K11 in Doppelbestimmung sowie in das 1. Well der Verdünnungsreihen 25 µl Lysispuffer I (Transportversuche) als Leerwert überführt. Von den Zellkulturplatten aus der Funktionskontrolle, dem Kompetitions- oder Aufnahmeassay-Screening werden je 25 µl homogenisiertes Zellysate auf eine weitere 96-Well-Platte übertragen und nach

Herstellerangaben mit den Reagenzien (Reagent B) des BCA-Kits versetzt. Nach der Inkubation für 90 min bei 37 °C wird die Messung der Absorption bei 562 nm am *Tecan infinite M200* durchgeführt. Unterschiede in den Proteinwerten der Zellen verschiedener Wells geben Aufschluss über die Vergleichbarkeit des Proteingehaltes inklusive der Transportproteine und die Vitalität der Zellen. Da abgestorbenes Zellmaterial vor der Proteinbestimmung aus den Wells entfernt wird, können deutlich niedrigere Proteinwerte in einigen Wells auf ein Absterben der Zellen hinweisen. Die Menge des aufgenommenen Substrates wird in Relation zur Menge des Proteingehaltes inklusive der Transportproteine mit *GraphPad Prism 8* ausgewertet und in [pmol / mg Protein x min] angegeben.

4 Ergebnisse

4.1 Effekt der Opioiden Fentanyl & Sufentanil auf OATP

4.1.1 Funktionskontrollen von HEK-pQCXIN::OATP1A2 und -1B1

Die Funktionalität der Transporter OATP1A2, -1B1 in mit pQCXIN-OATP transfizierten HEK-293 Zellen wurde durch Funktionskontrollen mit einer ^3H -markierten Referenzsubstanz (^3H -E3S, ^3H -BSP) für Organische-Anionen-Transporter überprüft. Als Kontrolle dienten HEK-pQCXIN. Gegenüber der Kontrollzelle zeigten die HEK-OATP1A2 eine 5,3-fache Aufnahme von E3S und die HEK-OATP1B1 eine 12-fache BSP-Aufnahme, siehe Abbildung 21 und Abbildung 22. Da die Aufnahme des Referenzsubstrates durch spezifische Inhibitoren gehemmt werden konnte, ist der OATP-abhängige Transport und somit die Funktionalität der OATP-überexprimierenden Zellen belegt. Die Kontrollzellen zeigen lediglich eine geringe Aufnahme über Diffusion. Nachfolgende Transportversuche wurden mit pQCXIN::OATP1A2 und -1B1 transfizierten HEK-293 Zellen durchgeführt, siehe Abschnitt 4.1.3.

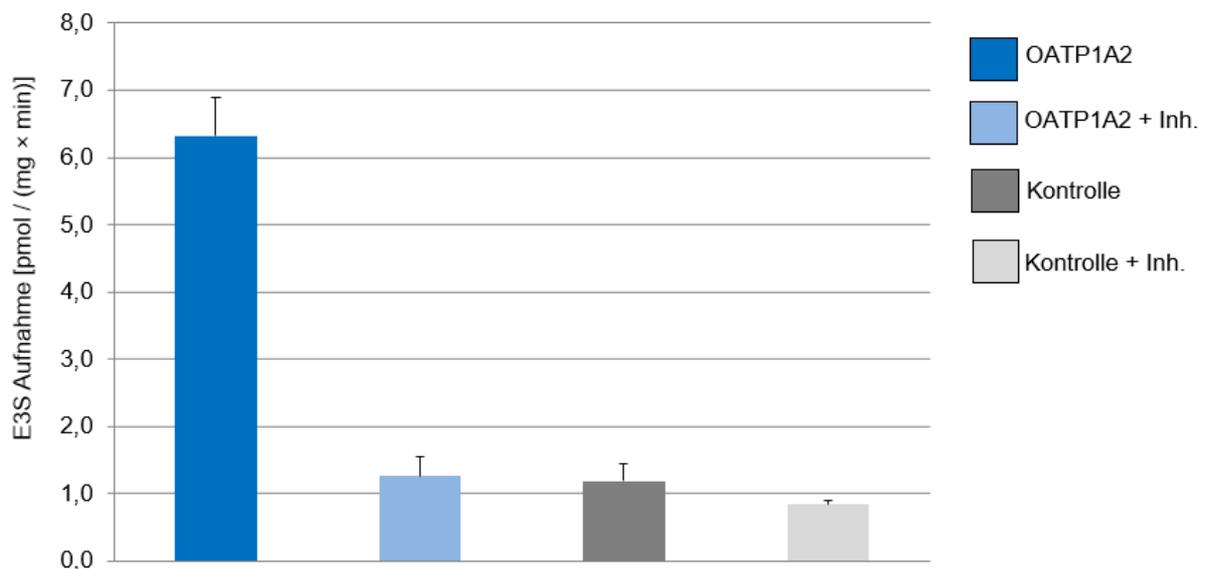


Abbildung 21: Funktionskontrollen HEK-pQCXIN::OATP1A2. Aufnahme von E3S, Kontrollzellen: HEK-pQCXIN, Inh.: 500 μM Naringin (n = 3; MW \pm SD)

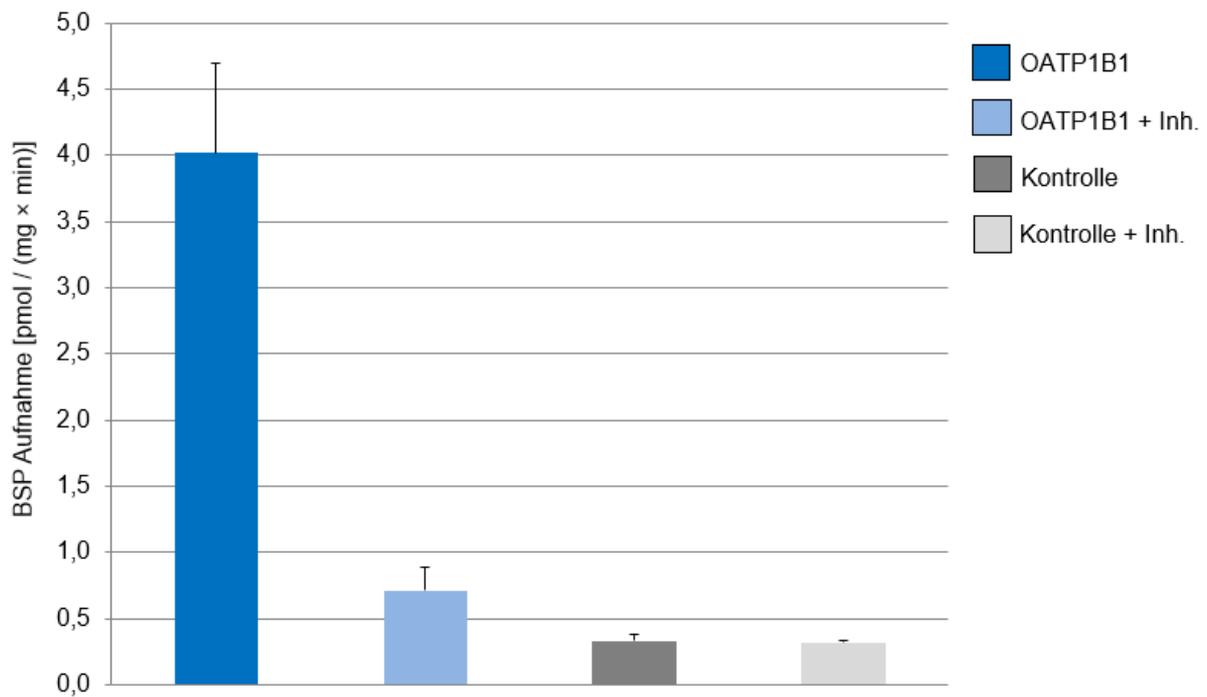


Abbildung 22: Funktionskontrollen HEK-pQCXIN::OATP1B1. Aufnahme von BSP, Kontrollzellen: HEK-pQCXIN, Inh.: 500 μ M Rifampicin (n = 3; MW \pm SD)

4.1.2 Funktionskontrolle mit fluoreszierendem Substrat als Alternative zu radioaktivem Substrat

Die Funktionskontrolle mit Rhodamin-123 wurde testweise parallel zur Funktionskontrolle mit 3 H-markiertem Referenzsubstrat bei den Aufnahmeassays angewandt. Rhodamin-123 ist ein Indikatorfarbstoff der Rhodamin-Familie der Fluoron-Farbstoffe. Dieser Farbstoff passiert die Zellmembran sowohl passiv in Form von Mizellen als auch mittels Membrantransportproteinen wie OATP1A2. [44] Die Messung erfolgt bei einer anregenden Wellenlänge von 485 nm und einer gemessenen Emission bei 550 nm. Diese Methode der Funktionskontrolle zeigt eine 8,5-fache Aufnahme von Rhodamin-123 der OATP1A2-überexprimierenden Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen, siehe Abbildung 23. Die Aufnahme von Rhodamin-123 konnte durch den spezifischen Inhibitor Naringin gehemmt werden. Die Kontrollzellen zeigen eine geringere Aufnahme, welche durch Diffusion bedingt ist.

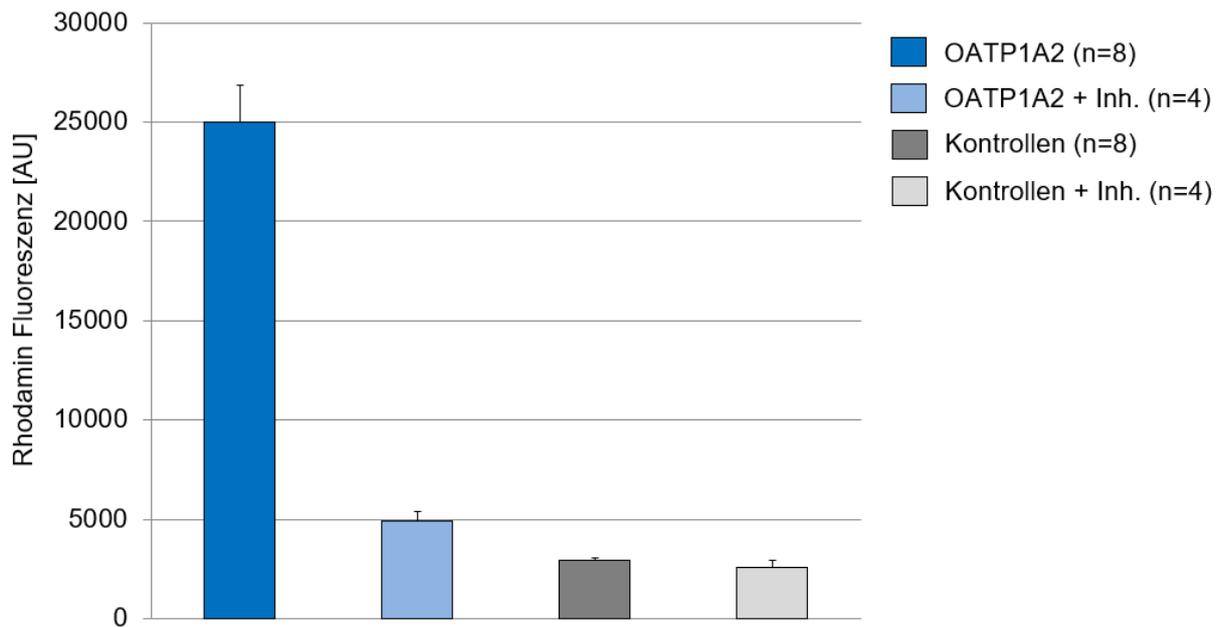


Abbildung 23: Funktionskontrolle mit Rhodamin-123 von Zellkulturen der Aufnahmeversuche mit HEK-pQCXIN::OATP1A2. Inh.: 500 μ M Naringin, [AU] = *arbitrary unit*, relative Einheit (n = 4-8; MW \pm SD)

4.1.3 Wettbewerbsassay mit Fentanyl und Sufentanil

Zur Untersuchung der Affinität von Fentanyl und Sufentanil zu den OATP wurden Wettbewerbsassays durchgeführt. Hierzu wurden stabil transfizierte HEK-pQCXIN::OATP1A2 und -OATP1B1 verwendet.

4.1.3.1 Fentanyl beeinflusst OATP1A2 in Wettbewerbsassays

In HEK-pQCXIN::OATP1A2 wurden jeweils 4 Versuche mit Fentanyl und Sufentanil durchgeführt. Die transfizierten Zellen zeigten in den Funktionskontrollen eine 4- bis 5-fache Aufnahme des Referenzsubstrates im Vergleich zu den Kontrollzellen. Diese Aufnahme konnte mit einem spezifischem Inhibitor gehemmt werden. Die Wettbewerbsassays mit der Opioid-Transporter-Kombination Fentanyl/OATP1A2 zeigten eine abnehmende Substrataufnahme mit steigender Opioidkonzentration (3,16 μ M, 10 μ M, 31,6 μ M, 100 μ M, 316 μ M, 1000 μ M), siehe Abbildung 24. Es wurde eine mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) von 14,17 μ M für die Opioid-Transporter-Kombination Fentanyl/OATP1A2 ermittelt. Diese Inhibition konnte für die Opioid-Transporter-Kombination Sufentanil/OATP1A2 nicht nachgewiesen werden, siehe Abbildung 25. Die Versuche deuteten einen minimalen Effekt von Sufentanil auf OATP1A2 an. Die E3S-Aufnahme nimmt mit steigender Sufentanil-Konzentration von

10,96 pmol (E3S) / (mg Protein x min) bei 0,316 nM auf 8,29 pmol (E3S) / (mg Protein x min) bei 1000 nM um 24,48 % ab. Um aussagekräftige Ergebnisse zu erzielen, wären höhere Sufentanil-Konzentrationen nötig, jedoch ist dieses sehr starke Opioid im Handel nicht in höheren Konzentrationen als 100 µg/ml verfügbar. Die Wettbewerbsversuche mit Sufentanil wurden in den Konzentrationen 3,16 nM, 10 nM, 31,6 nM, 100 nM, 316 nM, 1000 nM durchgeführt.

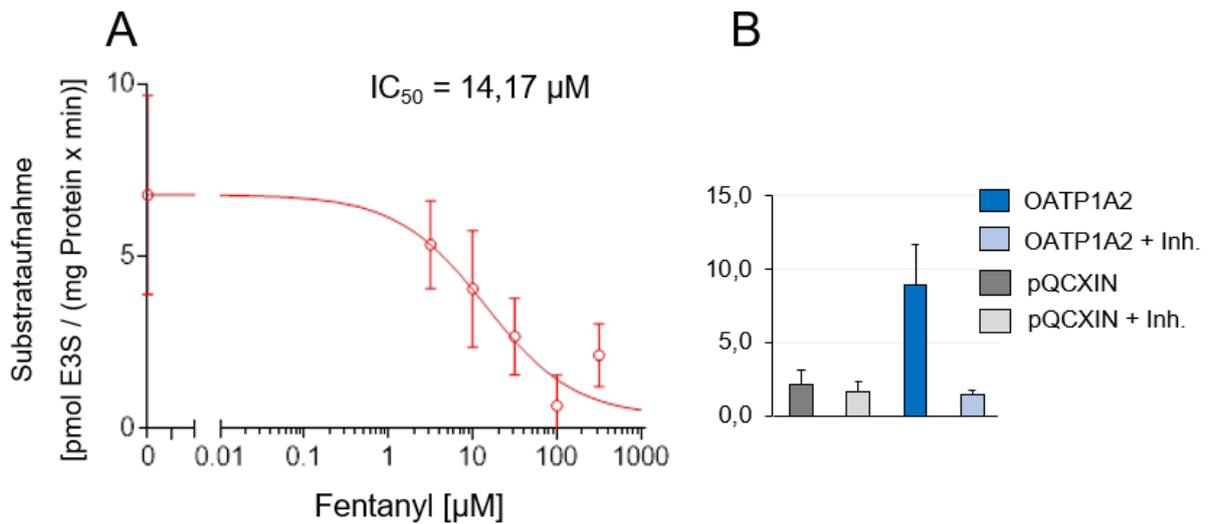


Abbildung 24: Wettbewerbsassays Fentanyl/OATP1A2. A: Wettbewerbsassay, Darstellung der Substrataufnahme der OATP1A2-überexprimierenden Zellen abzüglich der Aufnahme der Kontrollzellen; B: Funktionskontrolle, Substrataufnahme [pmol (E3S) / (mg Protein x min)], Inh.: 500 µM Naringin (n = 4; MW ± SD)

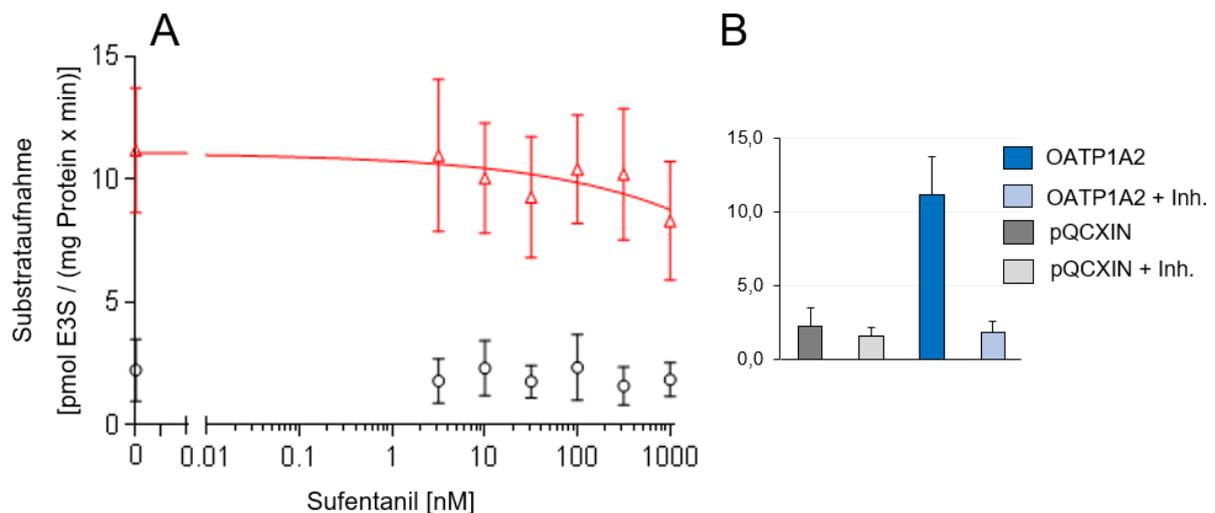


Abbildung 25: Wettbewerbsassays Sufentanil/OATP1A2. A: Wettbewerbsassay, Grau = Kontrollzellen, Rot = OATP-transfizierte Zellen; B: Funktionskontrolle, Substrataufnahme [pmol (E3S) / (mg Protein x min)], Inh.: 500 µM Naringin (n = 4; MW ± SD)

4.1.3.2 Kein Effekt auf OATP1B1 in Wettbewerbsassays

Es wurden je 4 Versuche mit Fentanyl und Sufentanil mit HEK-pQCXIN::OATP1B1 durchgeführt. Die Wettbewerbsassays mit der Opioid-Transporter-Kombination Fentanyl/OATP1B1 zeigten einen leichten Abfall der Substrataufnahme von BSP bei einer steigenden Konzentration von Fentanyl von 4,9 pmol (BSP / (mg Protein x min) bei 0,316 μ M auf 8,29 pmol (BSP) / (mg Protein x min) bei 1000 μ M, siehe Abbildung 26. Die Versuche mit der Opioid-Transporter-Kombination Sufentanil/OATP1B1 zeigten keine Inhibition durch das Opioid, siehe Abbildung 27. Die transfizierten Zellen zeigen in den Funktionskontrollen die 9,2 bis 12,3-fache Aufnahme des Referenzsubstrates im Vergleich zu den Kontrollzellen.

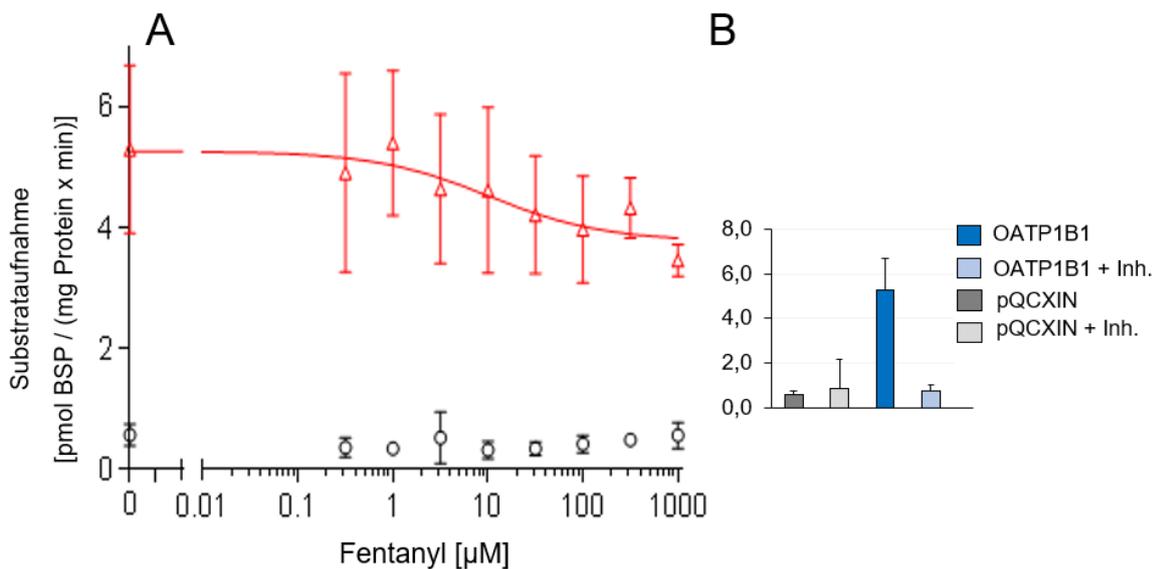


Abbildung 26: Wettbewerbsassays Fentanyl/OATP1B1. A: Wettbewerbsassay, Grau = Kontrollzellen, Rot = OATP-transfizierte Zellen; B: Funktionskontrolle, Substrataufnahme [pmol (BSP) / (mg Protein x min)], Inh.: 500 μ M Rifampicin (n = 4; MW \pm SD)

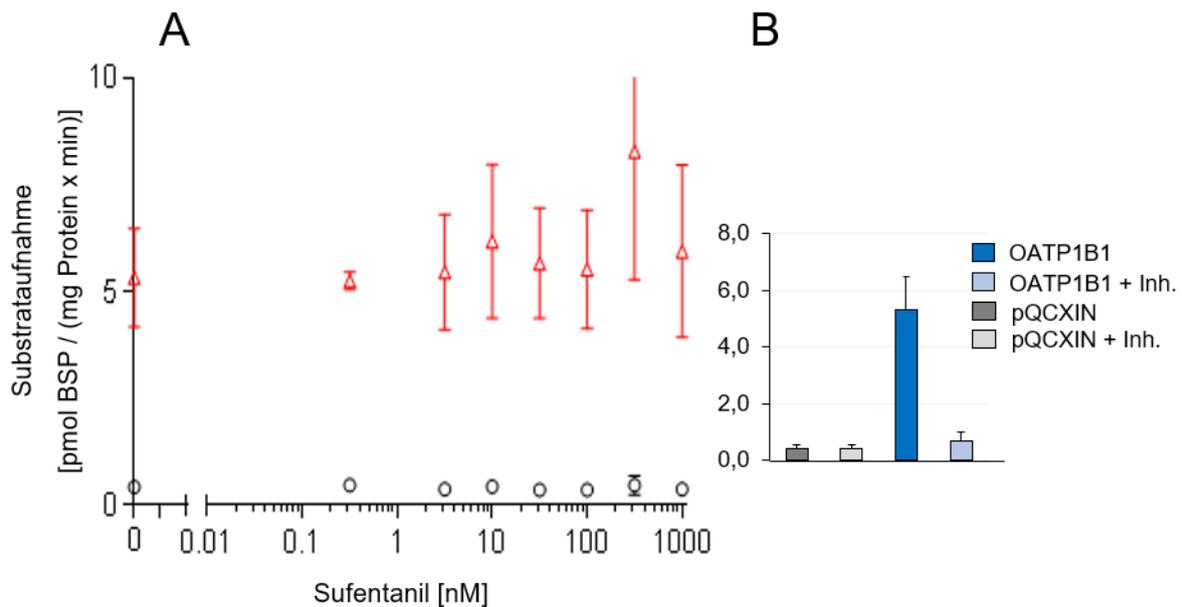


Abbildung 27: Kompetitionsassays Sufentanil/OATP1B1. A: Kompetitionsassay, Grau = Kontrollzellen, Rot = OATP-transfizierte Zellen; B: Funktionskontrolle, Substrataufnahme [pmol (BSP) / (mg Protein x min)], Inh.: 500 μ M Rifampicin (n = 4; MW \pm SD)

4.1.4 Aufnahmeassay-Screening von Fentanyl in HEK-pQCXIN::OATP1A2

Bei Nachweis einer kompetitiven Inhibition in den Kompetitionsassays der Opioid-Transporter-Kombination Fentanyl/OATP1A2 folgten Aufnahmeassay-Screenings zur Untersuchung des Transportes von Fentanyl durch OATP1A2. Da die Effekte der Opioide auf OATP1A2-transfizierte Zellen in den Kompetitionsassays höher waren als auf OATP1B1-transfizierte Zellen, wurden die Aufnahmeversuche mit der Opioid-Transporter-Kombination Fentanyl/OATP1A2 fortgesetzt. Aufgrund der in Abschnitt 4.1.3.1 dargestellten Gründe wurden keine weiteren Experimente mit Sufentanil durchgeführt.

Auswertung der Aufnahmeassay-Screenings mit LC-MS/MS-Analytik

Die Aufnahmeassay-Screenings zeigten keinen Unterschied in der Fentanylaufnahme zwischen OATP1A2-transfizierten Zellen und den Kontrollzellen, siehe Abbildung 28. Dass die Aufnahme der OATP-überexprimierenden Zellen nicht die Aufnahme der Kontrollzellen übersteigt ist ebenfalls der Abbildung 29 zu entnehmen. Es ist anzunehmen, dass Fentanyl nur ein Inhibitor von OATP1A2 ist und nicht selbst transportiert wird, daher wurden keine zeit-/konzentrationsabhängigen Aufnahmeassays durchgeführt.

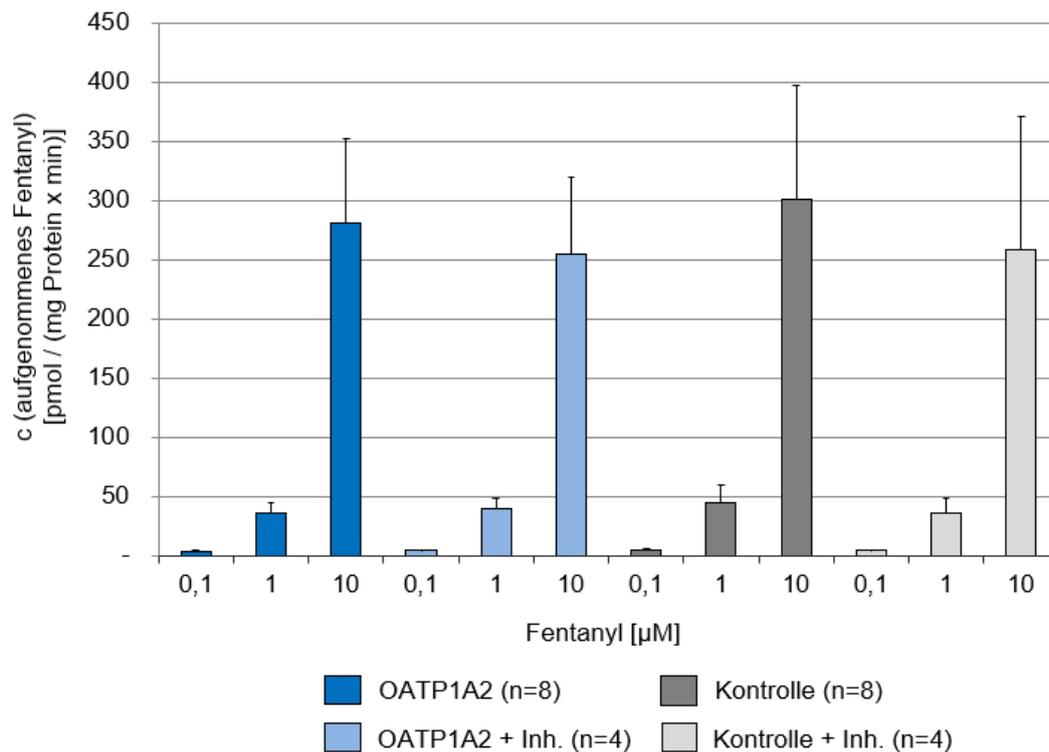


Abbildung 28: LC-MS/MS-Messung Aufnahmeassay-Screening Fentanyl. Aufnahme von Fentanylcitrat in HEK-pQCXIN::OATP1A2 in [pmol/ (mg Protein x min)], Kontrolle: HEK-pQCXIN; Inh.: 500 µM Naringin (n = 4-8; MW ± SD)

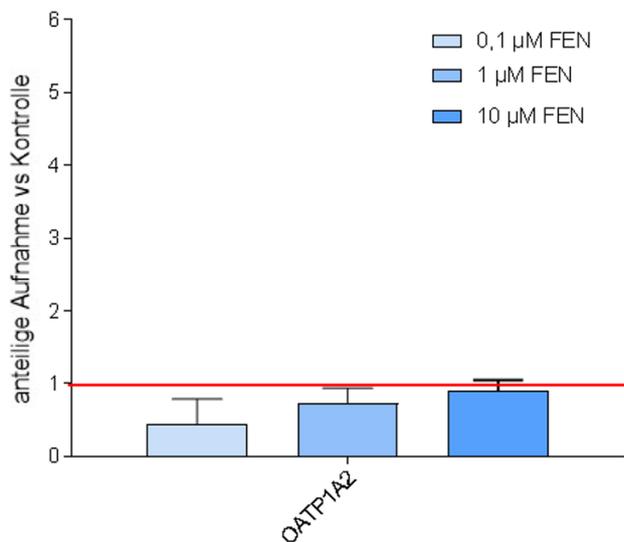


Abbildung 29: Aufnahmeassay-Screening Fentanyl. Normalisierung der Daten des Aufnahmeassay-Screenings mit HEK-pQCXIN::OATP1A2 auf die Aufnahme in die Kontrollzellen HEK-pQCXIN, Aufnahme in die Kontrollzellen = 1

4.2 Generierung stabil transfizierter T-REx™-pcDNA5/FRT::OATP1A2

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe der Klinik für Anästhesiologie der Universitätsmedizin Greifswald wurden mit zunehmender Zeit in Kultur von pQCXIN-stabil-transfizierten Zellen fluktuierende oder abnehmende Aktivität in den Funktionskontrollen bemerkt. Daher stellte ein wesentliches Ziel dieser Arbeit die Generierung eines neuen Zellmodells mit einer langfristig stabileren und reproduzierbareren Überexpression von OATP, verglichen mit der Überexpression im Zellmodell mit pQCXIN, dar. Zur Herstellung stabil transfizierter T-REx™-pcDNA5/FRT::OATP1A2 wurden drei Klonierungsstrategien verfolgt, siehe Tabelle 12. Für die erste Strategie wurde das Plasmid pcDNA5/FRT::OATP1A2 (Variante 0) des Instituts für Klinische Pharmakologie der Universität Greifswald umkloniert, welches im Rahmen der Dissertation von Anna Bauer erarbeitet wurde und strukturelle Fehler aufwies. Hierbei entstand pcDNA5/FRT::OATP1A2 (Variante 1), mit dem sich nachfolgend keine funktionellen Klone erzeugen ließen. Daher wurde in einer zweiten Strategie das sequenzierte Insert OATP1A2 aus Variante 1 extrahiert, der Vektor von pcDNA5/FRT::hOCT1_FLAG isoliert und beide Sequenzen ligiert. Das entstandene Plasmid, im Folgenden als pcDNA5/FRT::OATP1A2 Variante 2 bezeichnet, wurde ebenfalls transfiziert. Für die dritte Klonierungsstrategie wurde ein bereits kloniertes Plasmid pcDNA5/FRT::OATP1A2 (Variante 3) eingesetzt, welches durch Prof. Dr. Y. Hagos zur Verfügung gestellt wurde. Da die Varianten 1 und 2 eine zu geringe Aktivität in den Funktionskontrollen nach den transienten Transfektionen zeigten, wurde die stabile Transfektion lediglich mit Variante 3 durchgeführt.

4.2.1 Klonierungsstrategie pcDNA5/FRT::OATP1A2 Variante 1

4.2.1.1 *pcDNA5/FRT::OATP1A2: Insert in umgekehrter Orientierung*

Zur Überprüfung der Ausgangsvariante (Variante 0) von pcDNA5/FRT::OATP1A2 konnte mittels Kontrollverdau mit HindIII und EcoRI die korrekte Plasmidgröße inklusive OATP1A2-Insert von 7052 bp nachgewiesen werden (siehe Anhang Abbildung 40). Als Ursache für die fehlende Funktionalität ergaben weitere Analysen, dass das Insert OATP1A2 in umgekehrter Orientierung in den Expressionsvektor eingebaut wurde. Die einzelnen Schritte zur Korrektur der Ausrichtung des Inserts von Variante 0 werden in Abbildung 14 veranschaulicht. Der OATP1A2-Genabschnitt wurde mittels PCR aus pcDNA5/FRT::OATP1A2 (Variante 0) des *E. coli*-Klons 2-2

isoliert und nach einem präparativen Restriktionsverdau mit EcoRV und KpnI (siehe Anhang Abbildung 41 und Abbildung 42) mit dem Expressionsvektor pcDNATM5/FRT ligiert. Die Plasmide wurden mithilfe mehrfachen Kontrollverdau mit BamHI, HindIII, EcoRI, PstI, Sall, XbaI, SacI, EcoRV sowie mittels Sequenzierung mit den Primern pcDNA5_for, OATP1A2_1_for, OATP1A2_2_for, OATP1A2_4_for, OATP1A2_5_for, OATP1A2_7_for, OATP1A2_1_rev überprüft. Die Untersuchungen von pcDNA5/FRT::OATP1A2 Variante 1 zeigten einen ordnungsgemäßen Einbau des Inserts in den Expressionsvektor und einen korrekten Aufbau des Plasmids. Das nach der Umklonierung entstandene Plasmid pcDNA5/FRT::OATP1A2 wird im Folgenden als Variante 1 (V1) bezeichnet.

4.2.1.2 Transiente Transfektion von Variante 1

Es wurden drei transiente Transfektionen mit pcDNA5/FRT::OATP1A2 Variante 1 aus zwei *E. coli*-Klonen, pcDNATM5/FRT als Negativkontrolle und pQCXIN::OATP1A2 als Positivkontrolle durchgeführt. Die Funktionskontrollen der Transfektionen ergaben eine 1,2- bis 1,3-fache Substrataufnahme der pcDNA5/FRT::OATP1A2-transfizierten Klone im Vergleich zu den Kontrollzellen mit pcDNATM5/FRT sowie eine deutlich verminderte Funktionalität im Vergleich zu den mit pQCXIN-OATP1A2 transfizierten Zellen, welche das 8,7 bis 9,8-fache an Substrat transportierten (siehe Abbildung 30). Die Transfektionseffizienz wurde nach Kotransfektion mit pGFP-tpz überprüft und zeigte sich für alle Plasmide visuell vergleichbar. Um die Ursache der Funktionsunterschiede der pcDNA5/FRT-transfizierten Zellen zu den pQCXIN-transfizierten Zellen zu detektieren, wurde eine Sequenzierung der transfizierten Plasmide von Variante 1 (pcDNA5/FRT::OATP1A2) und pQCXIN::OATP1A2 mit den Primern pcDNA5_for, OATP1A2_1_for, OATP1A2_2_for, OATP1A2_5_for, OATP1A2_7_for, OATP1A2_4_for_new, OATP1A2_6_rev, OATP1A2_1_rev durchgeführt. Weiterhin ergab sich kein Hinweis auf eine fehlerhafte Sequenz in der OATP1A2-Sequenz und an den Übergängen zum Expressionsvektor von pcDNA5/FRT::OATP1A2 Variante 1.

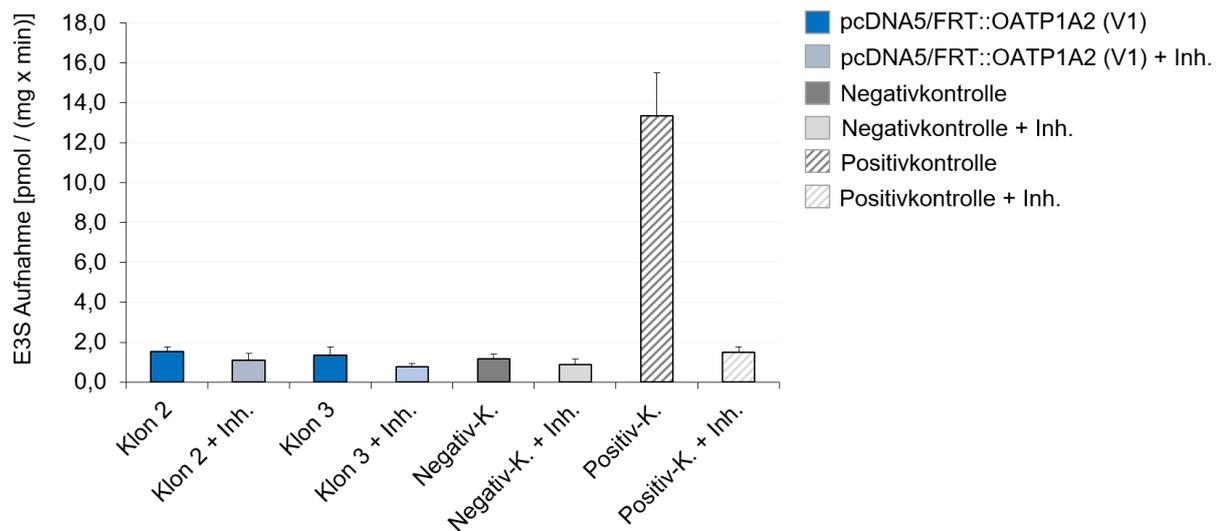


Abbildung 30: Funktionskontrolle T-REx™-pcDNA5/FRT::OATP1A2 (Variante 1) nach transienter Transfektion von pcDNA5/FRT::OATP1A2 aus *E. coli*-Klon 2+3, Negativkontrolle pcDNA5/FRT, Positivkontrolle pQCXIN::OATP1A2, Inh.: 500 µM Naringin (n = 3; MW ± SD)

4.2.2 Klonierungsstrategie pcDNA5/FRT::OATP1A2 Variante 2

Da die Ursache der verminderten Funktionalität von pcDNA5/FRT::OATP1A2 Variante 1 nicht ermittelt werden konnte, wurde eine neue Variante pcDNA5/FRT::OATP1A2 aus dem Expressionsvektor des funktionsfähigen Plasmids pcDNA5/FRT::hOCT1_FLAG und dem Insert OATP1A2 aus pcDNA5/FRT::OATP1A2 Variante 1 generiert, um so mögliche Fehler in der Sequenz des Expressionsvektors auszuschließen. Es erfolgte ein präparativer Restriktionsverdau mit EcoRV und anschließend SacI von pcDNA5/FRT::OATP1A2 (Variante 1) aus den *E. coli*-Klonen 2 und 3 sowie pcDNA5/FRT::hOCT1_FLAG mit EcoRV mit anschließender Gelextraktion, siehe Abbildung 31. Der OATP1A2-Genabschnitt und der leere Expressionsvektor pcDNA™5/FRT wurden ligiert und in *E. coli* Bakterien transformiert. Drei *E. coli*-Klone ausgehend von pcDNA5/FRT::OATP1A2 Klon 2 wurden vorbereitend für die transiente Transfektion mittels Festphasenextraktion isoliert und im Kontrollverdau mit HindIII, BamHI und EcoRI überprüft, siehe Abbildung 32. Das generierte Plasmid wird im Folgenden als pcDNA5/FRT::OATP1A2 Variante 2 (V2) gekennzeichnet.

4.2.2.1 Transiente Transfektion von Variante 2

Es erfolgte eine transiente Transfektion in T-REx™-293-Zellen mit pcDNA5/FRT::OATP1A2 (Variante 2) aus den *E. coli*-Klonen 2.4, 2.5, 2.10 und pGFP-tpz, pcDNA5/FRT, pcDNA5/FRT::hOCT1_FLAG, pQCXIN-OATP1A2 als Kontrolle. Für alle Plasmide zeigte sich eine vergleichbare Transfektionseffizienz, welche nach Kotransfektion mit pGFP-tpz fluoreszenzmikroskopisch überprüft wurde. Hierzu wurden keine Abbildungen erstellt. Die Funktionskontrolle ergab, dass T-REx™-pQCXIN-OATP1A2 im Vergleich zu T-REx™-pcDNA5/FRT::OATP1A2 die 6,5- 9,6-fache Substratmenge transportiert (siehe Abbildung 33).

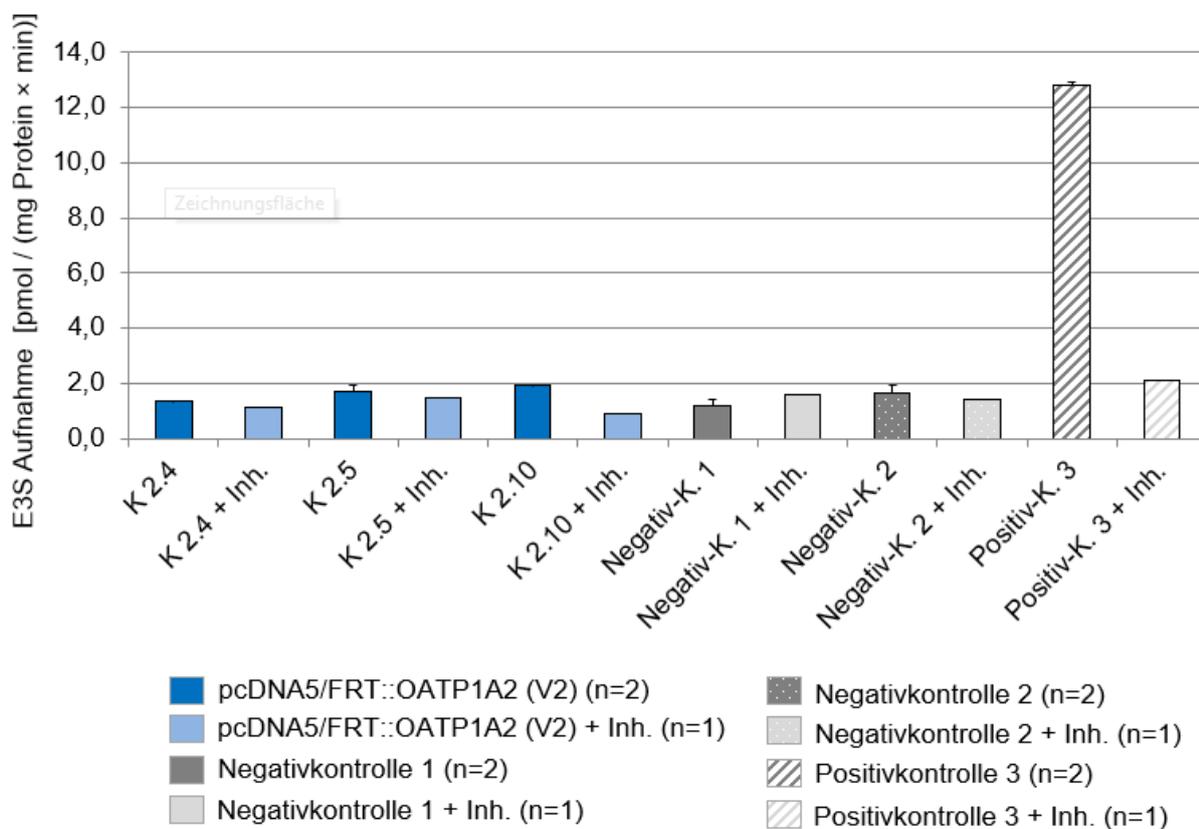


Abbildung 33: Funktionskontrolle T-REx™-pcDNA5/FRT::OATP1A2 (Variante 2) nach transienter Transfektion: pcDNA5/FRT::OATP1A2 aus *E. coli*-Klon 2.4, 2.5, 2.10; Negativkontrolle 1: pcDNA5/FRT, Negativkontrolle 2: pcDNA5/FRT::hOCT1_FLAG; Positivkontrolle: pQCXIN::OATP1A2, Inh.: 500 µM Naringin (n = 1-2; MW ± SD)

4.2.3 Transfektionen mit pcDNA5/FRT::OATP1A2 Variante 3

4.2.3.1 Transiente Transfektion

Da die Generierung eines neuen funktionsfähigen Plasmids pcDNA5/FRT::OATP1A2 mit den oben beschriebenen Strategien nicht erfolgreich verlief, stellte Prof. Dr. Y. Hagos das Plasmid pcDNA5/FRT::OATP1A2 (Variante 3) zur Verfügung. Abbildung 34 zeigt die Plasmidkarte des verwendeten Plasmids. Die Referenzsequenz für das OATP1A2-Insert ist NM_021094.4. Nach Isolation mittels alkalischer Lyse erfolgte eine transiente Transfektion mit pGFP-tpz, pcDNA5/FRT, pQCXIN::OATP1A2, pcDNA5/FRT::hOCT1_FLAG als Kontrollen in T-REx™-293-Zellen. Es zeigte sich für alle Plasmide eine vergleichbare Transfektionseffizienz. Diese wurde nach Kotransfektion mit pGFP-tpz fluoreszenzmikroskopisch überprüft. Hierzu liegen keine Abbildungen vor. Die Funktionskontrolle, siehe Abbildung 35, ergab im Vergleich zu den mit pcDNA™5/FRT transfizierten Kontrollzellen eine 2-fache bis 2,7-fache Substrataufnahme der mit pcDNA5/FRT::OATP1A2 (Variante 3) transient transfizierten Zellen, welche sich mit Naringin (500 µM) inhibieren lies. Verglichen mit den pcDNA5/FRT::OATP1A2 (Variante 3) zeigte sich eine 2,24 bis 2,9-fache Substrataufnahme der pQCXIN::OATP1A2-transfizierten Zellen.

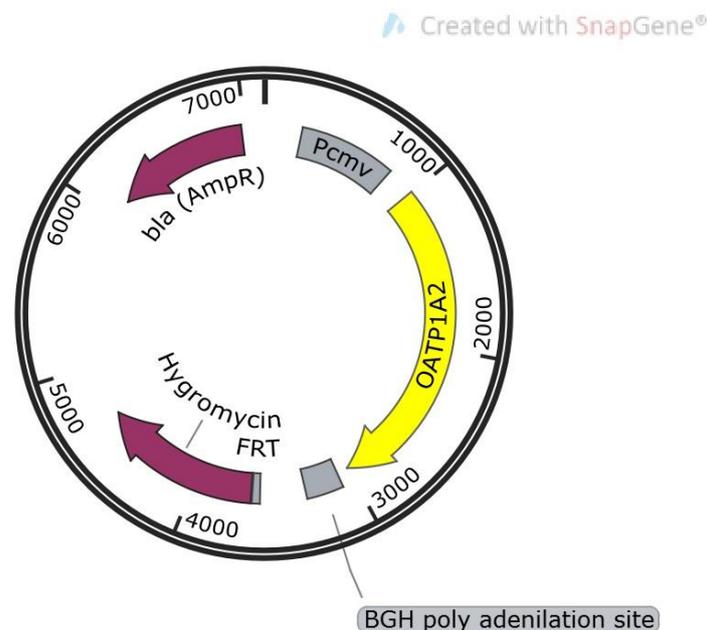


Abbildung 34: Plasmidkarte pcDNA5/FRT::OATP1A2 Variante 3 (7120 bp)

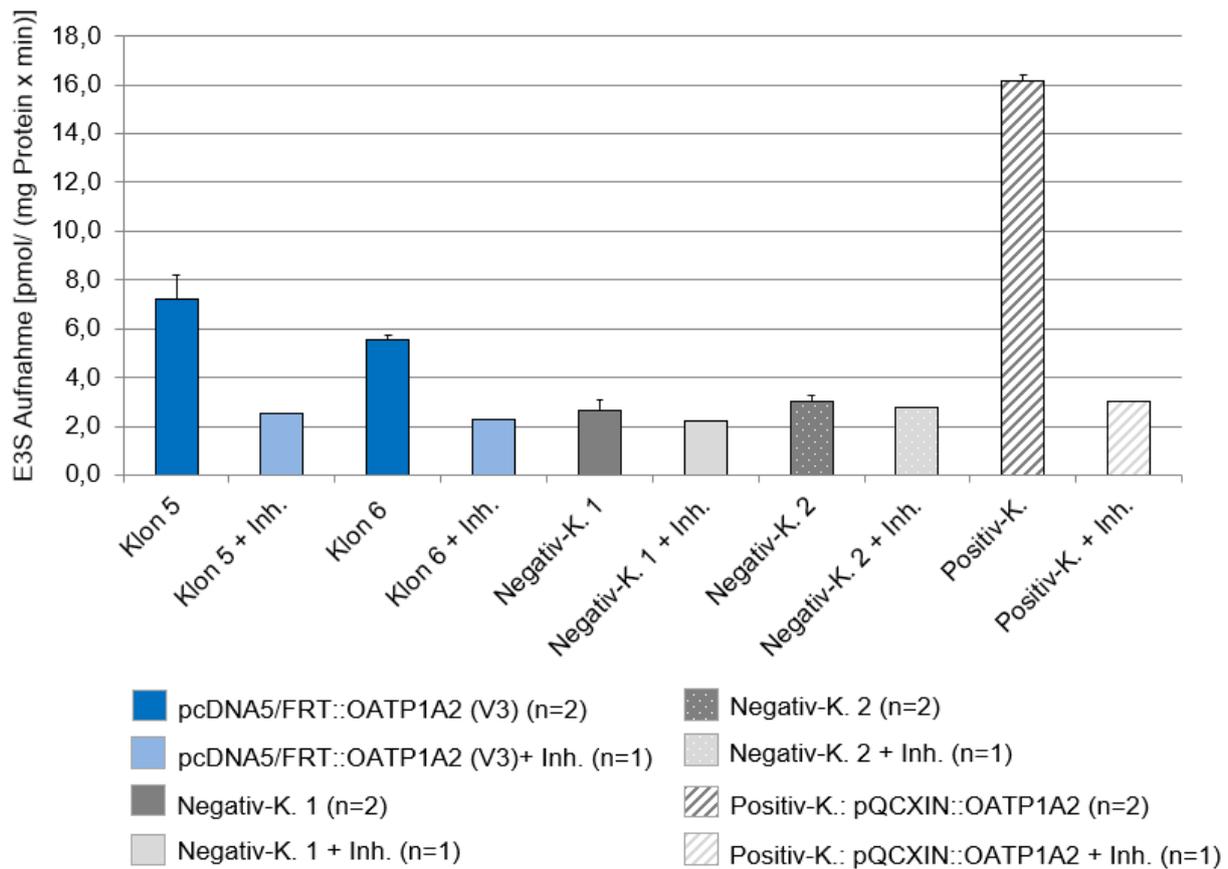


Abbildung 35: Funktionskontrolle T-REx™-pcDNA5/FRT::OATP1A2 (Variante 3) nach transienter Transfektion: pcDNA5/FRT::OATP1A2 aus *E. coli*-Klon 5 und 6; Negativkontrolle 1: pcDNA5/FRT, Negativkontrolle 2: pcDNA5/FRT::hOCT1_FLAG, Positivkontrolle pQCXIN::OATP1A2, Inh.: 500 µM Naringin (n = 1-2; MW ± SD)

4.2.3.2 Stabile Transfektion

Es wurde eine stabile Transfektion von pcDNA5/FRT::OATP1A2 (Variante 3) in T-REx™-293-Zellen durchgeführt. Die Ergebnisse der Validierung der transfizierten T-REx™-pcDNA5/FRT::OATP1A2 werden in den folgenden Abschnitten erläutert. Die Funktionskontrolle der T-REx™-pcDNA5/FRT::OATP1A2 mit T-REx™-pcDNA™5/FRT als Kontrolle zeigte, dass sich die Funktionalität gegenüber der transienten Transfektion nicht gesteigert hat, siehe Abbildung 36. Funktionskontrollen weiterer Klone sind im Anhang in Abbildung 43 dargestellt.

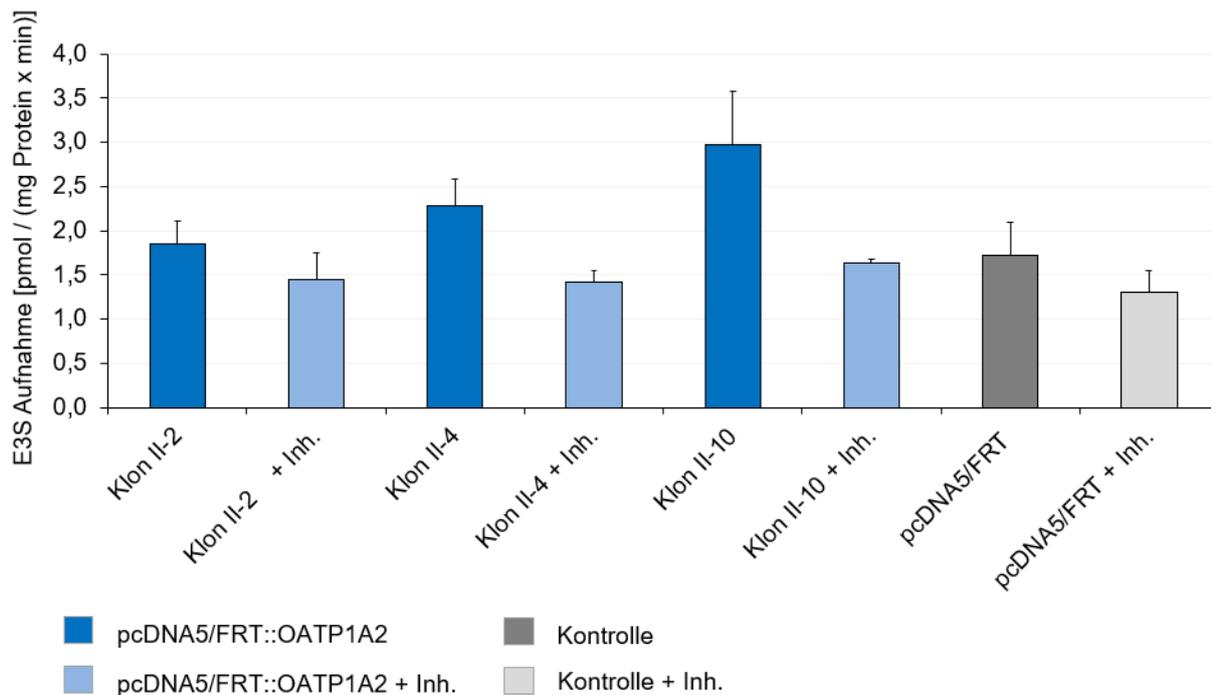


Abbildung 36: Funktionskontrolle nach stabiler Transfektion von pcDNA5/FRT::OATP1A2 (Variante 3) in T-REx-293: Exemplarisch für die Klone II-2, II-4, II-10 dargestellt. Inh.: 500 μ M Naringin (n = 2; MW \pm SD)

4.2.4 Validierung: Nachweis von OATP1A2 in stabil transfizierten T-RExTM-293

Zur Validierung der erfolgreichen Integration von pcDNA5/FRT::OATP1A2 (Variante 3) in das Wirtszellgenom von T-RExTM-293-Zellen wurden verschiedene Methoden eingesetzt: Hygromycin-PCR, *Gen-of-Interest*-PCR, Multiple-Integrations-PCR, Sequenzierung, Quantitative Echtzeit-PCR, Immunfluoreszenz. Tabelle 40 zeigt die Ergebnisse der verschiedenen Validierungsmethoden zusammengefasst für alle getesteten Klone von T-RExTM-pcDNA5/FRT::OATP1A2. Die Zellmorphologie wird mit schlecht (-), ausreichend ((+)), gut (+), sehr gut (++) bewertet. Wenn in der jeweiligen Validierungs-PCR die erwartete Bande im Agarosegel sichtbar ist, wird diese mit (+) gekennzeichnet. Die Multiple-Integrations-PCR ist eine Negativ-PCR, sodass die mehrfache Integration des GOI durch (+) gekennzeichnet wird. In der TaqMan®-Genotypisierung mittels quantitativer Echtzeit-PCR wird die mRNA-Expression des transfizierten Transporters auf die mRNA-Expression der Kontroll-RNA normalisiert. Ein hoher $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Wert entspricht einer hohen GOI-Expression. Die Immunfluoreszenz wurde gekennzeichnet durch: sehr schlecht (--, sehr viele ungefärbte Klone), schlecht (-, viele ungefärbte Klone), ausreichend ((+), wenige einzelne ungefärbte Klone),

gut (+, keine ungefärbten Klone), sehr gut (++, keine ungefärbten Klone & starke Transporterexpression). Der Transport von Esteron-3-sulfat wird als "mittlere x-fache Änderung" verglichen mit pQCXIN dargestellt. Die Ergebnisse der einzelnen Methoden werden im Folgenden erläutert.

Tabelle 40: Übersicht aller getesteten Klone T-REx™-pcDNA5/FRT::OATP1A2

| Vektor | Klon | Morphologie | Validierungs-PCR | | | Expression (2 ^{Δ-ΔΔCT}) | 1. Immunfluoreszenz | 2. Immunfluoreszenz | Transport ohne Inh. (x-fache Änderung relativ zu p5/FRT) | Transport mit Inh. (x-fache Änderung relativ zu p5/FRT) | Sequenziert |
|---------------------|-------|------------------------------|------------------|-----|---------------|--------------------------------------|---------------------|---------------------|---|--|-------------|
| | | | Hygromycin | GOI | Multiple Int. | | | | | | |
| pcDNA5/FRT::OATP1A2 | I-2 | + | + | + | - | 12.003,49 | -- | | 1,25 | 1,00 | |
| | I-3 | + | + | + | - | 4.777,92 | + | -- | 1,11 | 1,07 | |
| | I-4 | + | + | + | - | 4.572,71 | + | | 1,16 | 1,19 | |
| | I-5 | + | + | + | - | 8.425,22 | -- | | 1,34 | 0,91 | |
| | I-6 | (+) | + | + | - | 5.942,42 | - | -- | 1,09 | 1,26 | + |
| | I-8 | ++ | + | + | + | 21.151,90 | -- | | 1,21 | 0,83 | |
| | I-9 | + | + | + | - | 7.258,72 | - | | 1,38 | 0,94 | |
| | I-10 | + | + | + | + | 34.648,40 | - | | 1,32 | 1,23 | |
| | II-1 | + | + | + | - | 13.858,66 | -- | | 1,56 | 1,45 | |
| | II-2 | ++ | + | + | - | 8.590,34 | + | -- | 1,07 | 1,11 | |
| | II-4 | ++ | + | + | + | 20.807,74 | + | -- | 1,32 | 1,09 | |
| | II-6 | - (langsames Wachstum) | - | (+) | - | 32.253,48 | ∅ | | - | - | |
| | II-10 | + | + | + | - | 9.549,22 | - | | 1,73 | 1,27 | + |

4.2.4.1 Validierungs-PCR bestätigen erfolgreiche Transfektion & Integration

Zur Überprüfung der stabil transfizierten Klone T-REx™-pcDNA5/FRT::OATP1A2 wurden drei verschiedene PCR durchgeführt und die erhaltenen Amplikons mittels Gelelektrophorese sichtbar gemacht. In Abbildung 12 sind die PCR schematisch dargestellt. Die Ergebnisse der Validierungs-PCR werden exemplarisch in Abbildung 37 aufgeführt. Die Hygromycin-PCR, welche mit DNA-Aliquoten der transfizierten T-REx™-293-Zellen erfolgte, zeigte, dass alle Klone die Hygromycin-Gensequenz mit Ausnahme von Klon KII-6 enthalten, siehe Tabelle 40. Damit ist die erfolgreiche Transfektion und Integration von pcDNA5/FRT::OATP1A2 (Version 3) nachgewiesen. Nach Angaben des Institutes für Pharmakologie der Universität Greifswald wird für die Hygromycin-PCR eine Bandengröße von 518 bp erwartet. Untersuchungen im

Rahmen der vorliegenden Arbeit lassen jedoch einen Berechnungsfehler vermuten, da sich laut Erstbeschreibung der Hygromycin-PCR von Saadatmand (2012) ein Amplikon der Länge 614 bp ergeben soll [48]. Alle Klone enthalten ebenfalls den OATP1A2-Genabschnitt, wie mit der *Gen-of-Interest*-PCR anhand von DNA-Aliquoten der transfizierten T-REx™-203-Zellen bewiesen werden konnte, siehe Tabelle 40. Die erwartete Länge der Sequenz ist abhängig von dem verwendeten Transfektionsvektor. Für das Amplikon aus Teilen des verwendeten Vektors pcDNA™5/FRT und OATP1A2 wurde eine Länge von 3402 bp erwartet. Mittels Multiple-Integrations-PCR konnte nachgewiesen werden, dass die Klone KI-8, KI-10 und KII-4 den OATP1A2-Genabschnitt mehrfach integriert haben, siehe Tabelle 40. Die Multiple-Integrations-PCR ist eine negativ-PCR, das heißt ein Amplikon von 214 bp ist nur sichtbar, wenn eine mehrfache Integration vorliegt. Alle anderen Klone enthalten das Fragment einfach.

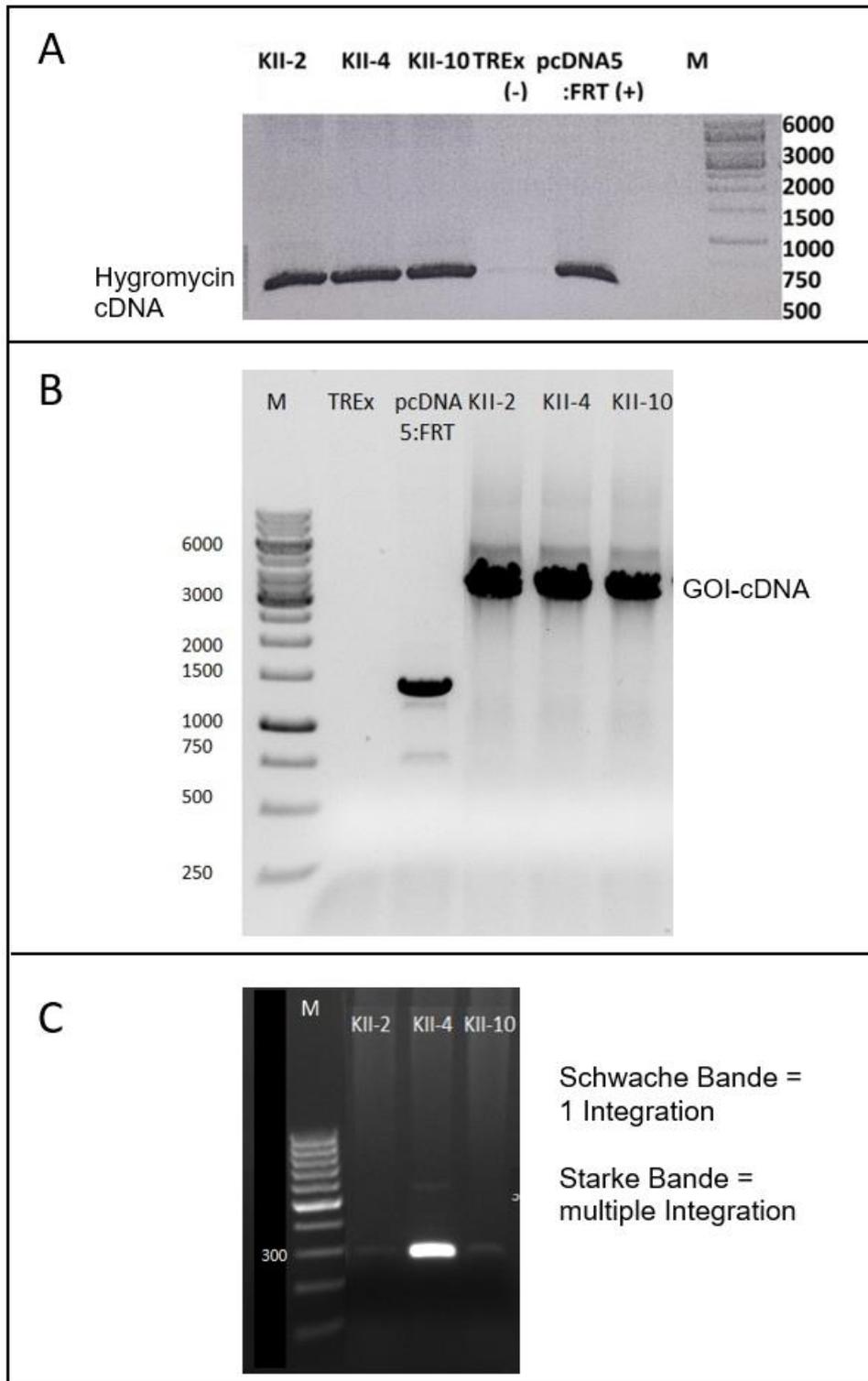


Abbildung 37: Kontrolle der korrekten Integration von pcDNA5/FRT::OATP1A2 in T-REx™-293 nach stabiler Transfektion. Exemplarische Darstellung der Klone II-2, II-4, II-10. Es wurden drei PCR durchgeführt und mittels Gelelektrophorese dargestellt. Der Nachweis des Amplikons von 614 bp Hygromycin-PCR (A) bestätigt die erfolgreiche Integration des Plasmids. Für die GOI-PCR (B) wird ein Amplikon von 3402 bp erwartet, welches die Integration von OATP1A2 in die Wirtszelle beweist. Für die Multiple-Integrations-PCR (C) wird bei multipler Integration des Plasmids ein Amplikon von 214 bp erwartet.

4.2.4.2 Sequenzierung: Keine strukturellen Fehler nachweisbar

Für die Validierung mittels Sequenzanalyse wurden die GOI-PCR-Proben der Klone T-REx™-pcDNA5/FRT::OATP1A2 KII-10, KI-6 aufbereitet. Zur Sequenzierung von pQCXIN::OATP1A2, pcDNA5/FRT::OATP1A2 K5 Midi und den aufgereinigten GOI-PCR-Proben von T-REx™-pcDNA5/FRT::OATP1A2 KII-10, KI-6 wurden die Primer OATP1A2_1_for, OATP1A2_1_rev, OATP1A2_3_for, OATP1A2_5_for, OATP1A2_6_rev, pcDNA5_rev verwendet. Die Sequenzanalyse ergab keine Unterschiede in den OATP1A2-Gensequenzen zwischen pcDNA5/FRT::OATP1A2 (Variante 3) und pQCXIN::OATP1A2. Die Gensequenzen von OATP1A2 stimmen ebenfalls mit der Referenzsequenz NM_021094.4 überein. Intakte Übergänge zwischen der OATP1A2-Gensequenz und dem Vektor sowie das Startcodon und die Kozak-Sequenz wurden nachgewiesen. Die Kozak-Sequenz ist eine Basenabfolge der mRNA, welche sich in direkter Nähe zum Startcodon AUG befindet und die Bindung des Ribosoms zur Initiation der Translation begünstigt. Die optimale Kozak-Sequenz lautet: (GCC)GCCRCCAUGG. Das AUG-Codon wird mit + 1 bis + 3 nummeriert. An Position -3 befindet sich A oder G. Den Kern der Kozak-Sequenz bilden die Basen der Positionen -3 bis +4, wobei die Basen -3 und +4 in Kombination mit dem Startcodon für die Initiation der Translation die größte Rolle spielen. [52]

4.2.4.3 Quantitative Echtzeit-PCR bestätigt OATP1A2-Expression

Bei der Messung der Genexpression mittels TaqMan®-Assay am QuantStudio™ 12k Flex konnte eine erhöhte Expression von OATP1A2 in der mRNA von T-REx™-pcDNA5/FRT::OATP1A2 (Klone KII-10, KI-6) nachgewiesen werden, siehe Tabelle 40.

4.2.4.4 Immunfluoreszenz-Färbung: Kein OATP1A2 in Zellmembranen

Mittels Immunfluoreszenz wurde die Expression und Lokalisation von OATP1A2 in den stabil transfizierten T-REx™-pcDNA5/FRT::OATP1A2 Klonen untersucht. Die Zellen wurden doppelt markiert mit den OATP1A2-spezifischen Antikörpern *SLCO1A2 Antibody Assay (Biotechnology Company)* und *Alexa Fluor® 488 goat anti-rabbit IgG*. Zur Darstellung der Zellmembranen wurde ebenfalls eine Färbung der Natrium-Kalium-ATPase mit den Antikörpern *mouse anti- Na⁺/K⁺-ATPase (Santa Cruz)* und *Alexa Fluor® 568 goat anti-mouse IgG* durchgeführt. Das Ergebnis der Immunfluoreszenz ist exemplarisch in Abbildung 38 dargestellt. Es zeigt für alle gefärbten Klone von T-REx™-pcDNA5/FRT::OATP1A2, dass OATP1A2 nicht in die Zellmembranen der Wirtszelle eingebaut wird. Dies wird besonders im Vergleich mit der Positivkontrolle

pQCXIN::OATP1A2 deutlich, bei der eine Überexpression von OATP1A2 in den Membranen eindeutig erkennbar ist. Färbungen weiterer Klone von T-REx™-pcDNA5/FRT::OATP1A2 sind im Anhang in Abschnitt 8.2.3 aufgeführt.

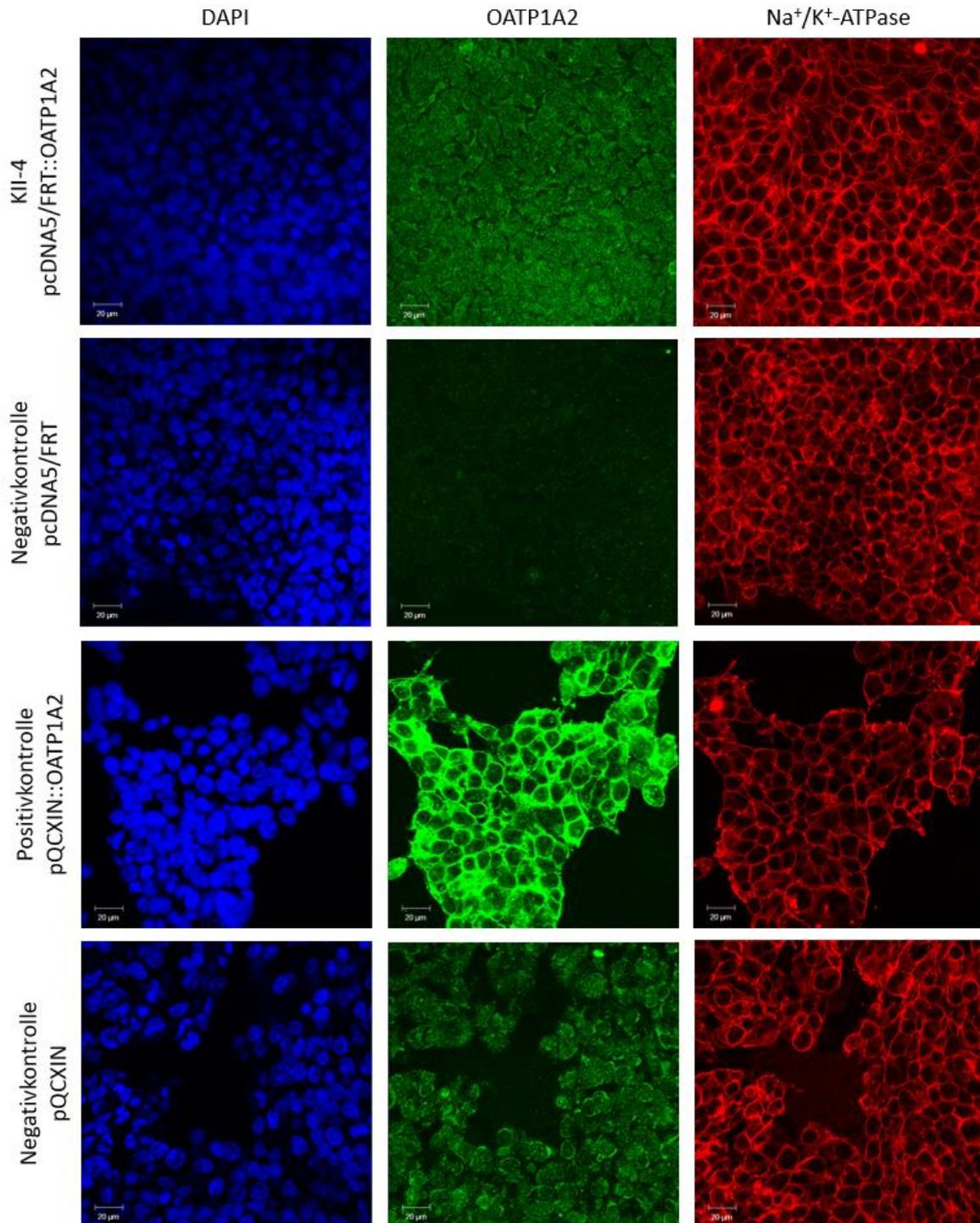


Abbildung 38: Immunfluoreszenz von T-REx™-pcDNA5/FRT::OATP1A2. Darstellung der Membranlokalisierung von OATP1A2 exemplarisch für Klon II-4, Positivkontrolle HEK-pQCXIN::OATP1A2, Negativkontrollen T-REx™-pcDNA™5/FRT und HEK-pQCXIN. Blau: DAPI/ Kernfärbung, Grün: OATP1A2, Rot: Na⁺/K⁺-ATPase, 40-fache Vergrößerung

4.2.5 Fazit: Generierung T-REx™-pcDNA5/FRT::OATP1A2

Die Funktionskontrollen nach den transienten und stabilen Transfektionen der T-REx™-293-Zellen mit pcDNA5/FRT::OATP1A2 (Variante 3) zeigten funktionelle Klone. Die mit pQCXIN::OATP1A2 transient transfizierten Zellen wiesen jedoch im Vergleich zu den mit pcDNA5/FRT::OATP1A2 (Variante 3) transient transfizierten Zellen eine bis zu 2,9-fache Substrataufnahme auf. Die erfolgreiche Transfektion und Integration der DNA in einfacher oder mehrfacher Ausführung an die gewünschte Stelle im Wirtszellgenom konnte gezeigt werden. Auch OATP1A2-RNA wurde mittels quantitativer Echtzeit-PCR belegt. Die Sequenzanalysen vom Genom der stabil transfizierten T-REx™-pcDNA5/FRT::OATP1A2 bestätigen ebenfalls die Integration der intakten OATP1A2-Sequenz sowie korrekte Übergänge zu Sequenzen des Expressionsvektors. Die ordnungsgemäße Lokalisation und Überexpression des Proteins OATP1A2 in der Zellmembran der transfizierten Zellen konnte in der Immunfluoreszenz dennoch nicht nachgewiesen werden.

5 Diskussion und Ausblick

Im Folgenden werden zunächst die Untersuchungen der Affinität von Fentanyl und Sufentanil zu OATP diskutiert, welche dazu dienen herauszufinden, ob OATP am Transport von diesen Opioiden beteiligt sind oder diesen beeinflussen. Des Weiteren wird auf die Ergebnisse der Funktionskontrolle mit Rhodamin-123 im Rahmen der OATP-Transportversuche als Alternative zu radioaktiv-markierter Referenzsubstanz eingegangen. Die Erarbeitung eines alternativen Zellmodells zur Generierung einer Zelllinie mit einer langfristig stabileren und reproduzierbareren Überexpression von OATP ist ein weiteres Ziel dieser Arbeit und wird im Anschluss erörtert.

5.1 Effekt der Opioiden Fentanyl & Sufentanil auf OATP

Bei der Überwindung körpereigener Barrieren, wie zum Beispiel der Blut-Hirn-Schranke, dem Darmepithel oder dem Gefäßendothel, spielen Transporter eine essentielle Rolle. Hierbei werden zwei Transporterfamilien unterschieden, Transporter mit *ATP-binding-cassette* (ABC-Transporter) und *solute carrier* (SLC-Transporter). [7,16] Die in dieser Arbeit untersuchten *organic anion transporter polypeptides* (OATP) gehören der SLC-Transporterfamilie an und transportieren als Aufnahmetransporter natrium-unabhängig große organische Anionen sowie neutrale und kationische Substanzen [9]. In vorherigen Untersuchungen der AG der Klinik für Anästhesiologie der Universitätsmedizin Greifswald wurde Loperamid als kompetitiver Inhibitor der Substrataufnahme verschiedener OATP sowie als Substrat von OATP1A2, OATP1B1 und OATP2B1 nachgewiesen, siehe Abbildung 7 [10,11]. Loperamid ist als Opioid strukturell verwandt mit Fentanyl und Sufentanil, kann aber im Gegensatz zu diesen aufgrund des Effluxtransportes durch p-Glykoprotein nicht zentral wirken [7]. Fentanyl und Sufentanil zählen als Opioiden zu den effizientesten Schmerzmitteln der Anästhesiologie, weil sie das zentrale Nervensystem beeinflussen und eine 100 bis 1.000-fach höhere analgetische Potenz als Morphin aufweisen [1,2]. Da zum Transport der Opioiden Fentanyl und Sufentanil bisher wenige Erkenntnisse vorliegen, ist im Rahmen dieser Arbeit untersucht worden, ob diese Opioiden OATP beeinflussen und gegebenenfalls selbst Substrate darstellen. Die hohe Lipophilie beider Opioiden lässt einen hohen Anteil an Diffusion bei der Passage von Zellmembranen vermuten [4]. Allerdings könnte unter anderem eine Beteiligung von OATP an der Passage der Blut-Hirn-Schranke die inter- und intraindividuelle Variabilität in der Wirkung und den

Nebenwirkungen erklären. Um den Einfluss von Fentanyl oder Sufentanil auf OATP zu untersuchen, wurden Kompletionsassays durchgeführt. Die verwendeten HEK-pQCXIN::OATP-Zellen wurden zuvor in Funktionskontrollen auf eine ausreichende Transportaktivität überprüft.

In Kompletionsassays der vorliegenden Arbeit mit der Opioid-Transporter-Kombination Fentanyl/ OATP1A2 konnte gezeigt werden, dass die E3S-Substrataufnahme mit steigender Fentanyl-Konzentration (3,16 μM , 10 μM , 31,6 μM , 100 μM , 316 μM , 1000 μM) abnimmt. Hierfür wurde eine IC_{50} von 14,17 μM berechnet. Die mittlere klinische/ intraoperative Dosis für Fentanyl liegt bei 2-20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Körpergewicht [53]. Dies entspricht 0,08 bis 0,83 μM bei einem Patienten mit 70 kg Körpergewicht und einem durchschnittlichen Blutvolumen von 5 Litern. Auch Bioverfügbarkeitsstudien zu verschiedenen Fentanylplastern mit einer Dosis von 25 $\mu\text{g}/\text{h}$ zeigten nach Einmalgabe maximale Plasmakonzentrationen von 1,17 bis 1,88 nM und nach Erreichen eines steady state durch Dreifachgabe 1,85 bis 2,6 nM [54]. In den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden dennoch höhere (nicht physiologische) Opioidkonzentrationen gewählt, um einen möglichen Effekt messbar zu machen und darstellen zu können. Die zum Zeitpunkt dieser Experimente noch nicht veröffentlichten Daten von Huo *et al.* (2020) postulieren aufgrund mikroskopischer Beobachtungen bei HEK-293-Zellen eine mittlere letale Dosis von Fentanyl von 100 bis 150 μM . Im Rahmen der Kompletionsassays konnte ein ungehindertes Zellwachstum ohne Auffälligkeiten beobachtet werden. Parallele Proteinbestimmungen zeigten stets vergleichbare Proteinwerte der getesteten Zellen. Da die mit Fentanyl inkubierten Zellen vor der Zelllyse und der Proteinbestimmung gewaschen wurden (siehe Abschnitt 3.8.8), wären abgestorbene Zellen mit dem Überstand entfernt worden. Folglich wäre ein letaler Effekt von Fentanyl auf die Zellen durch niedrigere Proteinwerte im Vergleich zu denen von Zellen aus parallelen Funktionskontrollen sichtbar geworden. Des Weiteren zeigt die IC_{50} von 14,17 μM für die Opioid-Transporter-Kombination Fentanyl/ OATP1A2 im experimentellen Set-up dieser Arbeit, dass die Inhibition durch Fentanyl bereits deutlich vor Erreichen der letalen Fentanyl-Dosis beobachtet werden kann. Die vergleichsweise niedrige IC_{50} von 2,8 μM für die Opioid-Transporter-Kombination Loperamid/ OATP1A2 aus Vorarbeiten der AG belegt eine 5,06-fach stärkere Inhibition von OATP1A2 durch Loperamid im Vergleich zu Fentanyl. Die Ergebnisse der Aufnahmeversuche stellten dar, dass Fentanyl in den Konzentrationen 0,1 μM , 1 μM , 10 μM ein Inhibitor von OATP1A2 ist,

aber im Gegensatz zu Loperamid (Abbildung 7) konnte kein Transport nachgewiesen werden. [10] Unter den Versuchsbedingungen der vorliegenden Arbeit konnte die Hypothese, dass Fentanyl ein Substrat von OATP ist, nicht bestätigt werden. Untersuchungen von Huo *et al.* (2020) konnten eine 5,1-fach erhöhte Aufnahme von Fentanyl (100 nM) durch OATP1A2 im Vergleich zu Kontrollzellen nachweisen. Huo *et al.* (2020) verwendeten für die Versuche stabil transfizierte HEK-293::pIRES2-ZsGreen1-OATP1A2. Jedoch muss berücksichtigt werden, dass hierbei ein anderes Plasmid (pIRES2-ZsGreen1-OATP1A2) verwendet wurde und es sich lediglich um Aufnahmeversuche handelt. Weitere Unterschiede verglichen mit dem experimentellen Set-up dieser Arbeit finden sich in der Inkubationszeit und der Versuchsdurchführung. Die Zellen wurden 5, 10, 15, 20 und 25 min mit Fentanyl (1 nM, 10 nM, 100 nM, 1000 nM) behandelt. Hierbei ergab sich eine optimale Behandlungsdauer von 15 min. [55] Mit zunehmender Behandlungsdauer könnte die Diffusion von Fentanyl im Vergleich zum Transport durch OATP1A2 zunehmen, womit ein Effekt durch den Transporter verfälscht werden würde. Dies ist anzunehmen, da Fentanyl durch seine starke Lipophilie Zellmembranen bei gegebenem Konzentrationsgradienten auch ohne Transporter passieren könnte [4]. Die Arbeiten von Huo *et al.* (2020) waren zum Zeitpunkt der Experimente der vorliegenden Arbeit noch nicht publiziert. Auf Grundlage von Untersuchungen der AG der Klinik für Anästhesiologie der Universitätsmedizin Greifswald mit Morphin wurden im Rahmen der Aufnahmeassay-Screenings der vorliegenden Arbeit sowohl eine geringere Inkubationszeit von 5 min gewählt als auch analoge Versuche mit dem Inhibitor Naringin (500 $\mu\text{M} \cong 290,25 \mu\text{g/ml}$) durchgeführt. Die Aufnahmeassay-Screenings erfolgten in Dreifachbestimmung. Huo *et al.* (2020) eliminierten diese Fehlerquelle der Diffusion durch analoge Versuche mit dem Inhibitor Naringin (100 $\mu\text{g/ml}$) und führten eine dreifache Wiederholung der Transportversuche durch [55]. Auch in der Dissertation von A. Hubeney wurde in zeitabhängigen Aufnahmeversuchen mit Bromocriptin und OATP1A2 ein maximaler Transport bei einer Inkubationszeit von 20 min beschrieben. Im Vergleich zur vorliegenden Arbeit verwendete A. Hubeney jedoch OATP1A2-überexprimierende MDCKII-Zellen. Des Weiteren ist Bromocriptin kein Opioid, sondern ein in der Therapie des Morbus Parkinson eingesetzter Dopaminrezeptor-Agonist. [56]

In den Kompetitionsassays der Opioid-Transporter-Kombinationen von Fentanyl (3,16 μ M, 10 μ M, 31,6 μ M, 100 μ M, 316 μ M, 1000 μ M) mit OATP1B1 konnte keine deutliche Inhibition des Transporters nachgewiesen werden, weshalb für OATP1B1 keine Aufnahmeversuche durchgeführt wurden. Untersuchungen von Ziesenitz, König *et al.* (2013) zeigten, dass Fentanyl kein Substrat von OATP1B1 darstellt und die Pharmakokinetik von Fentanyl bei Hemmung von OATP1B1 durch Rifampicin unbeeinflusst bleibt. [57] Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit für die Opioid-Transporter-Kombination Fentanyl/ OATP1B1 stimmen somit mit den Untersuchungen von Ziesenitz, König *et al.* (2013) überein.

Eine Inhibition eines OATP-Transporters durch Fentanyl oder gar die Konkurrenz mit zeitgleich vorhandenen Substanzen um dessen gemeinsame Nutzung könnte den Transport des konkurrierenden Substrates behindern. Im Falle von Medikamenten kann es durch diese Hemmung oder Konkurrenz um dieselben Transporter zu Wechselwirkungen kommen. Medikamente mit höheren Transporteraffinitäten würden bevorzugt den Transporter besetzen oder transportiert werden. Dadurch wird der Transport anderer Medikamente gehemmt sowie die weitere Wirkung verändert. Da Fentanyl parenteral, transdermal, intranasal sowie transmukosal appliziert werden kann und über die Blutbahn verteilt wird [4], könnte es OATP verschiedenster Lokalisationen erreichen und beeinflussen. Die unter anderem in der Prophylaxe von Schlaganfällen eingesetzten Statine Atorvastatin, Pravastatin und Rosuvastatin wurden bereits als Substrate von OATP1A2 in humanen Endothelzellen nachgewiesen [58,59]. Auch die Zytostatika Docetaxel und Doxorubicin werden mittels OATP transportiert [60,61]. Eine pharmakologische Hemmung könnte zu einer veränderten Wirksamkeit führen und sich auf die OATP-vermittelte Aufnahme in die Tumorzellen auswirken [60]. Wie aus Untersuchungen von van de Steeg, van Esch *et al.* (2013) hervorgeht, sind humane OATP1A/1B ebenfalls mitverantwortlich für die Plasma- und Gewebeverteilung von den Chemotherapeutika Methotrexat und Paclitaxel. Auch hier wird postuliert, dass eine veränderte OATP-Aktivität aufgrund von genetischen Variationen oder pharmakologischer Hemmung Einfluss auf die Wirkung dieser Medikamente nehmen kann. [62] König, Glaeser *et al.* (2011) konnten nachweisen, dass Mesalazin durch diverse OATP (OATP1B1, -1B3, -2B1) transportiert wird, jedoch nicht durch OATP1A2 und -4A1. Die Wirkung des zur Therapie von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen eingesetzten Präparates ist bedingt eine Akkumulation von Mesalazin im Darmepithel und in den Hepatozyten. Auch wenn OATP1A2 nicht für den

Transport von Mesalazin verantwortlich ist, so wird an diesem Beispiel die Bedeutung einer Hemmung von OATP durch Wechselwirkungen mit anderen Medikamenten deutlich. [63]

Die Wettbewerbsversuche mit der Opioid-Transporter-Kombination Sufentanil/OATP1A2 deuteten eine minimale Inhibition von Sufentanil auf OATP1A2 an. Die Aufnahme des Referenzsubstrates nahm mit steigender Sufentanil-Konzentration um 24,48 % ab. Um aussagekräftige Ergebnisse zu erzielen, wären höhere Sufentanil-Konzentrationen nötig. Die Wettbewerbsversuche mit Sufentanil wurden in den Konzentrationen 3,16 nM, 10 nM, 31,6 nM, 100 nM, 316 nM, 1.000 nM durchgeführt. Es ist nicht auszuschließen, dass die Effekte von Sufentanil vergleichbar mit denen von Fentanyl sind, jedoch sind die Experimente für Sufentanil limitiert, weil dieses als sehr starkes Opioid herstellerbedingt nicht in höheren Konzentrationen als 100 µg/ml verfügbar ist.

Zusammenfassend konnte im Rahmen des ersten Teilabschnitts dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass Fentanyl die Transportaktivität von OATP1A2 als Inhibitor beeinflusst. Eine Verfälschung der Ergebnisse durch Diffusion bei der Passage von Zellmembranen wurde durch die Verwendung eines spezifischen OATP1A2-Inhibitors eliminiert. Als mögliche Erklärung der inter- und intraindividuellen Variabilität in der Wirkung und den Nebenwirkungen von Fentanyl könnte unter anderem die Beteiligung von OATP an der Passage der Blut-Hirn-Schranke relevant sein. Ein bereits bekannter Faktor, welcher ebenfalls die inter- und intraindividuelle Variabilität von Opioiden beeinflusst, sind beispielsweise die Cytochrome P-450 (CYP-Enzyme). Die Wirkung von Fentanyl kann durch Wechselwirkung mit anderen Medikamenten verstärkt oder abgeschwächt werden, indem diese die Metabolisierung von Fentanyl durch CYP3A4 beeinflussen. Medikamente der Substanzgruppen der Makrolide, Antimykotika sowie Cimetidin inhibieren die Metabolisierung von Fentanyl, wodurch es länger in wirksamer Form im Organismus verbleibt. [38] Ein Transport von Fentanyl durch OATP1A2 konnte im Vergleich zu Huo *et al.* (2020) nicht gezeigt werden. Ein wesentlicher Unterschied im experimentellen Vorgehen stellte die Inkubationszeit der Zellen mit dem Opioid in den Aufnahmeversuchen dar. Versuche mit längeren Inkubationszeiten als 5 min wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt, weil dadurch sowie mittels analogen Versuchen mit dem Inhibitor Naringin (500 µM $\hat{=}$ 290,25 µg/ml) die Diffusion als Störfaktor in den Transportmessungen minimiert werden sollte.

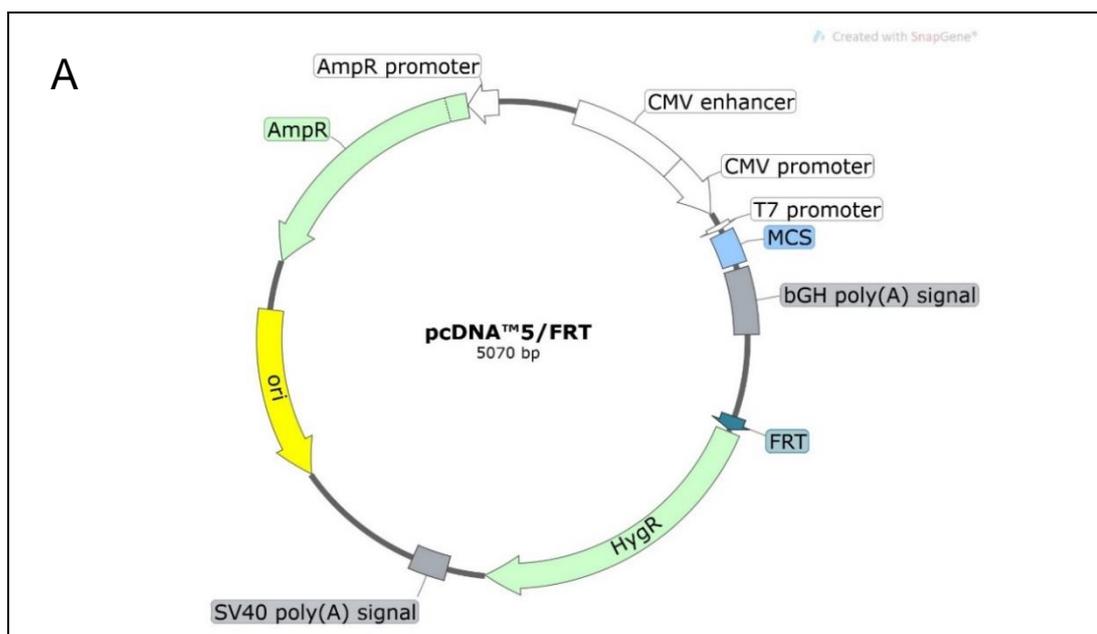
Die Analysen der vorliegenden Arbeit zur Opioid-Transporter-Kombination Fentanyl/OATP1B1 ergaben, dass Fentanyl kein Substrat von OATP1B1 darstellt und decken sich somit mit den Erkenntnissen von Ziesenitz, König *et al.* (2013). Ob die Effekte von Sufentanil auf OATP-Transporter vergleichbar mit denen von Fentanyl sind, konnte nicht nachgewiesen werden, weil dieses Opioid herstellerbedingt nicht in höher konzentrierter Form verfügbar ist. Um zukünftig die Widersprüche der erarbeiteten Ergebnisse zu denen von Huo *et al.* weiter abzuklären, bieten sich Aufnahmeversuchen mit veränderter Inkubationszeit an. Diese können Klärung verschaffen, ob sich unter den experimentellen Bedingungen wie in der vorliegenden Arbeit ein Fentanyl-Transport bei einer längeren Inkubationszeit zeigt.

5.2 Funktionskontrolle mit Rhodamin-123 als Alternative zu radioaktiv-markierter Referenzsubstanz

Um eine Alternative zur Funktionskontrolle mit radioaktiv-markiertem Referenzsubstrat in den Aufnahmeassay-Screenings zu untersuchen, wurde die Funktionskontrolle mit dem Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin-123 getestet. Untersuchungen von Forster, Thumser *et al.* (2012) zeigten, dass Rhodamin-123 von OATP1A2 transportiert wird, nicht aber von den nah verwandten Transportern OATP1B1, -1B3 und -2B1. [44] Aus diesem Grund kann Rhodamin-123 nur als Alternative in den Funktionskontrollen mit OATP1A2-überexprimierenden Zellen eingesetzt werden. Die Funktionskontrollen von HEK-pQCXIN::OATP1A2 im Zuge dieser Arbeit zeigten vergleichbare Ergebnisse zur Funktionalität der Zellen gegenüber der Methode mit einer ^3H -markierten Referenzsubstanz. Die Funktionskontrollen von HEK-pQCXIN::OATP1A2 mit ^3H -E3S zeigten eine 5,3-fache Substrataufnahme gegenüber der Kontrollzelle, siehe Abbildung 21. Die Funktionskontrollen mit Rhodamin-123 ergaben eine 8,5-fache Substrataufnahme der OATP1A2-überexprimierenden Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen, siehe Abbildung 23. Aufgrund des niedrigeren Gefahrenpotentials und den damit verbundenen geringeren Sicherheitsauflagen sowie den günstigeren Arbeitsbedingungen ist die kostengünstige Funktionskontrolle mit Rhodamin-123 eine lohnende Alternative zur herkömmlichen Funktionskontrolle mit ^3H -markiertem Referenzsubstrat.

5.3 Generierung stabil transfizierter T-REx™-pcDNA5/FRT::OATP1A2 mittels Flp-In™-System zur Erzeugung von stabilen Zelllinien mit definierter Kopienzahl der OATP1A2-Sequenz

Die Funktionskontrollen zu Beginn der Arbeiten und auch frühere Untersuchungen der AG der Klinik für Anästhesiologie der Universitätsmedizin Greifswald mit den verschiedenen HEK-pQCXIN::OATP Zelllinien wie zum Beispiel OATP1A2, -1B1 zeigten fluktuierende oder abnehmende Aktivitäten, je länger die Zellen kultiviert wurden. Dies ist ein bereits bekanntes Problem in der Grundlagenforschung bei der Verwendung von Vektoren, durch die das Gen von Interesse willkürlich im Genom der Wirtszelle integriert wird. [64] Daher stellte das zweite Ziel dieser Arbeit die Herstellung reproduzierbarer Zellen mit einer gleichbleibend hohen OATP1A2-Überexpression mithilfe des Flp-In™-Systems von Invitrogen sowie der Vergleich mit dem bisherigen pQCXIN-Modell dar. Im Folgenden werden mehrere Modelle zur Untersuchung von Transportern gegenübergestellt: zum einen das *in vitro* Zellmodell mit dem Expressionsvektor pcDNA5/FRT, welches im Rahmen dieser Arbeit entwickelt wurde und zum anderen die in der AG der Klinik für Anästhesiologie der Universitätsmedizin Greifswald bisher genutzte Methode mit pQCXIN als Vektor. Der in Abbildung 39 dargestellte Vektor pcDNA™5/FRT enthält unter anderem einen CMV-Promotor (siehe Seite 84), eine FRT-Sequenz und ein Hygromycin-Resistenzgen (siehe Abschnitt 3.7).



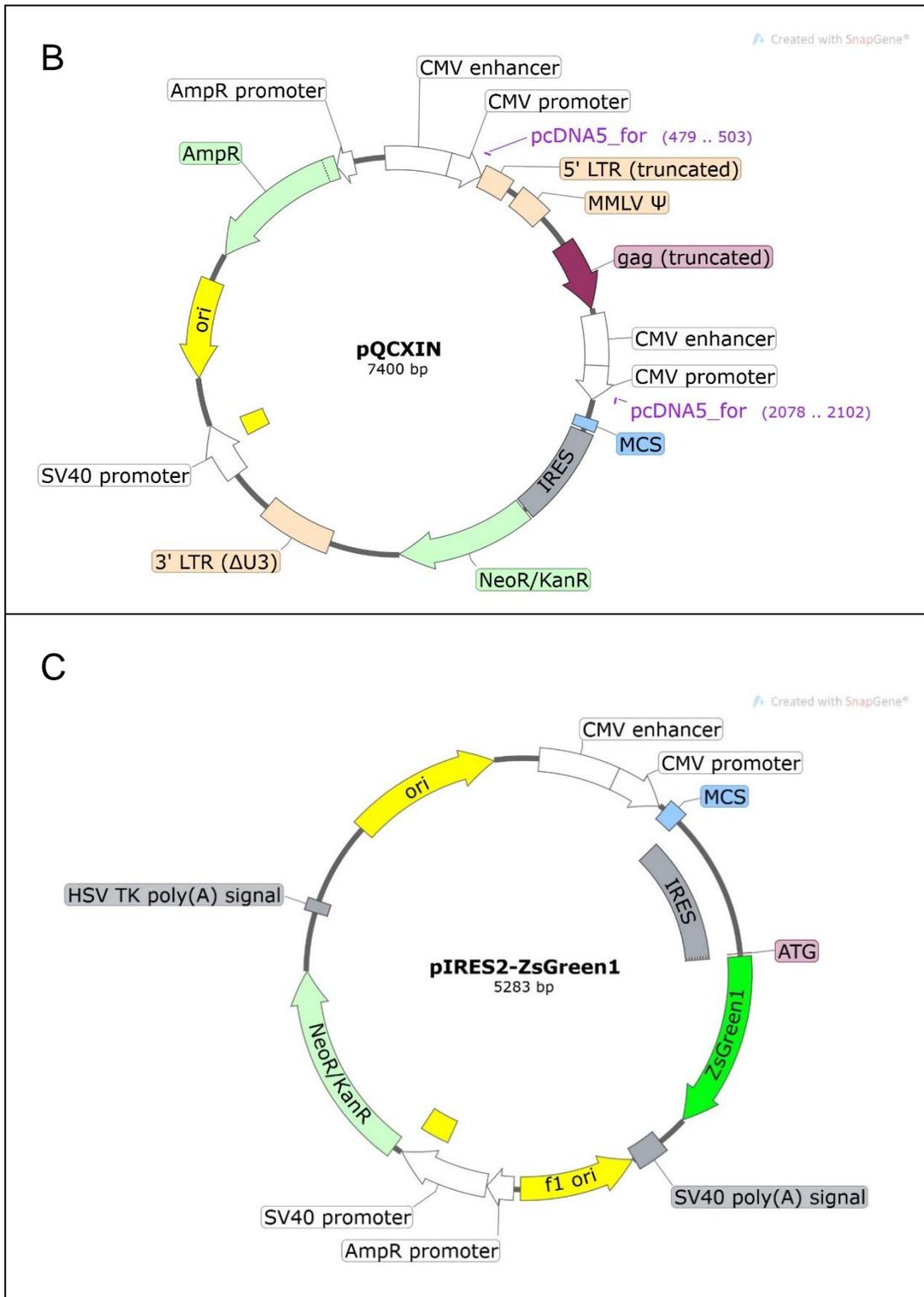


Abbildung 39: Expressionsvektoren zur Untersuchung von Transportern.

A: pcDNA5/FRT, B: pQCXIN, C: pIRES2-ZsGreen1

Die Integration der gewünschten Gensequenz erfolgt an einer spezifischen Genomlokalisierung in den T-REx™-293 Zellen, welche das Flp-In™-System unterstützen (Erläuterungen siehe Abschnitt 3.7). Für die Integration in die Wirtszelle ist eine Kotransfektion mit dem Vektor pOG44 notwendig. [47] Aufgrund der kontrollierten Integration des Gens von Interesse (im Rahmen dieser Arbeit OATP1A2) und der anschließenden Selektion der erfolgreich transfizierten Zellen mittels Hygromycin wurden besser reproduzierbare und kontrollierbarere Zellen im Vergleich zum Modell mit pQCXIN erwartet. Jedoch ist auch eine verminderte Expressionsrate des Gens von Interesse bei der Transfektion mit dem Flp-In™-System im Vergleich zum Zellmodell mit pQCXIN möglich, wenn die Höhe der Expression im bisher verwendeten Zellmodell durch eine multiple Integration und/oder einem zufällig günstigen Integrationsort verursacht wird. Der Vektor des bisher verwendeten Modells pQCXIN¹, siehe Abbildung 39, enthält zwei virale Promotoren, einen CMV Promotor und einen CMV/MSV Hybridpromotor, kombiniert aus Anteilen des Zytomegalie-Virus und *murine sarcoma virus*. Der Hybridpromotor in der 5'LTR des retroviralen Vektors soll im Vergleich zu unmanipulierten Promotoren eine höhere Expression sicherstellen. Durch eine Deletion in der U3-Region des 3'LTR wird eine Selbstinaktivierung des Hybridpromotors induziert, sobald der Expressionsvektor im Genom der Wirtszelle integriert ist. Anschließende Transkriptionen werden durch den zweiten CMV-Promotor gesteuert, welcher direkt vor der Sequenz des Gens von Interesse platziert ist. [66] pQCXIN verfügt außerdem über eine IRES-Sequenz und Resistenzen gegen Neomycin, Kanamycin und G-418 (Geneticin) [65,67]. Durch eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) können aufeinanderfolgende Gensequenzen über einen einzelnen Promotor abgelesen und aus einer gemeinsamen mRNA translatiert werden. Um eine erfolgreiche Transfektion sicherzustellen, können beispielsweise Markerproteine oder Resistenzmarker über die IRES-Sequenz nach dem Gen von Interesse codiert werden. Wenn die Markerproteine anschließend detektiert werden können oder nach Selektionierung über die Resistenz Zellen überleben, kann auch von einer erfolgreichen Transfektion des Gens von Interesse ausgegangen werden. [64,66] CMV-Promotoren, wie in den Vektoren pcDNA™5/FRT und pQCXIN enthalten, sind in der Forschung häufig verwendete Promotoren. Der virale CMV-Promotor

¹ Clontech wurde von Takara aufgekauft. In der aktuellen Produktinformation (Clontech, 2013) unter [65] wird nur ein Promotor angezeigt.

stammt aus dem Zytomegalie-Virus. Er ermöglicht in der S-Phase des Zellzyklus eine Initiation der Transkription. Dieser Promotor ist jedoch durch DNA-Methylierung von CpG-Inseln anfällig für eine abfallende Aktivität im Laufe der Kultivierung von transfizierten Zellen. Eine Mutation an Position 179 des Promotors führt zu einer verminderten Transkriptionsaktivität. [64] Da der CMV-Promotor von pcDNA5/FRT::OATP1A2 (Variante 3) zu 100 % mit dem Promotor der Referenzsequenz von pcDNATM5/FRT (*Thermo Fisher*) übereinstimmt, kann eine Mutation der CpG-Inseln ausgeschlossen werden. Eine vergleichende Übersichtstabelle zu den Merkmalen der beiden Expressionsvektoren pcDNATM5/FRT und pQCXIN ist im Anhang in Abschnitt 8.2.6 dargestellt. Es wurde angenommen, dass die Expression und Funktionalität durch die Integration des Gens von Interesse an einem willkürlichen Platz in der Wirtszelle beeinträchtigt sein könnte, weil die stabil transfizierten HEK-pQCXIN::OATP-Zellen in den Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit mehrfach fluktuierende oder abnehmende Aktivitäten mit zunehmender Zeit in Kultur zeigten. Für die daher geplante Generierung von OATP-stabil transfizierten Zelllinien wurden durch 3 verschiedene Klonierungsstrategien 3 Varianten von pcDNA5/FRT::OATP1A2 genutzt, siehe Tabelle 12. Da die mit den Varianten 1 und 2 von pcDNA5/FRT::OATP1A2 transient-transfizierten Zellen lediglich eine 1,3-fache Substrataufnahme oder teilweise sogar keine erhöhte Aufnahme im Vergleich zu den mit pcDNATM5/FRT transfizierten Kontrollzellen aufwiesen, wurde die stabile Transfektion lediglich mit pcDNA5/FRT::OATP1A2 Variante 3 durchgeführt. Diese Variante zeigte in den Funktionskontrollen nach transients Transfektion eine 2 bis 2,7-fache Substrataufnahme verglichen mit den mit pcDNATM5/FRT transfizierten Kontrollzellen. Nach stabiler Transfektion von Variante 3 wurde in den Funktionskontrollen jedoch nur noch maximal eine 1,7-fache Substrataufnahme im Vergleich zu den mit pcDNATM5/FRT transfizierten Kontrollzellen gemessen. Die Validierung der DNA dieser Zellen durch PCR und Sequenzierung zeigte keine Anhaltspunkte für strukturelle Fehler. Durch die Sequenzierung des Genoms der mit pcDNA5/FRT::OATP1A2 (Variante 3) transfizierten Zellen konnte belegt werden, dass das Startcodon und die OATP1A2-Sequenz sowie die Übergänge intakt sind und die Kozak-Sequenz vorhanden ist (siehe Anhang Abschnitt 8.2.4). Zum Vergleich der beiden OATP1A2-Zelllinien mit pQCXIN bzw. pcDNATM5/FRT wurde auch das Plasmid

pQCXIN::OATP1A2² sequenziert (siehe Anhang Abschnitt 8.2.5). Da der verwendete Primer pcDNA5_for für eine Sequenz der CMV-Promotoren kodiert und pQCXIN::OATP1A2 über zwei CMV Promotoren verfügt (siehe Abbildung 39), konnten die Sequenzierungsergebnisse des Primers pcDNA5_for nicht beurteilt werden. Weitere Sequenzierungen der OATP1A2-Sequenz von pQCXIN::OATP1A2 zeigten aber Übereinstimmung mit der Referenzsequenz OATP1A2 NM_021094.4 und korrekte Übergänge zwischen dem Vektor und der OATP1A2-Sequenz. Eine vollständige Sequenzierung der Plasmide pcDNA5/FRT::OATP1A2 (Variante 3) und pQCXIN::OATP1A2 wurde nicht durchgeführt, weil die im Folgenden näher erläuterten Ergebnisse der Validierungsmethoden zeigten, dass die Expressionsvektoren funktionieren und erfolgreich transfiziert werden konnten. Die Sequenzierungen des Genoms der mit pcDNA5/FRT::OATP1A2 (Variante 3) transfizierten Zellen belegen, dass die DNA für OATP1A2 in das Genom der Wirtszelle integriert wurde. Die Validierung der RNA mittels quantitativer Echtzeit-PCR zeigte eine erhöhte RNA-Konzentration in den OATP1A2-transfizierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen. Dies beweist, dass OATP1A2 im Genom der stabil transfizierten Zellen kodiert ist und auch nach der Transfektion in der mRNA nachweisbar ist. Somit ist ein genetischer Fehler, welcher eine Transkription verhindern würde, ausgeschlossen. Auch die Validierungs-PCR zeigten, dass das OATP1A2-Gen korrekt in die Wirtszelle integriert wurde. Trotzdem war die Funktionalität der pQCXIN-transfizierten Zelllinie in den Funktionskontrollen deutlich höher als die Funktionalität der mit pcDNA5/FRT::OATP1A2 transfizierten Zellen mit dem Flp-In™-System. Auch wenn ein Vorteil des Flp-In™-Systems die einmalige und präzise Integration der OATP-Sequenz in das Genom der Wirtszelle bezüglich der Reproduzierbarkeit ist, könnte eine mehrfache und zufällige Integration wie im pQCXIN-Zellmodell durch die stabile Transfektion zu einem höheren Expressionserfolg führen. Dies könnte die höhere Funktionalität der mit pQCXIN::OATP1A2 transfizierten Zellen erklären, wobei das pQCXIN-Zellmodell im experimentellen Set-up dieser Arbeit schon bei der transienten Transfektion ohne Integration des Plasmids in das Wirtszellgenom eine höhere Funktionalität aufwies. Alle Ansätze zur Fehlersuche, beispielsweise eine fehlerhafte DNA-Sequenz der Plasmide oder des GOI sowie eine fehlende OATP1A2-RNA, welche die verminderte Funktionalität der T-REx™-pcDNA5/FRT::OATP1A2 Zellen

² Analyse Sequenz für pQCXIN: https://www.addgene.org/browse/sequence_vdb/3869/

erklären würden, blieben erfolglos. Aufgrund der Verifikation der DNA und RNA und der fehlenden Funktionalität, könnte der Fehler Teil der Translation oder der posttranslationalen Prozessierung sein. Ein Nachweis des fertigen Proteins OATP1A2 in Form eines Western Blots liegt nicht vor. Die Immunfluoreszenz-Färbungen zeigen kein überexprimiertes OATP1A2 in den Zellmembranen der mit pcDNA5/FRT::OATP1A2 transfizierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen. Aufgrund der erhöhten E3S-Aufnahme in den Funktionskontrollen, welche sich inhibieren ließ, ist anzunehmen, dass eine Produktion von OATP1A2 in den stabil transfizierten T-REx™-293-Zellen in geringem Maße erfolgt, diese jedoch unterhalb der Nachweisgrenze der Immunfluoreszenz liegt oder Fehler in der Proteinfaltung eine Bindung des Antikörpers verhindern. Gegen die Annahme, dass die Nachweisgrenze nicht erreicht wird, spricht, dass schon die Funktionskontrollen nach transienter Transfektion eine zu geringe Funktionalität zeigten. Dass die geringe, aber dennoch hemmbare Funktionalität nicht in den Immunfluoreszenz-Färbungen zu sehen ist, widerspricht der obengenannten Annahme, dass die Integration einer Kopie des Plasmids nicht ausreicht. Auch zeigen Klone von T-REx™-pcDNA5::OATP1A2, in die das Plasmid Variante 3 trotz FlpIn™-System mehrfach integriert wurde, keine höhere Funktionalität im Vergleich zur einfachen Integration, siehe Tabelle 40. Aus den Validierungsergebnissen der DNA, RNA und der Immunfluoreszenz lässt sich schlussfolgern, dass die Produktion des OATP1A2-Proteins trotz korrekter Integration des GOI und der nachweislichen Transkription in eine RNA unvollständig oder fehlerhaft ist. Ein Grund für eine reduzierte Translation könnte ein ungeeigneter Expressionsvektor sein. Hier ist beispielsweise für eine reibungslose Transkription, aus der eine fehlerfreie RNA hervorgehen kann, der passende Promotor entscheidend. Sowohl pcDNA™5/FRT als auch pQCXIN verfügen beide, wie oben bereits beschrieben, über CMV-Promotoren, welche in Säugetierzellen funktionieren [64]. Für beide Expressionsvektoren konnte bereits gezeigt werden, dass sie in T-REx™-293-Zellen eingesetzt werden können. Durch mündliche Kommunikation mit Prof. Dr. Y. Hagos ist bekannt, dass eine Transfektion des Plasmids pcDNA5/FRT::OATP1A2 Variante 3 in T-REx™-293-Zellen mit anschließender OATP1A2-Überexpression möglich ist. Die Funktionalität von pQCXIN::OATP1A2 in T-REx™-293-Zellen konnte im Rahmen dieser Arbeit belegt werden. Somit gelten beide Expressionsvektoren in T-REx™-293-Zellen prinzipiell als funktionsfähig. Im Rahmen der mündlichen Kommunikation mit Prof. Dr. Y. Hagos stellte sich weiterhin

heraus, dass in den Funktionskontrollen der transfizierten Zellen eine pH-abhängige Transportaktivität nachgewiesen werden konnte. Laut den Untersuchungen von Prof. Dr. Y. Hagos wurde bei pH 6 eine 3- bis 4-fache E3S-Substrataufnahme im Vergleich zu Kontrollzellen festgestellt. Bei pH 7 wurde in den OATP1A2-Funktionskontrollen lediglich eine 2-fache Steigerung der Substrataufnahme im Vergleich zu nicht-transfizierten Zellen detektiert. Auch bei der Verwendung des alternativen OATP1A2-Referenzsubstrates Trosipium konnte eine pH-abhängige Transportaktivität (pH 6: 6-fache Steigerung, pH 7,4: 4,5-fache Steigerung) bestätigt werden. Im experimentellen Set-up der vorliegenden Arbeit wurde für die Transportversuche mit OATP1A2 transfizierten Zellen ein Inkubationspuffer mit einem pH von 7,3 bis 7,32 verwendet. Bereits 2008 postulierte Leuthold *et al.* eine erhöhte Transportaktivität in einem extrazellulär sauren Milieu mit einem pH von 6,5 durch die Protonierung basischer Aminosäuren der Transporter OATP1A2 und -1B3 [19]. Auch Untersuchungen von Badagnani, Catro *et al.* (2006) belegen einen pH-abhängigen Transport von Methotrexat und E3S durch OATP1A2. Bei einem pH von 5 wurde ein 5- bis 7-facher Transport von Methotrexat im Vergleich zu Transportuntersuchungen bei pH 7,4 festgestellt. Für E3S wiesen Badagnani, Catro *et al.* (2006) einen 2- bis 4-fachen Transport bei pH 5 verglichen mit pH 7,4 nach. Der detektierte Transport sei nachweislich nicht abhängig vom Protonengradienten über die Zellmembran sondern lediglich vom extrazellulären pH. Badagnani, Castro *et al.* (2006) verwendeten den Expressionsvektor pOX, welcher mit der OATP1A2-Sequenz in Oozyten transfiziert wurde. [68] Da jedoch der pH-Wert des menschlichen Blutes physiologisch zwischen 7,37 und 7,45 liegt [69] und der Fokus im Rahmen dieser Arbeit auf OATP1A2 der Blut-Hirn-Schranke und der Leber liegen, sind Transportmessungen unter physiologischen Bedingungen dieser Gewebe wie im experimentellen Set-up dieser Arbeit sinnvoll. Als weitere mögliche Ursache für die Diskrepanz in der Funktionalität beider Expressionsvektoren könnten Unterschiede im Aufbau und der Ausstattung der Plasmide sein. Wenn angenommen wird, dass die Ursache der verminderten Funktionalität von pcDNA™5/FRT im Vergleich zu pQCXIN nicht in einem fehlerhaften Plasmid liegt, könnte die Ursache in Störfaktoren der Proteinbiosynthese liegen. Da aus der Transfektion von pQCXIN::OATP1A2 in T-REx™-293-Zellen funktionelle überexprimierende Klone hervorgingen, kann davon ausgegangen werden, dass die verwendeten Zellen eine geeignete Zellausstattung zur Herstellung von OATP1A2 besitzen. Jedoch könnte die Proteinbiosynthese gezielt unterstützt werden.

Wie Zheng, Chan *et al.* (2014) zeigten, kann das Einbringen der PDZ-Proteine PDZK1 und NHERF1 in das Genom der OATP1A2 überexprimierenden Zellen, zum Beispiel durch Koloaliation mit OATP1A2 auf dem Expressionsvektor, die Expressionsrate sowie die Funktionalität von OATP1A2 deutlich verbessern. PDZ-Proteine sind Chaperone, also Hilfsproteine. Sie lenken andere Proteine zu bestimmten Zellregionen und verankern sie dort. PDZ-Proteine können mit OATP1A2 über die PDZ-Domäne an den letzten vier C-terminalen Aminosäuren interagieren. [70] Anhäufungen von Proteinaggregaten, sogenannte Einschlusskörper, können gleichermaßen Ursache des fehlenden Nachweises von Membranproteinen sein. Diese können bedingt sein durch fehlerhafte Disulfidbrückenbindung, eine mangelhafte Faltung zum Beispiel durch schlechte Löslichkeit sowie durch Proteinabbau oder gänzlichem Fehlen einer posttranslationalen Modifikation. [71] Chun, Thakkar *et al.* (2017) zeigten, dass insbesondere die N-terminale Sequenz von OATP1B3 eine bedeutende Rolle in der Membranlokalisation hat. Dies konnte auch für den humanen Transporter OATP1B1 und Oatp1b2 der Ratte nachgewiesen werden. Die Untersuchungen ergaben weiterhin, dass die N-terminalen Aminosäuren 12-50 von OATP1B3 für die korrekte Membranlokalisation unerlässlich sind. [72] Chun, Thakkar *et al.* (2017) untersuchten dies zwar nicht für OATP1A2, jedoch sollte bedacht werden, dass die Ursache der fehlerhaften Lokalisation im inkorrekten Aufbau der N-terminalen Sequenz liegen könnte. Da das Plasmid pcDNA5/FRT::OATP1A2 im Rahmen dieser Arbeit trotz 3 verschiedener Klonierungsstrategien nicht ordnungsgemäß funktioniert, stellt sich die Frage, ob OATP1A2 für eine Transfektion in T-REx™-293-Zellen mit dem Flp-In™-System grundsätzlich geeignet ist. Zwar ist pQCXIN::OATP1A2 ursprünglich nicht für die stabile Transfektion in T-REx™-293-Zellen entwickelt worden, jedoch zeigen die transienten Transfektionen dieser Arbeit, dass es grundsätzlich möglich ist, funktionelle OATP1A2-überexprimierende T-REx™-293-Klone herzustellen. Dies belegt auch, dass die Zellausstattung der T-REx™-293-Zellen intakte OATP1A2-Proteine hervorbringen kann. Dass eine Transfektion mit Hilfe des Flp-In™-System mit SLC-Transportern (*solute carrier*), wie *organic cation transporters* (OCT) oder *organic anion transporter polypeptides* (OATP) möglich ist, zeigten auch Untersuchungen von Sarah Römer (2019) aus der AG von Prof. Dr. Mladen V. Tzvetkov. Sie generierte stabil transfizierte MDCKII-Flp-Zellen, welche funktionelle OCT1 oder OATP2B1 überexprimieren. Analog zur Vorgehensweise in der vorliegenden Arbeit wurden für die Konstruktion des Plasmids pcDNA5/FRT::OATP2B1 sowohl Vektor als auch Insert

mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten. Die Schnittstellen wurden so gewählt, dass die Inserts in die MCS des Vektors eingefügt wurden. Die durch Sarah Römer hergestellten OATP2B1-Klone wiesen im Vergleich zu den Kontrollzellen eine 4,5-fache bis 6-fache Transportrate auf. Auch die Genexpressionsanalyse von OATP2B1 in MDCKII-Flp-Zellen mittels quantitativer Echtzeit-PCR zeigte im Vergleich zu den Untersuchungen im Zuge dieser Arbeit zu OATP1A2 deutlich höhere Werte. [73] Die Ergebnisse der Expressionsanalyse der OATP2B1-RNA in den MDCKII-Flp-Zellen ist jedoch erst mit der Expression von OATP1A2 durch eine Transfektion von pcDNA5/FRT::OATP1A2 in MDCKII-Flp-Zellen optimal vergleichbar. Da die in Sarah Römers Arbeit stabil transfizierten Zellen funktionelle Klone hervorbrachten und somit der Expressionsvektor intakt sein muss, stellte das Institut für Pharmakologie der Universität Greifswald das Plasmid pcDNA5/FRT::hOCT1 für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit als Grundlage für Variante 2 von pcDNA5/FRT:OATP1A2 zur Verfügung. Trotz der gleichartigen Plasmidkonstruktionen und der Transfektion mittels Flp-In™-System zeigen die mit pcDNA5/FRT::OATP1A2 transfizierten Zellen der 2. Klonierungsstrategie der vorliegenden Arbeit keine vergleichbare Funktionalität. Auch Karlgren, Vildhede et al. (2012) gelang die erfolgreiche Transfektion von OATP1B1, -1B3 und 2B1 mittels pcDNA™5/FRT in HEK-293-FlpIn™-Zellen, welche anschließend eine 6,5-fache (OATP1B3) - 44-fache (OATP2B1) Funktionalität im Vergleich zu den Kontrollzellen aufwiesen [74]. Ein weiteres *in vitro* Zellmodell zur Untersuchung von OATP1A2 beschreiben Huo et al. (2020). Im Vergleich der Arbeiten von Huo et al. (2020) zu den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit ergeben sich folgende Unterschiede. Huo et al. (2020) verwendeten ein anderes Plasmid (pIRES2-ZsGreen1-OATP1A2) und führten keine Wettbewerbsversuche sondern Aufnahmeversuche durch. Auch die Inkubationszeit und die Versuchsdurchführung unterscheiden sich deutlich vom experimentellen Set-up dieser Arbeit. Diese Faktoren können eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse beider Arbeiten erschweren. Sie generierten HEK-293-OATP1A2 stabil transfizierte Zellen, indem das Insert OATP1A2 in das pIRES2-ZsGreen1-Plasmid integriert und dieses in HEK-293-Zellen transfiziert wurde. [55] Das Plasmid pIRES2-ZsGreen1-Plasmid, siehe Abbildung 39, enthält einen CMV Promotor, eine IRES-Sequenz des Encephalomyocarditis Virus (EMCV) sowie ein ZnGreen1-Gen (*Zoanthus green fluorescent protein*). Außerdem verfügt das Plasmid über Resistenzen gegen Neomycin, Kanamycin und G-418 (Geneticin). [75] Das Gen von Interesse, OATP1A2, wird in die MCS kloniert und kann durch das

Vorhandensein der IRES-Sequenz mit dem nachfolgenden ZsGreen1-Gen aus einer gemeinsamen mRNA translatiert werden [76]. Dadurch wird sichergestellt, dass ein GFP-produzierender Klon zeitgleich auch das Gen von Interesse enthält und somit die Transfektion erfolgreich war. [64] Nach der Transfektion nach dem Herstellerprotokoll von *Lipofectamine*[™] 2000 selektierten Huo *et al.* (2020) die erfolgreich transfizierten Zellen mit Geneticin (G-418). [55] In den Transportversuchen der vorliegenden Arbeit wiesen die mit pQCXIN::OATP1A2 stabil transfizierten HEK-293-Zellen dagegen eine 4 bis 5-fache E3S-Substrataufnahme auf. Die mit pcDNA5/FRT::OATP1A2 stabil transfizierten T-REx[™]-293-Zellen zeigten nur maximal eine 1,7-fache E3S-Substrataufnahme. Da die Substrataufnahme in den Untersuchungen von Huo *et al.* (2020) jedoch zusätzlich zu den oben genannten Differenzen nicht unter Berücksichtigung der Proteinmenge angegeben wird, ist eine Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit fraglich. Im Vergleich zu den Zellmodellen mit pcDNA[™]5/FRT oder pQCXIN ist die Verifizierung einer stabilen Transfektion mit pIRES2-ZsGreen1 aufgrund der im Vektor enthaltenen GFP-Sequenz deutlich einfacher mittels Fluoreszenzmikroskopie durchzuführen. In Zusammenschau der Ergebnisse dieser Arbeit und von Huo *et al.* (2020) zeigen Zellen, welche mit einem Expressionsvektor transfiziert wurden, der eine IRES-Sequenz enthält (pQCXIN, pIRES2-ZsGreen1), eine höhere Funktionalität im Vergleich zu pcDNA5/FRT::OATP-transfizierten Zellen. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass die IRES-Sequenz eine Linker-Funktion einnimmt und die Expression des vorangehenden Gens begünstigt. Sowohl im Plasmid pQCXIN::OATP1A2 als auch in pIRES2-ZsGreen1-OATP1A2 wurde OATP1A2 in die der IRES-Sequenz vorgelagerten MCS-Region kloniert. Mizuguchi, Xu *et al.* (2000) konnten zeigen, dass die Genexpression eines Gens nach der IRES-Sequenz höher ist als die IRES-unabhängige Expression, in der lediglich eine Kozak-Sequenz im Bereich des Startcodons integriert ist. [77] Da hiervon für pQCXIN::OATP1A2 nur die Hygromycin-Resistenz betroffen ist, welche nach der IRES-Sequenz lokalisiert ist, spielt dies im Rahmen dieser Arbeit nur eine untergeordnete Rolle.

Zusammenfassend wurden zur Generierung von OATP1A2-stabil transfizierten Zelllinien mit dem Flp-In[™]-System drei Klonierungsstrategien verfolgt, welche jedoch nicht zu einer Überexpression von OATP1A2 in den Zellen führten. In den Funktionskontrollen wiesen die stabilen pQCXIN-transfizierten Zelllinien eine deutlich

höhere Funktionalität auf als die mit pcDNA5/FRT::OATP1A2 stabil transfizierten Zellen mit dem Flp-In™-System. Die Sequenzierungen des Genoms der stabil transfizierten T-REx™-pcDNA5/FRT::OATP1A2 (Variante 3) belegen eine Integration der DNA für OATP1A2 in das Genom der Wirtszelle. Auch die Validierungs-PCR (Hygromycin-PCR, GOI-PCR, Multiple-Integrations-PCR) zeigten keine Anhaltspunkte für strukturelle Fehler. Da die Ergebnisse der verschiedensten Validierungsmethoden zeigten, dass die Expressionsvektoren funktionieren und erfolgreich transfiziert wurden, erfolgte keine vollständige Sequenzierung der Plasmide pcDNA5/FRT::OATP1A2 (Variante 3) und pQCXIN::OATP1A2. Die einmalige und präzise Integration der OATP-Sequenz in das Genom der Wirtszelle wird als ein Vorteil des Flp-In™-Systems bezüglich der Reproduzierbarkeit gesehen. Trotzdem könnte eine mehrfache und zufällige Integration wie im pQCXIN-Zellmodell zu einem höheren Expressionserfolg führen. Im Rahmen dieser Arbeit zeigten jedoch stabil transfizierte T-REx™-pcDNA5::OATP1A2, in die das Plasmid Variante 3 trotz Flp-In™-System mehrfach integriert wurde, keine höhere Funktionalität im Vergleich zur einfachen Integration. Zwar konnte in den Funktionskontrollen eine inhibierbare Substrataufnahme festgestellt werden, dennoch scheint die Anzahl integrierter Kopien im experimentellen Set-up dieser Arbeit keine Rolle zu spielen. Zukünftig interessant sind auch Transportversuche mit einem veränderten pH-Wert, um eine mögliche pH-abhängige Transportaktivität von OATP1A2 bestätigen zu können. Western Blots inklusive Positivkontrolle (pQCXIN::OATP1A2 transfizierte Zellen) können in weiterführenden Untersuchungen noch durchgeführt werden, jedoch wurde OATP1A2 im Rahmen dieser Arbeit bereits auf Proteinebene mittels Immunfluoreszenzfärbungen und Funktionskontrollen überprüft. Sowohl die Transfektion von pcDNA5/FRT::OATP1A2 in MDCKII-Flp-Zellen als auch mit pIRES2-ZsGreen1-OATP1A2 transfizierte HEK-293-Zellen, welche von Huo et al. (2020) bereits erfolgreich generiert wurden, sollten Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

6 Zusammenfassung

In der Klinik wird eine inter- und intraindividuelle Variabilität in Wirkung und Nebenwirkung von Opioiden beobachtet [5,6]. Ursächlich hierfür könnte unter anderem eine individuelle Ausstattung mit Transportproteinen sein, welche pharmakologische Substanzen wie zum Beispiel Opioide über körpereigene Barrieren zu ihren Wirkorten transportieren. Mit dieser Arbeit sollte die Affinität der Opioide Fentanyl und Sufentanil zu ausgewählten *organic anion transporting polypeptides* (OATP) untersucht werden. Ein weiteres Ziel war die Generierung eines neuen OATP1A2-Transportmodells. Im Vergleich zum bisherig verwendeten Modell mit pQCXIN::OATP1A2 sollte eine Zelllinie mit definiert integriertem Transportprotein-Gen für eine reproduzierbarere OATP1A2-Überexpression generiert werden.

Eine Affinität von Fentanyl zu OATP1A2 konnte in Wettbewerbsversuchen (IC_{50} 14,17 μ M) belegt werden. Für die Kombination Fentanyl/ OATP1B1 war keine Inhibition des Transporters nachweisbar. Sufentanil inhibierte OATP1A2 geringfügig, konnte aber herstellerbedingt nicht in vergleichbaren Konzentrationen untersucht werden. Es zeigte sich kein Transport von Fentanyl durch OATP1A2.

Da Funktionskontrollen mit den vorhandenen HEK-pQCXIN::OATP-Zelllinien mit zunehmender Passagennummer fluktuierende oder abnehmende Aktivitäten zeigten, sollten stabile Zelllinien mit definierter vorzugsweise singulärer Integration des Zielgens in HEK-293-Zellen generiert werden. Mittels Flp-In™-System wurden über drei verschiedene Klonierungsstrategien Klone von T-REX™-pcDNA5/FRT::OATP1A2 hergestellt. Auf RNA- und DNA-Ebene konnte die korrekte Integration der OATP1A2-Sequenz nachgewiesen werden. In der Funktionskontrolle zeigte sich aber nur eine maximal 1,7 fache erhöhte Aktivität gegenüber Kontrollzellen. Mit keiner der drei gewählten Klonierungsstrategien konnten ausreichend funktionelle OATP1A2 überexprimierende Zellen generiert werden, trotz intakt integrierter OATP1A2-Sequenz sowie korrekter Übergänge, Startcodon und Kozak-Sequenz, bestätigt durch Sequenzierung des Genoms der T-REX™-pcDNA5/FRT::OATP1A2 (Variante 3). In stabil transfizierten Zellen ließ sich durch Immunfluoreszenz keine Expression, ordnungsgemäße Lokalisation und Überexpression von OATP1A2 darstellen. Ob dies an einer Proteinfehlfaltung oder einer zu niedrigen Proteinexpression liegt, konnte nicht zweifelsfrei bestimmt werden.

Insgesamt trägt diese Arbeit zur Beantwortung der Frage bei, inwiefern Fentanyl die Aufnahmetransporter der OATP-Familie beeinflusst und somit durch pharmakologische Hemmung die Wirkungen und Nebenwirkungen anderer Arzneimittel verändern kann. Obwohl die Generierung OATP1A2-überexprimierender T-REx™-pcDNA5/FRT::OATP mit dem Flp-In™-System im Rahmen dieser Arbeit nicht erfolgreich verlief, konnten weitere Erfahrungen zum Flp-In™-System gesammelt werden.

7 Literatur

1. Freye E. Opioides in der Medizin. 8. Auflage. Heidelberg: Springer Medizin Verlag Heidelberg; 2010. 3, 17, 34-48, 61-75, 229-235.
2. Angelo Ippolito, Florian Raimann, Joanna Warszawska, Kai Zacharowski und Andreas Pape. Opioides in der Anästhesie. *Arzneimitteltherapie* 2016;34. 07:235–242.
3. Ratiopharm GmbH. Fachinformation Sufentanil-ratiopharm® 0,05 mg/10 ml, 0,01/2 ml Injektionslösung. Ratiopharm GmbH. 2018. Version 2. <https://www.ratiopharm.de/assets/products/de/label/Sufentanil-ratiopharm%200%2C05%20mg%2010%20ml%2C%200%2C01%202%20ml%20injektionslosung%20-%20202.pdf?pzn=1351026> (Zuletzt geprüft am 26. April 2023).
4. Rossaint R., Werner C., Zwißler B. Die Anästhesiologie: Allgemeine und spezielle Ansthesiologie, Schmerztherapie und Intensivmedizin. 4. Auflage. Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2019. 291-313.
5. Nafziger AN, Bertino JS. Utility and application of urine drug testing in chronic pain management with opioids. *The Clinical journal of pain* 2009;25. 1:73–79. doi: 10.1097/AJP.0b013e31817e13cc. PMID: 19158549.
6. Kim RB. Transporters and Drug Discovery: Why, When, and How. *Molecular pharmaceutics* 2006;3. 1:26–32. doi: 10.1021/mp050084o. PMID: 16686366.
7. Freissmuth M, Offermanns S, Böhm S. *Pharmakologie und Toxikologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Medizin Verlag Heidelberg; 2020. 10-29, 188, 276-282.
8. Prasad B, Evers R, Gupta A, Hop CECA, Salphati L, Shukla S, Ambudkar SV, Unadkat JD. Interindividual variability in hepatic organic anion-transporting polypeptides and P-glycoprotein (ABCB1) protein expression: quantification by liquid chromatography tandem mass spectroscopy and influence of genotype, age, and sex. *Drug metabolism and disposition* 2014;42. 1:78–88. doi: 10.1124/dmd.113.053819. PMID: 24122874; PMCID: PMC3876790.
9. Roth M, Obaidat A, Hagenbuch B. OATPs, OATs and OCTs: the organic anion and cation transporters of the SLCO and SLC22A gene superfamilies. *British journal of pharmacology* 2012;165. 5:1260–1287. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01724.x. PMID: 22013971; PMCID: PMC3372714.
10. Engel A, Sieling T, Kolbow J, Wegner A, Keiser M, Siegmund W, Meissner K. Loperamide interacts with uptake transporters of the OATP family:

- Posterpräsentation. International Society for Anaesthetic Pharmacology (ISAP); 2013.
11. Engel A, Sieling T, Kolbow J, Wegner A, Keiser M, Siegmund W, K. M. Morphin und Loperamid unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Interaktion mit Aufnahmetransportern der OATP-Familie. PO-3.4.11. Anästh Intensivmed 2014;55:S277.
 12. Verband Forschender Arzneimittelhersteller e.V. In Deutschland zugelassene Arzneimittel für die Personalisierte Medizin. 2022. vfa.de/personalisiert (Zuletzt geprüft am 26. April 2023).
 13. van der Weide J, Steijns LS. Cytochrome P450 enzyme system: genetic polymorphisms and impact on clinical pharmacology. *Annals of clinical biochemistry* 1999;36 (Pt 6):722–729. doi: 10.1177/000456329903600604. PMID: 10586308.
 14. Tateishi T, Krivoruk Y, Ueng YF, Wood AJ, Guengerich FP, Wood M. Identification of human liver cytochrome P-450 3A4 as the enzyme responsible for fentanyl and sufentanil N-dealkylation. *ANESTHESIA AND ANALGESIA* 1996;82. 1:167–172. doi: 10.1097/00000539-199601000-00031. PMID: 8712396.
 15. Szucs TD. Personalisierte Medizin in der Kardiologie - Welche Gene sind wichtig? 30 Jahre Jubiläum HerzZentrum Hirslanden Zürich 2016:36–43.
 16. Giacomini KM, Huang S-M, Tweedie DJ, Benet LZ, Brouwer KLR, Chu X, Dahlin A, Evers R, Fischer V, Hillgren KM, Hoffmaster KA, Ishikawa T, Keppler D, Kim RB, Lee CA, Niemi M, Polli JW, Sugiyama Y, Swaan PW, Ware JA, Wright SH, Yee SW, Zamek-Gliszczyński MJ, Zhang L. Membrane transporters in drug development. *Nature reviews. Drug discovery* 2010;9. 3:215–236. doi: 10.1038/nrd3028. PMID: 20190787; PMCID: PMC3326076.
 17. Hagenbuch B, Meier PJ. Organic anion transporting polypeptides of the OATP/SLC21 family: phylogenetic classification as OATP/SLCO superfamily, new nomenclature and molecular/functional properties. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 2004;447. 5:653–665. doi: 10.1007/s00424-003-1168-y. PMID: 14579113.
 18. Bossuyt X, Müller M, Meier PJ. Multispecific amphipathic substrate transport by an organic anion transporter of human liver. Abstrakt. *Journal of Hepatology* 1996;25. 5:733–738. doi: 10.1016/s0168-8278(96)80246-7. PMID: 8938553.

19. Leuthold S, Hagenbuch B, Mohebbi N, Wagner CA, Meier PJ, Stieger B. Mechanisms of pH-gradient driven transport mediated by organic anion polypeptide transporters. *American journal of physiology. Cell physiology* 2008;296. 3:C570-C582. doi: 10.1152/ajpcell.00436.2008. PMID: 19129463.
20. Satlin LM, Amin V, Wolkoff AW. Organic anion transporting polypeptide mediates organic anion/HCO₃⁻ exchange. *The Journal of biological chemistry* 1997;272. 42:26340–26345. doi: 10.1074/jbc.272.42.26340. PMID: 9334206.
21. Li L, Lee TK, Meier PJ, Ballatori N. Identification of glutathione as a driving force and leukotriene C₄ as a substrate for oatp1, the hepatic sinusoidal organic solute transporter. *The Journal of biological chemistry* 1998;273. 26:16184–16191. doi: 10.1074/jbc.273.26.16184. PMID: 9632674.
22. Li L, Meier PJ, Ballatori N. Oatp2 mediates bidirectional organic solute transport: a role for intracellular glutathione. *Abstrakt. Molecular pharmacology* 2000;58. 2:335–340. doi: 10.1124/mol.58.2.335. PMID: 10908301.
23. Zhang B, Lauschke VM. Genetic variability and population diversity of the human SLCO (OATP) transporter family. *Pharmacological research* 2019;139:550–559. doi: 10.1016/j.phrs.2018.10.017. PMID: 30359687.
24. Alam K, Crowe A, Wang X, Zhang P, Ding K, Li L, Yue W. Regulation of Organic Anion Transporting Polypeptides (OATP) 1B1- and OATP1B3-Mediated Transport: An Updated Review in the Context of OATP-Mediated Drug-Drug Interactions. *International journal of molecular sciences* 2018;19. 3:855. doi: 10.3390/ijms19030855. PMID: 29538325; PMCID: PMC5877716.
25. Meier-Abt F, Mokrab Y, Mizuguchi K. Organic anion transporting polypeptides of the OATP/SLCO superfamily: identification of new members in nonmammalian species, comparative modeling and a potential transport mode. *The Journal of membrane biology* 2005;208. 3:213–227. doi: 10.1007/s00232-005-7004-x. PMID: 16648940.
26. Hänggi E, Freimoser Grundschober A, Leuthold S, Meier PJ, St-Pierre MV. Functional analysis of the extracellular cysteine residues in the human organic anion transporting polypeptide, OATP2B1. *Molecular pharmacology* 2006;70. 3:806–817. doi: 10.1124/mol.105.019547. PMID: 16754786.
27. Hagen P. Charakterisierung von Struktur und Funktionsmechanismus des Organo-Anionen-Transporters 2B1 (OATP2B1) mittels Förster-Resonanzenergietransfers. *Inauguraldissertation. Greifswald; 2018. 1-9.*

28. Huang Y, Lemieux MJ, Song J, Auer M, Wang D-N. Structure and mechanism of the glycerol-3-phosphate transporter from *Escherichia coli*. *Science (New York, N.Y.)* 2003;301. 5633:616–620. doi: 10.1126/science.1087619. PMID: 12893936.
29. Glaeser H, Bailey DG, Dresser GK, Gregor JC, Schwarz UI, McGrath JS, Jolicoeur E, Lee W, Leake BF, Tirona RG, Kim RB. Intestinal drug transporter expression and the impact of grapefruit juice in humans. *Clin Pharmacol Ther* 2007;81. 3:362–370. doi: 10.1038/sj.clpt.6100056. PMID: 17215845.
30. König J, Cui Y, Nies AT, Keppler D. Localization and genomic organization of a new hepatocellular organic anion transporting polypeptide. *The Journal of biological chemistry* 2000;275. 30:23161–23168. doi: 10.1074/jbc.M001448200. PMID: 10779507.
31. Bült M. Aufnahmetransporter – Ein neues Puzzlestück zur Klärung der hohen Variabilität von Opioiden? Posterpräsentation. Deutscher Anästhesiekongress; 2017.
32. Silbernagl S, Despopoulos A, Draguhn A. Taschenatlas Physiologie. 7. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2007. 276-278.
33. Martin Buchholz, Dr. Johannes Wengst. Wirkstoffprofil Loperamid. Martin Buchholz, Dr. Johannes Wengst. <https://www.wirkstoffprofile.de/online/Loperamid> (Zuletzt geprüft am 26. April 2023).
34. Saiz-Rodríguez M, Ochoa D, Herrador C, Belmonte C, Román M, Alday E, Koller D, Zubiaur P, Mejía G, Hernández-Martínez M, Abad-Santos F. Polymorphisms associated with fentanyl pharmacokinetics, pharmacodynamics and adverse effects. *Basic & clinical pharmacology & toxicology* 2019;124. 3:321–329. doi: 10.1111/bcpt.13141. PMID: 30281924.
35. Koolen SL, van der Rijt CC. Is there a role for pharmacogenetics in the dosing of fentanyl? *Pharmacogenomics* 2017;18. 5:417–419. doi: 10.2217/pgs-2017-0022. PMID: 28346084.
36. Gourlay GK, Kowalski SR, Plummer JL, Cousins MJ, Armstrong PJ. Fentanyl blood concentration-analgesic response relationship in the treatment of postoperative pain. *ANESTHESIA AND ANALGESIA* 1988;67. 4:329–337. PMID: 3354866.
37. Ramos-Matos CF, Bistas KG, Lopez-Ojeda W. Fentanyl. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. PMID: 29083586. Aktualisiert 30.06.2022 (Zuletzt geprüft am 26. April 2023).

38. Wilde M, Pichini S, Pacifici R, Tagliabracci A, Busardò FP, Auwärter V, Solimini R. Metabolic Pathways and Potencies of New Fentanyl Analogs. *Frontiers in pharmacology* 2019;10:1–16. doi: 10.3389/fphar.2019.00238. PMID: 31024296; PMCID: PMC6461066.
39. van de Donk T, Ward S, Langford R, Dahan A. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of sublingual sufentanil for postoperative pain management. *Anaesthesia* 2018;73. 2:231–237. doi: 10.1111/anae.14132. PMID: 29219169.
40. Mandery K, Bujok K, Schmidt I, Keiser M, Siegmund W, Balk B, König J, Fromm MF, Glaeser H. Influence of the flavonoids apigenin, kaempferol, and quercetin on the function of organic anion transporting polypeptides 1A2 and 2B1. *Biochemical pharmacology* 2010;80. 11:1746–1753. doi: 10.1016/j.bcp.2010.08.008. PMID: 20797388.
41. Leonhardt M, Keiser M, Oswald S, Kühn J, Jia J, Grube M, Kroemer HK, Siegmund W, Weitschies W. Hepatic uptake of the magnetic resonance imaging contrast agent Gd-EOB-DTPA: role of human organic anion transporters. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 2010. 38, 7:1024–1028. doi: 10.1124/dmd.110.032862.
42. Elbaridi N, Kaye AD, Choi S, Urman RD. Current Concepts of Phenylpiperidine Derivatives Use in the Treatment of Acute and Chronic Pain. *Pain Physician* 2017. 20(2S):SE23-SE31. PMID: 28226339.
43. Elkiweri IA, Zhang YL, Christians U, Ng K-Y, van Tissot Patot MC, Henthorn TK. Competitive substrates for P-glycoprotein and organic anion protein transporters differentially reduce blood organ transport of fentanyl and loperamide: pharmacokinetics and pharmacodynamics in Sprague-Dawley rats. *ANESTHESIA AND ANALGESIA* 2009;108. 1:149–159. doi: 10.1213/ane.0b013e31818e0bd1. PMID: 19095843; PMCID: PMC2637614.
44. Forster S, Thumser AE, Hood SR, Plant N. Characterization of rhodamine-123 as a tracer dye for use in in vitro drug transport assays. *PloS one* 2012;7. 3:e33253. doi: 10.1371/journal.pone.0033253. PMID: 22470447; PMCID: PMC3314654.
45. Thomas, P. and Smart, T. G. HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins. *Journal of pharmacological and toxicological methods* 2005. 51(3):187–200. doi: 10.1016/j.vascn.2004.08.014. PMID: 15862464.

46. Chen A. Growth and Maintenance of the Flp-In™ T-REx™ Cell Line: User Guide. Thermo Fisher Scientific. 2020. 5-14. https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/flpintrexcells_man.pdf (Zuletzt geprüft am 26. April 2023).
47. Chen A. Flp-In™ System For Generating Stable Mammalian Expression Cell Lines by Flp Recombinase-Mediated Integration. Invitrogen by Thermo Fischer Scientific. 2010. 1-25. https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/flpinsystem_man.pdf (Zuletzt geprüft am 26. April 2023).
48. Saadatmand AR. OCT1-mediated cellular drug uptake and interactions between drug transport and drug metabolism. Dissertation. Göttingen; 2012. 39-41, 96-98.
49. Thermo Fisher Scientific. Real-Time PCR: Ct-Wert verstehen. Thermo Fisher Scientific. 2016. <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/real-time-pcr-understanding-ct.html> (Zuletzt geprüft am 26. April 2023).
50. Sigma-Aldrich. 24-well-plate-template-pdf. <https://www.sigmaaldrich.com/DE/en/deepweb/assets/sigmaaldrich/marketing/global/documents/136/899/24-well-plate-template.pdf> (Zuletzt geprüft am 26. April 2023).
51. Engel A, Wegner A, Sieling T, Keiser M, Siegmund W, Meissner K. OATP1A2 – Ein neues Puzzleteil zur Klärung der hohen Variabilität von Morphin? Posterpräsentation. Hauptstadtkongress der DGAI für Anästhesiologie und Intensivtherapie (HAI); 2014.
52. Kozak M. At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. *Journal of Molecular Biology* 1987;196. 4:947–950. doi: 10.1016/0022-2836(87)90418-9. PMID: 3681984.
53. HEXAL AG. Gebrauchsinformation: Information für Anwender: Fentanyl HEXAL 0,1 mg/ Fentanyl Hexal 0,5 mg. HEXAL AG. 2019. https://www.gelbe-liste.de/produkte/beipackzettel_Fentanyl-HEXAL-0-1-mg-Injektionsloesung.pdf/fa5d3f6d-1c12-462f-bcba-baa16b26cfaa (Zuletzt geprüft am 26. April 2023).
54. HEXAL AG. Fentanyl Fachinformationen. HEXAL AG. 2009.
55. Huo X-C, Yang H-W, Huang L-H, Zhang F, Pan Z-Y, Liao Q. Organic anion transporting polypeptide 1A2 mediates fentanyl uptake in cultured cells.

- Molecular medicine reports 2020;21. 1:485–492. doi: 10.3892/mmr.2019.10796. PMID: 31746415.
56. Hubeny, Andrea. Untersuchungen zur Expression und Funktion von OATP-Transportern in Blutzellen und der Blut-Hirn-Schranke. Inauguraldissertation. Greifswald; 2015. 56, 57.
 57. Ziesenitz VC, König SK, Mahlke N, Jantos R, Skopp G, Weiss J, Haefeli WE, Mikus G. Fentanyl pharmacokinetics is not dependent on hepatic uptake by organic anion-transporting polypeptide 1B1 in human beings. *Basic & clinical pharmacology & toxicology* 2013;113. 1:43–48. doi: 10.1111/bcpt.12066. PMID: 23480028.
 58. Ronaldson PT, Brzica H, Abdullahi W, Reilly BG, Davis TP. Transport Properties of Statins by Organic Anion Transporting Polypeptide 1A2 and Regulation by Transforming Growth Factor- β Signaling in Human Endothelial Cells. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 2021;376. 2:148–160. doi: 10.1124/jpet.120.000267. PMID: 33168642; PMCID: PMC7839073.
 59. Fandler-Höfler S, Kneihsl M, Gattringer T. Update zur Sekundärprophylaxe nach ischämischem Schlaganfall. *psychopraxis. neuropraxis* 2021;24. 6:348–355. doi: 10.1007/s00739-021-00758-5.
 60. Iusuf D, Hendriks JJMA, van Esch A, van de Steeg E, Wagenaar E, Rosing H, Beijnen JH, Schinkel AH. Human OATP1B1, OATP1B3 and OATP1A2 can mediate the in vivo uptake and clearance of docetaxel. *International journal of cancer* 2015;136. 1:225–233. doi: 10.1002/ijc.28970. PMID: 24825069.
 61. Durmus S, Naik J, Buil L, Wagenaar E, van Tellingen O, Schinkel AH. In vivo disposition of doxorubicin is affected by mouse Oatp1a/1b and human OATP1A/1B transporters. *International journal of cancer* 2014;135. 7:1700–1710. doi: 10.1002/ijc.28797. PMID: 24554572.
 62. van de Steeg E, van Esch A, Wagenaar E, Kenworthy KE, Schinkel AH. Influence of human OATP1B1, OATP1B3, and OATP1A2 on the pharmacokinetics of methotrexate and paclitaxel in humanized transgenic mice. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2013;19. 4:821–832. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-2080. PMID: 23243220.
 63. König J, Glaeser H, Keiser M, Mandery K, Klotz U, Fromm MF. Role of organic anion-transporting polypeptides for cellular mesalazine (5-aminosalicylic acid)

- uptake. Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals 2011;39. 6:1097–1102. doi: 10.1124/dmd.110.034991. PMID: 21430235.
64. Wang T, Guo X. Expression vector cassette engineering for recombinant therapeutic production in mammalian cell systems. Applied microbiology and biotechnology 2020;104. 13:5673–5688. doi: 10.1007/s00253-020-10640-w. PMID: 32372203.
65. Clontech Laboratories, Inc., A Takara Bio Company. pQCXIN Retroviral Vector Map. 2013. Cat. No. 631514, Sold as a part of 631516. <https://www.takarabio.com/assets/a/114159> (Zuletzt geprüft am 26. April 2023).
66. BD Biosciences Clontech. BD Retro-X Q Vectors: New self-inactivating vectors engineered to produce higher titers. 2002. http://www.ebiotrade.com/emgzf/clontechniques_7_02/Reto-X_Q_Vectors.pdf (Zuletzt geprüft am 26. April 2023).
67. Clontech Laboratories, Inc., A Takara Bio Company. pQCXIN Retroviral Vector Information. 2008. Protocol No. PT3667-5, Version No. PR7Y2441. www.honorgene.com/uploads/old/documents/vector/pqcxin_-_addgene_vector_databaseshou_ce_.pdf (Zuletzt geprüft am 26. April 2023).
68. Badagnani I, Castro RA, Taylor TR, Brett CM, Huang CC, Stryke D, Kawamoto M, Johns SJ, Ferrin TE, Carlson EJ, Burchard EG, Giacomini KM. Interaction of methotrexate with organic-anion transporting polypeptide 1A2 and its genetic variants. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics 2006;318. 2:521–529. doi: 10.1124/jpet.106.104364. PMID: 16702441.
69. Herold G. Innere Medizin: Eine vorlesungsorientierte Darstellung : 2020 : unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung : mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis. Köln: Gerd Herold; 2020. 968.
70. Zheng J, Chan T, Cheung FSG, Zhu L, Murray M, Zhou F. PDZK1 and NHERF1 regulate the function of human organic anion transporting polypeptide 1A2 (OATP1A2) by modulating its subcellular trafficking and stability. PloS one 2014;9. 4:e94712. doi: 10.1371/journal.pone.0094712. PMID: 24728453; PMCID: PMC3984249.
71. Biologics International Corp. Protein Expression Protocol & Troubleshooting. <https://www.biologicscorp.com/protein-expression-protocol-troubleshooting-in-e-coli/#.YdbZzWCZMuU> (Zuletzt geprüft am 26. April 2023).

72. Chun S-E, Thakkar N, Oh Y, Park JE, Han S, Ryoo G, Hahn H, Maeng SH, Lim Y-R, Han BW, Lee W. The N-terminal region of organic anion transporting polypeptide 1B3 (OATP1B3) plays an essential role in regulating its plasma membrane trafficking. *Biochemical pharmacology* 2017;131:98–105. doi: 10.1016/j.bcp.2017.02.013. PMID: 28216016.
73. Römer S. Functional characterisation of splice variant rs35854239 in the OCT1 gene & Validation of the Flp-In-System in MDCKII cells. Masterarbeit. Greifswald; 2019. 81-94.
74. Karlgren M, Vildhede A, Norinder U, Wisniewski JR, Kimoto E, Lai Y, Haglund U, Artursson P. Classification of inhibitors of hepatic organic anion transporting polypeptides (OATPs): influence of protein expression on drug-drug interactions. *Journal of medicinal chemistry* 2012;55. 10:4740–4763. doi: 10.1021/jm300212s. PMID: 22541068; PMCID: PMC3361267.
75. Clontech Laboratories, Inc., A Takara Bio Company. pIRES2-ZsGreen1. SnapGene. https://www.snapgene.com/resources/plasmid-files/?set=mammalian_expression_vectors&plasmid=pIRES2-ZsGreen1 (Zuletzt geprüft am 26. April 2023).
76. Clontech Laboratories, Inc. A Takara Bio Company. pIRES2-ZsGreen1 Vector Information. 2005. Cat. No. 632478, Protocol No. PT3824-5, Version No. PR52081. <https://www.takarabio.com/documents/Vector%20Documents/PT3824-5.pdf> (Zuletzt geprüft am 26. April 2023).
77. Mizuguchi H, Xu Z, Ishii-Watabe A, Uchida E, Hayakawa T. IRES-dependent second gene expression is significantly lower than cap-dependent first gene expression in a bicistronic vector. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 2000;1. 4:376–382. doi: 10.1006/mthe.2000.0050. PMID: 10933956.
78. Chen A. pcDNA™ 5/FRT Vector User Guide: Expression vector designed for use with the Flp-In™ System. Invitrogen. 2012. Cat. No. V6010-20, Publication Part Number 25-0307. https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/flpin_pcdna5frt_man.pdf (Zuletzt geprüft am 26. April 2023).
79. Invitrogen by Thermo Fischer Scientific. pcDNA5/FRT. SnapGene. https://www.snapgene.com/resources/plasmid-files/?set=mammalian_expression_vectors&plasmid=pcDNA5_FRT (Zuletzt geprüft am 26. April 2023).

80. NovoPro. pQCXIN Vector Map and Sequence. NovoPro.
<https://www.novoprolabs.com/vector/V10397> (Zuletzt geprüft am 26. April 2023).
81. Zentrale Kommission für die Biologische Sicherheit. Allgemeine Stellungnahme der ZKBS zu häufig durchgeführten gentechnischen Arbeiten mit den zugrunde liegenden Kriterien der Vergleichbarkeit: Stabile und transiente Genexpression mithilfe γ -retroviraler und lentiviraler Vektoren. 2020. Az. 6790-10-41.
https://www.zkbs-online.de/ZKBS/SharedDocs/Downloads/01_Allgemeine%20Stellungnahmen/10_Viren/retrovirale_Vektoren_2020.html (Zuletzt geprüft am 26. April 2023).
82. Püschel G, Kühn H, Kietzmann T, Höhne W, Christ B, Doenecke D, Koolman J. Taschenlehrbuch Biochemie. Stuttgart: Thieme; 2011. 469.
83. Zhu XD, Sadowski PD. Cleavage-dependent ligation by the FLP recombinase. Characterization of a mutant FLP protein with an alteration in a catalytic amino acid. *The Journal of biological chemistry* 1995;270. 39:23044–23054. doi: 10.1074/jbc.270.39.23044. PMID: 7559444.

8 Anhang

8.1 Material

8.1.1 Verwendete Zellen und Bakterien

| Zellen/ Bakterien | Hersteller |
|---|--|
| HEK-OATP 1A2*1 | Institut für Pharmakologie der Universität Greifswald, D |
| HEK-OATP 1B1 | |
| HEK-OATP 1B3 | |
| HEK pQCXIN | |
| Flp-In™ T-REx™-293 | invitrogen, Life technologies corp., Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D, Artikelnummer R710-07 |
| One Shot® TOP10 Electrocomp™ <i>E. coli</i> | invitrogen, Life technologies corp., Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D, Artikelnummer C404050 |

8.1.2 Chemikalien und Kits

| Chemikalien/Kits | Hersteller |
|--|---|
| 10x Buffer EcoRI (with BSA) | Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D |
| 10x Buffer KpnI with BSA 1 ml | Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D |
| 10x Buffer R (with BSA) 1 ml | Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D |
| 10x Tango Buffer with BSA | fermentas, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D |
| 1 kB DNA Ladder | Promega Corporation, Madison, WI, US |
| 6x DNA Loading Dye | VWR International bvba, Leuven, B |
| Acetonitril Rotisol® HPLC Gradient Grade | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D |
| Agarose Standard | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D |
| Alexa Fluor 568 goat anti-mouse IgG (H+L), polyclonal, 2 mg/ml | Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D |
| Alexa Fluor® 488 goat anti-rabbit IgG (H+L), polyclonal, 2 mg/ml | Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D |
| Ampicillin sodium salt | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D |
| Anti-SLCO1A2, monoclonal rabbit anti-human antibody | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D |
| BamHI 20.000 U/ml | New England Biolabs, Frankfurt am Main, D |
| Biozym LE Agarose | Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf, D |
| Blue/Orange 6X Loading Dye | Promega Corporation, Madison, WI, US |
| Buf. 0 | Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D |
| CASYton | OLS OMNI Life Science, Bremen, D |
| Chloroform | ChemSolute, Renningen, D |
| Dextromethorphan hydrobromide monohydrate | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D |

| | |
|---|---|
| DMEM + 4,5 g/L D-Glucose, L-Glutamin, Pyruvate | Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D |
| DNA ladder peqGold 100 bp | VWR, Darmstadt, D |
| DNA ladder peqGold 1 kb | VWR, Darmstadt, D |
| DNeasy® Blood and Tissue Kit (250) | QIAGEN GmbH, Hilden, D |
| DPBS w/o Ca, Mg | Pan Biotech GmbH, Aidenbach, D |
| Eco32I (EcoRV) Qty 4000 U, 10 U/µl | Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D |
| ECORI (Enzym) Qty 10000 U, 10 U/µl | Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D |
| Ethanol 70 Vol.-% (MEK-vergällt) | Universitätsapotheke, 17475 Greifswald |
| Ethanol Rotipuran® ≥99,8 %, p.a. | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D |
| Ethidiumbromid | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D |
| Exonuclease I (Exol) | Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D |
| Expand Long Template PCR System | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D |
| FBS, Qualified | gibco by Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D |
| FuGene6® Transfection Reagent | Promega Corporation, Madison, WI US |
| G-418 Sulfat (Geneticin), 100 mg/ml | IvivoGen, Toulouse, F |
| Glycerin Rotipuran® ≥99,5 %, p.a., wasserfrei | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D |
| High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit | applied biosystems by Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D |
| HindIII Qty: 5000 U, 10 U/µL | Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D |
| Hygromycin B in PBS 50 mg/ml | invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D |
| Isoamylalkohol | Merck KGaA, Darmstadt, D |
| Isopropanol (2-Propanol) | ChemSolute, Renningen, D |
| KOD Hot Start DNA Polymerase KIT | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D |
| KpnI 4000 U, 10 U/µl | Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D |
| Lipofectamine® 2000 Reagent | invitrogen, Life technologies corp., Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D |
| Methanol | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D |
| MycoBlue Mycoplasma Detector | Vazyme Biotech Co., Ltd., Nanjing, C |
| Mycoplasma Detection Kit-Quick Test | Biotoool LCC, München, D |
| Na ⁺ /K ⁺ -ATPase α (H-3), sc-48345, mouse monoclonal IgG2b κ (200 µg/ml) | Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, D |
| Naringin hydrate | VWR International bvba, Leuven, B |
| Natriumchlorid (NaCl) | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D |
| Natriumhydroxid (NaOH) | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D |
| NEBuffer 3.1 | New England Biolabs, Frankfurt am Main, D |

| | |
|---|--|
| normal Rabbit IgG, Isotyp control | invitrogen, Life technologies corp., Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D |
| PCR Mycoplasma Test Kit I/C | PromoCell GmbH, Heidelberg, D |
| Penicillin-Streptomycin: Penicillin 10,000 U/ml, Streptomycin 10 mg/ml | Pan Biotech GmbH, Aidenbach, D |
| Pierce™ BCA Protein Assay Kit | Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D |
| Plasmocin™ treatment - 50 mg (2x1 ml) | IvivoGen, Toulouse, F |
| Poly-D-lysine hydrobromide mol wt 1,000- 5,000 | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D |
| Poly-D-lysine hydrobromide mol wt 70,000-150,000 | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D |
| Pre-Developed TaqMan® Assay Reagents Human TBP (20x) | applied biosystems by Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D |
| PstI 3000U, 10 U/μl | Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D |
| Qiagen Plasmid Plus Midi Kit (100) | QIAGEN GmbH, Hilden, D |
| QIAquick® Gel Extraktion Kit (250) | QIAGEN GmbH, Hilden, D |
| Q-Solution | QIAGEN GmbH, Hilden, D |
| Rapid DNA Ligation Kit | Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D |
| Rhodamin 123, Mol. Wt. 381, 50 mg | Biotium, Inc. Hayward, US |
| Rifampicin | AppliChem GmbH, Darmstadt, D |
| RIPA Buffer | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D |
| RNase A | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D |
| RNaseZAP™ | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D |
| RNeasy® Plus Mini Kit (50) | QIAGEN GmbH, Hilden, D |
| Roti®-Mount FluorCare DAPI | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D |
| Rotisolv® LC-MS Grade, Wasser mit 0,1 % Ameisensäure | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D |
| Rotiszint® eco plus, LSC-Universalcocktail | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D |
| SacI 1200 U, 10 U/μl | Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D |
| Sall 1500 U, 10 U/μl | fermentas, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D |
| Sephadex™ G-50 superfine | GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, SE |
| Shrimp Alkaline Phosphatase 10x Reaction Buffer | Affymetrix® USB® Products by Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D |
| SLCO1A2 Antibody | Assay Biotechnology Company, Inc., CA 94538, US |
| SLCO1A2 Hs00366488_m1 250 μl 20x Mix | applied biosystems by Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D |
| SYBR® Safe DNA Gel Stain | IvivoGen by Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D |

| | |
|------------------------------------|--|
| TaqMan® Gene Expression Master Mix | applied biosystems by Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D |
| Trypan Blue stain 0,4 % | Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D |
| TrypLE™ Express | Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D |
| Trypsin / EDTA | Pan Biotech GmbH, Aidenbach, D |
| Tween® 20 Ph. Eur. | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D |
| Unique Buffer (10x Buffer Sacl) | Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D |
| Xbal 10 U/µl, 1500 U | fermentas, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D |

8.1.3 Substrate

| Substrat | Hersteller |
|---|---|
| ³ H-Bromosulphophthalein 20-40 Ci/mmol 0.74-1.48 TBq/mmol | Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig, D |
| ³ H-Esteron-3-Sulfat 367,5 g/mol, 250 µCi | Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig, D |
| Bromosulphophthalein (BSP) | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D |
| Esteron-3-sulfat 388,52 g/mol | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D |
| Fentanylcitrat | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D |
| Fentanylcitrat | Fagron GmbH & Co. KG, Barsbüttel, D |
| Sufentanil Citrate solution 100 µg/mL | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D |

8.1.4 Medien, Puffer

Die Rezepte für die verschiedenen Puffer sind im Methodenteil unter der zugehörigen Methode zu finden.

| 10x Inkubationspuffer | Hersteller |
|--|--|
| CaCl ₂ (94/96 %) | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D |
| D-(+)-Glucose, minimum 99,5 % | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D |
| HEPES Pufferan | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D |
| Kaliumchlorid | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D |
| Kaliumphosphat monobasisch (KH ₂ PO ₄) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D |
| Magnesiumsulfat Heptahydrat (7x H ₂ O) | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D |
| Natriumchlorid | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D |

| HEK-Medium | Hersteller |
|------------------------------|--------------------------------|
| FKS Sera Plus | Pan Biotech GmbH, Aidenbach, D |
| L-Glutamin 200 mM | |
| MEM NEAA | |
| MEM-Medium with Earles Salts | |

| LB-Medium | Hersteller |
|---|---------------------------------------|
| Hefeextrakt, pulv., für die Bakteriologie 0,5 % | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D |
| Natriumchlorid (NaCl) | |
| Trypton/Pepton aus Casein 1 % | |

| Lysispuffer P2 | Hersteller |
|-------------------------|---------------------------------------|
| Natriumhydroxid (NaOH) | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D |
| SDS/Natriumlaurylsulfat | |

| Lysispuffer I (Transportversuche) | Hersteller |
|--|---------------------------------------|
| Natriumchlorid | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D |
| Sodium- deoxycholate | Sigma Aldrich, Buchs, CH |
| Tris-HCL 121,14 g/mol | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D |
| Triton® X-100 | Merck KGaA, Darmstadt, D |

| Neutralisationspuffer P3 | Hersteller |
|---------------------------------|---------------------------------------|
| Kaliumacetat | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D |

| Reinigungs- und Desinfektionsmittel | Hersteller |
|--|---|
| 1 % Bodedex forte | BODE Chemie GmbH, Unternehmen der Hartmann Gruppe, Hamburg, D |
| Lysoformin 3000 | Lysoform Dr. Hans Rosemann GmbH, Berlin, D |
| Mycoplasma-ExS Spray | PromoCell GmbH, Heidelberg, D |

| Resuspensionspuffer P1 | Hersteller |
|---|---|
| EDTA, <i>Ethylendiaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate</i> | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D |
| Rnase A (nach dem Autoklavieren hinzugegeben) | |
| Tris-HCl | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D |

| TAE-Puffer | Hersteller |
|------------------------------------|--|
| Ethylendiamintetraessigsäure, EDTA | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D |
| Tris-HCl | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D |

| TBE-Puffer | Hersteller |
|--|---|
| Borsäure | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D |
| EDTA-Natrium, <i>Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate</i> | |
| TRIS, Trizma® Base | |

8.1.5 Primer

Tabelle 41: Primer Sequenzierungs-PCR

Alle Sequenzierungs-Primer wurden von der Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D hergestellt.

| Primer | Sequenz |
|-------------------|---------------------------|
| pcDNA5_for | GCGTGACGGTGGGAGGTCTATATA |
| OATP1A2_1_for | GACAATTCAACATCCCAACATC |
| OATP1A2_2_for | CCATCAGAGTGACAAAGGAAG |
| OATP1A2_4_for | GTATTTATAACTTACCTCCAAT |
| OATP1A2_5_for | TGTCATATCTGTCAGCTTGTCT |
| OATP1A2_7_for | CGGATTGCCGGCAGCACTAAGA |
| OATP1A2_4_for_new | GAATATCATCTTCAGATGCAATC |
| OATP1A2_6_rev | CTGCTCATCGCTGACAAGATTAG |
| OATP1A2_1_rev | CAATCTCAAAGCTTCCATTAAT |
| pcDNA5_rev | ACGGGGGAGGGGCAAACAACAGATG |
| OATP1A2_3_for | TGCAGGAGTTAACGTGCTCACT |

Tabelle 42: Primer Validierungs-PCR

Alle Primer für die Validierungs-PCR wurden von Eurofins genomics, Ebersberg, D hergestellt.

| Primer | Sequenz |
|--------------------|---------------------------|
| Hyg_r2 | ACGCCCTCCTACATCGAAGCTGAAA |
| P _{SV40} | AGCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGG |
| LacZ | CCTTCCTGTAGCCAGCTTTCATCAA |
| P _{CMV} | CCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTA |
| P _{FRT_f} | AATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCC |

Tabelle 43: Weitere PCR-Primer

Alle PCR-Primer wurden von der MWG-Biotech AG, Ebersberg, D mit der Konzentration 100 µM hergestellt.

| Primer | Sequenz |
|-------------------|---|
| OATP1A2_EcoRV_rev | TAAGCTT <u>GATATCAATTACAATTTAGTTTTCAATTC</u> |
| OATP1A2_KpnI_for | CTGTGCT <u>GGTACCAGCAACATGGGAGAAACTGAGAAA</u> |

8.1.6 Plasmide

| Plasmide | Hersteller |
|---|---|
| pcDNA™5/FRT Mammalian Expression Vector | invitrogen, Life technologies corp., Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D, Katalognummer: V601020 |
| pOG44 Flp-Recombinase Expression Vector | Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D Katalognummer: V600520 |
| pGFP-tpz | Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D |
| pcDNA5/FRT::OATP1A2 Variante 1 | Prof. Dr. Mladen V. Tzvetkov, Institut für Pharmakologie der Universitätsmedizin Greifswald, D |
| pcDNA5/FRT::OATP1A2 Variante 2 | Im Rahmen dieser Arbeit generiert |
| pcDNA5/FRT::OATP1A2 Variante 3 | Prof. Dr. Yohannes Hagos, Göttingen, D |
| pQCXIN::OATP1A2 | Dr. Markus Keiser, Institut für Pharmakologie der Universität Greifswald |
| pcDNA5/FRT::hOCT1_FLAG | Marleen Meyer, Institut für Pharmakologie der Universität Greifswald |

8.1.7 Laborgeräte

| Gerätename | Hersteller |
|---|---|
| 3130xL Genetic Analyser | Applied Biosystem, Darmstadt, Germany |
| Absaugpumpe | ABM Greiffenberger Antriebstechnik GmbH, Marktredwitz, D |
| Agitateurs Variomag Mono | Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D |
| Analytical balance M-Pact AX124 | Sartorius AG, Göttingen, D |
| API 4000 QTRAP® mass spectrometer | Applied biosystems MDS Sciex, AB Sciex Germany GmbH, Darmstadt, D |
| Autoclave HV-50 | HMC Europe GmbH, Tüßling, D |
| Biometra MP86 Membran Vakuumpumpe | Biometra GmbH, Göttingen, D |
| Biometra® Standard Power Pack P25 | Biometra GmbH, Göttingen, D |
| Block Heater, 3 Block, Digital, SBH130D/3 | stuart®, Stone, Staffordshire, UK |
| Brutschrank BD 260 | Binder GmbH, Tuttlingen, D |
| CASY Cell Counter & Analyzer, 5651736 | Innovatis, Bielefeld, D |
| Centrifuge 5417R | Eppendorf AG, Hamburg, D |
| Centrifuge 5430R | Eppendorf AG, Hamburg, D |
| Centrifuge Heraeus™ Multifuge™ 3S-R | Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D |

| | |
|--|---|
| Centrifuge himac CT 15RE | Himac, Koki Holdings Co., Ltd., Tokyo, JP |
| Clatronic MWG 775H Mikrowelle | CLATRONIC INTERNATIONAL GMBH, Kempen, D |
| Concentrator plus-Gesamtsystem, mit integrierter Membran-Vakuumpumpe, mit Rotor F-45-48-11, Katalog-Nr. 5305000304 | Eppendorf AG, Hamburg, D |
| Countess™ automated cell counter | Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D |
| CTO-20AC prominence column oven | SHIMADZU SCIENTIFIC INSTRUMENTS, INC., Columbia, Maryland 21046, US |
| Elektrophoresekammer Model: 40-0911 | PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, D |
| Eppendorf Multipette® stream | Eppendorf AG, Hamburg, D |
| eppendorf Research plus Einkanal, (10/100/1000 µl) | Eppendorf AG, Hamburg, D |
| Eppendorf Research® plus, 8-Kanal, variabel, inklusive epT.I.P.S.®-Box, 30 – 300 µL, orange | Eppendorf AG, Hamburg, D |
| EVOS Flc, XL Cell Imaging System | Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D |
| Gekühlte Tischzentrifuge VWR Mega Star 1.6R | VWR International GmbH, Darmstadt, D |
| Gel logic 200 imaging system | Eastman Kodak Company, Rochester NY, US |
| GenePulser Xcell™ Electroporation Systems, Total system 1652660 | Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, D |
| GenoSmart | VWR International GmbH, Darmstadt, D |
| Grant Heizblock QBT 1 | Grant Instruments™ PCMT, Shepreth, Cambridge, SG8 6GB, UK |
| Harvard Apparatus 11 Plus Syringe Pump, MA1 70-2208 | Harvard Apparatus, Inc., 84 October Hill Road, Holliston, Massachusetts 01746, US |
| Heraeus Pico™ 21 Centrifuge, Ventilated | Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D |
| Heraeus™ Fresco 21 Centrifuge | Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D |
| Heraeus™ Multifuge™ X3 Universalzentrifuge | Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D |
| Herasafe® KS 12 Sicherheitswerkbank | Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D |
| HPLC Degassing Unit DGU20A5R | SHIMADZU SCIENTIFIC INSTRUMENTS, INC., Columbia, Maryland 21046, US |
| HPLC system Nexera X2 series | Shimadzu Germany GmbH, Duisburg, D |
| Inkubationshaube TH15 | Edmund Bühler GmbH, Bodelshausen, D |
| Kompaktschüttler KS 15 A control | Edmund Bühler GmbH, Bodelshausen, D |
| Laser Scanning Microscope LSM780 | Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, D |
| Memmert BE500 incubator | Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, D |
| Microscope Primovert | Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, D |
| MIDI 40 CO2 Incubator | Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D |
| Mikroskop Palm MicroBeam | Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, D |
| Mikrozentrifuge Mini Star silverline | VWR International GmbH, Darmstadt, D |
| Mr Frosty freezing Container | Nalgene, Merck KGaA, Darmstadt, D |
| NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer | Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D |
| neoLab Vortex Schüttler, Art. Nr.: 7-2020 | neoLab, Heidelberg, D |
| New Brunswick™ Innova® 42, M1335-0012 | Eppendorf AG, Hamburg, D |
| Objektiv 40-fach Pln Apo 40x/1.3 Oil Dicll | Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, D |
| Objektiv 63-fach alpha-pln Apo 63x/1.46 Oil | Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, D |

| | |
|--|--|
| Octopus QPLEX, PR435 | NH DyeAGNOSTICS GmbH, Halle, D |
| peqTwist Vortex Mixer | PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, D |
| PH METER LAB PHENOMENAL PH 1000 L | VWR International GmbH, Darmstadt, D |
| Pipetboy PeqMate peqlab | PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, D |
| Pipetboy pipetus® | Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG Eberstadt, D |
| PowerPac™ HC High-Current Power Supply | Bio-Rad Laboratories S.r.l., Segrate (MI), IT |
| Precision balance M-pact AS623 | Sartorius AG, Göttingen, D |
| QIAcube/ QIAcube Connect | QIAGEN GmbH, Hilden, D |
| QuantStudio 12K Flex | applied biosystems by Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D |
| Sample Concentrator, SBHCONC/1 | stuart®, Stone, Staffordshire, UK |
| sartorius Präzisionswaage CPA225D | Sartorius, Göttingen, D |
| Standard-Wipptisch WT15, 230 V | Biometra GmbH, Göttingen, D |
| T100™ Thermal Cycler | Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, D |
| Tecan infinite M200 Microplate Reader | Tecan Group Ltd., Männedorf, CH |
| Thermo Scientific™ Variomag Maxi Direct Rührer | Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D |
| Thermo Scientific™ Safe 2020 Sicherheitswerkbank | Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D |
| ThermoCell MixingBlock MB-102 | Hangzhou Bioer Technology Co. Ltd., Hangzhou, CN |
| Thermo-Shaker HC24 PCMT, Grant-bio | Grant Instruments™ PCMT, Shepreth, Cambridge, SG8 6GB, UK |
| Tischabzug Scala | WALDNER Laboreinrichtungen GmbH & Co. KG, Wangen, D |
| Vacuspip, Bench-top aspiration system | Integra Biosciences GmbH, Biebertal, D |
| Variomag™ maxi, magnetic stirrer | Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D |
| Veriti™ 96 Well Fast Thermal Cycler | Applied Biosystems® Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D |
| VM20 Vacuum Manifold | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D |
| Vortex mixer | VWR International GmbH, Darmstadt, D |
| VWB 12 – Wasserbad | VWR International GmbH, Darmstadt, D |
| VWR Standard Analog Shaker | VWR International GmbH, Darmstadt, D |
| Wallac 1409 Liquid Scintillation Counter | LKB-Wallac, Mt Waverley, Victoria, 3149 AU |
| Water Bath AQUAline AL25 | Lauda, Lauda-Königshofen, D |
| Zeiss Axio Observer Z.1 | Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, D |

8.1.8 Software und Datenbanken

| Software | Hersteller |
|--|---|
| ApE-A plasmid Editor v. 2.0.61 | M. Wayne Davis |
| Applied Biosystems Sequencing Analysis Version 5.2 | Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D |
| Citavi 6 | Swiss Academic Software GmbH, Wädenswil, CH |
| clone manager 9 | Sci Ed Software LLC |
| Gap 5 | Staden Package, James K. Bonfield <i>et al.</i> , http://staden.sourceforge.net/ |
| GraphPad Prism 8 für Windows | GraphPad Software, San Diego, CA, USA) |
| KODAK Imaging Software | Eastman Kodak Company NY 14650, US |
| NanoDrop 1000 Operating Software, version 3.8.1 | Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D |
| Needleman-Wunsch Global Align Nucleotide Sequences: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch&PROG_DEF=blastn&BLAST_PROG_DEF=blastn&BLAST_SPEC=GlobalAlign&LINK_LOC=BlastHomeLink | NCBI, National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA |
| QuantStudio™ 12k Flex Software | applied biosystems by Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D |
| SnapGene | GSL Biotech LLC |
| Tecan i-control version 3.8.2.0 | Tecan Group Ltd., Männedorf, CH |
| The Sequence Manipulation Suite, Reverse complement: https://www.bioinformatics.org/sms/rev_com_p.html | Paul Stothard |
| Zen 2010 Version 6.0 | Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, D |

8.1.9 Verbrauchsmaterial

| Verbrauchsmaterial | Hersteller |
|--|--|
| 0.2 ml Micro-Strips & Caps | ABgene® House by Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D |
| 96 Well ELISA Microplates, PS, F-bottom | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D |
| 96 Well Microplates, F-bottom, µClear®, schwarz, STERIL, 10 ST./BTL | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D |
| 96-Well PCR Plate, non-skirted, Low- profile, natural | STARLAB INTERNATIONAL GmbH, Hamburg, D |
| Casycups | OLS OMNI Life Science, Bremen, D |
| Cell Culture Flask, T25 | Eppendorf AG, Hamburg, D |
| Cell Culture Flask, T25 | Sarstedt Aktiengesellschaft & Co., Nümbrecht, D |
| Cell Culture Flask, T75 | Eppendorf AG, Hamburg, D |
| Countess™ Cell counting chamber slide | Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D |
| Cryo.s™, 2ml, PP, Runder Boden, Außengewinde, Steril | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D |

| | |
|--|---|
| CytoOne Multiwell Plate with Lid 12 Well | STARLAB INTERNATIONAL GmbH, Hamburg, D |
| CytoOne Multiwell Plate with Lid 6 Well | STARLAB INTERNATIONAL GmbH, Hamburg, D |
| Disposable Glass Pasteur Pipettes 150 mm | VWR International GmbH, Darmstadt, D |
| Electroporation cuvette 2 mm | VWR International GmbH, Darmstadt, D |
| Eppendorf Combitips advanced®, Biopur®, 10 ml, orange | Eppendorf AG, Hamburg, D |
| epT.I.P.S.® Standard 50-1000 µl | Eppendorf AG, Hamburg, D |
| Falcon MULTIWELL™ 24 Well | Becton Dickinson Labware, Le Point De Claix, F |
| Falcon® High Clarity Polypropylene Conical Tube 50 ml | Falcon® Corning GmbH, Kaiserslautern, D |
| Filter pipette tip, sterile (10, 100 and 1000 µl) | Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, D |
| Filter-Tips 1000 µl, B 4x32 | QIAGEN GmbH, Hilden, D |
| Filter-Tips 1000 µl, wide bore, B 4x32 | QIAGEN GmbH, Hilden, D |
| Flat 8 Cap Strips | Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D |
| High Clarity Polypropylene 15ml Conical Tube 15 ml | Falcon® Corning GmbH, Kaiserslautern, D |
| Laborglasflasche Duran® 500 ml | DWK Life Sciences GmbH, Wertheim/Main, D |
| MF-Millipore™ 0.025 µm MCE Membrane | Merck KGaA, Darmstadt, D |
| Micro tube 2 ml with cap (not skirted) | sarstedt Aktiengesellschaft & Co., Nümbrecht, D |
| MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Olate with Barcode (0.1 ml) | applied biosystems by Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D |
| MicroAmp™ Fast 8-Tube Strip, 0.1 ml | applied biosystems® by life technologies™, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D |
| Mikroeinsatz, N 9 N 10 N 11, 6,0x31,0 mm, 0,2 ml, konisch, 15 mm Spitze, klar | Machery-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, D |
| MultiScreen® Column Loader 45UL | Merck KGaA, Darmstadt, D |
| MultiScreen-HV, 96-Well Plates, 0,45 µm, hydrophilic, low protein binding | Merck KGaA, Darmstadt, D |
| PARAFILM® M ALL-PURPOSE LABORATORY FILM | Bemis Corporate, Neenah, WI 54956, US |
| Petrischale 92x16 mm ohne Nock. | Sarstedt Aktiengesellschaft & Co., Nümbrecht, D |
| Pipettenspitze 250 µl, farblos | Sarstedt Aktiengesellschaft & Co., Nümbrecht, D |
| Rattler Plating Beads (4,5 mm) sterile | Zymo Research Europe GmbH, Freiburg, D |
| Reagiergefäß 0,5 ml, PP | Sarstedt Aktiengesellschaft & Co., Nümbrecht, D |
| Reagiergefäß 1,5 ml | Sarstedt Aktiengesellschaft & Co., Nümbrecht, D |
| SafeSeal Surphob Spitzen, extra lang, steril, Filterspitzen (10, 100, 1000 µl) | Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, D |
| SeafeSeal Reagiergefäß 2 ml, PP | Sarstedt Aktiengesellschaft & Co., Nümbrecht, D |
| Serologische Pipette 10 ml | Sarstedt Aktiengesellschaft & Co., Nümbrecht, D |
| Serologische Pipette steril (2,5, 10, 25 ml) | Sarstedt Aktiengesellschaft & Co., Nümbrecht, D |

| | |
|--|---|
| SuperFrost® Plus Objektträger | R. Langenbrinck GmbH Labor- u. Medizintechnik, Emmendingen, D |
| TC-Flasche T75, Stand., Bel. Ka. | Sarstedt Aktiengesellschaft & Co., Nümbrecht, D |
| Tissue Culture Dish | Falcon® Corning GmbH, Kaiserslautern, D |
| WICOM 11mm CRIMPSNAP-Vials (R), klar, 1. hydrolytische Klasse Glas, 2 ml Volumen | Wicom, Heppenheim, Germany |
| WICOM PP Schnappkappe, klar, für 11 mm Snap/Crimp-Vials mit PTFE/Silikon-Septum | Wicom, Heppenheim, Germany |

8.2 Weitere Ergebnisse

8.2.1 pcDNA5/FRT::OATP1A2 (Variante 1): Validierung und Umklonierung

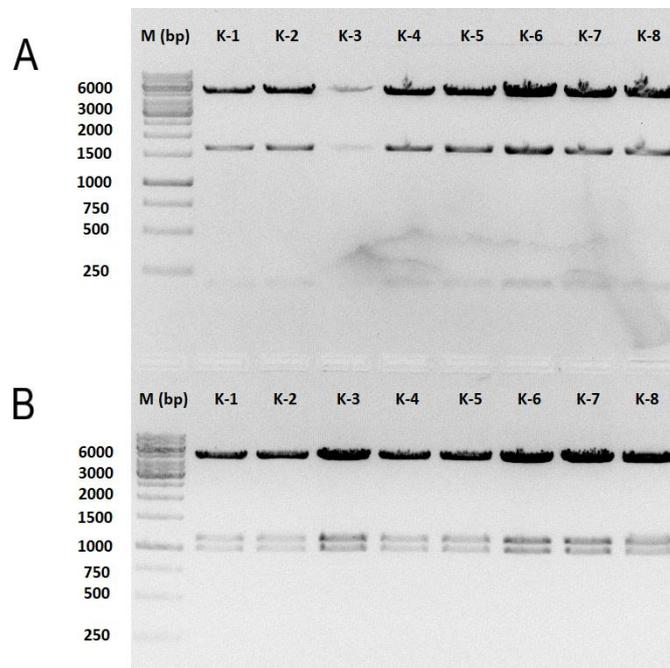


Abbildung 40: Kontrollverdau pcDNA5/FRT::OATP1A2 (Variante 1) aus verschiedenen *E. coli*-Klonen (K 1-8). Nachweis des korrekten Plasmidaufbaus. A: HindIII (erwartete Sequenzen: 5219 bp, 1644 bp, 189 bp); B: EcoRI (erwartete Sequenzen: 4901 bp, 1151 bp, 1000 bp)

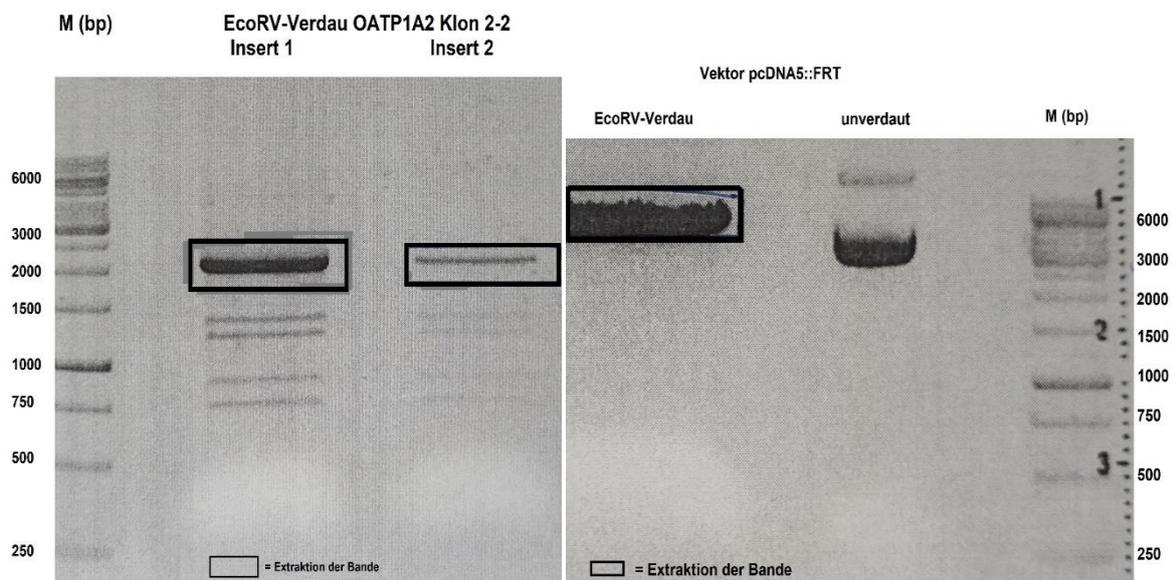


Abbildung 41: EcoRV-Verdau: Genabschnitt OATP1A2 & Vektor pcDNA5/FRT

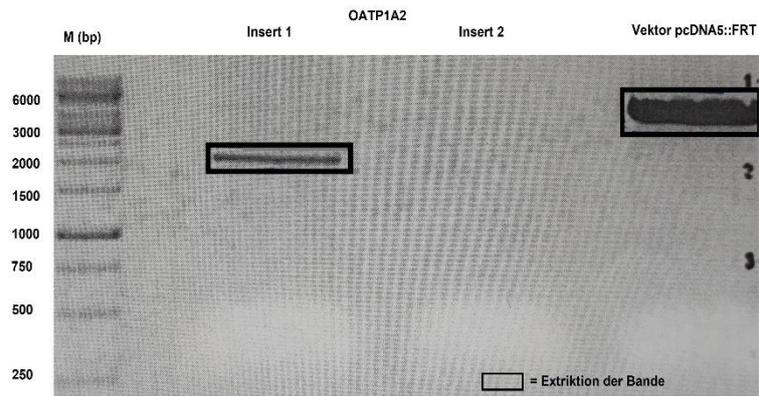


Abbildung 42: KpnI-Verdau: Genabschnitt OATP1A2 & Vektor pcDNA5/FRT

8.2.2 Funktionskontrolle nach stabiler Transfektion von Variante 3

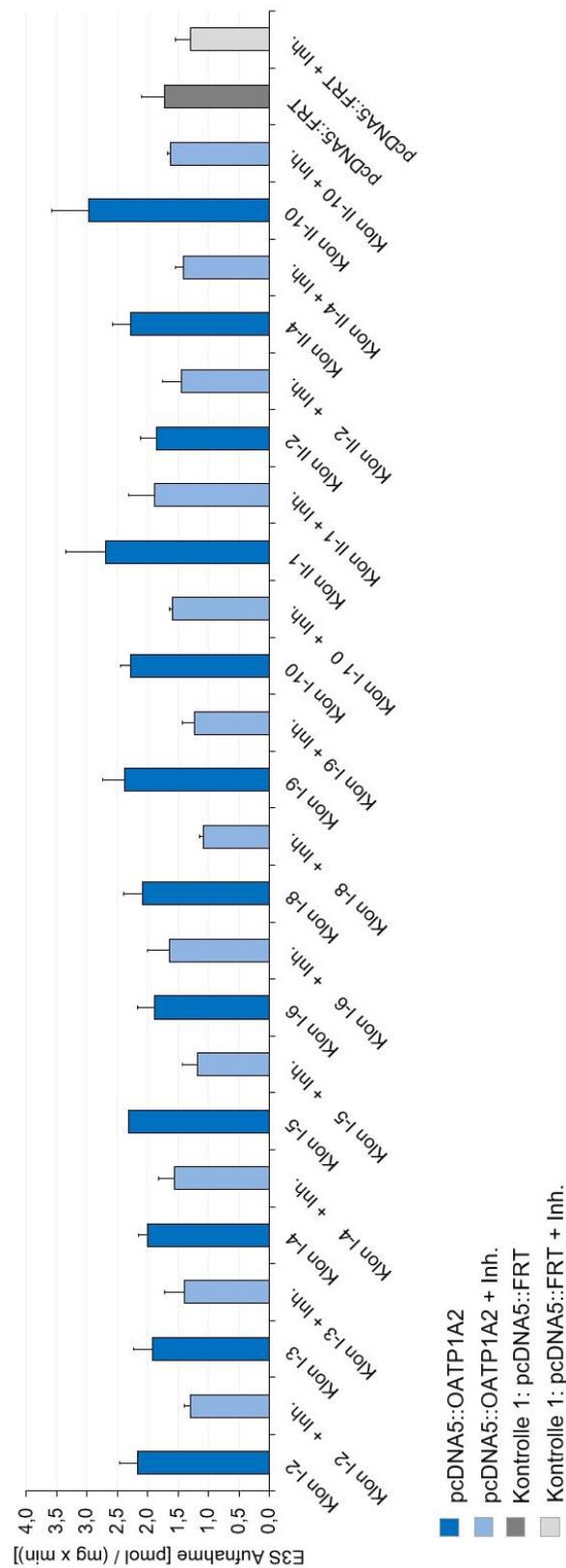


Abbildung 43: Funktionskontrolle weiterer Klone nach stabiler Transfektion von pcDNA5/FRT::OATP1A2 (Variante 3) in T-REx-293. Inh.: 500 μ M Naringin (n = 2; MW \pm SD)

8.2.3 Immunfluoreszenz weiterer Klone stabil transfizierter T-REx™-pcDNA5/FRT::OATP1A2

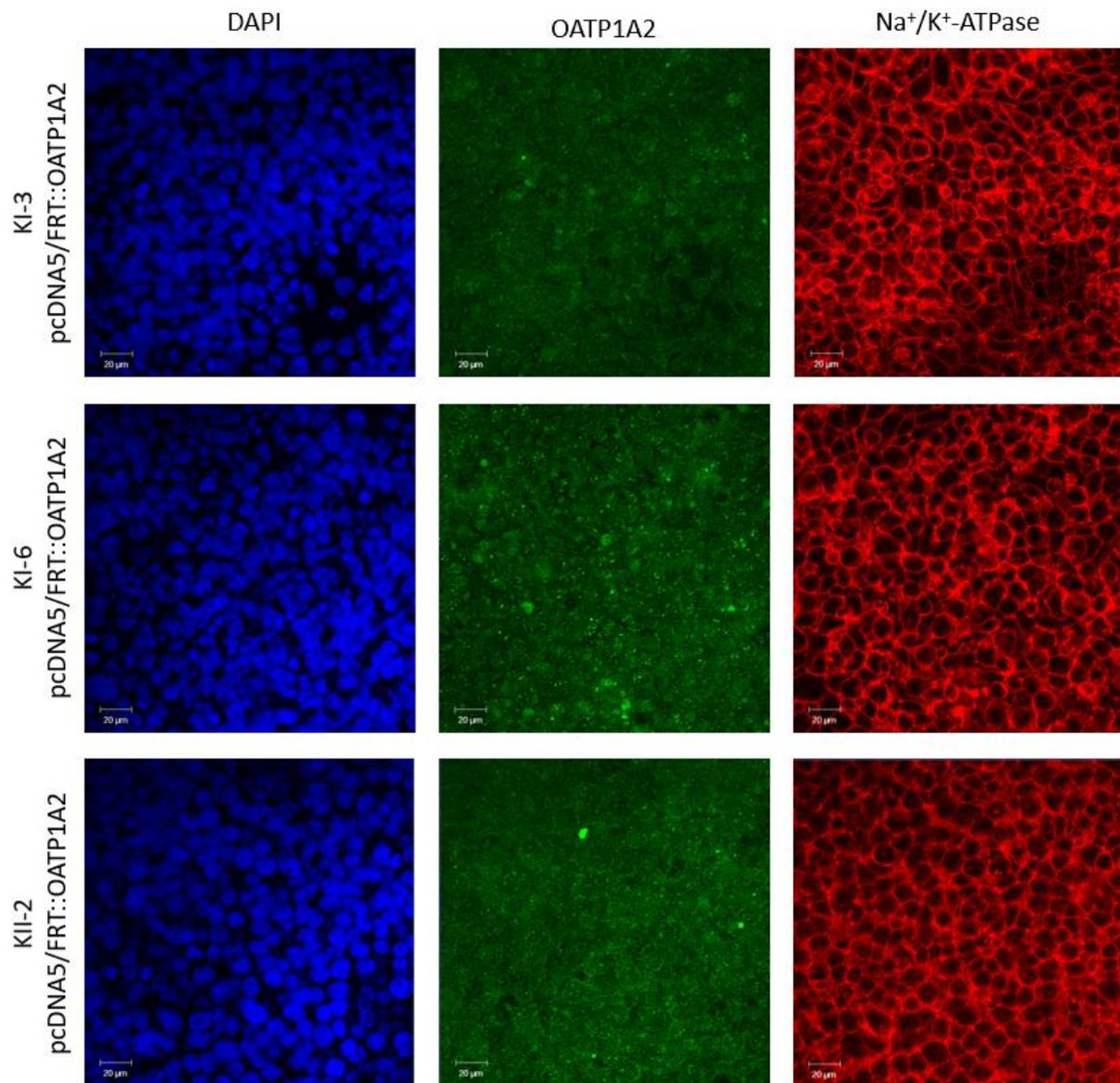


Abbildung 44: Immunfluoreszenz weiterer Klone der stabil transfizierten T-REx™-pcDNA5/FRT::OATP1A2. Blau: DAPI, Grün: OATP1A2-Färbung, Rot: Na⁺/K⁺-ATPase, 40-fache Vergrößerung

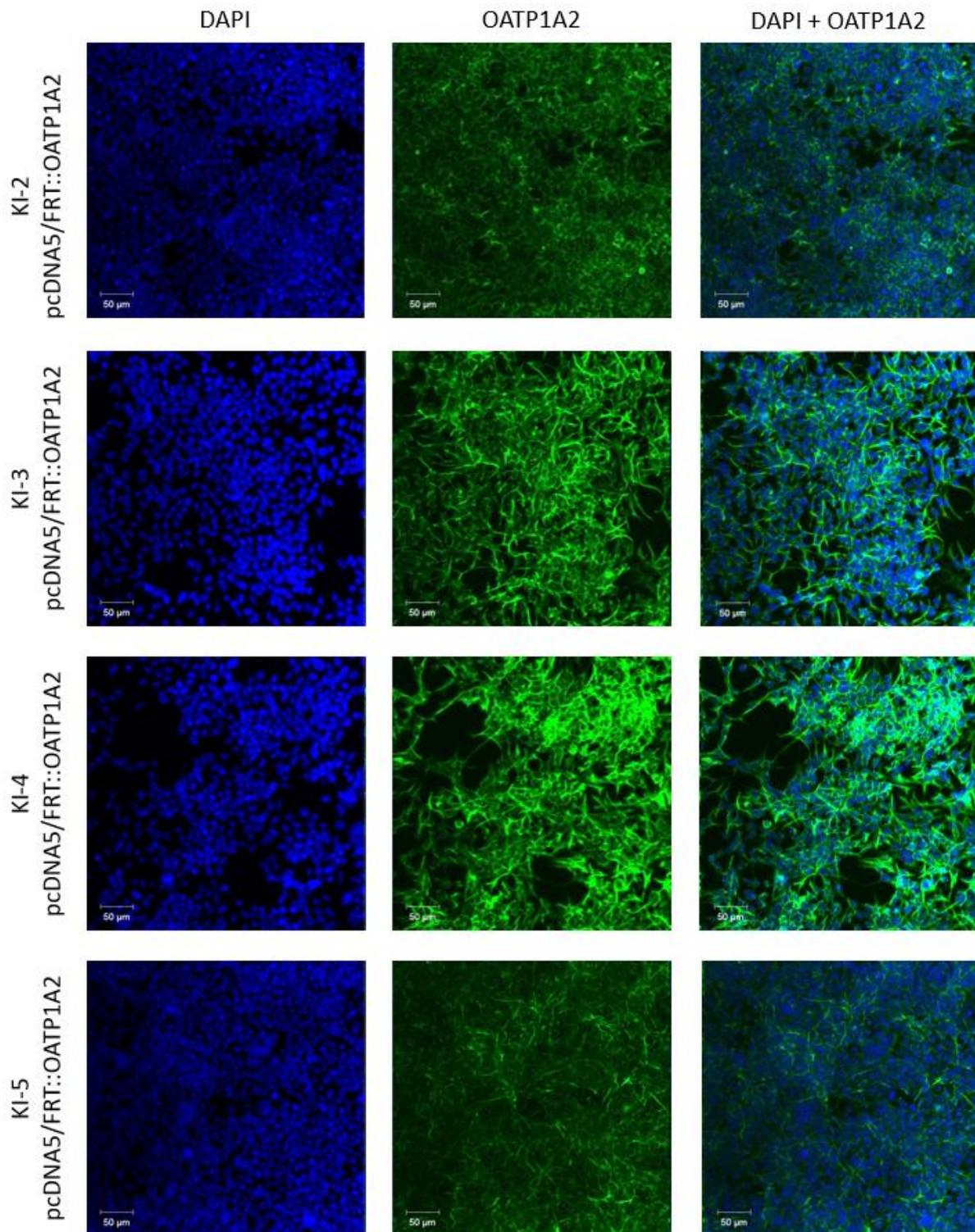


Abbildung 45: Immunfluoreszenz weiterer Klone der stabil transfizierten T-REx™-pcDNA5/FRT::OATP1A2. Blau: DAPI, Grün: OATP1A2-Färbung, 40-fache Vergrößerung

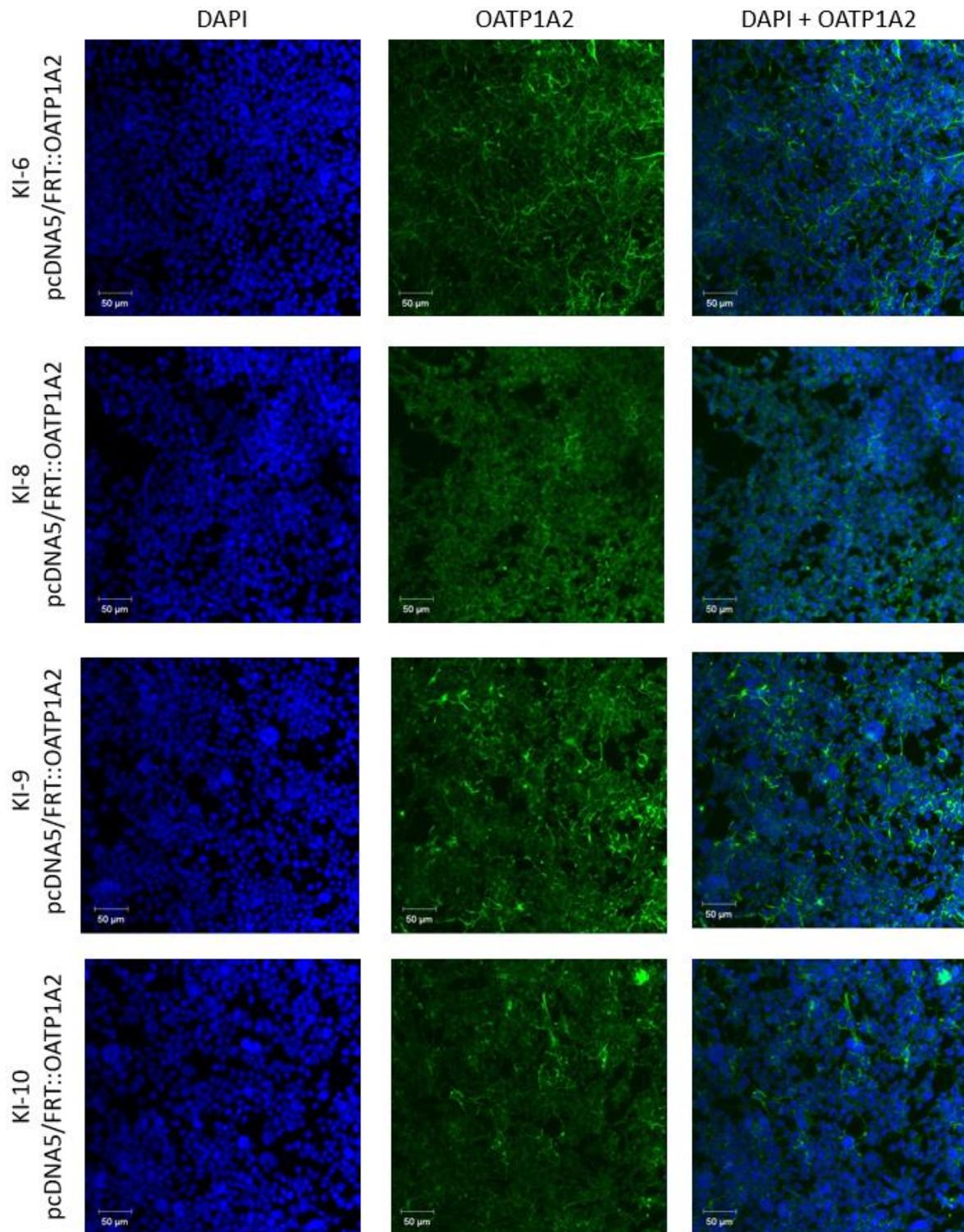


Abbildung 46: Immunfluoreszenz weiterer Klone der stabil transfizierten T-REx™-pcDNA5/FRT::OATP1A2. Blau: DAPI, Grün: OATP1A2-Färbung, 40-fache Vergrößerung

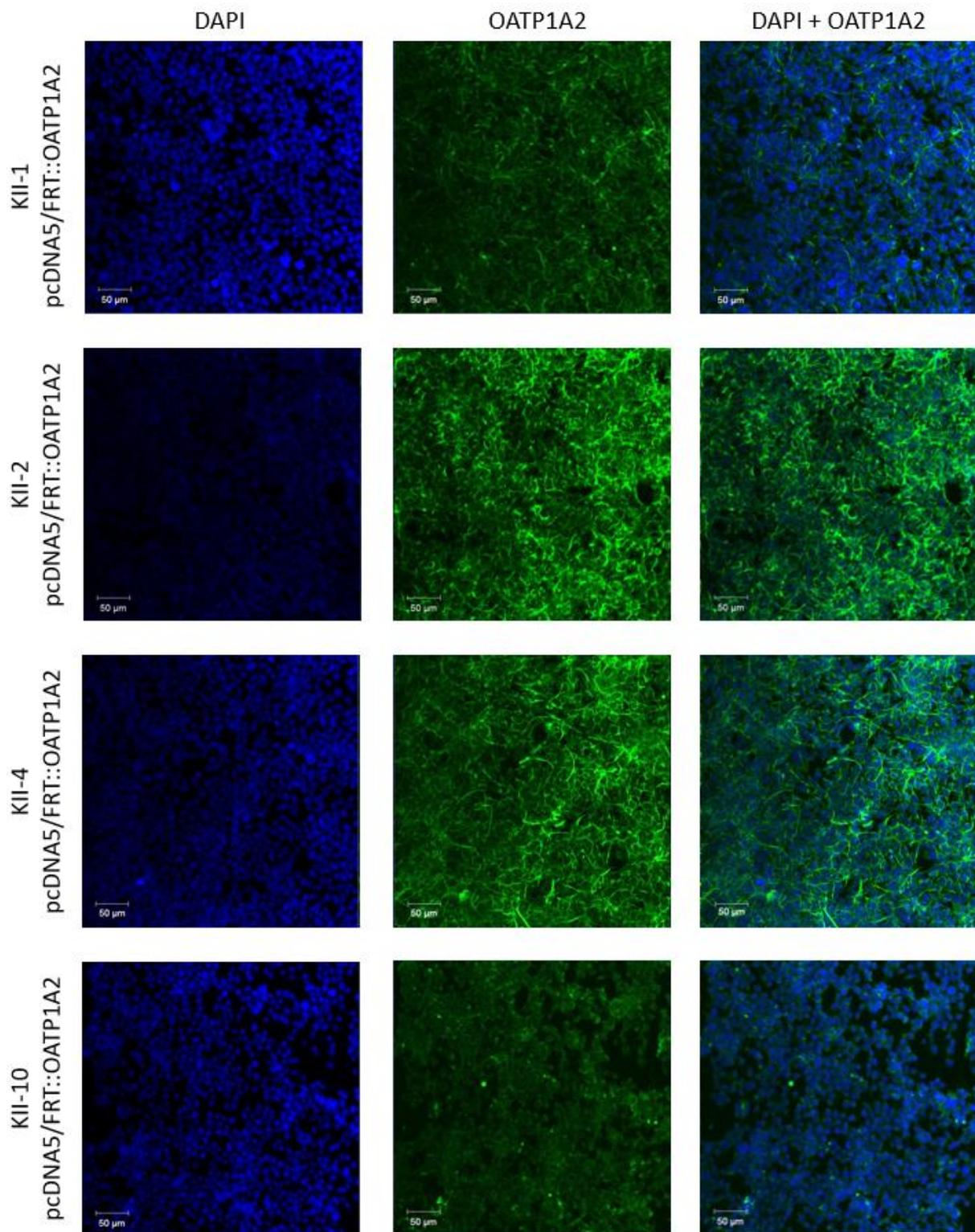


Abbildung 47: Immunfluoreszenz weiterer Klone der stabil transfizierten T-REx™-pcDNA5/FRT::OATP1A2. Blau: DAPI, Grün: OATP1A2-Färbung, 40-fache Vergrößerung

8.2.4 Sequenzierungen pcDNA5/FRT::OATP1A2 (Variante 3) in T-REx™-293

Nachfolgend werden Ausschnitte der erarbeiteten Sequenzierungsergebnisse für pcDNA5/FRT::OATP1A2 Variante 3 aufgeführt, welches in T-REx™-293 stabil transfiziert wurde.

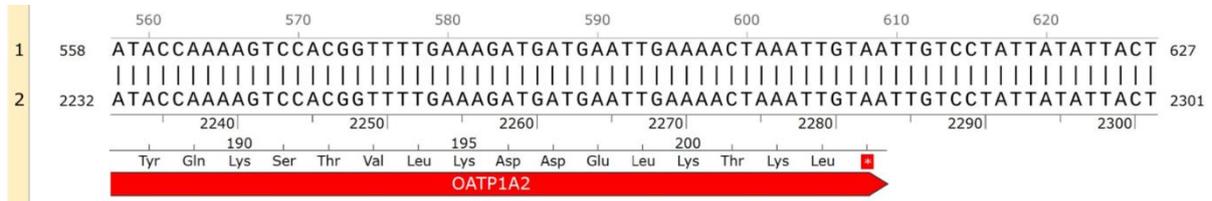


Abbildung 48: 1. Sequenzierung T-REx™-pcDNA5/FRT::OATP1A2 (Variante 3) Klon I-6 mit dem Primer OATP1A2 5_for: 1) Klon DNA, 2) Referenzsequenz NM_021094.4

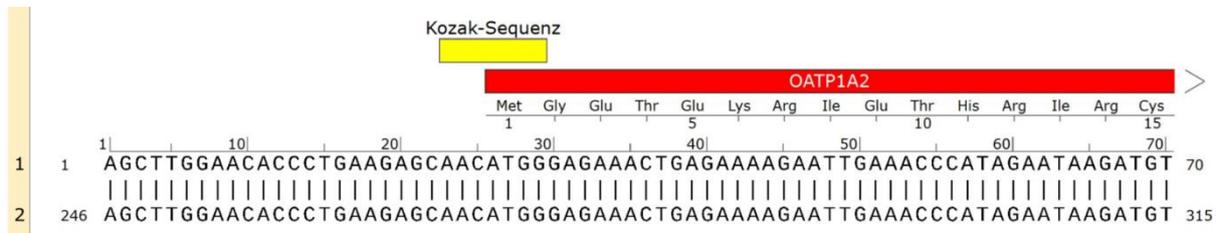


Abbildung 49: 2. Sequenzierung T-REx™-pcDNA5/FRT::OATP1A2 (Variante 3) Klon II-10 mit dem Primer pcDNA5_for: 1) Klon DNA, 2) Referenzsequenz NM_021094.4

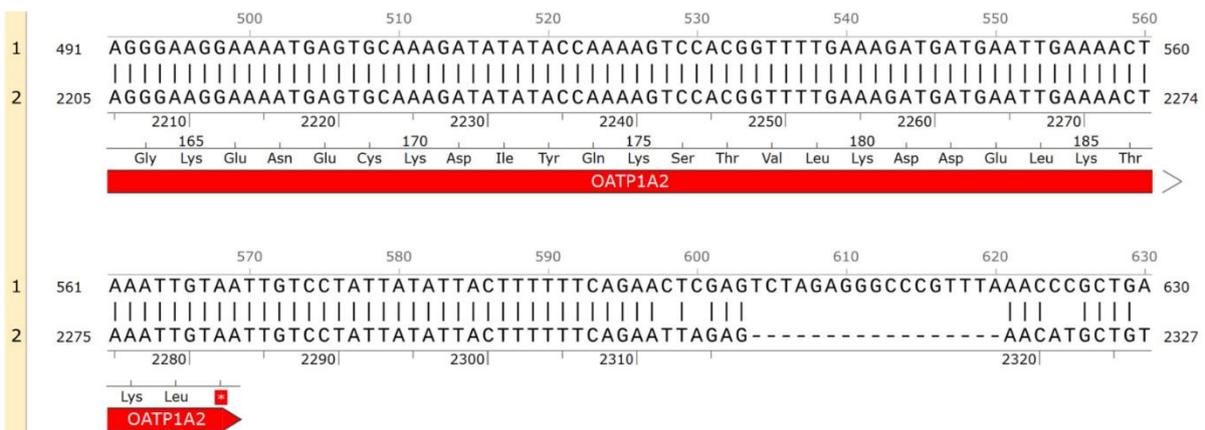


Abbildung 50: 3. Sequenzierung T-REx™-pcDNA5/FRT::OATP1A2 (Variante 3) Klon II-10 mit Primer OATP1A2 5_for: 1) Klon DNA, 2) Referenzsequenz NM_021094.4, Sequenzierungsungenauigkeiten am Ende



Abbildung 51: 4. Sequenzierung T-Rex™-pcDNA5/FRT::OATP1A2 (Variante 3) Klon II-10 mit Primer OATP1A2_1_rev: 1) Klon DNA, 2) pcDNA5/FRT

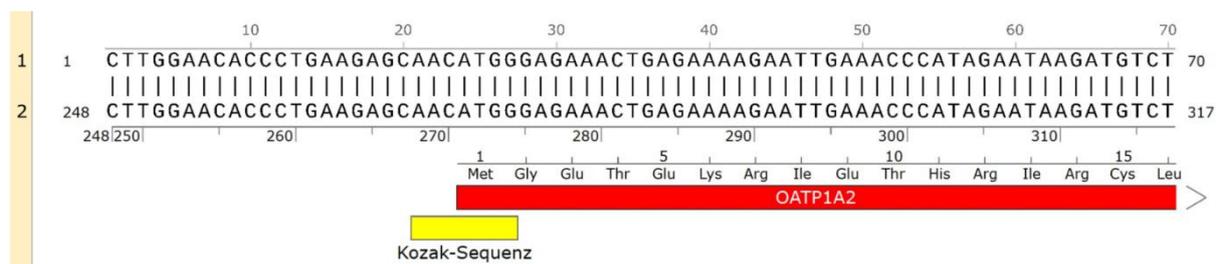


Abbildung 52: 1. Sequenzierung Plasmid pcDNA5/FRT::OATP1A2 (Variante 3) mit Primer pcDNA5_for: 1) pcDNA5/FRT::OATP1A2, 2) Referenzsequenz NM_021094.4

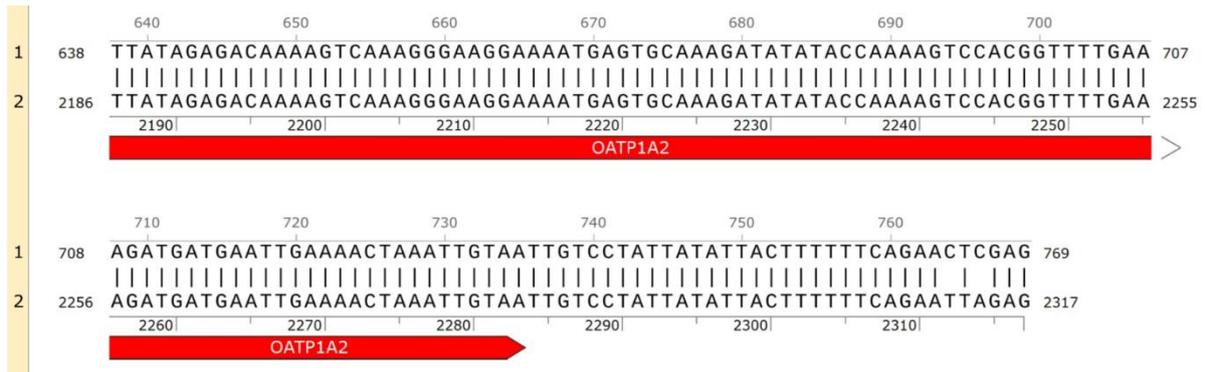
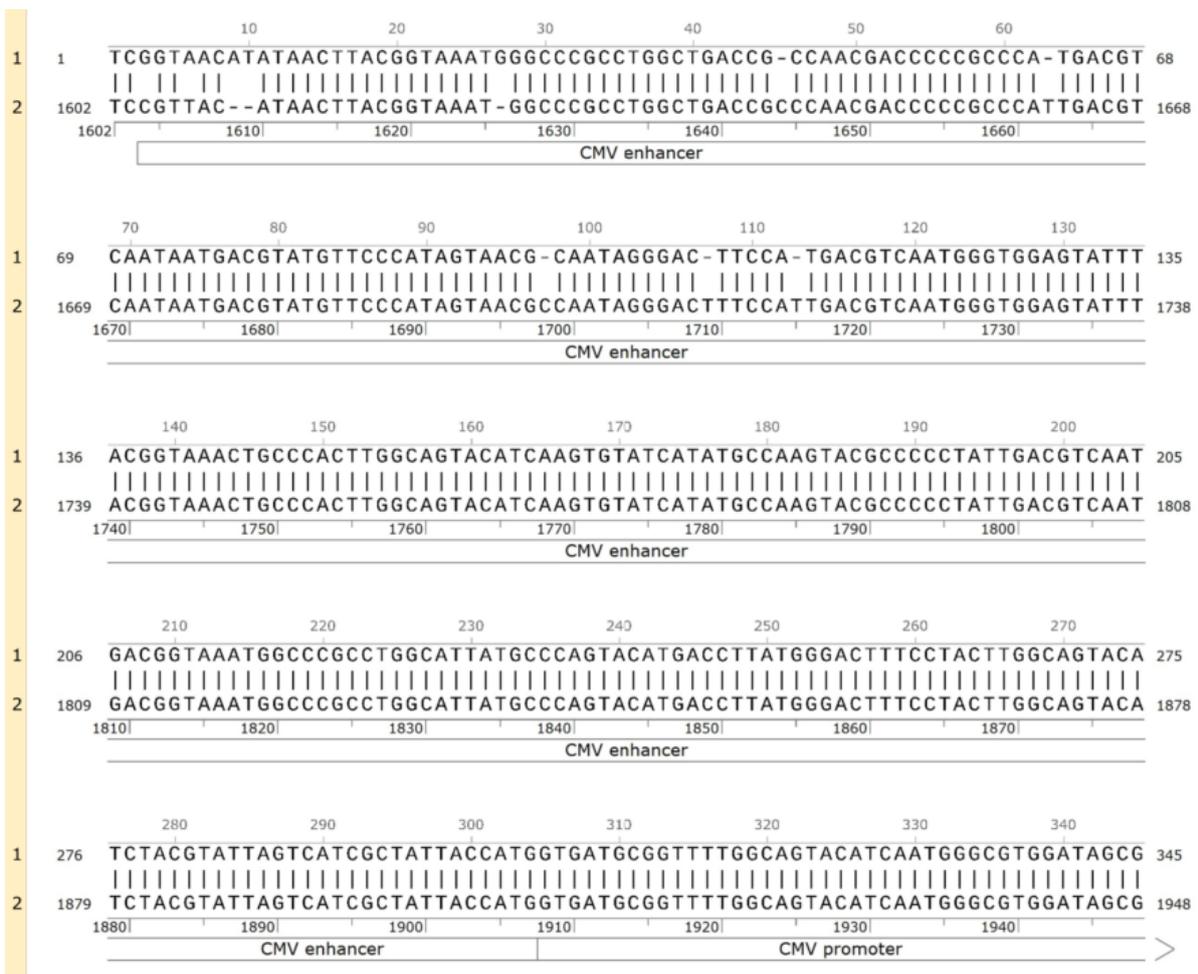


Abbildung 53: 2. Sequenzierung Plasmid pcDNA5/FRT::OATP1A2 (Variante 3) mit Primer pcDNA5_rev: 1) pcDNA5/FRT::OATP1A2, 2) Referenzsequenz NM_021094.4

8.2.5 Sequenzierungen pQXCIN::OATP1A2

Im Folgenden werden Ausschnitte der erarbeiteten Sequenzierungsergebnisse für pQXCIN::OATP1A2 dargestellt.



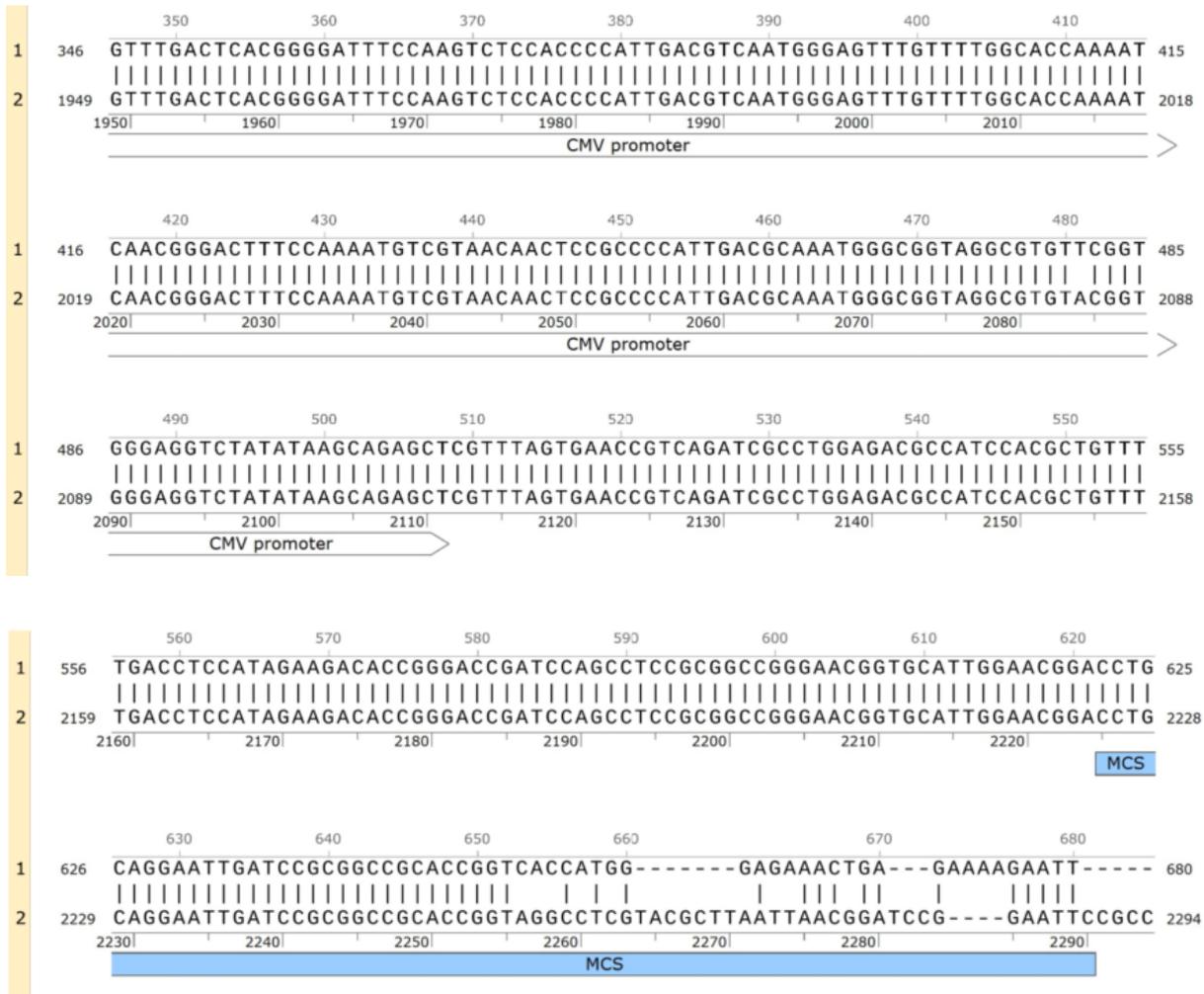


Abbildung 54: 1. Sequenzierung Plasmid pQCXIN::OATP1A2 mit Primer OATP1A2_1_rev: 1) pQCXIN-OATP1A2, 2) pQCXIN

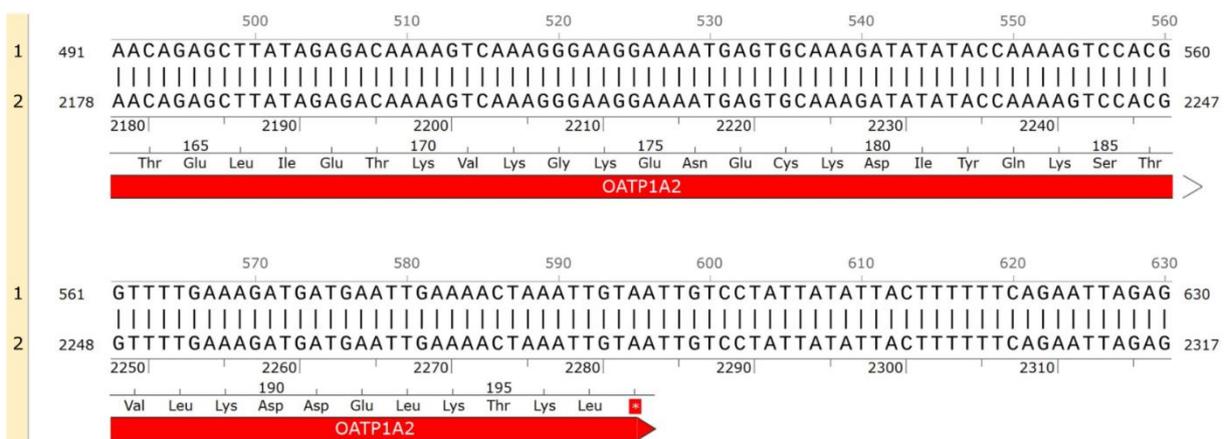


Abbildung 55: 2. Sequenzierung Plasmid pQCXIN::OATP1A2 mit Primer OATP1A2 5_for: 1) pQCXIN-OATP1A2, 2) Referenzsequenz NM_021094.4

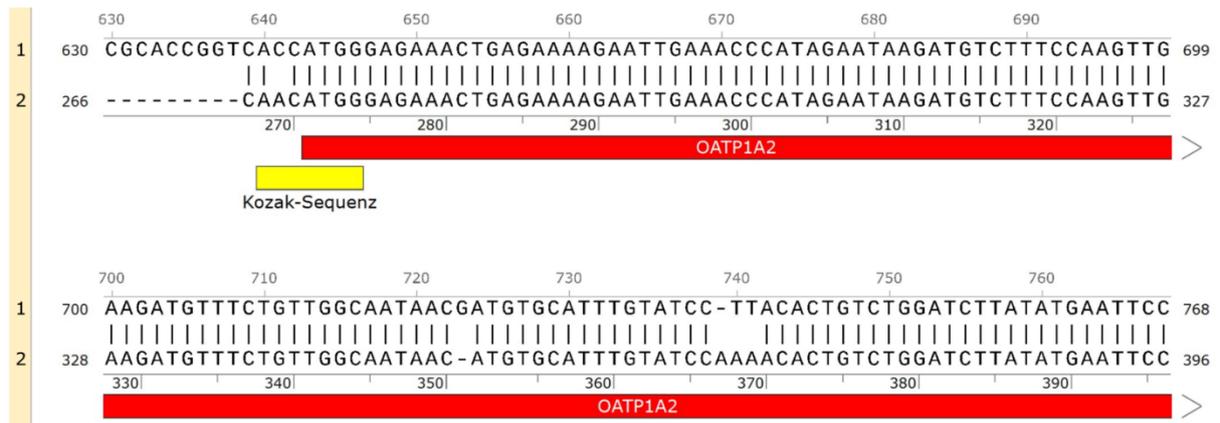


Abbildung 56: 3. Sequenzierung Plasmid pQCXIN::OATP1A2 mit Primer OATP1A2_1_rev: 1) pQCXIN-OATP1A2, 2) Referenzsequenz NM_021094.4, enthält Sequenzierungsungenauigkeiten

8.2.6 Vergleich pQCXIN und pcDNA5/FRT

Tabelle 44: Vergleich der Eigenschaften von pQCXIN und pcDNA5/FRT

| Eigenschaft | Funktion | pQCXIN [65,67,80] | pcDNA5/FRT [78,79] |
|---|---|--|--------------------------------------|
| Größe [bp] | | 7400 | 5070 |
| 5' LTR (5' long terminal repeat des monoklonalen murine sarcoma virus) | Repetitive Sequenzabschnitte aus dem Retrovirus MSV [81] | 1-728 enthält CMV/MSV Promotor | |
| CMV/MSV Hybridpromotor | Viraler Promotor kombiniert aus Zytomegalie-Virus und murine sarcoma virus | 1-511 | |
| MMLV Psi (Ψ^+ , extended packaging signal des monoklonalen murine leukemia virus) | Verpackungssignal für die RNA-Verpackung aus dem murinen γ -Retrovirus (MLV) [81] | 758-1567 | |
| gag (truncated) | Abgeschnittenes MMLV-Glycosaminoglykan-Gen, dem das Startcodon fehlt, für die Partikelbildung erforderliches Gen; in pQCXIN funktionslos [67] | 1151-1567 | |
| PCMV (CMV Promoter) | Viraler Promotor aus dem Zytomegalie-Virus; ermöglicht in der S-Phase des Zellzyklus eine Initiation der Transkription [64] | Enhancer 1604-1907 Promoter 1908-2111 | Enhancer 335-614 Promoter 615-818 |
| T7 Promotor | Bewirkt Transkription in vitro in Sense-Orientierung und Sequenzierung durch das Insert [78] | | 863-882 |
| MCS (multiple cloning site) | Enthält Erkennungssequenzen vieler Restriktionsenzyme für die Integration des Gens von Interesse [82] | 2242-2290 | 895-1010 |

| Eigenschaft | Funktion | pQCXIN [65,67,80] | pcDNA5/FRT [78,79] |
|--|---|--|--|
| bGH (Bovine growth hormone) Poly(A) Signal | Terminationssequenz am 3'-Ende der mRNA für Proteinexpression in eukaryotischen Zellen, Polyadenylierung erfolgt nach Transkription [78] | | 1028-1252 |
| FLP Recombination Target (FRT) site (direkt vor Hygromycin-Resistenzgen) | Rekombination über Flp-Sequenz in 8-bp Kernsequenz: TCTAGAAA [83] | | 1536-1583 |
| Hygromycin Resistenzgen | Ermöglicht die Selektion stabiler transgener Klone; ohne Promotor/ATG SV40 Promotor + ATG sind in T-REx Zelle; [78] Produkt: Aminoglycosid-Phosphotransferase von <i>E. coli</i> | | 1591-2611 |
| IRES (internal ribosome entry site) vom Enzephalomyokarditis-Virus (EMCV) | Initiiert Cap-unabhängige Translation, nur ein Promotor notwendig [77] | 2292–2881 | |
| NeoR (Neomycin Resistenzgen) | Neomycin-, Kanamycin-, Geneticin- Resistenz | 2895–3689 | |
| 3'LTR (selbst-inaktivierende 3' long terminal repeat des murine sarcoma virus) | Repetitive Sequenzabschnitte aus dem Retrovirus MSV [81] | 4087-4512 enthält PolyA-Signal: 4415-4420 | |
| SV40 Promoter | Initiation der Transkription | 4792–5059 | In Flp-In™ Zelle enthalten: vor Integration Initiation der Expression des lacZ-Zeocin™-Resistenzgens + β-Galactosidase-aktivität; nach Integration des Plasmids Initiation der Expression des Hygromycin-Resistenzgens |
| SV40 Ori | Initiiert die Replikation [67] | 5013–5078 | in Flp-In™ Wirtszelle |

| Eigenschaft | Funktion | pQCXIN [65,67,80] | pcDNA5/FRT [78,79] |
|--|---|-------------------|--------------------|
| SV40 early poly(A) Signal | Terminationssequenz am 3'-Ende der mRNA, ermöglicht das Beenden der Transkription und Polyadenylierung [78] | | 2743-2873 |
| Ori (high-copy-number ColE1/pMB1/pBR322/pUC origin of replication) | Bewirkt eine hohe Kopienzahl bei der Replikation sowie Wachstum in E. coli [78] | 5419-6007 | 3256-3929 |
| AmpR (Ampicillin Resistenzgen) | Produkt: β -Lactamase → Ampicillin-Resistenz zur Selektion von Bakterien, die das Plasmid nach der Transformation aufgenommen haben [82] | 6178-7038 | 4074-4934 |
| AmpR Promoter | ermöglicht Expression von AmpR [78] | 7039-7143 | 4935-5039 |
| CMV Enhancer | Bindungsort von Transkriptionsfaktoren im erweiterten Promotorbereich, Stimuliert die Transkription [82] | 7329-308 | |