



Aus der Abteilung für klinische Pharmakologie  
(Leitung: Prof. Dr. med. Stefan Engeli / Prof. Dr. rer. nat. Mladen Tzvetkov)  
des Institutes für Pharmakologie  
der Universitätsmedizin der Universität Greifswald  
unter Anleitung von Prof. Dr. rer. nat. Stefan Oswald

**Charakterisierung der Expression, Lokalisation und Funktion  
des Aufnahmetransporters *organic cation transporter 1* (OCT1)  
im menschlichen Darm**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktorin der Medizin  
(Dr. med.)

der Universitätsmedizin  
der Universität Greifswald

2022

vorgelegt von

**Joana Werner**

geboren am 05. Mai 1992 in Bremerhaven

**Dekan:** Prof. Dr. med. Karlhans Endlich

**1. Gutachter:** Prof. Dr. rer. nat. Stefan Oswald

**2. Gutachter:** Prof. Dr. rer. nat. Giuliano Ciarimboli

**Ort / Raum:** Greifswald, Ferdinand-Sauerbruch-Str. 1, DZ7, Raum 4.2.22-J 02.16

**Tag der Disputation:** 14. November 2022

*Für Frank*

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>INHALTSVERZEICHNIS.....</b>	<b>I</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>III</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>V</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>VI</b>
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Hintergrund.....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Die ABC-Transporter .....	2
1.1.2 Die SLC-Transporter .....	3
1.1.3 Der organische Kationentransporter 1 (OCT1).....	3
<b>2 AUFGABENSTELLUNG .....</b>	<b>7</b>
<b>2.1 Zielsetzung .....</b>	<b>7</b>
<b>3 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>9</b>
<b>3.1 Material.....</b>	<b>9</b>
<b>3.2 Zellbiologische Untersuchungen .....</b>	<b>9</b>
3.2.1 Zellkultivierung .....	10
3.2.2 Immunfluoreszenzfärbung .....	11
3.2.3 Transwellassay.....	13
<b>3.3 Ussing-Kammer .....</b>	<b>16</b>
3.3.1 Versuchsaufbau .....	16
3.3.2 Präparation des Gewebes .....	19
3.3.3 Versuchsvorbereitung.....	19
3.3.4 Versuchsdurchführung.....	20
<b>3.4 Analytische Methoden .....</b>	<b>21</b>
3.4.1 Liquid-Chromatographie-Massenspektrometrie.....	21
<b>3.5 Statistische Auswertungen.....</b>	<b>21</b>
<b>4 ERGEBNISSE .....</b>	<b>22</b>
<b>4.1 Untersuchungen mittels konfokaler Lasermikroskopie.....</b>	<b>22</b>
<b>4.2 Untersuchung des vektoriiellen Transportes im Transwellassay.....</b>	<b>23</b>
<b>4.3 Untersuchung des vektoriiellen Transportes in der Ussing-Kammer .....</b>	<b>26</b>
<b>5 DISKUSSION .....</b>	<b>29</b>
<b>6 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK .....</b>	<b>36</b>
<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>VII</b>

**ANHANG..... XV**

**a) Laborgeräte, Verbrauchsmaterialien und kommerzielle Kits ..... XV**

**b) Chemikalien .....XVII**

**c) Puffer ..... XIX**

**d) Zellkultivierung ..... XX**

**e) Weitere Ergebnisse ..... XXI**

# ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<b>Abb. 1:</b> Schematische Darstellung des intestinalen Epithels .....	<b>1</b>
<b>Abb. 2:</b> Übersicht über die Einteilung der Membrantransportproteine.....	<b>2</b>
<b>Abb. 3:</b> Schematische Darstellung der Sekundärstruktur der <i>organic cation transporter</i> .....	<b>4</b>
<b>Abb. 4:</b> Schematische Darstellung einer doppelt stabil transfizierten MDCKII-Zelle .....	<b>9</b>
<b>Abb. 5:</b> Prinzip der indirekten Immunfluoreszenzfärbung.....	<b>12</b>
<b>Abb. 6:</b> Prinzip der direkten Immunfluoreszenzfärbung.....	<b>13</b>
<b>Abb. 7:</b> Prinzip eines Transwellassays zur Untersuchung des transzellulären Transportes .....	<b>15</b>
<b>Abb. 8:</b> Schematische Darstellung Versuchsaufbau Ussing-Kammer .....	<b>17</b>
<b>Abb. 9:</b> Exemplarische Darstellung der elektrischen Parameter (humanes Gewebe) ...	<b>18</b>
<b>Abb. 10:</b> Schematische Übersicht über die Schichten der Darmwand .....	<b>19</b>
<b>Abb. 11:</b> Immunfluoreszenzfärbung von Caco-2- und MDCKII-OCT1/P-gp-Zellen.....	<b>22</b>
<b>Abb. 12:</b> Relative Permeabilitätswerte und <i>Efflux Ratio</i> von Morphin im Transwellassay über MDCKII-Doppeltransfektanten.....	<b>23</b>
<b>Abb. 13:</b> Transwellassays des Transportes von Morphin über MDCKII-Zellen .....	<b>24</b>
<b>Abb. 14:</b> Relative Permeabilitätswerte und <i>Efflux Ratio</i> von Morphin im Transwellassay über Caco-2-Zellen.....	<b>24</b>
<b>Abb. 15:</b> Transwellassays des Transportes von Morphin über Caco-2-Zellen .....	<b>25</b>
<b>Abb. 16:</b> Exemplarische Darstellung der elektrischen Parameter (porcines Gewebe) ..	<b>26</b>
<b>Abb. 17:</b> Vektorieller Transport und resultierende <i>Efflux Ratio</i> von Morphin in der Ussing-Kammer (humanes Gewebe) .....	<b>27</b>
<b>Abb. 18:</b> Vektorieller Transport und resultierende <i>Efflux Ratio</i> von Morphin in der Ussing-Kammer (porcines Gewebe) .....	<b>28</b>
<b>Abb. 19:</b> Relative Permeabilitätswerte und <i>Efflux Ratio</i> von Morphin in der Ussing- Kammer.....	<b>28</b>
<b>Abb. 20:</b> Immunfluoreszenzfärbung von Caco-2-Zellen.....	<b>XXI</b>
<b>Abb. 21:</b> Immunfluoreszenzfärbung von MDCKII-OCT1/P-gp-Zellen .....	<b>XXII</b>
<b>Abb. 22:</b> Versuch A: Transwellassay des vektoriellen Transportes von Morphin über Caco-2-Zellen.....	<b>XXIII</b>

**Abb. 23:** Versuch B: Transwellassay des vektoriellen Transportes von Morphin über Caco-2-Zellen..... **XXIII**

**Abb. 24:** Versuch C: Transwellassay des vektoriellen Transportes von Morphin über Caco-2-Zellen..... **XXIV**

**Abb. 25:** Versuch A und B: Transwellassay des vektoriellen Transportes von Morphin über MDCKII-Zellen..... **XXIV**

**Abb. 26:** Versuch A: Vektorieller Transport, *Efflux Ratio* und zeitabhängiger Verlauf des Transportes von Morphin in der Ussing-Kammer (humanes Gewebe) ..... **XXV**

**Abb. 27:** Versuch B: Vektorieller Transport, *Efflux Ratio* und zeitabhängiger Verlauf des Transportes von Morphin in der Ussing-Kammer (humanes Gewebe) ..... **XXV**

**Abb. 28:** Versuch A: Vektorieller Transport, *Efflux Ratio* und zeitabhängiger Verlauf des Transportes von Morphin in der Ussing-Kammer (porcines Gewebe) ..... **XXVI**

**Abb. 29:** Versuch B: Vektorieller Transport, *Efflux Ratio* und zeitabhängiger Verlauf des Transportes von Morphin in der Ussing-Kammer (porcines Gewebe) ..... **XXVI**

# TABELLENVERZEICHNIS

<b>Tab. 1:</b> Organspezifische Verteilung der OCT-Isoformen.....	<b>5</b>
<b>Tab. 2:</b> Ausgewählte Substrate des <i>organic cation transporter 1</i> .....	<b>5</b>
<b>Tab. 3:</b> Medium für Caco-2-Zellen .....	<b>10</b>
<b>Tab. 4:</b> Medium für MDCKII-Zellen .....	<b>10</b>
<b>Tab. 5:</b> Selektionsantibiotika für stabil transfizierte Zellen.....	<b>11</b>
<b>Tab. 6:</b> Verwendeter Verdünnungsfaktor .....	<b>14</b>
<b>Tab. 7:</b> Verwendeter Volumenfaktor .....	<b>15</b>
<b>Tab. 8:</b> Verwendete Laborgeräte .....	<b>XV</b>
<b>Tab. 9:</b> Verwendete Verbrauchsmaterialien .....	<b>XVI</b>
<b>Tab. 10:</b> Verwendete Software .....	<b>XVII</b>
<b>Tab. 11:</b> Verwendete Chemikalien.....	<b>XVII</b>
<b>Tab. 12:</b> Inkubationspuffer für Transwellassay .....	<b>XIX</b>
<b>Tab. 13:</b> DPBS-Waschpuffer.....	<b>XIX</b>
<b>Tab. 14:</b> Ansätze für die Herstellung der KBR-Lösung für die Ussing-Kammer .....	<b>XX</b>
<b>Tab. 15:</b> Verwendete Grundmedien und Zusätze für die Zellkultivierung.....	<b>XX</b>
<b>Tab. 16:</b> Übersicht über die Mitglieder der SLC22-Familie .....	<b>XXVII</b>



# ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
μA	Mikroampère
μl	Mikroliter
μM	Mikromol
μm	Mikrometer
A	<i>Ampère</i>
Abb.	Abbildung
ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
ap	apikal
aqua bidest.	<i>aqua bidestillata</i> , mittels Umkehrosiose gewonnen
ATP	Adenosintriphosphat
bl	basolateral
BRCP	<i>breast cancer resistance protein</i>
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumine</i> )
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
ca.	<i>circa</i>
Caco	<i>caucasian colon adenocarcinoma</i>
cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratzentimeter
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig
EBSS	<i>Earle's Balanced Salt Solution</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	<i>Efflux Ratio</i>
et al.	und andere ( <i>et alii</i> )
FKS	Fetales Kälberserum
g	Gramm
G418	Aminoglykosidantibiotikum Neomycin
(HP)LC-MS/MS	<i>(high performance) liquid chromatography-</i> Massenspektrometrie/Massenspektrometrie
I	Stromstärke
IgG	Immunglobulin G
IP	Inkubationspuffer
KBR	Krebs-Ringer-Lösung
logP	Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient

---

M	Molar
MDCK	<i>Madin Darby Canine Kidney</i>
MDCKII-OCT1/P-gp	MDCK-Zelllinie, die P-gp und OCT1 überexprimiert
MDR	<i>multidrug resistance protein</i>
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmol	Millimol
mM	Millimolar
MPP	1-Methyl-4-phenylpyridinium
MRP	<i>multidrug resistance-related protein</i>
mV	Millivolt
MW	Molekulargewicht
n	Versuchszahl
NEAA	<i>non-essential amino acid</i>
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OAT	<i>organic anion transporter</i>
OATP	<i>organic anion transporting polypeptide</i>
OCT	<i>organic cation transporter</i>
$P_{app}$	scheinbarer Permeabilitätskoeffizient ( <i>apparent permeability coefficient</i> )
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PD	Potentialdifferenz
PEPT	<i>peptide transporter</i>
P-gp, ABCB1	P-Glykoprotein ( <i>permeability glycoprotein</i> )
pH	Maß für den sauren oder basischen Charakter einer wässrigen Lösung ( <i>potentia hydrogenii</i> )
pKa	negativer Base-10-Logarithmus der Säuredissoziationskonstante ( $K_a$ ) einer Lösung
PSC833	Valspodar
R	Widerstand
s	Sekunde
SCC	Kurzschlussstrom ( <i>short circuit current</i> )
SLC	<i>solute carrier</i>
Tab.	Tabelle
TEA	Tetraethylammonium
TMD	Transmembrandomäne
U	Elektrische Spannung
u.a.	unter anderem/unter anderen
UGT	UDP-Glucuronosyltransferase
V	Volt

---

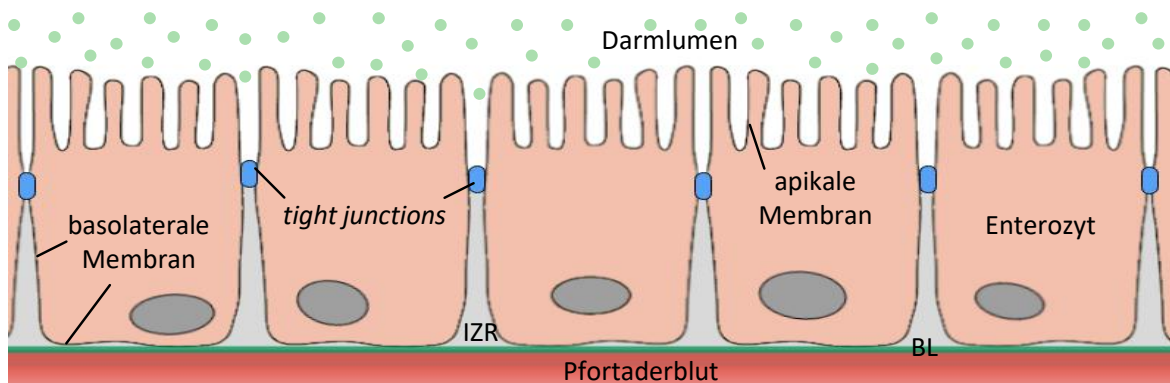
vgl.	vergleiche
vs.	<i>versus</i>
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
ZO	<i>Zonae occludens</i>
Ω	Ohm

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Hintergrund

Die Wirkung eines Medikamentes ist das Ergebnis zahlreicher komplexer Vorgänge im Organismus. Pharmakokinetisch durchläuft ein Arzneistoff die Teilprozesse der Resorption, Distribution und Metabolisierung, sowie seiner Elimination oder der seiner Metabolite über die Galle oder den Urin [1]. Vor allem die Leber, aber auch der Gastrointestinaltrakt, insbesondere das Jejunum, sind Organe, die die orale Bioverfügbarkeit eines Pharmakons determinieren [2]. In beiden Organen spielen metabolisierende Enzyme und Transportproteine eine wichtige Rolle [3; 4].

Die epithelialen Zellen der Darmschleimhaut (Enterozyten) sind über *tight junctions* fest miteinander verbunden und bilden somit einen zellulären *Monolayer* (Abb. 1), in dem eine apikale und eine basolaterale Membran unterschieden werden können. Die apikale Membran wird durch den Bürstensaum aus Mikrovilli charakterisiert und ist dem Darmlumen zugewandt. Die basolaterale Membran befindet sich auf der serosalen Seite der Zelle und liegt damit in Richtung des Interstitiums, bzw. der Blutbahn [5].



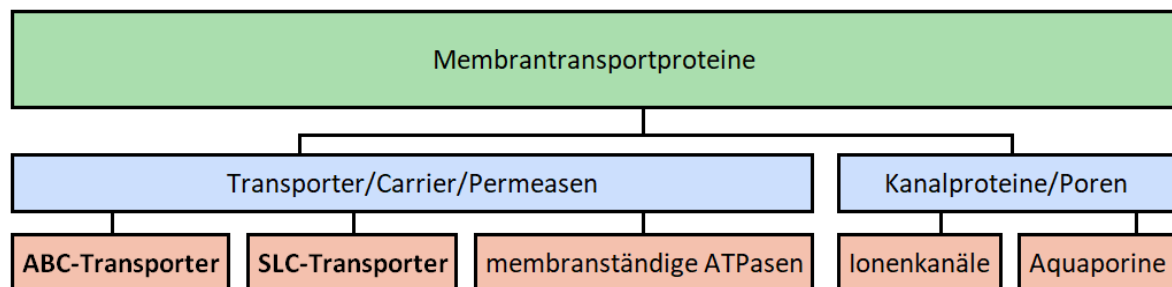
**Abb. 1:** Schematische Darstellung des intestinalen Epithels: Trennung der apikalen (luminalen) von der basolateralen (serosalen) Membran durch *tight junctions* (blau); IZR=Interzellulärraum, BL=Basallamina

Diese intestinale Barriere kann passiv nur von hoch lipophilen und ungeladenen Substanzen überwunden werden, während hydrophile bzw. geladene Substanzen zur Überwindung einer solchen Membran auf entsprechende, in der Plasmamembran lokalisierte Transportproteine angewiesen sind [5].

Bei diesen handelt es sich um ubiquitär vorkommende integrale Membranproteine, die für vitale Prozesse, wie z.B. die Aufnahme wichtiger Nährstoffe (z.B. Kohlenhydrate,

Peptide, Cholesterol) in die Zelle, die Verteilung zellulärer Signalstoffe (z.B. Hormone) oder die Elimination von Metaboliten und Noxen aus dem Organismus, verantwortlich sind [6]. Abhängig von der Anzahl und Richtung der zu transportierenden Stoffe unterscheidet man Uniport (Transport eines Stoffes in eine bestimmte Richtung), Symport (Transport zweier Stoffe gleichzeitig in dieselbe Richtung) und Antiport (Transport zweier Stoffe in entgegengesetzte Richtungen) [7].

Vorrangig werden fünf große Transporterklassen unterschieden (Abb. 2). Die Superfamilie der *solute carrier transporter* (SLC) und die der *ATP-binding-cassette*-Transporter (ABC) beinhalten die quantitativ am häufigsten vorkommenden Vertreter und sind von klinischer Bedeutung für den Arzneimitteltransport [8].



**Abb. 2:** Übersicht über die Einteilung der Membrantransportproteine (modifiziert nach [8])

### 1.1.1 Die ABC-Transporter

Zur Gruppe der ABC-Transporter zählen 49 Mitglieder [9] und sie wird in sieben Familien (ABCA bis ABCG) unterteilt [10]. Ihre Vertreter hydrolysieren das Energieträgermolekül ATP, um Energie für den primär aktiven Transport zu generieren [5]. Dadurch sind ABC-Transporter in der Lage Substrate auch entgegen eines bestehenden Konzentrationsgradienten zu transportieren [1]. Dieses Merkmal ist gerade bei intestinal und biliär vorkommenden Transportern relevant, da sowohl im Gastrointestinaltrakt als auch in den Gallenwegen sehr hohe Substratkonzentrationen bestehen können.

Zu den klinisch und pharmakologisch relevanten ABC-Transportern zählen beispielsweise das *multidrug resistance protein* (MDR), das *multidrug resistance-related protein* (MRP) und das *breast cancer resistance protein* (BCRP), die allesamt als Effluxtransporter fungieren [11]. Einer der bekanntesten Vertreter ist das P-glykoprotein (MDR1, ABCB1) [12].

Hierbei handelt es sich um einen ubiquitär vorkommenden, unidirektionalen Effluxtransporter, dessen Substrate sowohl endogener, als auch xenobiotischer Herkunft

sein können [12]. Zu den Substanzen, die von P-gp transportiert werden gehören beispielsweise Morphin, Ranitidin [13], Simvastatin [14], Rhodamin 123 [15; 16] und Verapamil [13; 15]. Durch Valspodar (PSC833) wird P-gp potent inhibiert [15; 16]. Eine der Hauptaufgaben des P-glykoprotein ist es, durch seinen nach extrazellulär gerichteten Transport, die Zellen, in denen es exprimiert wird (z.B. in Darm, Leber, Niere und Gehirn) vor Schädigung durch potentiell toxische Stoffe zu schützen. Aufgrund dieser Eigenschaft wird es unter anderem für die Entwicklung von Resistenzen gegen eine Vielzahl von Zytostatika verantwortlich gemacht [14].

### 1.1.2 Die SLC-Transporter

Es sind mittlerweile über 400 Transporter vom SLC-Typ bekannt [17; 18]. Sie transportieren ein breites Spektrum von Substraten mittels erleichterter Diffusion oder sekundär aktivem Transport, welcher definitionsgemäß durch einen Konzentrationsgradienten angetrieben wird, der zuvor durch primär aktive Transportprozesse aufgebaut wurde [19]. Zu ihren Substraten gehören neben ungeladenen auch kationische und anionische endogene Stoffe und Xenobiotika [20]. Die Richtung ihres Transportes hängt vom jeweiligen Vertreter ab. Grundlegend sind sowohl ein Influx- als auch ein Effluxtransport möglich [21].

Klinisch-pharmakologisch relevante Familien dieser Gruppe sind bspw. die *organic anion transporter* (OAT)-Familie, *organic cation transporter* (OCT)-Familie und *organic anion transporter polypeptides* (OATP)-Familie [22].

### 1.1.3 Der organische Kationentransporter 1 (OCT1)

Der *organic cation transporter* (OCT) 1 zählt zur SLC-Familie 22, welche außerdem die *organic anion transporter*, *organic zwitterion/cation transporter* und weitere OCTs umfasst [23].

Eine Übersicht aller Mitglieder der SLC22-Familie befindet sich im Anhang in Tab. 16.

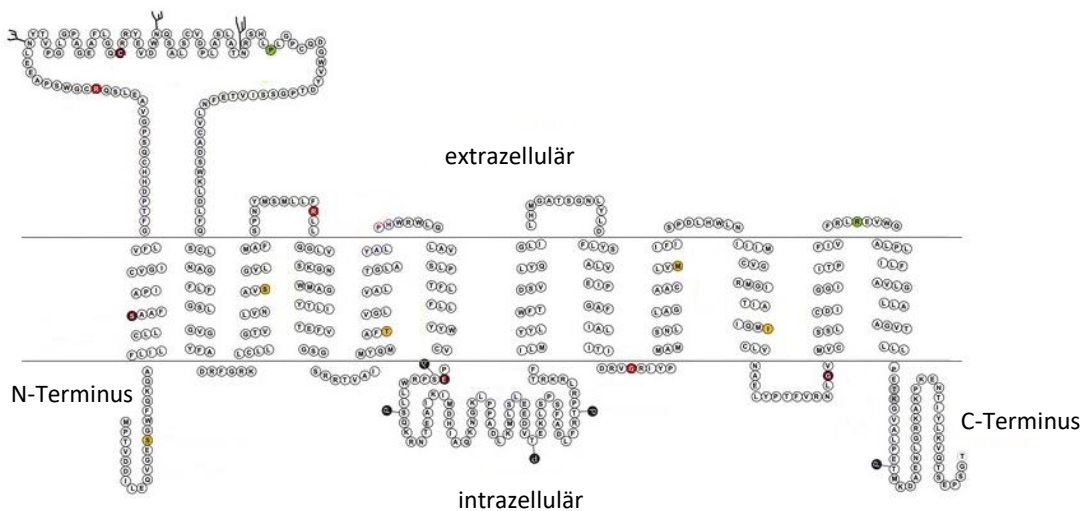
Der allgemeine Aufbau der OCTs ist in Abb. 3 dargestellt und zeigt die aus 12  $\alpha$ -helikalen, Transmembrandomänen bestehende Sekundärstruktur, deren Amino- und Carboxyl-Enden sich beide intrazellulär befinden. Zwischen dem ersten und zweiten Segment findet sich ein großer extrazellulärer glykosylierter Loop. Die große intrazelluläre Schleife zwischen der sechsten und siebten TMD besitzt die Möglichkeit der Phosphorylierung

durch Proteinkinase C, die zu einer Änderung der Substratelektivität führen kann [24]. Insgesamt scheint die Regulation von OCTs abhängig von Subtyp, Spezies und Gewebelokalisation zu variieren [25].

Generell kommen OCTs ubiquitär in epithelialen Geweben vor. Hierbei handelt es sich um polyspezifische Transporter, die über ein breites Substratspektrum verfügen. Zu diesem zählen neben organischen Kationen und schwachen Basen, welche bei einem physiologischen pH-Wert von 7,4 eine positive Ladung aufweisen, auch ungeladene Moleküle, wie z.B. Cimetidin [23; 26].

Da die OCTs sowohl endogene als auch zahlreiche exogene kationische Substanzen transportieren, spielen sie eine wichtige Rolle bei der hepatischen und renalen Elimination. Darüber hinaus wird vermutet, dass sie in der intestinalen Absorption von Medikamenten eine entscheidende Stellung einnehmen [23].

Obwohl sich OCTs sowohl in ihrem Aufbau als auch in ihrem Substratspektrum relativ ähnlich sind und sie allesamt in epithelialen Geweben exprimiert werden, gibt es deutliche Abweichungen bei der Verteilung in den verschiedenen Organen (Tab. 1) sowie deutliche speziesspezifische Unterschiede [6].



**Abb. 3:** Schematische Darstellung der Sekundärstruktur der *organic cation transporter* (modifiziert nach [27])

**Tab. 1:** Organspezifische Verteilung der OCT-Isoformen, vorrangige Expression hervorgehoben [23; 28–32]

Subtyp	Leber	Niere	Intestinum	Sonstige Organe
OCT1	<b>sinusoidale Membran</b>	luminale Membran des distalen und proximalen Tubulus	<b>apikale</b> oder <b>basolaterale</b> Membran	Herz, Skelettmuskulatur, Gehirn, Plazenta, Brustdrüsen, Lunge
OCT2		<b>basolaterale Membran</b>		
OCT3	sinusoidale Membran		apikale Membran	

Von besonderem pharmakologischen und klinischen Interesse ist dabei u.a. OCT1, dessen codierende Sequenz (*SLC22A1*) zunächst von der Ratte [33], später auch von anderen Spezies - inklusive der menschlichen- kloniert wurde [31; 34; 35].

Obwohl OCT1 in einer Vielzahl von Organen exprimiert wird, spielt insbesondere die Expression in der sinusoidalen Membran der Hepatozyten [26] eine wichtige Rolle, da OCT1 hier für die Aufnahme zahlreicher Substrate aus der Blutbahn verantwortlich ist [36].

Für die Substrate von OCT1 konnte ein Pharmakophor-Modell entwickelt werden, welches eine positiv ionisierbare, eine hydrophobe und zwei Akzeptorstellen für Wasserstoffbrückenbindungen beinhaltet [37]. Eine Übersicht der über OCT1 transportierten Substanzen zeigt Tab. 2.

**Tab. 2:** Ausgewählte Substrate des *organic cation transporter 1* [38; 39]

Endogene Stoffe und Nährstoffe	Arzneistoffe	Modellsubstrate	Inhibitoren
Adrenalin	Aciclovir	MPP	Clonidin
Agmatin	Metformin	TEA	Ondansetron
Noradrenalin	Morphin		Spiroinolacton
Serotonin	Ranitidin		Verapamil
	Trospium		

OCT1 vermittelt einen temperaturabhängigen, sättigbaren Transport, der durch verschiedene organische Kationen, sowie neutrale Verbindungen, wie z.B. Spiroinolacton [40], gehemmt werden kann [6]. Er arbeitet als Uniporter und vermittelt erleichterte



Diffusion entlang des elektrochemischen Gradienten des zu transportierenden Substrates [23]. Der Transport ist hierbei prinzipiell bidirektional möglich und sowohl  $\text{Na}^+$ - als auch pH-unabhängig [41; 42].

Für die Hepatozyten konnte OCT1 aufgrund der starken Genexpression und des signifikanten Proteinvorkommens bezüglich seiner Funktion und Lokalisation bereits weitgehend charakterisiert werden [3]. Im Kontrast hierzu wird seine Expression und Funktion im humanen Gastrointestinaltrakt und die exakte Lokalisation in den Enterozyten bis heute kontrovers diskutiert.

## 2 AUFGABENSTELLUNG

### 2.1 Zielsetzung

Die Aufnahme oral verabreichter Substanzen in die Blutbahn ist u.a. stark abhängig von der Expression verschiedenster Transportproteine im oberen Dünndarm. Während für die Expression und Lokalisation zahlreicher ATP-abhängiger Effluxtransporter wie dem P-gp, BCRP oder auch verschiedene MRPs Einigkeit über die Expressionsstärke und auch Expressionsort herrscht, ist für die ATP-unabhängigen Transporter der SLC-Familie bislang noch nicht abschließend geklärt, in welcher Weise sie an der Aufnahme von Substanzen beteiligt sind. Verschiedene Beispiele zeigten in der Vergangenheit, dass einmal postulierte Meinungen kurze Zeit später widerrufen werden mussten. So konnten Gläser et al. zeigen, dass OATP1A2 im Darm exprimiert wird, was als Erklärung für die Aufnahme verschiedenster Substanzen diente [43; 44]. Spätere Publikationen konnten klar widerlegen, dass OATP1A2 im Darm exprimiert wird [3]. Ein anderes Beispiel betrifft die intestinale Lokalisation des Anionentransporters OATP2B1. Die Expression dieses Transporters konnte im Darm von verschiedenen Arbeitsgruppen bestätigt werden. Uneinigkeit hingegen herrschte darüber, ob OATP2B1 in der apikalen oder basolateralen Membran der Enterozyten exprimiert wird. Zeigten frühere Publikationen eine apikale Expression [45; 46], konnten neuere Arbeiten deutlich eine basolaterale Expression des Transportproteins ausmachen [47; 48].

In gleicher Weise herrscht auch Uneinigkeit über den Expressionsort des Transportproteins OCT1. Obwohl frühere Publikationen eine basolaterale Expression postulierten [49–54], zeigte eine jüngere Arbeit eine apikale Lokalisation [55]. Trotzdem dies als Erklärung für die intestinale Aufnahme von z.B. Trosipiumchlorid dienen könnte [56; 57], bleibt offen, warum die intestinale Bioverfügbarkeit von Trosipiumchlorid unter 10% liegt [58]. Weitere Beispiele für Substanzen mit einer geringen oralen Bioverfügbarkeit, die gleichzeitig Substrat von OCT1 sind, sind z.B. Morphin [59] und Aciclovir [60].

Da das Wissen um die Lokalisation eines Transportproteins für die Prädiktion von Aufnahme, Verteilung, Metabolisierung und Ausscheidung von oral verabreichten Substanzen von entscheidender Bedeutung ist, ist es Ziel der vorliegenden

Promotionsarbeit, mittels verschiedener Methoden die apikale bzw. basolaterale Lokalisation von OCT1 in humanem Darm zu verifizieren bzw. zu widerlegen.

## 3 MATERIAL UND METHODEN

### 3.1 Material

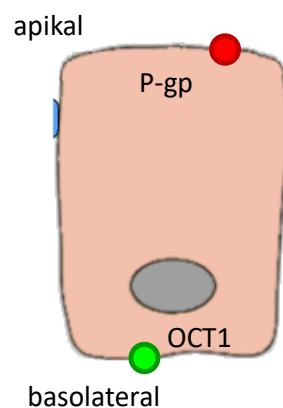
Eine Auflistung der verwendeten Laborgeräte, Verbrauchsmaterialien, Chemikalien, Software, kommerziellen Kits, Puffer sowie Medien befindet sich im Anhang (Tab. 8 - Tab. 15).

### 3.2 Zellbiologische Untersuchungen

Zur Untersuchung des vektoriiellen Transportes wurde die über OCT1 transportierte Testsubstanz Morphin verwendet. Die Versuche wurden in Caco-2- und MDCKII-Zellen durchgeführt. Die Caco-2-Zellen stammten von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen. Bei der Caco-2-Zelllinie handelt es sich um Zellen, die initial aus einem humanen Colon-Adenokarzinom isoliert wurden und nach spontaner Differenzierung zahlreiche morphologische und funktionelle Eigenschaften von Enterozyten aufweisen.

Die MDCKII-Zelllinie wurde ursprünglich von S.H. Madin und N.B. Darby aus den Nierenepithelzellen des proximalen Tubulus eines Cocker Spaniels isoliert [61–63].

Für die unterschiedlichen Experimente wurde eine doppelt stabil transfizierte MDCKII-Zelllinie, die apikal P-gp und basolateral OCT1 überexprimiert und als Selektionsmerkmal sowohl ein Neomycin- als auch ein Hygromycin-Resistenzgen trägt, verwendet (Abb. 4). Die Zelllinie wurde im Institut für Pharmakologie entwickelt und umfangreich charakterisiert.



**Abb. 4:** Schematische Darstellung einer doppelt stabil transfizierten MDCKII-Zelle (MDCKII-OCT1/P-gp); apikale Expression von P-gp; basolaterale Expression von OCT1

Die MDCKII-OCT1/P-gp-Zellen zeigen ein adhärentes Wachstum als Monolayer mit *gap junctions* und *tight junctions*. Sie lassen aufgrund ihrer Polarität eine apikale und eine basolaterale Membran unterscheiden, was eine grundlegende Voraussetzung für die Untersuchung eines gerichteten Transportes darstellt, da durch die starken Zell-Zell-Verbindungen ein parazellulärer Transport unterbunden wird.

### 3.2.1 Zellkultivierung

Die Zellkultivierung erfolgte mit den in Tab. 3 - Tab. 5 aufgeführten Medien und Selektionsantibiotika bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit in einem Zellinkubator in T75-Zellkulturflaschen (75 cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche). Die Zugabe der Selektionsantibiotika wurde spätestens drei Tage vor Versuchsbeginn beendet, um mögliche Interaktionen mit den zu untersuchenden Transportproteinen auszuschließen.

**Tab. 3:** Medium für Caco-2-Zellen

500 ml	MEM Eagle without glutamine	
enthält	2,2 g/l	NaHCO <sub>3</sub>
		EBSS
Zusätze	20 %	Hitze-inaktiviertes FKS
	2 mM	NEAA
	2 mM	stabiles Glutamin
	1 %	Penicillin/Streptomycin

**Tab. 4:** Medium für MDCKII-Zellen

500 ml	DMEM low glucose (1 g/l) without glutamine	
enthält	1,0 g/l	Glukose
	3,7 g/l	NaHCO <sub>3</sub>
		Na-Pyruvat
Zusätze	10 %	FKS
	4 mM	stabiles Glutamin
	1 %	Penicillin/Streptomycin

**Tab. 5:** Selektionsantibiotika für stabil transfizierte Zellen

Zelllinie	Transporter	Selektionsantibiotikum	Volumen (µl/ml)
MDCKII	OCT1, P-gp	Hygromycin B	7,5
	3,7 g/l	Neomycin (G418)	12

Eine Kontrolle der Zelldichte und Identifizierung einer potentiellen Kontamination erfolgte unter einem Lichtmikroskop. Alle Zellkulturarbeiten, mit Ausnahme der abschließenden Transwellassays und Immunfluoreszenzfärbungen, wurden zur Minimierung des Kontaminationsrisikos unter sterilen Bedingungen unter einer Sterilwerkbank durchgeführt. Vor dem Kontakt mit dem Arbeitsplatz wurden sämtliche Utensilien mit 70%-igem Ethanol desinfiziert.

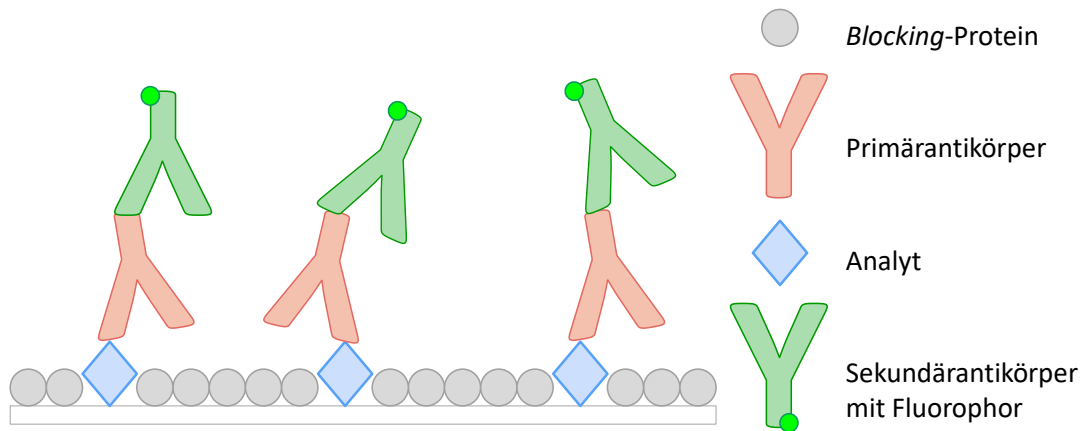
Eine Passagierung der Zellen erfolgte jeweils bei Erreichen einer ca. 90%-igen Konfluenz, um ein mögliches Absterben der Zellen durch Zellkontakthemmung zu vermeiden. Hierfür wurden die Zellen zunächst mit 7 ml *phosphate buffered saline* (PBS) gewaschen und im Folgenden mittels 3 ml Trypsin-EDTA-Lösung (0,05 % / 0,02 % (V/V)) enzymatisch von der Unterlage abgelöst. Im Anschluss erfolgte die Resuspendierung im Nährmedium und Applikation der gewünschten Zellzahl auf eine neue Wachstumsunterlage.

Für die Kryokonservierung der Zellen wurden diese in einem entsprechenden Einfriermedium (FKS + 10 % DMSO) zunächst bei -80°C eingefroren und anschließend bei -196°C in flüssigem Stickstoff gelagert. Zur Inkulturnahme von kryokonservierten Zellen wurde die Zellsuspension bei 37°C in einem Wasserbad aufgetaut und nach Entfernung des Einfriermediums mit der entsprechenden Nährlösung resuspendiert und in Zellkulturflaschen überführt. Ein entsprechendes Selektionsantibiotikum wurde gegebenenfalls nach 24 Stunden appliziert.

### 3.2.2 Immunfluoreszenzfärbung

Die Überprüfung der Expression und Lokalisation der Transportproteine in Caco-2- und MDCKII-OCT1/P-gp-Zellen erfolgte mittels indirekter sowie direkter Immunfluoreszenzfärbung. Mithilfe spezifischer Antikörper wurden dabei die zu lokalisierenden Transportproteine markiert und durch einen Zweitantikörper, der an einen Fluorophor gekoppelt und gegen den ersten Antikörper gerichtet ist, sichtbar gemacht (Abb. 5). In Caco-2-Zellen wurden zur Abgrenzung des apikalen vom basolateralen Kompartiment die

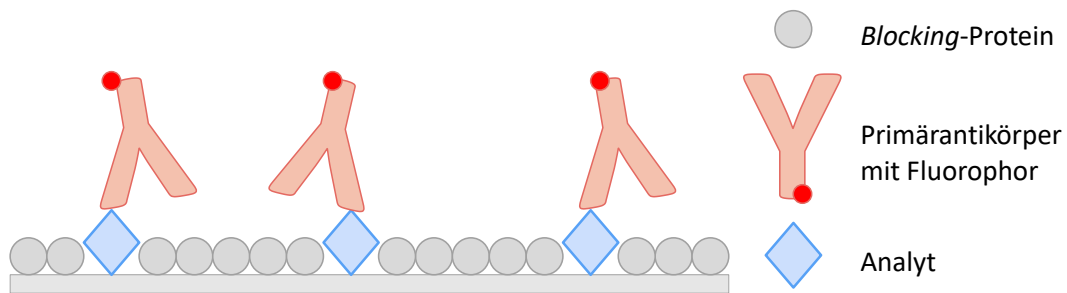
*Zonae occludens (tight junctions)* mittels eines bereits markierten ZO1-Antikörpers sichtbar gemacht (Abb. 6).



**Abb. 5:** Prinzip der indirekten Immunfluoreszenzfärbung: Der primäre Antikörper (z.B. anti-OCT1) bindet an sein Epitop (Analyt, z.B. OCT1), welches auf einer Membran fixiert ist. An diesen Primärantikörper bindet der fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper (z.B. Alexa Fluor 488), der mittels konfokaler Lasermikroskopie nachgewiesen werden kann.

Für die MDCKII-OCT1/P-gp-Zelllinie wurde dieses bereits durchgeführt und die Lokalisation von OCT1 in der basolateralen Membran bestätigt.

Für die Färbung wurden 120.000 Zellen auf Deckgläschen in einer 24-Well-Platte ausgesät und für 21 Tage (Caco-2) bzw. 7 Tage (MDCK-OCT/P-gp) kultiviert. Sobald die Zellen eine Konfluenz von 100 % aufwiesen, wurden sie für 15 min bei  $-20^{\circ}\text{C}$  mit Aceton/Methanol (1:1) fixiert. Nach der Permeabilisierung der Zellen mittels 0,1 % Triton-X-100 (in PBS) wurden die unspezifischen Proteinbindungsstellen mit 1 % BSA (120 min bei  $20^{\circ}\text{C}$ ) geblockt. Im Anschluss an die Zugabe der primären Antikörper gegen OCT1 (1:500 in 1 % BSA) und P-gp (1:20 in 1 % BSA) bzw. des bereits markierten ZO1-Antikörpers wurden die Zellen über Nacht bei  $4^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Am folgenden Tag wurden, gegen die primären Antikörper gerichtete, sekundäre Antikörper (Alexa Fluor 488 für OCT1, Alexa Fluor 568 für P-gp) appliziert und die Zellen nochmals für 60 min bei  $20^{\circ}\text{C}$  im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Deckgläschen mit *Thermo Fisher ProLong Gold Antifade Mountant with DAPI* auf Objektträger geklebt und die Expression sowie Lokalisation von OCT1 mittels konfokaler Lasermikroskopie analysiert.



**Abb. 6:** Prinzip der direkten Immunfluoreszenzfärbung: Ein fluoreszenzmarkierter primärer Antikörper (z.B. anti-ZO1) bindet an sein Epitop (Analyt, z.B. ZO1), welches auf einer Membran fixiert ist und kann direkt mittels konfokaler Lasermikroskopie nachgewiesen werden.

### 3.2.3 Transwellassay

Alle zellbasierten Assays wurden ohne Zusatz von selektionierenden Antibiotika dreimal jeweils in Duplikaten durchgeführt.

#### Allgemeines Vorgehen

Die Zellen wurden in Abhängigkeit der individuellen Wachstumsgeschwindigkeit mit einer Dichte von ca. 120.000 Zellen/Well ausgesät. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels eines automatisierten Zellcounters. Sobald sich ein konfluenten Zellrasen gebildet hatte, wurden die Versuche durchgeführt.

#### Transwellassay zur Untersuchung des vektoriiellen Transportes von Morphin

Unter vektoriellem Transport versteht man den gerichteten transzellulären Transport u.a. von Nährstoffen und Xenobiotika, sowohl von der apikalen zur basolateralen Seite einer polarisierten Zelle, als auch in entgegengesetzter Richtung. In der vorliegenden Arbeit wurden Caco-2-Zellen verwendet, um aus den gemessenen vektoriiellen Transportraten in An- bzw. Abwesenheit spezifischer Inhibitoren indirekt Rückschlüsse auf die Lokalisation und Expression von OCT1 ziehen zu können. Als Kontrolle dienten doppelt stabil transfizierte MDCKII-OCT1/P-gp-Zellen.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte auf Transwell-Filtern mit einer Porengröße von 0,4 µm. Eine visuelle Kontrolle des Zellwachstums wurde auf transparenten Filtern durchgeführt. Pro Filter wurden 120.000 Zellen ausgesät und bis zwei Tage nach Erreichen einer sichtbaren vollständigen Konfluenz inkubiert. Dies diente zur Sicherstellung der



Ausbildung von *tight junctions* zwischen den Zellen. Um im Versuch möglichst physiologische Bedingungen zu schaffen, wurde im apikalen Kompartiment ein pH von 6,5 und im basolateralen Kompartiment ein pH von 7,4 eingestellt. Um den Transport von apikal nach basolateral zu untersuchen, wurden 750 µl Inkubationspuffer (IP) (pH 7,4) in das basolaterale und 250 µl Substanzlösung (pH 6,5) in das apikale Kompartiment appliziert (10 µM Morphin). Zur Ermittlung des Transportes in entgegengesetzter Richtung, wurden 750 µl der Substanzlösung in das basolaterale Kompartiment (pH 7,4) gegeben (Abb. 7).

Zusätzlich wurden verschiedene Hemmstoffe in jeweils beide Kompartimente hinzugefügt, um einerseits die Effekte einer Inhibition von OCT1 (durch Ranitidin bzw. MPP) und andererseits von P-gp (durch PSC833) in die Untersuchung mit einzubeziehen. Nach 15 min, 30 min und 45 min wurde jeweils eine Probe von 200 µl aus dem *receiver*-Kompartiment (Akzeptor-Kompartiment) entnommen und durch 200 µl warmen IP ersetzt. Die Proben wurden mittels HPLC/MS-MS analysiert und der Transport über die  $P_{app}$ -Wert-Bestimmung beurteilt.

Um ein korrektes Modell aus den gemessenen Konzentrationen reproduzieren zu können, musste die Verdünnung der Proben zum Zeitpunkt  $t = 30$  min und  $t = 45$  min durch die Zugabe des nativen IP nach den Probenentnahmen zum Zeitpunkt  $t = 15$  min bzw.  $t = 30$  min berücksichtigt werden.

Hierfür wurde folgender Verdünnungsfaktor (Tab. 6) in die Auswertung mit einbezogen:

**Tab. 6:** Verwendeter Verdünnungsfaktor

Zeitpunkt (t) der Probenentnahme [min]	Verdünnungsfaktor
15	$c_{15} = c_{t15}$
30	$c_{30} = c_{t30} \cdot \left(\frac{750}{550}\right)$
45	$c_{45} = c_{t45} \cdot \left(\frac{750}{550}\right) \cdot \left(\frac{750}{550}\right)$

Um eine Vergleichbarkeit der Messwerte für den vektoriellen Transport von apikal nach basolateral, sowie der Messwerte für den Transport von basolateral nach apikal zu erreichen, wurden aufgrund der unterschiedlichen Volumina in den beiden Kompartimenten außerdem folgende Volumenfaktoren (Tab. 7) mit einbezogen, um eine korrekte  $P_{app}$ -Wert-Berechnung zu ermöglichen:

Tab. 7: Verwendeter Volumenfaktor

Transportrichtung	Volumenfaktor
ap>bl	0,75
bl>ap	0,25

Die Berechnung des  $P_{app}$ -Wertes [cm/s] erfolgte anschließend über folgende Formel:

Formel 1:  $P_{app}$ -Wert

$$P_{app} = \frac{1}{A \cdot c_0} \cdot \frac{dQ}{dt}$$

$A = \text{Wachstumsfläche} [\text{cm}^2]$

$c_0 = \text{Ausgangskonzentration im } donor\text{-Kompartiment} [\frac{\text{ng}}{\text{cm}^3}]$

$\frac{dQ}{dt} = \text{lineare Transportrate des Substrates über die Zeit} [\frac{\text{ng}}{\text{s}}]$

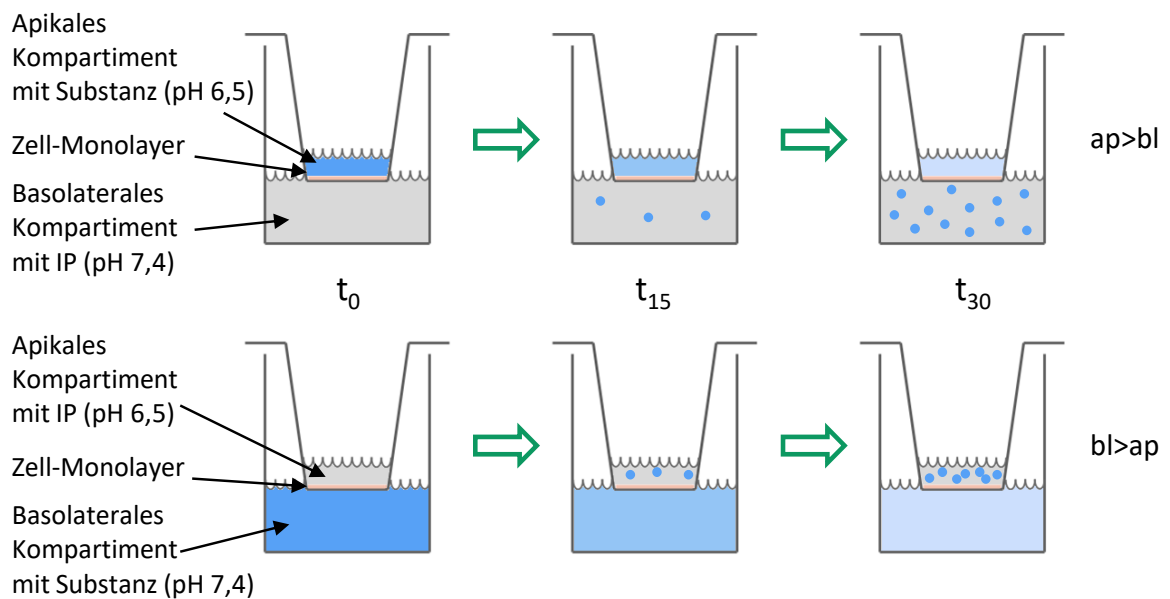


Abb. 7: Prinzip eines Transwellassays zur Untersuchung des vektoriellen transzellulären Transportes:

Auf einem Transwell-Filter werden die zu untersuchenden Zellen kultiviert bis die Ausbildung von *tight junctions* gewährleistet ist. Die so gebildete polarisierte Zellschicht trennt im Transwell-Versuch ein mit Inkubationspuffer (IP) gefülltes basolaterales (pH 7,4) von einem apikalen Kompartiment (pH 6,5). Zur Untersuchung des Transportes wird dem jeweiligen *donor*-Kompartiment (apikal bei  $ap > bl$ , basolateral bei  $bl > ap$ ) die entsprechende Testsubstanz, jeweils in An- bzw. Abwesenheit entsprechender Inhibitoren, zugegeben und Proben zur Analyse zu definierten Zeitpunkten  $t$  aus dem *receiver*-Kompartiment (basolateral bei  $ap > bl$ , apikal bei  $bl > ap$ ) entnommen.

### 3.3 Ussing-Kammer

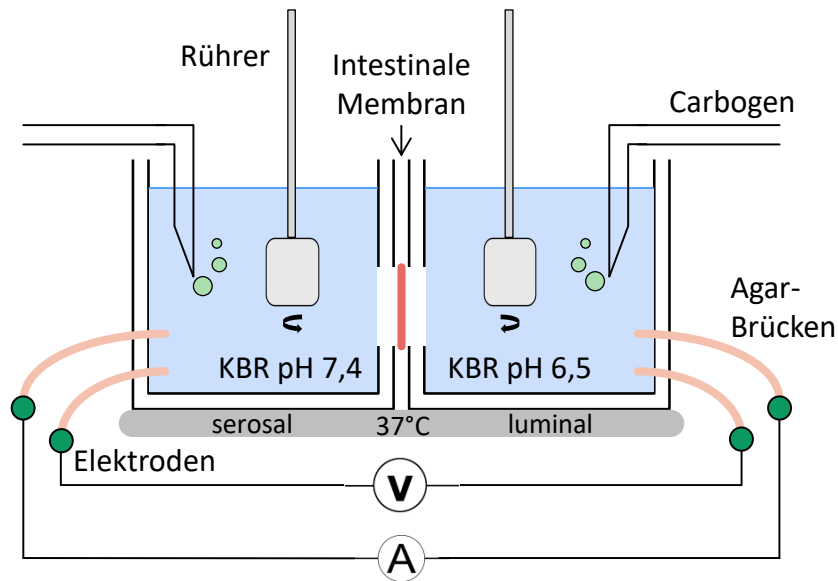
Ursprünglich wurde die Ussing-Kammer Mitte des 20. Jahrhunderts von Hans Henriksen Ussing zur Messung des NaCl-Transportes über epitheliale Membranen entwickelt [64; 65]. Vorbild für den hier verwendeten Versuchsaufbau und die Versuchsdurchführung ist die bei AstraZeneca [66] etablierte Methode einer modifizierten Ussing-Kammer zur *ex vivo*-Untersuchung des vektoriellen Transportes von Testsubstanzen über jejunale Membranen verschiedener Spezies.

Der vektorielle Transport der Testsubstanz Morphin (250  $\mu\text{M}$ ) wurde in An- und Abwesenheit von PSC833 (10  $\mu\text{M}$ ), als Inhibitor für P-gp einerseits und MPP bzw. Ranitidin (jeweils 100  $\mu\text{M}$ ) als Inhibitor für OCT1 andererseits, untersucht.

#### 3.3.1 Versuchsaufbau

Die Ussing-Kammer (Abb. 8) besteht aus zwei durch die zu untersuchende Membran getrennten Kammern, die von - auf 37°C temperierten - Aluminiumblöcken umgeben sind. Die Kammern stehen über vier Agarbrücken in Kontakt zu Elektroden, über die anhand kontinuierlich gemessener elektrischer Parameter die Vitalität und Integrität des Gewebes überwacht wird.

Hierzu wird zum einen die Potentialdifferenz (PD) gemessen, welche die Spannung zwischen apikalem und basolateralem Kompartiment darstellt. Sie gilt als ein Maß für die Arbeit, die aufgewendet werden muss, um eine Ladung von der luminalen zur serosalen Seite über das Epithelgewebe zu transportieren. Die intestinale Potentialdifferenz entsteht durch den unidirektionalen Transport von Natriumionen, die im Symport mit Glukose oder Aminosäuren von der apikalen zur basolateralen Seite des Epithels transportiert werden. Aufgrund dessen herrscht (bei intakter Membran) ein Ladungsungleichgewicht - und damit auch unterschiedliche Potentiale in den beiden Kammern. Das positivere, im apikalen Kompartiment herrschende Potential, führt optimalerweise zu negativen PD-Werten im Bereich von ca. -1 bis -11 mV abhängig von Spezies und Gewebeart.



**Abb. 8:** Schematische Darstellung Versuchsaufbau Ussing-Kammer:

Die zwei mit KBR-Lösung gefüllten Kammern werden durch die zu untersuchende Membran in ein serosales (pH 7,4) und ein lumenales (pH 6,5) Kompartiment getrennt. Über Agar-Brücken stehen die beiden Kompartimente mit Elektroden in Verbindung, die kontinuierlich die Potentialdifferenz (V) bzw. den Kurzschlussstrom (A) zur Überwachung der Gewebeviabilität messen. Durch temperierte Aluminiumblöcke wird eine Versuchstemperatur von 37°C aufrechterhalten. Eine konstante Carbogenzufuhr, sowie ein stetes Durchmengen der KBR-Lösung mittels Rührpaddles sind über die gesamte Versuchsdauer gewährleistet. Zur Untersuchung des Transportes wird dem jeweiligen *donor*-Kompartiment (luminal bei  $a_p > b_l$ , serosal bei  $b_l > a_p$ ) die entsprechende Testsubstanz, jeweils in An- bzw. Abwesenheit entsprechender Inhibitoren, zugegeben und Proben zur Analyse zu definierten Zeitpunkten  $t$  aus dem *receiver*-Kompartiment (serosal bei  $a_p > b_l$ , luminal bei  $b_l > a_p$ ) entnommen.

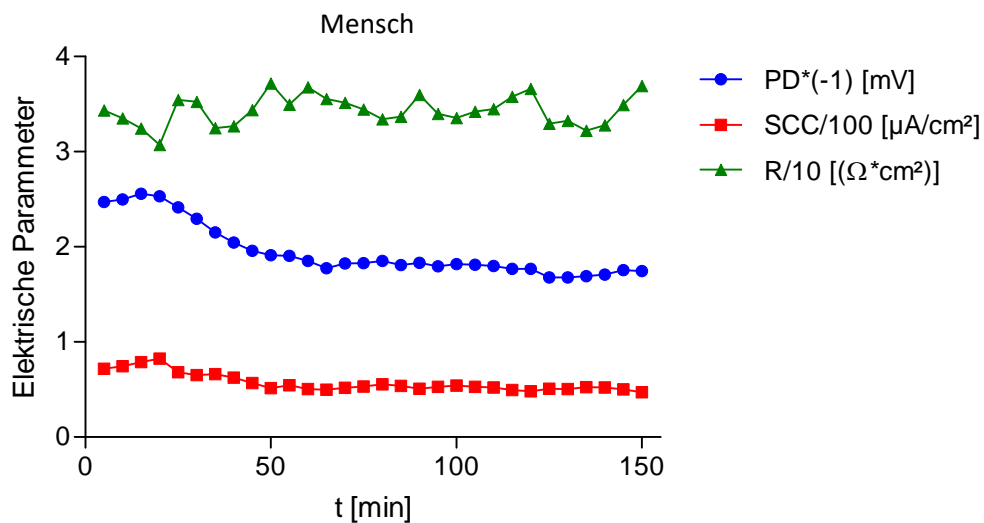
Zum anderen wird der *short circuit current* (SCC) gemessen. Dieser Kurzschlussstrom entspricht der Stromstärke, die angelegt werden muss, um die Potentialdifferenz auf 0 mV zu senken. Der SCC-Wert gibt anhand des Ladungstransportes Auskunft über die Funktionsfähigkeit des Gewebes hinsichtlich ionaler Transportvorgänge. Die Messung der Spannung erfolgt im Verlauf von Stromimpulsen von -30 bis 30  $\mu\text{A}$ , die sich im Strom-Spannungsdiagramm als Gerade darstellen. Deren Schnittpunkt mit der Ordinate entspricht hierbei der Potentialdifferenz (PD).

Der Widerstand (R), als dritter beschreibender Parameter, entspricht der Steigung dieser Geraden. Der Widerstand ermöglicht Rückschlüsse auf verschiedene Eigenschaften des Gewebes. In erster Linie schließt ein positiver Widerstand Defekte als Folge der vorangegangenen Präparation aus. Zudem spricht ein Widerstand im Bereich von 5-10  $\Omega/\text{cm}^2$  für die gegebene Integrität der Lipiddoppelschicht der Zellmembran sowie der Zell-Zell-Verbindungen (*tight junctions*) zwischen den Epithelzellen.

Der Kurzschlussstrom (SCC) kann, angelehnt an das Ohm'sche Gesetz ( $I = U/R$ ), wie angegeben errechnet werden:

$$\text{SCC} = \text{PD}/R$$

Alle genannten elektrischen Parameter (Abb. 9) geben Auskunft über die Viabilität des verwendeten Gewebes. Hierbei sind die intakten Transportvorgänge über die Mukosa von besonderer Bedeutung, da sie die Grundlage für die Versuchsdurchführung darstellen.

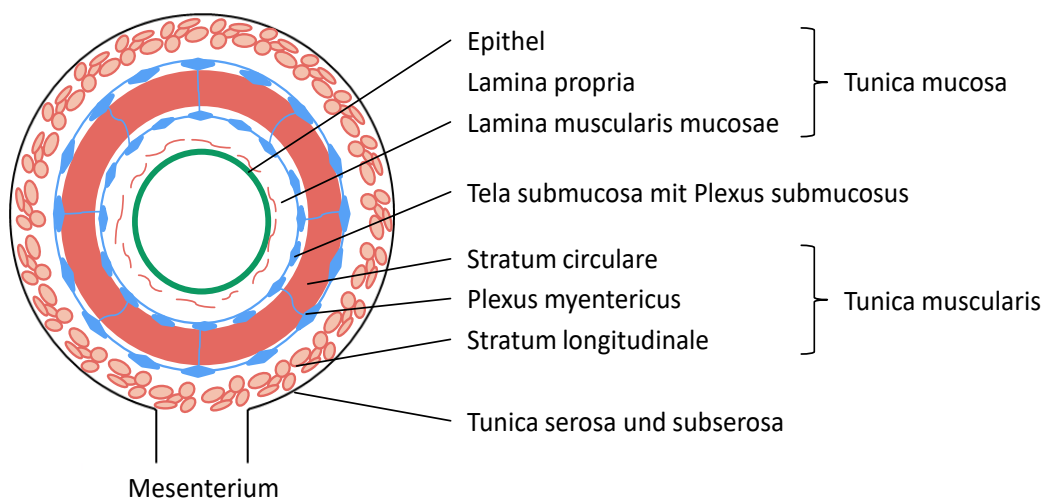


**Abb. 9:** Exemplarische Darstellung der elektrischen Parameter zur Überwachung der Viabilität humanen jejunalen Gewebes in der Ussing-Kammer: Potenzialdifferenz (PD, blau); Kurzschlussstrom (SCC, rot); Widerstand (R, grün)

In den beiden Kammern befinden sich während der Versuchsdurchführung die auf 37°C temperierten und mit Carbogen begasten Testlösungen. In beiden Kompartimenten werden jeweils physiologische pH-Werte von 7,4 apikal (dem Blut-pH-Wert entsprechend) und 6,5 basolateral (dem jejunalen pH-Wert entsprechend) eingestellt. Abhängig vom Versuchsaufbau kann sowohl die apikale als auch die basolaterale Kammer, als *donor*- oder als *receiver*-Kompartiment fungieren und ermöglicht es, den transepithelialen Transport der zu untersuchenden Substanz jeweils von apikal nach basolateral als auch entgegengesetzt zu untersuchen.

### 3.3.2 Präparation des Gewebes

Die Gewinnung des humanen und porcinen Darmgewebes erfolgte auf unterschiedlichem Wege. Humane Gewebeproben entstammten aus Operationen von freiwilligen Spendern, wofür ein entsprechendes Ethikvotum der Ethikkommission der Universitätsmedizin Greifswald vorliegt (BB122/12). Porcine Gewebeproben wurden durch sofortige Entnahme nach Schlachtung gewonnen. Die Reinigung und der Transport des Gewebes erfolgten in eiskalter Custodiol® HTK-Lösung zur Aufrechterhaltung der Gewebeviabilität. Unter einer Sterilwerkbank wurde der Darm entlang des Mesenterialansatzes eröffnet und ein ca. 2 cm<sup>2</sup> großes Gewebstück mit der luminalen Seite nach unten auf der Silikonunterlage in einem begasten Becken mit gekühlter (10°C) Krebs-Ringer-Lösung (KBR) befestigt. Dies ermöglichte die Entfernung von *Tunica serosa* und *subserosa*, sowie *Tunica muscularis* und *Tela submucosa*, sodass ausschließlich die *Tunica mucosa* für die Versuchsdurchführung zur Verfügung stand (Abb. 10).



**Abb. 10:** Schematische Übersicht über die Schichten der Darmwand:

Zur Verwendung in der Ussing-Kammer werden die *Tela submucosa*, *Tunica muscularis*, *serosa* sowie *subserosa* entfernt, so dass lediglich die *Tunica mucosa* für die Untersuchungen zur Verfügung steht.

### 3.3.3 Versuchsvorbereitung

Vor Beginn des Experimentes erfolgte die Eingabe der exponierten Membranfläche innerhalb der verwendeten speziesabhängigen Verbindungsstücke in das Ussing-Programm sowie die Registrierung der Hintergrund-Messwerte der noch unbestückten Ussing-Kammer. Das präparierte Gewebe wurde auf dem Verbindungsstück fixiert und

zwischen den beiden Kammern eingespannt. Um Schädigungen an der Membran vorzubeugen wurde nun raumtemperierte KBR-Lösung mit einem apikalen pH-Wert von 6,5 und einem basolateralen pH-Wert von 7,4 hinzugefügt und dem Gewebe ca. 30 Minuten Zeit zur Akklimatisierung gegeben.

### 3.3.4 Versuchsdurchführung

Zeigten sich die gemessenen elektrischen Parameter während dieser 30 Minuten als stabil, wurde die vorgewärmte Substanzlösung (Morphin [100 µM]) appliziert und die Aufzeichnung mittels Ussing v 1.0.1. gestartet. Bei der Verwendung von humanem und porcinem Gewebe erwies sich ein PD-Wert um -2 mV (mindestens -1 mV) als günstig. Der Widerstand R sollte bei < 1000 Ω liegen. Es wurden Proben von je 200 µl zum Zeitpunkt t = 0 min, t = 30 min, t = 60 min, t = 90 min, t = 120 min und t = 150 min aus den *receiver*-Kompartimenten, sowie zum Zeitpunkt t = 0 min und t = 150 min aus den *donor*-Kompartimenten entnommen und jeweils durch 200 µl native KBR-Lösung mit entsprechendem pH-Wert ersetzt. Nach der letzten Probenentnahme wurde mittels *Lucifer Yellow* die Integrität des Darmgewebes geprüft, um einen potentiellen parazellulären Transport auszuschließen. Hierfür wurde nach Abschluss des Versuchs dem jeweiligen *donor*-Kompartiment 100 µM *Lucifer Yellow* zugegeben und nach weiteren 60 Minuten eine Probe von 200 µl aus dem entsprechenden *receiver*-Kompartiment entnommen. Daraufhin wurde *Lucifer Yellow* unter Berücksichtigung des jeweiligen Endvolumens der *receiver*-Kompartimente durch Messung der Absorptionswellenlänge von 425 nm photometrisch quantifiziert.

Die Aufbereitung und Vermessung der gewonnenen Proben erfolgten per HPLC-MS/MS (siehe 3.4.1). Abschließend wurde aus den Ergebnissen der  $P_{app}$ -Wert [cm/s] für das jeweilige Substrat errechnet (vgl. Formel 1). Dieser gilt als Maß für die vektorielle Transportrate eines Substrates und lässt sich vom Fick'schen Diffusionsgesetz ableiten.

Ferner wurde zur Beurteilung der Ergebnisse der Ussing-Kammer-Versuche die sogenannte *Efflux-Ratio* (ER) verwendet. Diese ergibt sich aus nachfolgender Formel:

**Formel 2:** *Efflux-Ratio*

$$ER = \frac{P_{app} (bl > ap)}{P_{app} (ap > bl)}$$

Die ER ist der Quotient aus den  $P_{app}$ -Werten beider möglichen Transportrichtungen. Ergibt dieser einen Wert von 1 ist, liegt kein vektorieller Transport vor. Werte  $>1$  weisen auf einen aktiven Transport von basolateral nach apikal hin, während Werte  $<1$  für einen entgegengesetzten Transport sprechen.

### **3.4 Analytische Methoden**

#### **3.4.1 Liquid-Chromatographie-Massenspektrometrie**

Die Analytik zur Quantifizierung von Morphin in der Ussing-Kammer und im Transwellassay erfolgte in der analytischen Abteilung der Klinischen Pharmakologie des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie an der Universitätsmedizin Greifswald mittels einer validierten Flüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS)-Methode.

200  $\mu\text{l}$  der gewonnenen Proben wurden mit 400  $\mu\text{l}$  eiskaltem Acetonitril (Proteinfällung) und 25  $\mu\text{l}$  der internen Standardlösung (Morphin-d3, Endkonzentration: 50 ng/ml) versetzt, für 30 Sekunden gemischt und dann für 20 Minuten bei Raumtemperatur mittels Vakuumevaporation eingengt. Die nachfolgende Analyse erfolgte mit einer Agilent 1100 HPLC-Anlage gekoppelt an das API 4000 Massenspektrometer. Die chromatographische Trennung erfolgte mittels der Trennsäule XTerra MS C18 (2.1 x 100 mm) und isokratischer Elution (60 % Acetonitril, 40 % 5 mM Ammoniumacetat-Lösung, pH 3,8) bei einer Flussrate von 200  $\mu\text{l}/\text{min}$  und einem Injektionsvolumen von 10  $\mu\text{l}$ . Die massenspektrometrische Detektion erfolgte im positiven Ionisationsmodus, wobei die Massenübergänge (m/z) 286.3/151.9 für Morphin und 289.2/151.9 für Morphin-d3 verwendet wurden.

### **3.5 Statistische Auswertungen**

Zur Auswertung und graphischen Darstellung aller Versuche wurden die Softwareprogramme Microsoft Office Excel 2010 und Graph Pad Prism 5.0 genutzt.



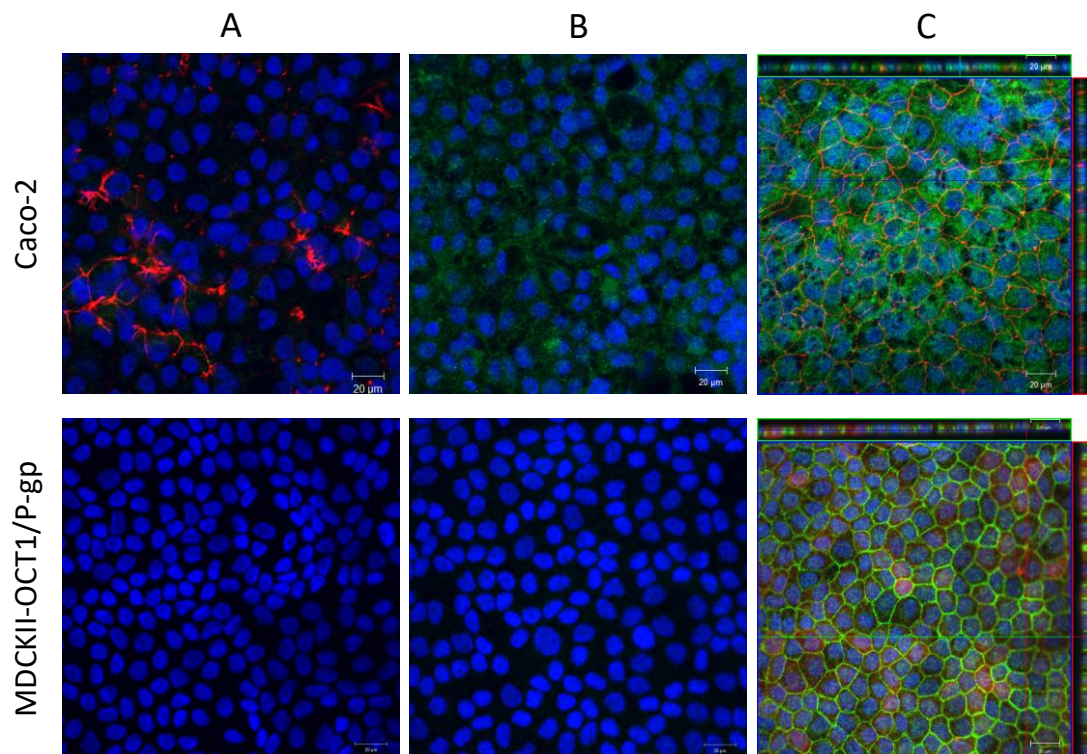
## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Untersuchungen mittels konfokaler Lasermikroskopie

Die Untersuchung der Lokalisation von OCT1 in Caco-2-Zellen wurde mittels Immunfluoreszenzfärbung im konfokalen Lasermikroskop durchgeführt, nachdem die optimalen Bindungskonditionen der verwendeten Antikörper zuvor experimentell definiert wurden. Die optimale Konzentration des Antikörpers gegen das humane OCT1 betrug 1:500 in Anwesenheit von 1 % BSA.

Parallel wurden als Kontrolle stabil transfizierte MDCKII-OCT1/P-gp-Zellen angefärbt und ausgewertet. Dabei zeigte sich, eine Lokalisation von P-gp in der apikalen sowie von OCT1 in der basolateralen Zellmembran (Abb. 11-C). Eine unspezifische Bindung der Antikörper konnte mittels einer geeigneten IgG-Isotypenkontrolle (Abb. 11-B) ausgeschlossen werden.

In Caco-2-Zellen konnte eine Expression von OCT1 nicht eindeutig nachgewiesen werden (Abb. 11-C), da auch die entsprechende Isotypenkontrolle eine zwar geringer ausgeprägte, jedoch deutliche Anfärbung aufwies (Abb. 11-B).



**Abb. 11:** Immunfluoreszenzfärbung von Caco-2- und MDCKII-OCT1/P-gp-Zellen im Vergleich: Zellkerne blau (A) Sekundärantikörperkontrolle (Alexa 488) (B) Isotypenkontrolle mittels IgG *rabbit* (C) Anfärbung von OCT1 (grün) und P-gp bzw. ZO1 (rot) - Maßstab 20 µm (Ergänzende Abbildungen im Anhang.)

## 4.2 Untersuchung des vektoriellen Transportes im Transwellassay

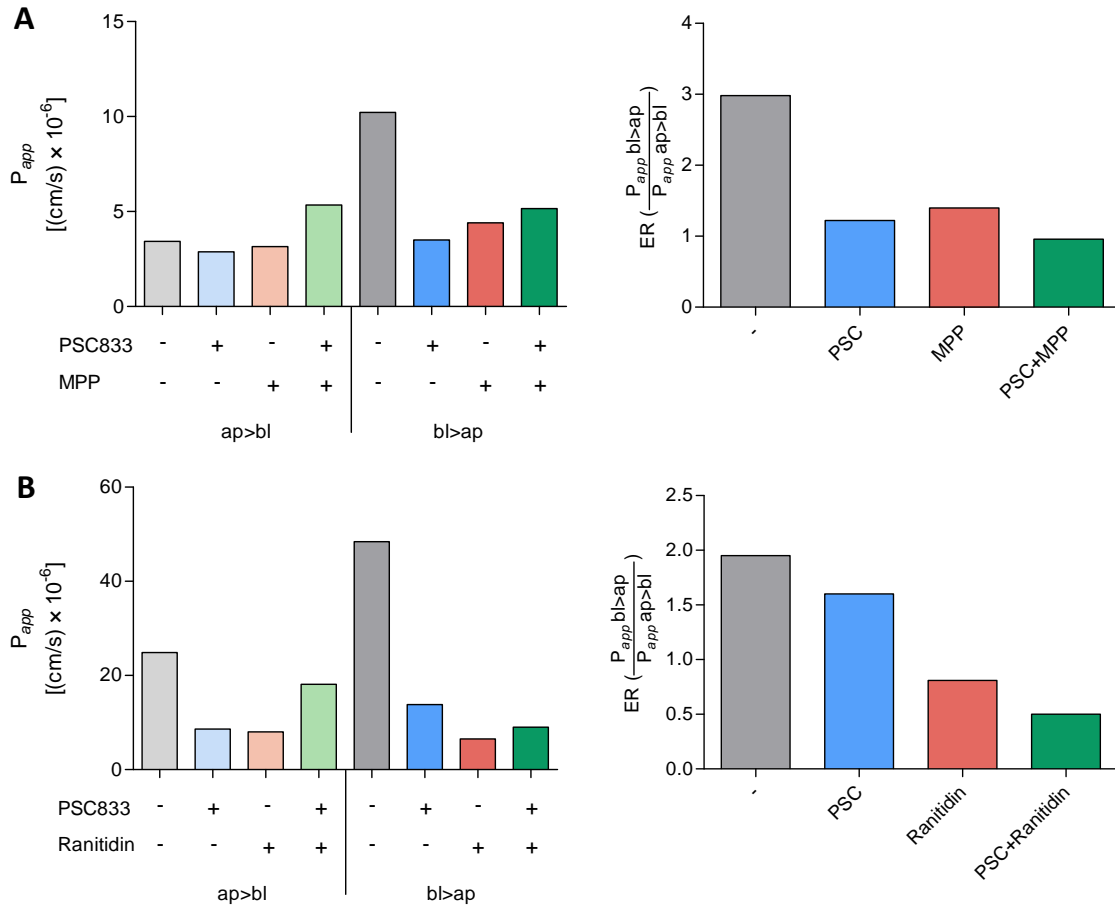
Im Transwellassay wurde mittels Morphin dessen vektorieller Transport über Caco-2- bzw. MDCKII-Monolayer bestimmt, um Rückschlüsse auf die Lokalisation und Expression von OCT1 ziehen zu können.

Dabei zeigte sich in den MDCKII-Zellen ein deutlich gerichteter Transport vom basolateralen zum apikalen Kompartiment ( $P_{app} ap>bl = 3,43$  bzw.  $24,86$  bei einem  $P_{app} bl>ap = 10,22$  bzw.  $48,41$  (Abb. 12-A und Abb. 12-B)), welcher sich durch die transporterspezifischen Inhibitoren PSC833 und Ranitidin bzw. MPP hemmen ließ (Abb. 13). Die *Efflux Ratio* (ER)  $bl>ap$  betrug dabei  $2,98 - 1,95$  (Abb. 12, Abb. 13).

In den Caco-2-Zellen hingegen konnte kein eindeutiges Ergebnis dargestellt werden (Abb. 14). Während sich zum Teil (Abb. 15-A) ein hemmbarer Transport von basolateral nach apikal zeigte (welcher auf eine basolaterale Lokalisation von OCT1 hindeuten würde), konnte ein eindeutig transportervermittelter Transport bei fehlender Inhibierbarkeit nicht nachgewiesen werden (Abb. 15-B und Abb. 15-C).

MDCKII-OCT1/P-gp	A		ER		B		ER
	$P_{app}$ $\left[ \left( \frac{cm}{s} \right) \times 10^{-6} \right]$		$\left( \frac{P_{app}(bl>ap)}{P_{app}(ap>bl)} \right)$		$P_{app}$ $\left[ \left( \frac{cm}{s} \right) \times 10^{-6} \right]$		
	ap>bl	bl>ap			ap>bl	bl>ap	
-	3,43	10,22	2,98		24,86	48,41	1,95
+PSC	2,88	3,51	1,22		8,65	13,83	1,60
+MPP/Ranitidin	3,16	4,40	1,39		8,00	6,51	0,81
+PSC +MPP/Ranitidin	5,34	5,15	0,96		18,11	9,00	0,50

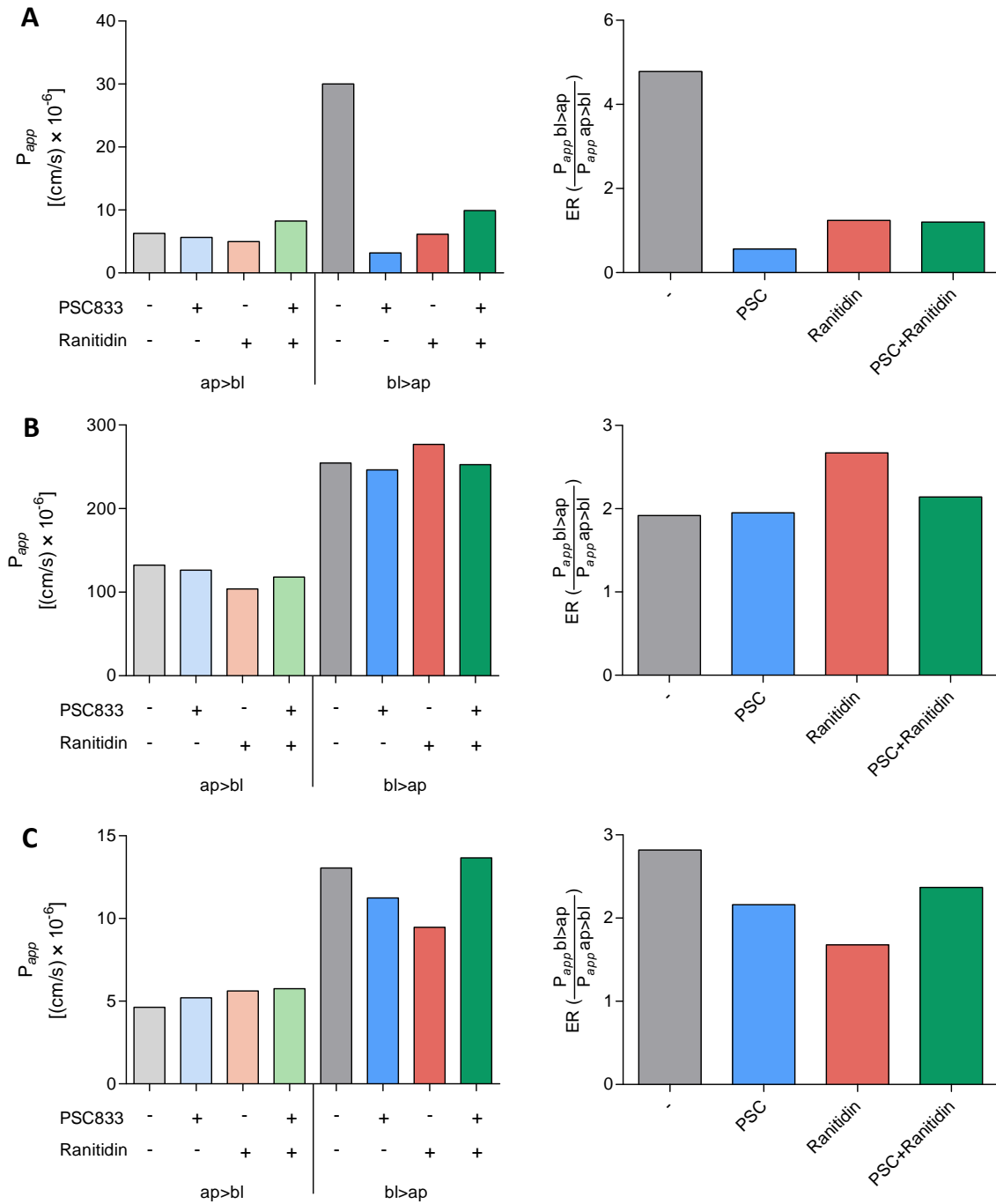
**Abb. 12:** Relative Permeabilitätswerte ( $P_{app}$ ) und *Efflux Ratio* (ER) von Morphin im Transwellassay über MDCKII-Doppeltransfektanten in An- bzw. Abwesenheit von PSC833 und/oder Ranitidin (oder MPP), jeweils im Duplikat, n=1



**Abb. 13:** Transwellassays des vektorialen Transportes von Morphin über einen MDCKII-Zell-Monolayer in An- bzw. Abwesenheit von PSC833 und/oder Ranitidin, jeweils im Duplikat, n=1;  $P_{app}$ -Werte und resultierende *Efflux Ratio* (ER)

Caco-2	A			B			C		
	$P_{app}$ [(cm/s) × 10 <sup>-6</sup> ]		ER	$P_{app}$ [(cm/s) × 10 <sup>-5</sup> ]		ER	$P_{app}$ [(cm/s) × 10 <sup>-6</sup> ]		ER
	ap>bl	bl>ap	$\left(\frac{P_{app}(bl>ap)}{P_{app}(ap>bl)}\right)$	ap>bl	bl>ap	$\left(\frac{P_{app}(bl>ap)}{P_{app}(ap>bl)}\right)$	ap>bl	bl>ap	$\left(\frac{P_{app}(bl>ap)}{P_{app}(ap>bl)}\right)$
-	6,27	30,00	4,78	13,24	25,45	1,92	4,63	13,05	2,82
+PSC	5,64	3,17	0,56	12,63	24,63	1,95	5,21	11,24	2,16
+Ranitidin	4,97	6,15	1,24	10,38	27,68	2,67	5,62	9,47	1,69
+PSC+Ranitidin	8,25	9,91	1,20	11,81	25,27	2,14	5,76	13,67	2,37

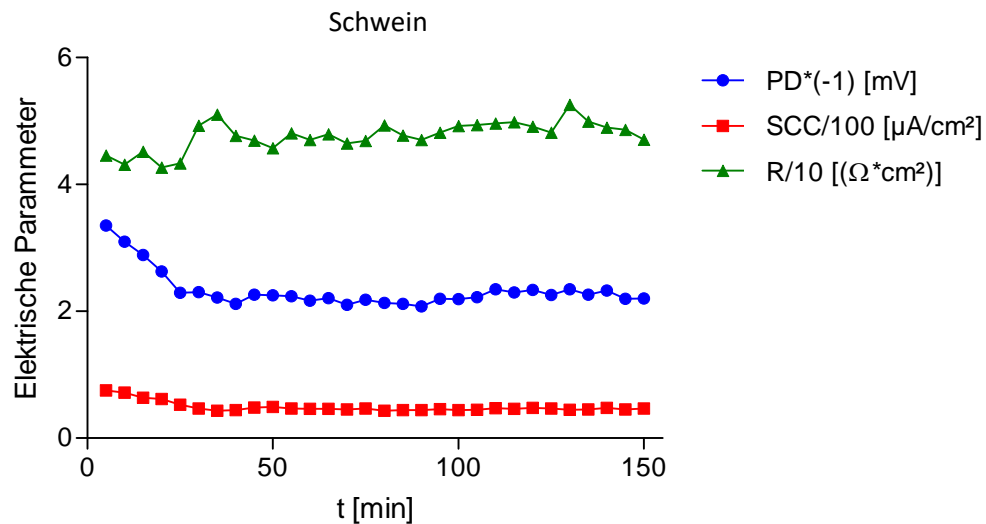
**Abb. 14:** Relative Permeabilitätswerte ( $P_{app}$ ) und *Efflux Ratio* (ER) von Morphin im Transwellassay über Caco-2-Zellen in An- bzw. Abwesenheit von PSC833 und/oder Ranitidin, jeweils im Duplikat, n=1



**Abb. 15:** Transwellassays des vektorialen Transportes von Morphin über einen Caco-2-Zell-Monolayer in An- bzw. Abwesenheit von PSC833 und/oder Ranitidin, jeweils im Duplikat, n=1;  $P_{app}$ -Werte und resultierende *Efflux Ratio* (ER)

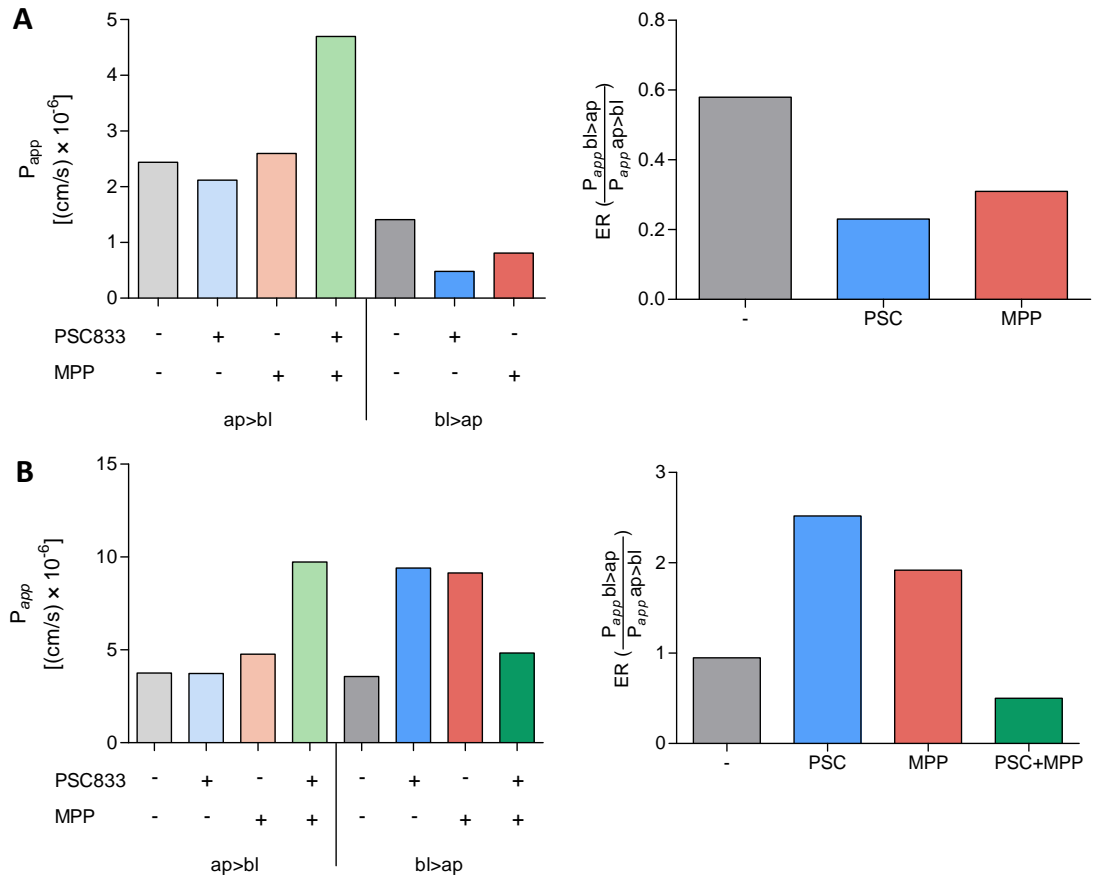
### 4.3 Untersuchung des vektoriellen Transportes in der Ussing-Kammer

Zur Feststellung der Vitalität und Eignung des verwendeten Darmgewebes wurden über die gesamte Versuchsdauer kontinuierlich die elektrophysiologischen Parameter (PD, SCC, R) gemessen und aufgezeichnet. Dabei zeigte sich sowohl bei humanem (Abb. 9), als auch porcinem (Abb. 16) Gewebe die gewünschte Stabilität der Parameter über einen Versuchszeitraum von 2,5 Stunden.

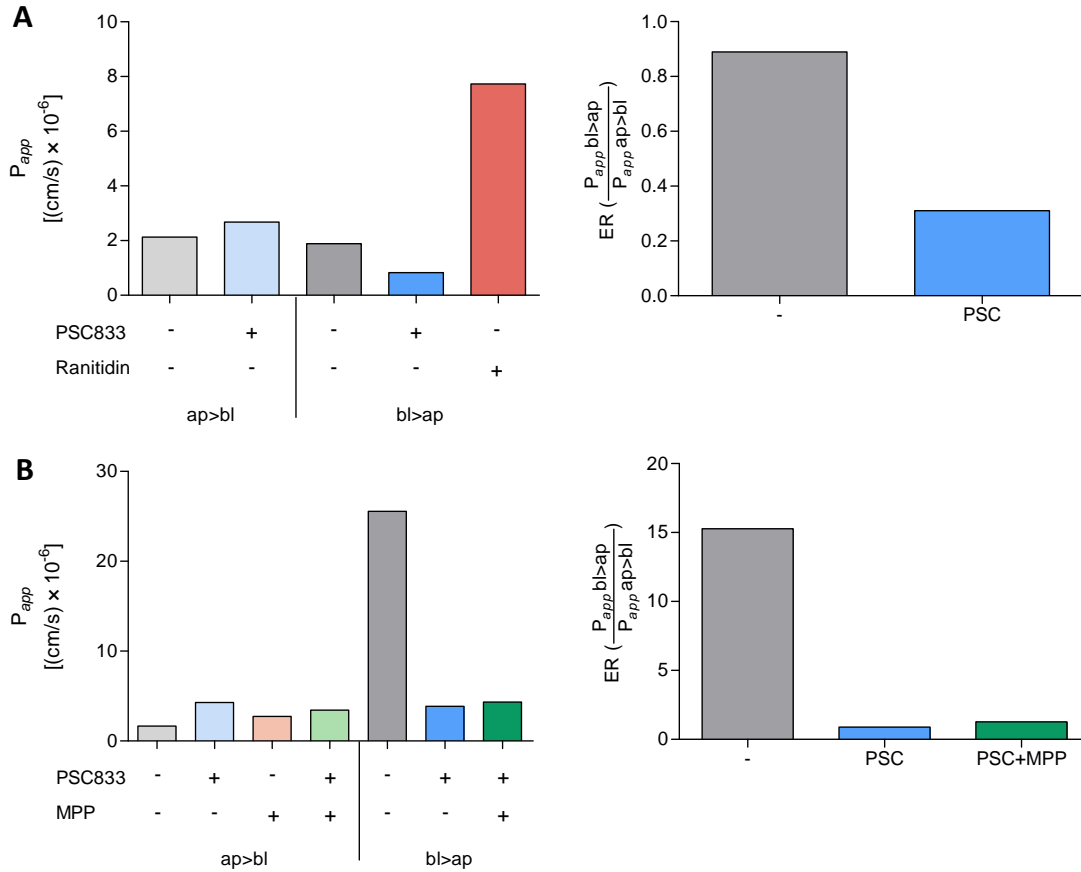


**Abb. 16:** Exemplarische Darstellung der elektrischen Parameter zur Überwachung der Viabilität porcinen jejunalen Gewebes in der Ussing-Kammer: Potentialdifferenz (PD, blau); Kurzschlussstrom (SCC, rot); Widerstand (R, grün)

Mit Ausnahme eines Versuches, bei dem sich ein gerichteter ap>bl-Transport von Morphin darstellen ließ (Abb. 17-A), konnte weder in humanem noch in porcinem intestinalen Gewebe ein gerichteter Transport von Morphin reproduzierbar nachgewiesen werden (Abb. 17-B, Abb. 18, Abb. 19). Des Weiteren zeigten auch die Inhibitoren PSC833 und Ranitidin bzw. MPP keinen eindeutigen Effekt auf das Transportverhalten von Morphin.



**Abb. 17:** Vektorieller Transport ( $P_{app}$ -Werte) von Morphin in der Ussing-Kammer unter Verwendung humanen intestinalen Gewebes in An- bzw. Abwesenheit von PSC833 und/oder MPP und die daraus resultierende *Efflux Ratio* ( $P_{app} bl>ap/P_{app} ap>bl$ ), n=1



**Abb. 18:** Vektorieller Transport ( $P_{app}$ -Werte) von Morphin in der Ussing-Kammer unter Verwendung porcinen intestinalen Gewebes in An- bzw. Abwesenheit von PSC833 und/oder MPP und die daraus resultierende *Efflux Ratio* ( $P_{app} \text{ bl>ap}/P_{app} \text{ ap>bl}$ ; rechts), n=1

	Mensch			Schwein		
	$P_{app}$ [( $\frac{\text{cm}}{\text{s}}$ ) × 10 <sup>-6</sup> ] ap>bl	$P_{app}$ [( $\frac{\text{cm}}{\text{s}}$ ) × 10 <sup>-6</sup> ] bl>ap	ER ( $\frac{P_{app} \text{ (bl>ap)}}{P_{app} \text{ (ap>bl)}}$ )	$P_{app}$ [( $\frac{\text{cm}}{\text{s}}$ ) × 10 <sup>-6</sup> ] ap>bl	$P_{app}$ [( $\frac{\text{cm}}{\text{s}}$ ) × 10 <sup>-6</sup> ] bl>ap	ER ( $\frac{P_{app} \text{ (bl>ap)}}{P_{app} \text{ (ap>bl)}}$ )
-	3,09 ± 0,93	2,49 ± 1,53	0,81	1,90 ± 0,32	13,73 ± 16,74	7,23
+PSC	2,93 ± 1,14	4,95 ± 6,32	1,69	3,48 ± 1,14	2,35 ± 2,14	0,68
+MPP/Ranitidin	3,68 ± 1,54	4,98 ± 5,90	1,35	2,74	7,73	2,82
+PSC +MPP/Ranitidin	7,22 ± 3,55	4,83	0,67	3,43	4,35	1,27

**Abb. 19:** Relative Permeabilitätswerte ( $P_{app}$ ) und *Efflux Ratio* (ER) von Morphin in der Ussing-Kammer unter Verwendung humanen und porcinen intestinalen Gewebes in An- bzw. Abwesenheit von PSC833 und/oder Ranitidin (oder MPP), n=1

## 5 DISKUSSION

Die Expression und Lokalisation von Transportproteinen im Gastrointestinaltrakt ist maßgeblich an der Absorption und Elimination von oral verabreichten Arzneistoffen beteiligt und somit letztlich für deren Bioverfügbarkeit verantwortlich. Obwohl zahlreiche Untersuchungen hinsichtlich der Lokalisation und des Ausmaßes der Expression der bekannten Arzneistofftransporter durchgeführt wurden, gibt es vereinzelt noch Uneinigkeit über die Integrität der ermittelten Ergebnisse. Im Vergleich zu den Transportprozessen in Leber und Niere konnten beispielsweise die im intestinalen Epithel vorkommenden Transportproteine bisher nur unzureichend charakterisiert werden [67]. Hierbei ist vor allem ihre Lokalisation in der apikalen bzw. basolateralen Membran der Zelle entscheidend, da durch diese die charakteristische Funktion der Transportproteine determiniert wird. Außerdem werden die pharmakokinetischen Prozesse (Resorption, Distribution, Metabolisierung und Elimination) durch die organspezifische Expression der Transporter beeinflusst [68].

Diese bedingt vor allem Arzneimittelneben- und -wechselwirkungen, denn eine Induktion bzw. Inhibition der Transportproteine kann einen bedeutenden Einfluss auf die Serumspiegel ihrer Substrate haben [69]. Dadurch kann es vorkommen, dass entweder die Sicherheit (aufgrund toxischer Serumkonzentrationen) oder die Wirksamkeit (aufgrund von Konzentrationen unterhalb der effektiven Serumspiegel) nicht mehr gegeben ist. Hierbei stehen vor allem die OCTs und OATPs, sowie die Effluxtransporter P-gp und BCRP im Fokus, da sie im Vergleich mit anderen Transportproteinen die größte Quantität im menschlichen Körper aufweisen [70].

Eine weitere klinisch relevante Konsequenz, die sich aus den Eigenschaften von Transportproteinen ergibt, ist die hohe pharmakokinetische Variabilität ihrer Substrate. Eine häufig diskutierte Ursache hierfür sind genetische Polymorphismen, die durch unterschiedlich starke Substrataffinitäten bedeutende interindividuelle Differenzen im Ansprechen auf bestimmte Wirkstoffe bedingen [27; 71].

Intestinale Aufnahmetransporter sind in der Lage nicht diffusionsfähige Stoffe entweder aus der Blutbahn (basolaterale Lokalisation) oder aus dem Darmlumen (apikale Lokalisation) über die Zellmembran in die Enterozyten aufzunehmen.



Apikal gelegene Effluxtransporter können entsprechend die intestinale Absorption reduzieren, indem sie die zuvor in die Enterozyten aufgenommenen Substanzen aus dem Zellinneren (zurück) in das Darmlumen befördern (z.B. P-gp). Basolateral lokalisierte Effluxtransporter hingegen können Arzneistoffe aus den Enterozyten dem portalen Kreislauf zuführen und somit als funktionale Aufnahmetransporter für den vektoriiellen Transport vom Darmlumen in Richtung des Pfortadersystems fungieren (z.B. MRP3) [1].

Das umfangliche Wissen über Expression, Regulation und Lokalisation, sowie die detaillierte Charakterisierung der an der intestinalen Absorption beteiligten Membrantransporter ist demnach von zentraler Bedeutung für die gezielte Entwicklung zukünftiger Arzneistoffe bzw. das bessere Verständnis der intestinalen Absorptionsprozesse insgesamt. In diesem Bereich können durch umfassende pharmakokinetische Kenntnis der jeweiligen Transporter, vor allem die orale Bioverfügbarkeit sowie das *targeting* optimiert und die Toxizität von Arzneistoffen limitiert werden [1]. Praktisch wird dies heute bereits für den Peptidtransporter PEPT1 umgesetzt, wodurch die Absorption spezifisch entwickelter *Prodrugs* z.B. Valacyclovir oder Cefuroxim-axetil erheblich verbessert werden konnte [72]. Daher war das Ziel der vorliegenden Arbeit die Lokalisation von OCT1 in der Enterozytenmembran mit Hilfe immunhistochemischer Verfahren und Methoden der Transporterpharmakologie festzustellen.

Aufgrund widersprüchlicher und nur spärlicher Literaturangaben zur Lokalisation von OCT1 in der Enterozytenmembran [51; 55] sollte im Rahmen dieser Arbeit mittels unterschiedlicher Methoden eine richtungsweisende Aussage hierzu getroffen werden. Allerdings ist es bis heute nicht gelungen, humane Enterozyten nach Isolation dauerhaft zu kultivieren. Daher wurden stattdessen, den Enterozyten ähnliche Caco-2-Zellen [73] als Zellmodell verwendet und unter anderem mittels Immunfluoreszenzfärbung untersucht. Die Kontrollzelllinie (MDCKII-OCT1/P-gp) lässt in der konfokalen Lasermikroskopie eine deutliche basolaterale Expression von OCT1 erkennen (Abb. 11-C), während sich in den Caco-2-Zellen lediglich eine diffuse Anfärbung zeigt (Abb. 11-C). Aufgrund der ebenfalls positiven Isotypenkontrolle (Abb. 11-B) muss davon ausgegangen werden, dass der verwendete Antikörper, anders als in den MDCKII-OCT1/P-gp-Zellen, hier lediglich an unspezifische Proteine bindet, nicht aber an OCT1. Eine mögliche Ursache hierfür könnte das Fehlen des Kationentransporters in den Caco-2-Zellen darstellen. Diese Annahme

würde auch die Ergebnisse einer Untersuchung mittels *targeted proteomics* durch Brück *et al.* untermauern, die besagen, dass Caco-2-Zellen keine signifikante OCT1-Expression aufweisen [73]. Aufgrund dieser Datenlage sollten Caco-2-Zellen nicht als *in vitro*-Modell zur Betrachtung der Transporter-Expression und Funktion in Enterozyten dienen, was auch durch andere Untersuchungen bestätigt wurde [74; 75]. Im Gegensatz dazu wurde dies in der Vergangenheit jedoch häufig getan [55], was möglicherweise in Fehlinterpretationen resultierte.

Es konnte mittels der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Antikörper weder eine eindeutig apikale, noch basolaterale Expression von OCT1 in Caco-2-Zellen dargestellt und somit die aus der Literatur bekannten Daten weder bestätigt, noch widerlegt werden.

Da die Möglichkeit zu bestehen scheint, dass OCT1 in Caco-2-Zellen in keinem signifikanten Ausmaß vorliegt, muss zwingend infrage gestellt werden, ob Caco-2-Zellen ein geeignetes Zellmodell für Enterozyten darstellen. Die Beantwortung dieser Frage bedarf jedoch weiterer Untersuchungen.

Anstatt OCT1 im Zellmodell immunhistochemisch zu untersuchen, besteht die Möglichkeit den Transporter in fixierten intestinalen Gewebeschnitten anzufärben. Aufgrund der kurzen Laufzeit und des limitierten Zugriffs auf entsprechende Gewebeproben konnte dies im Rahmen dieser Arbeit allerdings nicht verwirklicht werden. Es sollte jedoch als Anstoß für weitere Untersuchungen in Betracht gezogen werden, ob dies eine geeignetere Methode darstellt, um die Lokalisation von OCT1 in Enterozyten zu bestimmen.

Im Allgemeinen stellt die Immunfluoreszenzfärbung bei korrekter Anwendung eine durchaus geeignete Methode zur visuellen Darstellung der Lokalisation von Transportproteinen dar [5]. Die erhobenen Daten sollten jedoch stets mit Ergebnissen anderer etablierter Methoden untermauert werden.

Eine solche Methode stellt der hier angewendete Transwellassay dar. Durch die Bestimmung des vektorialen transzellulären Transportes und die Charakterisierung des Einflusses spezifischer Inhibitoren, können indirekt Rückschlüsse auf die Einbindung der beteiligten Transportproteine gezogen werden [76]. Dieser transepitheliale Netto-Flux wird durch die Diffusion in beide Richtungen, die Aktivität eines oder mehrerer Transportsysteme sowie durch die intrazelluläre Akkumulation und Metabolisierung des jeweiligen Testsubstrates bestimmt. Er wird als Permeabilitätskoeffizient

( $P_{app}$ ) in  $\frac{\text{cm}}{\text{s}}$  angegeben.

Die im Rahmen dieser Studie mittels Transwellassay erhobenen Daten zeigen in den MDCKII-Zellen einen hemmbaren gerichteten Transport vom basolateralen zum apikalen Kompartiment. Bei einer *Efflux Ratio* (ER)  $\text{bl} > \text{ap}$  von durchschnittlich 2,5 (Abb. 12), bestätigt dies funktionell die bekannte basolaterale Lokalisation von OCT1 in unserer Kontroll-Zelllinie.

In den Caco-2-Zellen konnte kein signifikantes Ergebnis erzeugt werden. Die Resultate des ersten Versuchs zeigen (Abb. 15-A) einen deutlich hemmbaren Transport von basolateral nach apikal. Dies deutete zunächst auch hier auf eine basolaterale Lokalisation von OCT1 hin. In den darauffolgenden Versuchen konnten diese Ergebnisse jedoch nicht reproduziert werden, da hier ein eindeutig transporter-vermittelter Transport bei fehlender Inhibierbarkeit nicht nachzuweisen war (Abb. 15-B und Abb. 15-C).

Aufgrund der widersprüchlichen Befunde der einzelnen Versuche lässt sich keine abschließende Aussage zur Lokalisation von OCT1 treffen. Wie bereits zuvor angemerkt ist die Eignung der Caco-2-Zellen als Zellmodell für die Untersuchung von OCT1 als fraglich anzusehen, da die Möglichkeit der fehlenden Expression des Kationentransporters besteht [73]. Diese Tatsache könnte eine mögliche Erklärung für die Schwierigkeiten bei der Untersuchung im Transwellassay darstellen. Eine weitere mögliche experimentelle Fehlerquelle stellen bisher bekannte intestinale Kationentransporter (z.B. OCT3 in der apikalen Membran) bzw. unbekannte Transportproteine dar, die ebenfalls in den Transport von Morphin eingebunden sind [51].

Generell sollten die im Transwellassay gewonnenen Ergebnisse stets kritisch betrachtet werden. Zwar können die verwendeten Zellmodelle grundsätzlich dazu genutzt werden, um erste Hinweise auf die Zusammenhänge zwischen Transportproteinen und deren Substraten zu generieren. Es sollte dabei jedoch stets bedacht werden, dass die Übertragbarkeit der *in vitro* gewonnenen Erkenntnisse gewissen Limitationen unterliegt. *In vitro*-Methoden sind immer außerhalb des physiologischen Kontextes einzuordnen, da in der Regel lediglich Teilprozesse untersucht werden können [66; 77]. Komplexe Abläufe und Prozesse lassen sich oft nicht naturgetreu abbilden, da zahlreiche Einflussgrößen nicht in die Untersuchungen mit einfließen. Beispiele hierfür sind lokaler Blutfluss, die Anwesenheit solubilisierender Gallensalze bzw. intestinalen Mukus, physiologische pH-Gegebenheiten und parallel ablaufende Prozesse des intestinalen Metabolismus

und/oder Transports [1]. Dadurch ist die Vergleichbarkeit mit der tatsächlichen *in vivo*-Situation und somit die Aussagekraft der Ergebnisse deutlich einschränkt. Dies bedingt die Notwendigkeit weiterer *in vitro*-Versuche, deren Ergebnisse kritisch miteinander verglichen werden müssen. Aufgrund dessen wurde im Rahmen dieser Promotionsarbeit die Ussing-Kammer als zusätzliches Modell herangezogen.

Untersuchungen mit der Ussing-Kammer erlauben es *ex vivo* den Transport von Testsubstanzen, über Membranen zu erforschen. Ein Vorteil hierbei ist es, dass prinzipiell jede beliebige Membran untersucht werden kann und das System nicht lediglich auf spezifische Gewebe limitiert ist [64]. Somit ermöglicht es realistischere Aussagen zur Pharmakokinetik *in vivo*. Die Verwendung vitalen Gewebes stellt im Vergleich zu anderen *in vitro*-Methoden potenzielle Stärke der Ussing-Kammer dar. Intakte *ex vivo*-Mukosa weist physiologische Mengen sämtlicher in Enterozyten vorkommender Enzyme und Transportproteine auf. Kein anderes *in vitro*-Modell ist in der Lage den intestinalen Metabolismus und die Zusammenhänge der biorelevanten Transportprozesse so realitätsnah abzubilden, wie die Ussing-Kammer [78]. In die Interpretation der Daten muss daher ein potenzieller *First-Pass*-Effekt (durch Konjugation oder enzymatischen Abbau) unbedingt mit eingezogen werden [66].

Gleichzeitig stellt die Verwendung vitalen Gewebes eine klare Limitation der Ussing-Kammer dar. Hier handelt es sich nicht um ein starres System, mit dem Ergebnisse zuverlässig reproduziert werden können. Aufgrund eines komplizierten, störanfälligen Versuchsaufbaus und einer vermutlich hohen Variabilität zwischen den einzelnen Gewebeproben ist die Erhebung signifikanter Daten und Messwerte nur eingeschränkt möglich [79]. Die Vitalität des verwendeten Gewebes wird bei dieser Methode durch relativ konstante elektrische Parameter beschrieben, für die jedes Labor eigene speziesabhängige Grenzwerte definiert. Mit fortschreitender Versuchsdauer sinkt die Viabilität der Membran, was sich in einer Änderung des PD-Wertes, sowie des elektrischen Widerstandes äußert. Erfahrungswerte haben gezeigt, dass für Transportexperimente in der Ussing-Kammer ein Zeitfenster von etwa zwei Stunden zur Verfügung steht [79].

Die Kalkulation der  $P_{app}$ -Werte wurde auf Grundlage einer stetigen Zunahme der Wirkstoffkonzentration innerhalb des festgelegten Zeitintervalls durchgeführt.

Die vorliegenden Ergebnisse der Untersuchungen in der Ussing-Kammer zum transepithelialen Transport von Morphin sind widersprüchlich. Es ergaben sich sowohl in porcinem als auch in humanem Gewebe keine Hinweise auf einen eindeutigen vektoriellen Transport über die Enterozytenmembran. Auch die eingesetzten Inhibitoren ließen keinen signifikanten Effekt erkennen. Die z.T. hohen Standardabweichungen zeigen, dass es große Schwankungen innerhalb der Versuchsreihen gab.

Aufgrund der fehlenden Konsistenz der Daten lässt sich keine klare Aussage zur Lokalisation von OCT1 in humanen oder porcinen Enterozyten formulieren. Angesichts der aktuellen Datenlage ist auch keine Tendenz erkennbar.

Des Weiteren ist zu berücksichtigen, dass für die Versuche in der Ussing-Kammer Darmgewebe unterschiedlicher Patienten und Tiere verwendet wurde (verschiedene Schweinerassen, Geschlechter, Alter). Naheliegend ist, dass die Expression und Aktivität von OCT1 einer erheblichen interindividuellen Variabilität auch innerhalb einer Spezies unterliegt [71]. Anzustreben wäre daher eine zusammenhängende Versuchsreihe mit vergleichbaren Gewebeproben eines einzelnen Individuums.

Eine deutliche Limitation stellte die begrenzte Laufzeit der Datenerhebung, sowie die beschränkte Verfügbarkeit von humanem Darmgewebe dar, was lediglich eine geringe Versuchszahl ermöglichte.

Für zukünftige Untersuchungen in der Ussing-Kammer sollte ein *Monitoring* des pH-Wertes in beiden Kompartimenten über die Gesamtdauer des Versuches in Betracht gezogen werden. *In vivo* wird sowohl im Blut als auch im Darmlumen ein relativ konstanter pH aufrecht erhalten. Zwar wurde bisher der pH-Wert vor Versuchsbeginn möglichst genau auf 6,5 bzw. 7,4 eingestellt, (größere) pH-Schwankungen im Verlauf können so jedoch nicht ausgeschlossen werden. In diesem Fall wird möglicherweise die Transportaktivität von OCT1 oder das Diffusionsverhalten von Morphin [38] und Ranitidin beeinflusst. Eine Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die *in vivo*-Situation wäre somit nicht gegeben. In diesem Zusammenhang müssen auch die nicht unwesentlichen Limitationen von Morphin als genutztes Referenzsubstrat erwähnt werden. Im Gegensatz zu einem idealen Transportersubstrat, welches möglichst keine passive Diffusion und Biotransformation aufweist, unterliegt Morphin einem ausgeprägten Metabolismus durch das Phase-II-Enzym UGT2B7, welches auch im menschlichen und porcinen Intestinum, nicht aber in Caco-2- oder MDCKII-Zellen exprimiert wird [80]. Lediglich die protonierte

Form des Morphins scheint hierbei ein OCT1-Substrat zu sein. Die freie Base unterliegt jedoch aufgrund ihrer merklichen Lipophilie ( $\log P$  0,9) und moderaten Basizität ( $pK_a$  8,2) einer gewissen freien Diffusion [81]. Zudem ist dieser Prozess aufgrund der gegebenen pH-Unterschiede (pH 6,5 im apikalen vs. pH 7,4 im basolateralen Kompartiment) auch im basolateralen Kompartiment bevorzugt und kann die errechnete *Efflux-Ratio* entsprechend verzerren [38].

Des Weiteren ist Morphin auch ein Substrat von P-gp [82], was erheblichen Einfluss auf die intestinale Absorption haben kann.

Zukünftige Untersuchungen sollten daher Substanzen bevorzugen, welche diese Limitation möglichst nicht aufweisen wie bspw. Butylscopolamin, Trospium oder Sulpirid [38].

Abschließend kann festgehalten werden, dass die erhobenen Daten zur Lokalisation und Funktion von OCT1 mittels Morphin keine eindeutige Aussage zur exakten Lokalisation von OCT1 im Intestinum zulassen. Interessanterweise konnte auch in zahlreichen klinischen Studien keine Interaktion zwischen oral appliziertem Morphin und anderen OCT1-Substraten bzw. Hemmstoffen gezeigt werden. Somit erscheint insbesondere eine apikale Lokalisation von OCT1 fraglich, was auch Expressionsdaten und funktionellen Befunden in tierexperimentellen Studien entspricht [38].

## 6 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Die Sicherheit und Wirksamkeit der Arzneimitteltherapie wird maßgeblich von Transportproteinen beeinflusst. Die zelluläre Lokalisation von Transportern hat hierbei wesentlichen Einfluss darauf, ob diese als funktionelle Aufnahme- oder Effluxtransporter fungieren. Für den menschlichen Darm ist die Lokalisation einiger Transporter noch unklar. Ein Beispiel hierfür ist der *organic cation transporter* (OCT1), welcher für die intestinale Aufnahme zahlreicher kationischer Arzneistoffe, wie beispielsweise Morphin verantwortlich gemacht wird [83]. Bisher gibt es allerdings widersprüchliche Aussagen über die exakte Lokalisation dieses Transporters in der Zellmembran von Enterozyten. Folglich ist die tatsächliche Bedeutung dieses Proteins für die Absorption von Arzneistoffen bis heute ungeklärt [49; 51; 52; 56].

Daher war das Ziel dieser Arbeit die Expression, Lokalisation und Funktion von OCT1 in Enterozyten anhand verschiedener labortechnischer Methoden näher zu charakterisieren. Mittels Immunfluoreszenzfärbung wurde versucht die Lokalisation von OCT1 im Zellmodell zu bestimmen. Ebenfalls im Zellmodell erfolgte die Untersuchung des vektoriellen Transportes von Morphin mittels Transwellassay. Diese, sowie entsprechende Analysen vitalen intestinalen Gewebes in der Ussing-Kammer, wurden genutzt, um indirekt Rückschlüsse auf die Transporterlokalisierung zu ziehen.

Trotz eindeutiger und der Hypothese entsprechender Expression und Funktion in MDCKII-OCT1/P-gp-Zellen, konnten im Rahmen dieser Arbeit keine eindeutigen Ergebnisse bezüglich der Lokalisation von OCT1 in Caco-2-Zellen generiert werden.

Caco-2-Zellen sollten als Zellmodell für Enterozyten, insbesondere hinsichtlich der Charakterisierung von OCT1, neu bewertet werden, da aktuellen Erkenntnissen entsprechend möglicherweise keine signifikante Expression von OCT1 in diesen Zellen vorliegt. Auch das genutzte OCT1-Modellsubstrat Morphin ist möglicherweise problematisch. Es ist darauf hinzuweisen, dass es sich bei den vorliegenden Daten aufgrund der geringen Versuchszahl nur um vorläufige Ergebnisse handeln kann, welche in zukünftigen Arbeiten verifiziert werden sollten.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die vorliegende Arbeit zwar keine neuen Erkenntnisse bezüglich der Lokalisation von OCT1 in Enterozyten erbringen konnte, jedoch die Bedeutung eines kritischen Umgangs mit etablierten Methoden und deren Ergebnissen unterstreicht.

## LITERATURVERZEICHNIS

- [1] **Wehling, M.** et al. [Hrsg.] (2011) *Klinische Pharmakologie: 256 Tabellen*. 2. Aufl. Stuttgart: Thieme.
- [2] **Masaoka, Y.** et al. (2006) *Site of drug absorption after oral administration: assessment of membrane permeability and luminal concentration of drugs in each segment of gastrointestinal tract* in: *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* 29, 3-4, pp. 240–250. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2006.06.004>
- [3] **Drozdik, M.** et al. (2019) *Protein Abundance of Clinically Relevant Drug Transporters in the Human Liver and Intestine: A Comparative Analysis in Paired Tissue Specimens* in: *Clinical pharmacology and therapeutics* 105, Nr. 5, pp. 1204–1212. <https://doi.org/10.1002/cpt.1301>
- [4] **Fritz, A.** et al. (2019) *Expression of clinically relevant drug-metabolizing enzymes along the human intestine and their correlation to drug transporters and nuclear receptors: An intra-subject analysis* in: *Basic & clinical pharmacology & toxicology* 124, Nr. 3, pp. 245–255. <https://doi.org/10.1111/bcpt.13137>
- [5] **Alberts, B.** et al. (2017) *Molekularbiologie der Zelle*. 6. Aufl. Weinheim: Wiley-VCH.
- [6] **Ciarimboli, G.** (2008) *Organic cation transporters* in: *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems* 38, 7-8, pp. 936–971. <https://doi.org/10.1080/00498250701882482>
- [7] **Heinrich, P. C.** et al. (2014) *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. 9. Aufl. Berlin: Springer.
- [8] **Schartl, M.**; Gessler, M.; Eckardstein, A. v. (2013) *Biochemie und Molekularbiologie des Menschen*. s.l.: Urban Fischer Verlag - Lehrbücher.
- [9] **Vasiliou, V.**; Vasiliou, K.; Nebert, D. W. (2009) *Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family* in: *Human Genomics* 3, Nr. 3, pp. 281–290. <https://doi.org/10.1186/1479-7364-3-3-281>
- [10] HUGO Gene Nomenclature Committee (27.08.2021) *Gene group: ATP binding cassette subfamily B (ABCB)* [online]. HGNC.



- [11] **Mutschler, E.** et al. (2013) *Mutschler Arzneimittelwirkungen – Lehrbuch der Pharmakologie, der klinischen Pharmakologie und Toxikologie : mit einführenden Kapiteln in die Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie*. 10. Aufl. Stuttgart: WVG Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.
- [12] **Dean, M.;** Rzhetsky, A.; Allikmets, R. (2001) *The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily* in: *Genome research* 11, Nr. 7, pp. 1156–1166. <https://doi.org/10.1101/gr.184901>
- [13] **Collett, A.** et al. (1999) *Modulation of the permeability of H2 receptor antagonists cimetidine and ranitidine by P-glycoprotein in rat intestine and the human colonic cell line Caco-2* in: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 288, Nr. 1, pp. 171–178.
- [14] **Eckford, P. D. W.;** Sharom, F. J. (2009) *ABC efflux pump-based resistance to chemotherapy drugs* in: *Chemical reviews* 109, Nr. 7, pp. 2989–3011. <https://doi.org/10.1021/cr9000226>
- [15] **Kim, R. B.** (2002) *Drugs as P-glycoprotein substrates, inhibitors, and inducers* in: *Drug metabolism reviews* 34, 1-2, pp. 47–54. <https://doi.org/10.1081/DMR-120001389>
- [16] **Li, M.** et al. (2017) *P-gp activity and inhibition in the different regions of human intestine ex vivo* in: *Biopharmaceutics & drug disposition* 38, Nr. 2, pp. 127–138. <https://doi.org/10.1002/bdd.2047>
- [17] **Hediger, M. A.** et al. (2013) *The ABCs of membrane transporters in health and disease (SLC series): introduction* in: *Molecular aspects of medicine* 34, 2-3, pp. 95–107. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.12.009>
- [18] HUGO Gene Nomenclature Committee (27.08.2021) *Gene group: Solute carriers (SLC)* [online]. HGNC.
- [19] **Lai, R. E.;** Jay, C. E.; Sweet, D. H. (2018) *Organic solute carrier 22 (SLC22) family: Potential for interactions with food, herbal/dietary supplements, endogenous compounds, and drugs* in: *Journal of food and drug analysis* 26, 2S, S45-S60. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2018.03.002>

- [20] **Jonker, J. W.;** Schinkel, A. H. (2004) *Pharmacological and physiological functions of the polyspecific organic cation transporters: OCT1, 2, and 3 (SLC22A1-3)* in: The Journal of pharmacology and experimental therapeutics 308, Nr. 1, pp. 2–9. <https://doi.org/10.1124/jpet.103.053298>
- [21] **Koepsell, H. (2011)** *Substrate recognition and translocation by polyspecific organic cation transporters* in: Biological chemistry 392, 1-2, pp. 95–101. <https://doi.org/10.1515/BC.2011.009>
- [22] **Nigam, S. K. (2018)** *The SLC22 Transporter Family: A Paradigm for the Impact of Drug Transporters on Metabolic Pathways, Signaling, and Disease* in: Annual review of pharmacology and toxicology 58, pp. 663–687. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010617-052713>
- [23] **Koepsell, H. (2013)** *The SLC22 family with transporters of organic cations, anions and zwitterions* in: Molecular aspects of medicine 34, 2-3, pp. 413–435. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.10.010>
- [24] **You, G. (2004)** *The role of organic ion transporters in drug disposition: an update* in: Current drug metabolism 5, Nr. 1, pp. 55–62.
- [25] **Roth, M.;** Obaidat, A.; Hagenbuch, B. (2012) *OATPs, OATs and OCTs: the organic anion and cation transporters of the SLCO and SLC22A gene superfamilies* in: British Journal of Pharmacology 165, Nr. 5, pp. 1260–1287. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01724.x>
- [26] **Nies, A. T. et al. (2011)** *Organic cation transporters (OCTs, MATEs), in vitro and in vivo evidence for the importance in drug therapy* in: Handbook of experimental pharmacology, Nr. 201, pp. 105–167. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-14541-4\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-642-14541-4_3)
- [27] **Seitz, T. et al. (2015)** *Global genetic analyses reveal strong inter-ethnic variability in the loss of activity of the organic cation transporter OCT1* in: Genome medicine 7, Nr. 1, p. 56. <https://doi.org/10.1186/s13073-015-0172-0>
- [28] **Nies, A. T. et al. (2008)** *Vectorial transport of the plant alkaloid berberine by double-transfected cells expressing the human organic cation transporter 1 (OCT1, SLC22A1) and the efflux pump MDR1 P-glycoprotein (ABCB1)* in: Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology 376, Nr. 6, pp. 449–461. <https://doi.org/10.1007/s00210-007-0219-x>

- [29] **Nishimura, M.;** Naito, S. (2005) *Tissue-specific mRNA Expression Profiles of Human ATP-binding Cassette and Solute Carrier Transporter Superfamilies* in: Drug Metabolism and Pharmacokinetics 20, H. 6, S. 452–477. <https://doi.org/10.2133/dmpk.20.452>
- [30] **Meyer-Wentrup, F.** et al. (1998) *Membrane localization of the electrogenic cation transporter rOCT1 in rat liver* in: Biochemical and biophysical research communications 248, Nr. 3, pp. 673–678. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.9034>
- [31] **Gorboulev, V.** et al. (1997) *Cloning and characterization of two human polyspecific organic cation transporters* in: DNA and cell biology 16, Nr. 7, pp. 871–881. <https://doi.org/10.1089/dna.1997.16.871>
- [32] **Tzvetkov, M. V.** et al. (2009) *The effects of genetic polymorphisms in the organic cation transporters OCT1, OCT2, and OCT3 on the renal clearance of metformin* in: Clinical pharmacology and therapeutics 86, Nr. 3, pp. 299–306. <https://doi.org/10.1038/clpt.2009.92>
- [33] **Gründemann, D.** et al. (1994) *Drug excretion mediated by a new prototype of polyspecific transporter* in: Nature 372, H. 6506, S. 549. <https://doi.org/10.1038/372549a0>
- [34] **Zhang, L.** et al. (1997) *Cloning and functional expression of a human liver organic cation transporter* in: Molecular pharmacology 51, Nr. 6, pp. 913–921. <https://doi.org/10.1124/mol.51.6.913>
- [35] **Green, R. M.** et al. (1999) *Cloning and functional expression of a mouse liver organic cation transporter* in: Hepatology (Baltimore, Md.) 29, Nr. 5, pp. 1556–1562. <https://doi.org/10.1002/hep.510290530>
- [36] **Franke, R. M.;** Gardner, E. R.; Sparreboom, A. (2010) *Pharmacogenetics of drug transporters* in: Current pharmaceutical design 16, Nr. 2, pp. 220–230.
- [37] **Moaddel, R.** et al. (2007) *Pharmacophore modelling of stereoselective binding to the human organic cation transporter (hOCT1)* in: British Journal of Pharmacology 151, Nr. 8, pp. 1305–1314. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707341>
- [38] **Wenzel, C.;** Drozdik, M.; Oswald, S. (2021) *Organic Cation Transporter 1 an Intestinal Uptake Transporter: Fact or Fiction?* in: Frontiers in Pharmacology 12, p. 648388. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.648388>

- [39] **Koepsell, H. (2020)** *Organic Cation Transporters in Health and Disease* in: *Pharmacological Reviews* 72, Nr. 1, pp. 253–319. <https://doi.org/10.1124/pr.118.015578>
- [40] **Ahlin, G. et al. (2008)** *Structural requirements for drug inhibition of the liver specific human organic cation transport protein 1* in: *Journal of Medicinal Chemistry* 51, Nr. 19, pp. 5932–5942. <https://doi.org/10.1021/jm8003152>
- [41] **Busch, A. E. et al. (1996)** *Electrogenic properties and substrate specificity of the polyspecific rat cation transporter rOCT1* in: *The Journal of biological chemistry* 271, Nr. 51, pp. 32599–32604. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.51.32599>
- [42] **Volk, C. et al. (2003)** *Different affinities of inhibitors to the outwardly and inwardly directed substrate binding site of organic cation transporter 2* in: *Molecular pharmacology* 64, Nr. 5, pp. 1037–1047. <https://doi.org/10.1124/mol.64.5.1037>
- [43] **Glaeser, H. et al. (2007)** *Intestinal drug transporter expression and the impact of grapefruit juice in humans* in: *Clinical pharmacology and therapeutics* 81, Nr. 3, pp. 362–370. <https://doi.org/10.1038/sj.clpt.6100056>
- [44] **Jia, J. et al. (2014)** *Characterization of the intestinal and hepatic uptake/efflux transport of the magnetic resonance imaging contrast agent gadolinium-ethoxylbenzyl-diethylenetriamine-pentaacetic acid* in: *Investigative radiology* 49, Nr. 2, pp. 78–86. <https://doi.org/10.1097/RLI.0b013e3182a70043>
- [45] **Kobayashi, D. et al. (2003)** *Involvement of human organic anion transporting polypeptide OATP-B (SLC21A9) in pH-dependent transport across intestinal apical membrane* in: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 306, Nr. 2, pp. 703–708. <https://doi.org/10.1124/jpet.103.051300>
- [46] **Sai, Y. et al. (2006)** *Predominant contribution of organic anion transporting polypeptide OATP-B (OATP2B1) to apical uptake of estrone-3-sulfate by human intestinal Caco-2 cells* in: *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 34, Nr. 8, pp. 1423–1431. <https://doi.org/10.1124/dmd.106.009530>
- [47] **Keiser, M. et al. (2017)** *The Organic Anion-Transporting Peptide 2B1 Is Localized in the Basolateral Membrane of the Human Jejunum and Caco-2 Monolayers* in: *Journal of pharmaceutical sciences* 106, Nr. 9, pp. 2657–2663. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2017.04.001>

- [48] **Mooij, M. G. et al. (2016)** *Human Intestinal PEPT1 Transporter Expression and Localization in Preterm and Term Infants* in: *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 44, Nr. 7, pp. 1014–1019. <https://doi.org/10.1124/dmd.115.068809>
- [49] **Jonker, J. W. et al. (2001)** *Reduced hepatic uptake and intestinal excretion of organic cations in mice with a targeted disruption of the organic cation transporter 1 (Oct1 Slc22a1) gene* in: *Molecular and cellular biology* 21, Nr. 16, pp. 5471–5477. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.16.5471-5477.2001>
- [50] **Wang, D.-S. et al. (2002)** *Involvement of organic cation transporter 1 in hepatic and intestinal distribution of metformin* in: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 302, Nr. 2, pp. 510–515. <https://doi.org/10.1124/jpet.102.034140>
- [51] **Müller, J. et al. (2005)** *Drug specificity and intestinal membrane localization of human organic cation transporters (OCT)* in: *Biochemical pharmacology* 70, Nr. 12, pp. 1851–1860. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2005.09.011>
- [52] **Koepsell, H.; Lips, K.; Volk, C. (2007)** *Polyspecific organic cation transporters: structure, function, physiological roles, and biopharmaceutical implications* in: *Pharmaceutical research* 24, Nr. 7, pp. 1227–1251. <https://doi.org/10.1007/s11095-007-9254-z>
- [53] **Giacomini, K. M.; Huang, S.-M. (2013)** *Transporters in drug development and clinical pharmacology* in: *Clinical pharmacology and therapeutics* 94, Nr. 1, pp. 3–9. <https://doi.org/10.1038/clpt.2013.86>
- [54] **Watanabe, K. et al. (2002)** *Studies on intestinal absorption of sulpiride (1): carrier-mediated uptake of sulpiride in the human intestinal cell line Caco-2* in: *Biological & pharmaceutical bulletin* 25, Nr. 7, pp. 885–890. <https://doi.org/10.1248/bpb.25.885>
- [55] **Han, T. K. et al. (2013)** *Organic cation transporter 1 (OCT1/mOct1) is localized in the apical membrane of Caco-2 cell monolayers and enterocytes* in: *Molecular pharmacology* 84, Nr. 2, pp. 182–189. <https://doi.org/10.1124/mol.112.084517>

- [56] **Tadken, T. et al. (2016)** *Trospium chloride is absorbed from two intestinal "absorption windows" with different permeability in healthy subjects* in: *International journal of pharmaceutics* 515, 1-2, pp. 367–373. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.10.030>
- [57] **Bexten, M. et al. (2015)** *Expression of drug transporters and drug metabolizing enzymes in the bladder urothelium in man and affinity of the bladder spasmolytic trospium chloride to transporters likely involved in its pharmacokinetics* in: *Molecular pharmaceutics* 12, Nr. 1, pp. 171–178. <https://doi.org/10.1021/mp500532x>
- [58] **Abebe, B. T. et al. (2019)** *Effects of the P-Glycoprotein Inhibitor Clarithromycin on the Pharmacokinetics of Intravenous and Oral Trospium Chloride: A 4-Way Crossover Drug-Drug Interaction Study in Healthy Subjects* in: *The Journal of Clinical Pharmacology* 59, Nr. 10, pp. 1319–1330. <https://doi.org/10.1002/jcph.1421>
- [59] **Yadlapalli, J. S. K. et al. (2021)** *A pharmacokinetic study of morphine-6-O-sulfate in rat plasma and brain* in: *Drug development research*. <https://doi.org/10.1002/ddr.21785>
- [60] **Gurgel Assis, M. S. et al. (2021)** *Novel Insights to Enhance Therapeutics With Acyclovir in the Management of Herpes Simplex Encephalitis* in: *Journal of pharmaceutical sciences* 110, Nr. 4, pp. 1557–1571. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2021.01.003>
- [61] **Simmons, N. L. (1982)** *Cultured monolayers of MDCK cells: A novel model system for the study of epithelial development and function* in: *General Pharmacology: The Vascular System* 13, H. 4, S. 287–291. [https://doi.org/10.1016/0306-3623\(82\)90047-7](https://doi.org/10.1016/0306-3623(82)90047-7)
- [62] **Mukkavilli, R.; Jadhav, G.; Vangala, S. (2017)** *Evaluation of Drug Transport in MDCKII-Wild Type, MDCKII-MDR1, MDCKII-BCRP and Caco-2 Cell Lines* in: *Current pharmaceutical biotechnology* 18, Nr. 14, pp. 1151–1158. <https://doi.org/10.2174/1389201019666180308091855>
- [63] **Dukes, J. D.; Whitley, P.; Chalmers, A. D. (2011)** *The MDCK variety pack: choosing the right strain* in: *BMC cell biology* 12, p. 43. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-12-43>

- [64] **Persson, P. B. (2016)** *Did you know? The Ussing chamber origin* in: *Acta physiologica* (Oxford, England) 218, Nr. 2, p. 67. <https://doi.org/10.1111/apha.12689>
- [65] **Ussing, H. H.; Zerahn, K. (1999)** *Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. Reprinted from Acta. Physiol. Scand. 23: 110-127, 1951* in: *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 10, Nr. 9, pp. 2056–2065.
- [66] **Sjöberg, Å. et al. (2013)** *Comprehensive study on regional human intestinal permeability and prediction of fraction absorbed of drugs using the Ussing chamber technique* in: *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* 48, 1-2, pp. 166–180. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2012.10.007>
- [67] **Müller, J. et al. (2017)** *Expression, regulation and function of intestinal drug transporters: an update* in: *Biological chemistry* 398, Nr. 2, pp. 175–192. <https://doi.org/10.1515/hsz-2016-0259>
- [68] **Shugarts, S.; Benet, L. Z. (2009)** *The role of transporters in the pharmacokinetics of orally administered drugs* in: *Pharmaceutical research* 26, Nr. 9, pp. 2039–2054. <https://doi.org/10.1007/s11095-009-9924-0>
- [69] **Silva, R. et al. (2015)** *Modulation of P-glycoprotein efflux pump: induction and activation as a therapeutic strategy* in: *Pharmacology & therapeutics* 149, pp. 1–123. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.11.013>
- [70] **Oswald, S. et al. (2019)** *Protein Abundance of Clinically Relevant Drug Transporters in The Human Kidneys* in: *International Journal of Molecular Sciences* 20, Nr. 21, p. 5303. <https://doi.org/10.3390/ijms20215303>
- [71] **Mofu Mato, E. P. et al. (2018)** *Genetic polymorphisms of organic cation transporter 1 (OCT1) and responses to metformin therapy in individuals with type 2 diabetes: A systematic review* in: *Medicine* 97, Nr. 27, e11349. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000011349>
- [72] **Kramer, W. (2011)** *Transporters, Trojan horses and therapeutics: suitability of bile acid and peptide transporters for drug delivery* in: *Biological chemistry* 392, 1-2, pp. 77–94. <https://doi.org/10.1515/bc.2011.017>

- [73] **Brück, S.** et al. (2017) *Caco-2 cells - expression, regulation and function of drug transporters compared with human jejunal tissue* in: *Biopharmaceutics & drug disposition* 38, Nr. 2, pp. 115–126. <https://doi.org/10.1002/bdd.2025>
- [74] **Uchida, Y.** et al. (2015) *Quantitative targeted absolute proteomics for 28 human transporters in plasma membrane of Caco-2 cell monolayer cultured for 2, 3, and 4 weeks* in: *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 30, Nr. 2, pp. 205–208. <https://doi.org/10.1016/j.dmpk.2014.11.002>
- [75] **Ölander, M.** et al. (2016) *The Proteome of Filter-Grown Caco-2 Cells With a Focus on Proteins Involved in Drug Disposition* in: *Journal of pharmaceutical sciences* 105, Nr. 2, pp. 817–827. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2015.10.030>
- [76] **Ghaffarian, R.;** Muro, S. (2013) *Models and methods to evaluate transport of drug delivery systems across cellular barriers* in: *Journal of visualized experiments : JoVE*, Nr. 80, e50638. <https://doi.org/10.3791/50638>
- [77] **Lemmens, G.** et al. (2021) *Drug Disposition in the Lower Gastrointestinal Tract: Targeting and Monitoring* in: *Pharmaceutics* 13, Nr. 2, p. 161. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13020161>
- [78] **He, L.** et al. (2013) *Use of the Ussing chamber technique to study nutrient transport by epithelial tissues* in: *Frontiers in bioscience (Landmark edition)* 18, pp. 1266–1274.
- [79] **Kisser, B.** et al. (2017) *The Ussing Chamber Assay to Study Drug Metabolism and Transport in the Human Intestine* in: *Current protocols in pharmacology* 77, 7.17.1-7.17.19. <https://doi.org/10.1002/cpph.22>
- [80] **Drozdziak, M.** et al. (2018) *Protein Abundance of Clinically Relevant Drug-Metabolizing Enzymes in the Human Liver and Intestine: A Comparative Analysis in Paired Tissue Specimens* in: *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 104, Nr. 3, pp. 515–524. <https://doi.org/10.1002/cpt.967>
- [81] **Tzvetkov, M. V.** et al. (2013) *Morphine is a substrate of the organic cation transporter OCT1 and polymorphisms in OCT1 gene affect morphine pharmacokinetics after codeine administration* in: *Biochemical pharmacology* 86, Nr. 5, pp. 666–678. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.06.019>



- [82] **Ofoegbu**, A.; B Ettienne, E. (2021) *Pharmacogenomics and Morphine* in: The Journal of Clinical Pharmacology 61, Nr. 9, pp. 1149–1155. <https://doi.org/10.1002/jcph.1873>
- [83] **Zhu**, P. et al. (2018) Irinotecan Alters the Disposition of Morphine Via Inhibition of Organic Cation Transporter 1 (OCT1) and 2 (OCT2) in: *Pharmaceutical research* 35, Nr. 12, p. 243. <https://doi.org/10.1007/s11095-018-2526-y>

# ANHANG

## a) Laborgeräte, Verbrauchsmaterialien und kommerzielle Kits

**Tab. 8:** Verwendete Laborgeräte

Laborgeräte	Hersteller
Analysenwaage CPA225D	Sartorius AG, Göttingen
Automated Cell Counter TC10™	Bio-Rad, Herkules, CA, USA
Clean Bench HERASAFE KS	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Dual Timer C5080	TFA Dostmann/Wertheim
Heizblock peQLab Biotechnologie GmbH	peQLab, VWR, Erlangen
HERAEUS Multifuge X3R Centrifuge	Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dänemark
HPLC-Anlage Agilent 1100	Agilent Technologies, Waldbronn
Kryotec -80°C Tiefkühlschrank	Hans-S. Schröder GmbH, Hamburg
L7-65 Ultrazentrifuge	Beckmann Coulter, Inc., Palo Alto, CA, USA
Laborpumpe KNF LAB	Laboport KNF, Freiburg
Laborwaage	Sartorius AG, Göttingen
Lasermikroskop LSM780	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Lauda Aqualine AL25 Wasserbad	Lauda, Lauda-Königshofen
LC-MS/MS – System (API 4000)	AB Sciex, Darmstadt
Lichtmikroskop LEICA DMIL LED	Leica Microsystems, Wetzlar
Magnetrührer: MR 3001	Heidolph Instruments, Schwabach
Mixing Block MB-102	BIOER, Hangzhou, China
Multipipette	Eppendorf, Hamburg
pH-Meter Seven Easy	Mettler Toledo, Columbus, OH, USA
PHMP Thermo-Shaker	Grant-bio, Cambridge, UK
Photometer „infinite M200“ (Tecan Reader)	TECAN, Männedorf, Schweiz
Pipette E4XLS, 5-50µl	Eppendorf, Hamburg
Pipetten Eppendorf	Eppendorf, Hamburg
Reference Electrodes	Hach Lange Sensors, Düsseldorf
Rotilabo®-Stopfen aus Naturgummi	Roth, Karlsruhe
S1-Brutschränke	Memmert, Schwabach
Sicherheitswerkbank	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Trennsäule XTerra MS C18	Waters, Milford, USA

Labogeräte	Hersteller
Ussing-Kammer	Abteilung für Feinmechanik, Universität Greifswald
Vortexer Heidolph REAX 2000	Heidolph Instruments, Schwabach
Vortexer IKA MS 3 Basic	IKA-Werke GmbH, Staufen

**Tab. 9:** Verwendete Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
96-Well Platten: Nunc™ MicroWell™ Platten mit Nunclon™ Delta Oberfläche	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
BD Discardit II, Spritze 20 ml	BD Labware, Franklin Lakes, NJ, USA
Cryo.STM Einfrierröhrchen	Greiner BIO-ONE GmbH, Frickenhausen
ep T.I.P.S.® Standard 2-200 µl	Sarstedt, Nümbrecht
ep T.I.P.S.® Standard 50-1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Eppendorf Safe-Lock Tubes 0,5 /1,0/1,5/2,0 ml	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Tubes 1,5/2,0/5,0 ml	Eppendorf, Hamburg
Falcon® 15 ml High-Clarity Polypropylene Conical Tubes	Corning, Corning, NY, USA
Falcon® 50 ml Polypropylene Conical Tube	Corning, Corning, NY, USA
Falcon® Cell Culture Insert high density, 0,4 µM pore size, translucent PET Membrane	Corning, Corning, NY, USA
Falcon® Cell Culture Insert high density, 0,4 µM pore size, transparent PET Membrane	Corning, Corning, NY, USA
Falcon® Companion Plate, 24 Well with Low Evaporation Lid, notched for use with Cell Culture Inserts	Corning, Corning, NY, USA
Falcon® Multiwell 24 Well	Corning, Corning, NY, USA
Falcon® Zellkulturflasche (75 cm²)	Corning, Corning, NY, USA
Parafilm “M” Laboratory Film	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, IL, USA
Serologische Pipetten 5/10/25/50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
TC10™ Counting Slides	Bio-Rad, Herkules, CA, USA

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Transferpipetten	Sarstedt, Nümbrecht
VWR Micro Tip 0,1-10 µL	VWR, Radnor, PA, USA

**Tab. 10:** Verwendete Software

Software	Hersteller
GraphPadPrism 5.0	GraphPad; St. Diego, CA, USA
Microsoft Office Excel 2010	Microsoft Corporation; Redmond, WA, USA
Tecan Reader	TECAN, Männedorf, Schweiz
Ussing v 1.0.1	UCC Labs

## b) Chemikalien

**Tab. 11:** Verwendete Chemikalien

Substanz	Hersteller
(D+)-Glukose	Merck, Darmstadt
Acetonitril (Ultra LC-MS/MS grade)	Roth, Karlsruhe
Agar-Agar, Kobe I	Roth, Karlsruhe
Bovines Serumalbumin (BSA)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid-Dihydrat (CaCl <sub>2</sub> × 2H <sub>2</sub> O)	Roth, Karlsruhe
Calciumchlorid-Dihydrat (CaCl <sub>2</sub> × 2H <sub>2</sub> O)	Roth, Karlsruhe
Custodiol	Dr. Franz Köhler Chemie, Bensheim
di-Kaliumhydrogenphosphat (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
di-Natrium-Fumarat	Merck, Hohenbrunn
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 2H <sub>2</sub> O)	Roth, Karlsruhe
DMEM Low Glucose 1,5 g/l	PAN Biotech, Aidenbach
DPBS	PAN Biotech, Aidenbach
Ethanol ≥ 99,8%	Roth, Karlsruhe
Ethanol 70%	Universitäts-Apotheke, Greifswald
Fetal Bovine Serum Gold (FKS)	PAN Biotech, Aidenbach
G418 (Geneticin)	PAN Biotech, Aidenbach

Substanz	Hersteller
HCl	Merck, Darmstadt
HEPES	Roth, Karlsruhe
Hygromycin B, 50mg/ml	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Kaliumcarbonat (K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Roth, Karlsruhe
Lucifer Yellow	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Magnesiumchlorid-Hexahydrat (MgCl × 6 H <sub>2</sub> O)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Magnesiumsulfat-Heptahydrat (MgSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O)	Roth, Karlsruhe
MEM Eagle	PAN Biotech, Aidenbach
Methanol	Mellinckrodt Baker B.V., Deventer, Holland
Morphin-Hydrochlorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
MPP	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt
Natrium-L-Glutamat-Monohydrat	Merck, Darmstadt
Natrium-Pyruvat	AppliChem, Darmstadt
PSC833 (Valspodar)	Novartis Pharma GmbH, Basel, Schweiz
Ranitidin-Hydrochlorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Rotiszint® eco plus, LSC-Universalcocktail	Roth, Karlsruhe
Stable Glutamine 200mM	PAN Biotech, Aidenbach
Triton-X-100	Merck, Darmstadt
Trypsin/EDTA Solution	PAN Biotech, Aidenbach

### c) Puffer

**Tab. 12:** Inkubationspuffer für Transwellassay

Substanz	Konzentration
<i>aqua bidest.</i>	
CaCl <sub>2</sub>	1,5 mM
Glukose	5 mM
HEPES	12,5 mM
KCl	5 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 mM
MgSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O	1,2 mM
NaCl	142 mM
jeweils auf pH 6,5 bzw. 7,4 eingestellt	

**Tab. 13:** DPBS-Waschpuffer

Substanz	Konzentration
KCl	2,7 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5 mM
NaCl	137 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8,1 mM
auf pH 7,4 eingestellt	

**Tab. 14:** Ansätze für die Herstellung der KBR-Lösung für die Ussing-Kammer

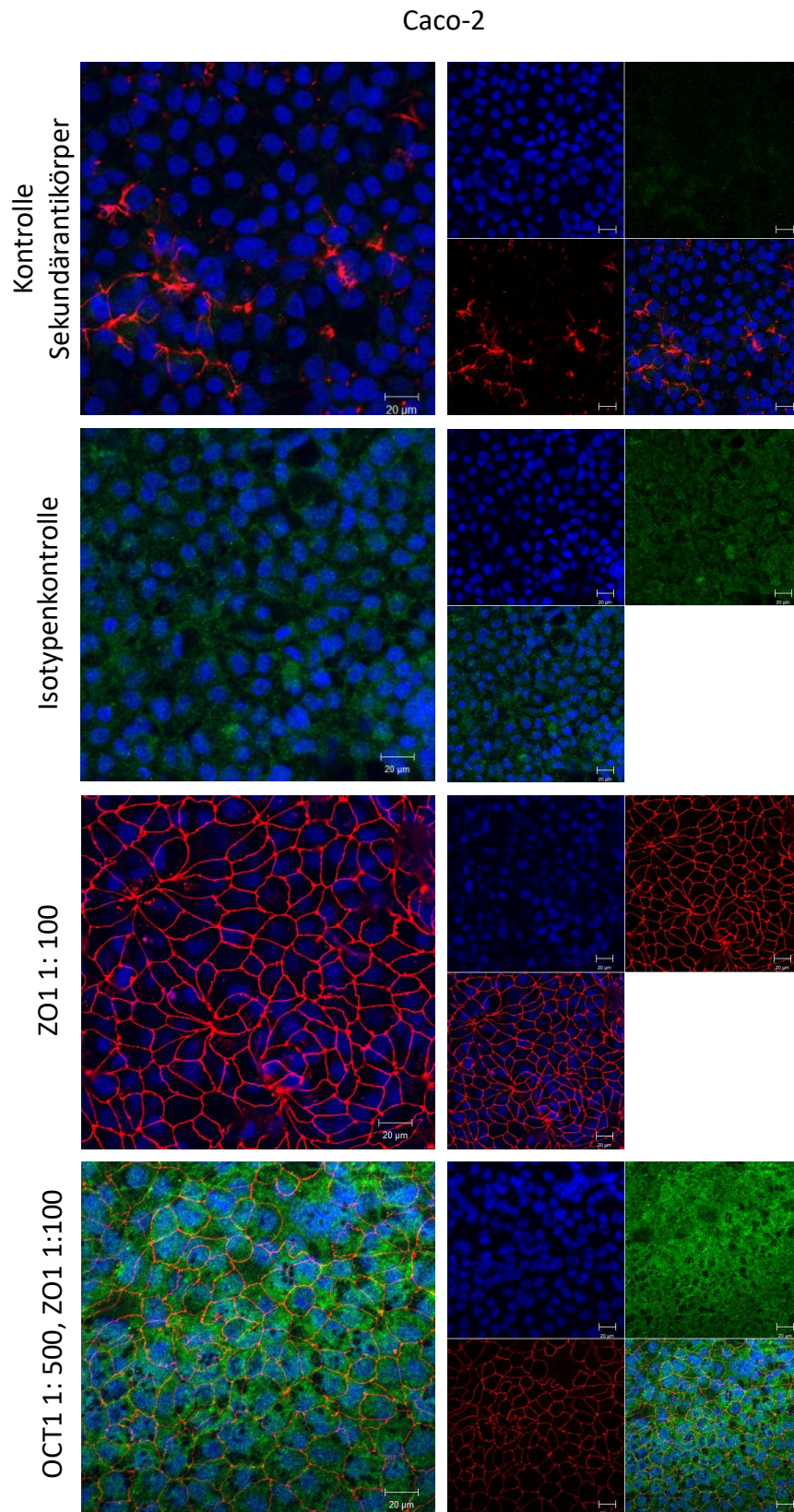
Medium/Zusatz	Substanz	Konzentration
Stocklösung 1	<i>aqua bidest.</i>	
	KCl	4,7 mM
	MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	1,2 mM
	NaCl	108 mM
Stocklösung 2	<i>aqua bidest.</i>	
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,6 mM
	NaHCO <sub>3</sub>	16 mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	1,8 mM
Stocklösung 3	<i>aqua bidest.</i>	
	CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	1,25 mM
Yummy-Lösung	<i>aqua bidest.</i>	
	Na <sub>2</sub> -Fumarat	5,4 mM
	Na-L-Glutamat	4,9 mM
	Na-Pyruvat	4,9 mM

#### d) Zellkultivierung

**Tab. 15:** Verwendete Grundmedien und Zusätze für die Zellkultivierung

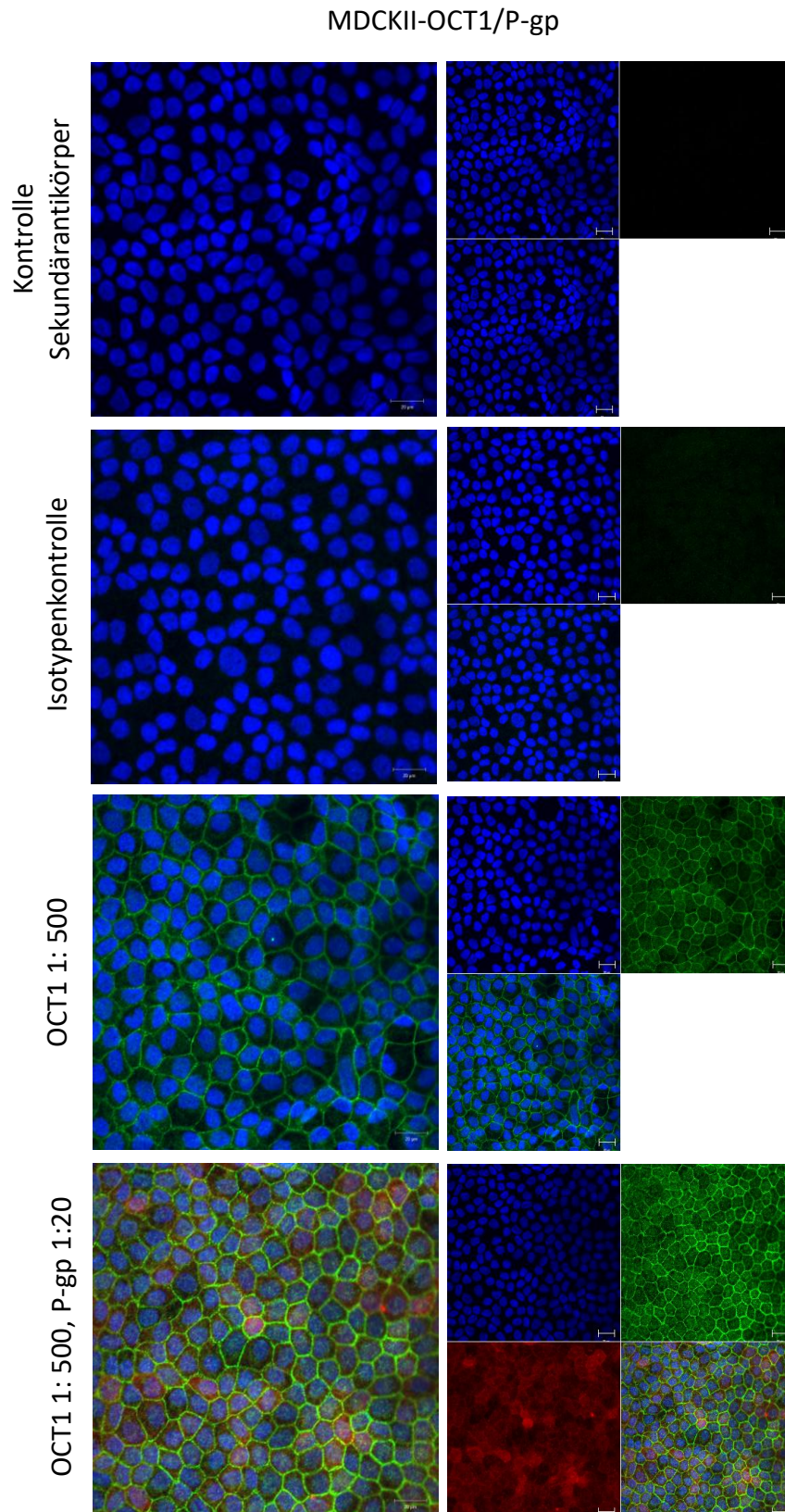
Medium/Zusatz	Hersteller
DMEM (mit 1,0 g/L Glukose, ohne L-Glutamin, mit Natriumpyruvat und 3,7 g/L NaHCO <sub>3</sub> )	PAN Biotech, Aidenbach
DPBS (ohne Calcium und Magnesium)	PAN Biotech, Aidenbach
Trypsin/EDTA Lösung (0,05/0,02 % in PBS, ohne Calcium und Magnesium)	PAN Biotech, Aidenbach
stabiles Glutamin (200 mM)	PAN Biotech, Aidenbach
SeraPlus (Special Processed FBS)	PAN Biotech, Aidenbach
Penicillin/Streptomycin	
Non-Essential Amino Acids (100x)	
Neomycin (G418)	InvivoGen, Toulouse, Frankreich
Hygromycin B (100 mg/ml)	InvivoGen, Toulouse, Frankreich

## e) Weitere Ergebnisse

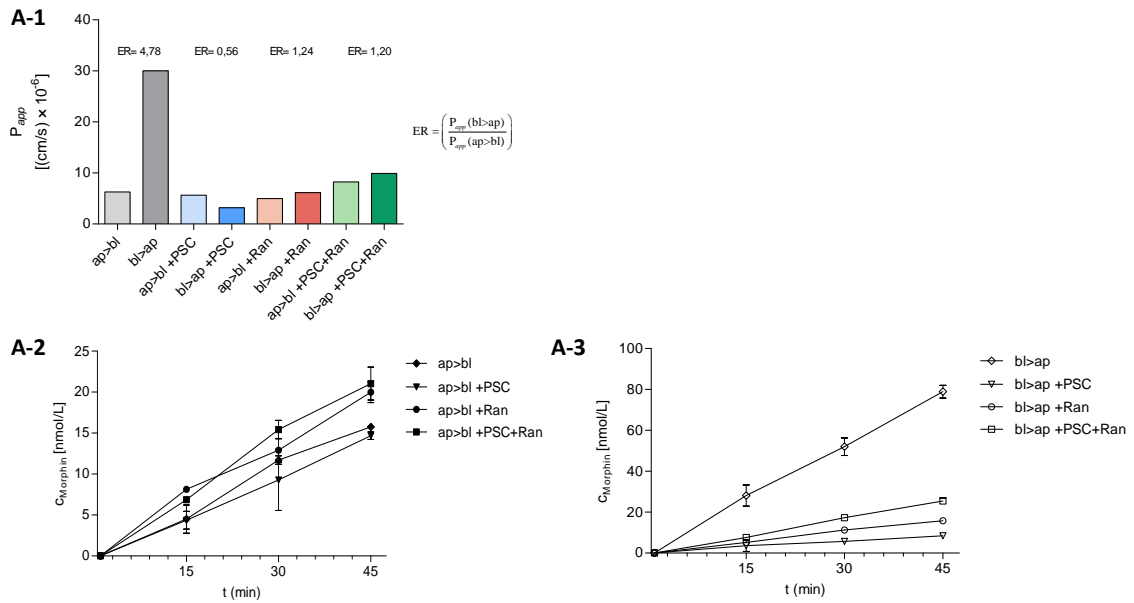


**Abb. 20:** Immunfluoreszenzfärbung von Caco-2-Zellen: Zellkerne blau; Sekundäntikörperkontrolle (Alexa 488); Isotypenkontrolle mittels IgG *rabbit*; alleinige Darstellung der *tight junctions* mittels ZO1 (rot), Anfärbung von OCT1 (grün, keine eindeutig basolaterale oder apikale Lokalisation) und ZO1 - Maßstab 20 µm

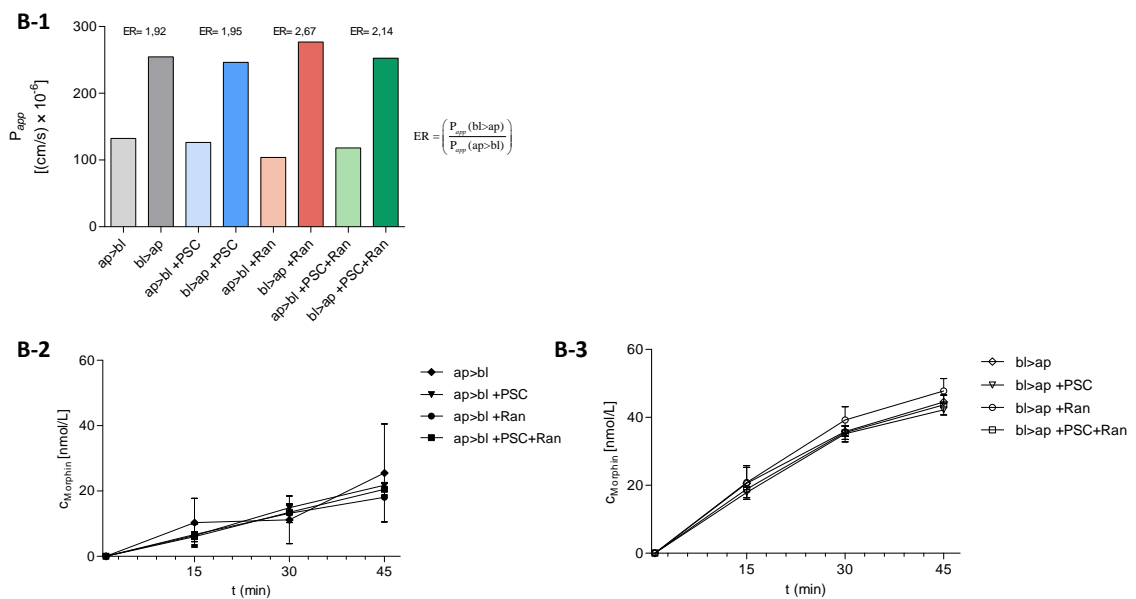




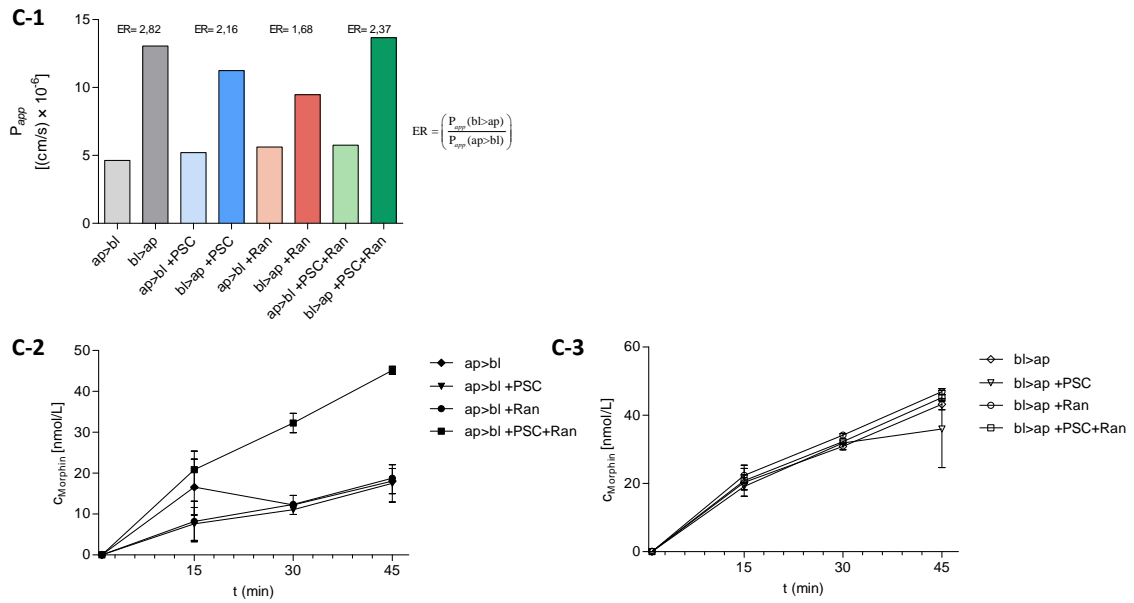
**Abb. 21:** Immunfluoreszenzfärbung von MDCKII-OCT1/P-gp-Zellen: Zellkerne blau; Sekundäntikörperkontrolle (Alexa 488); Isotypenkontrolle mittels IgG *rabbit*; alleinige Anfärbung von OCT1 (grün); Anfärbung von OCT1(basolaterale Lokalisation) und P-gp (rot, apikale Lokalisation) - Maßstab 20  $\mu$ m



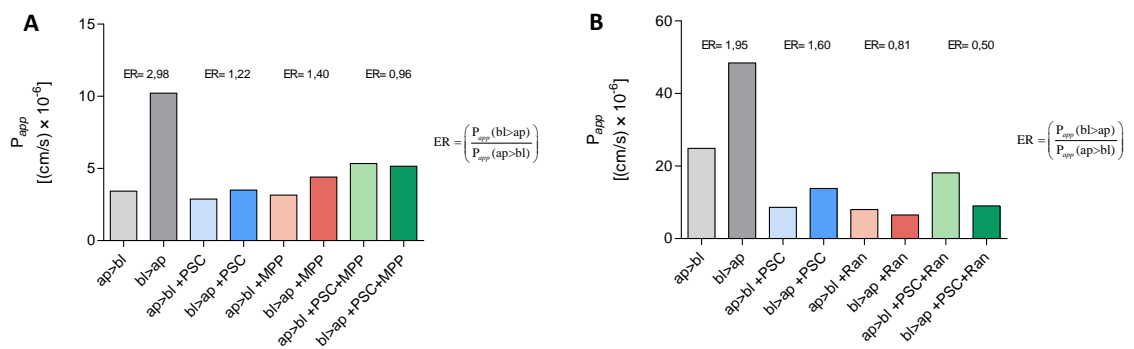
**Abb. 22:** Versuch A: Transwellassay des vektoriiellen Transportes von Morphin über einen Caco-2-Zell-Monolayer in An- bzw. Abwesenheit von PSC833 und/oder Ranitidin, jeweils im Duplikat, n=1; (1)  $P_{app}$ -Werte und resultierende *Efflux Ratio* (ER), (2) zeitabhängiger Verlauf des vektoriiellen Transportes (ap>bl), (3) zeitabhängiger Verlauf des vektoriiellen Transportes (bl>ap)



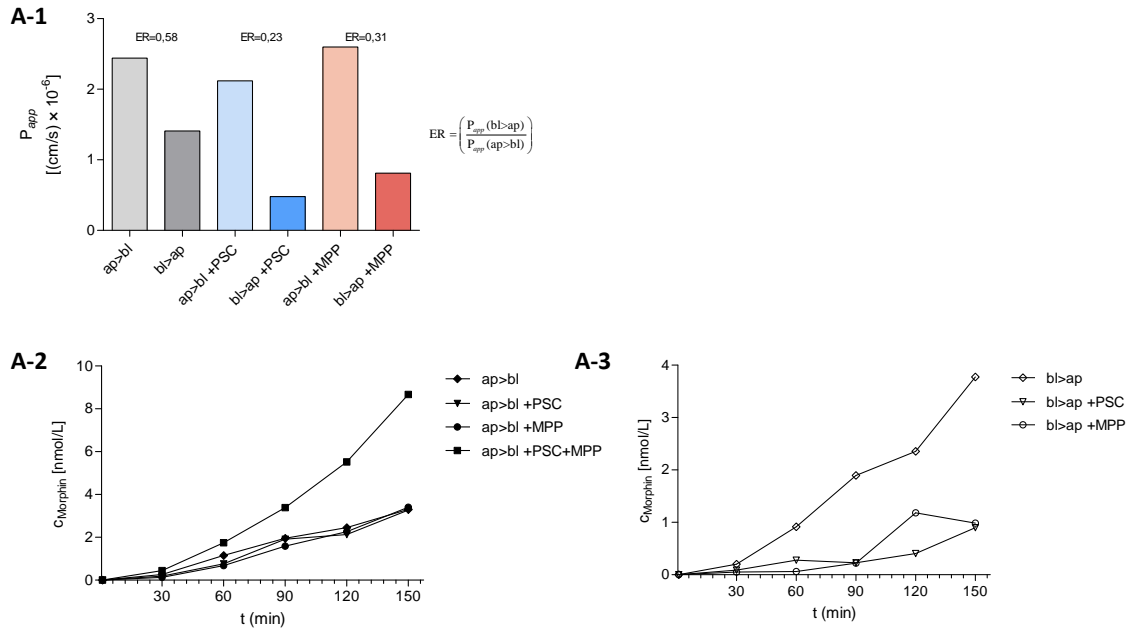
**Abb. 23:** Versuch B: Transwellassay des vektoriiellen Transportes von Morphin über einen Caco-2-Zell-Monolayer in An- bzw. Abwesenheit von PSC833 und/oder Ranitidin, jeweils im Duplikat, n=1; (1)  $P_{app}$ -Werte und resultierende *Efflux Ratio* (ER); (2) zeitabhängiger Verlauf des vektoriiellen Transportes (ap>bl); (3) zeitabhängiger Verlauf des vektoriiellen Transportes (bl>ap)



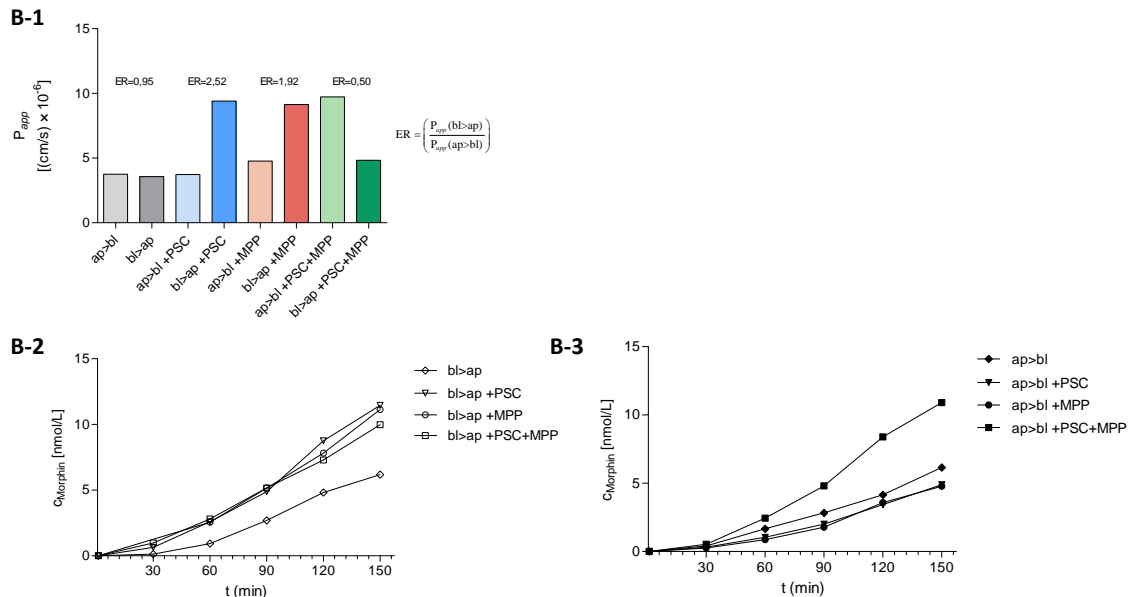
**Abb. 24:** Versuch C: Transwellassay des vektoriiellen Transportes von Morphin über einen Caco-2-Zell-Monolayer in An- bzw. Abwesenheit von PSC833 und/oder Ranitidin, jeweils im Duplikat, n=1; (1)  $P_{app}$ -Werte und resultierende *Efflux Ratio* (ER); (2) zeitabhängiger Verlauf des vektoriiellen Transportes (ap>bl); (3) zeitabhängiger Verlauf des vektoriiellen Transportes (bl>ap)



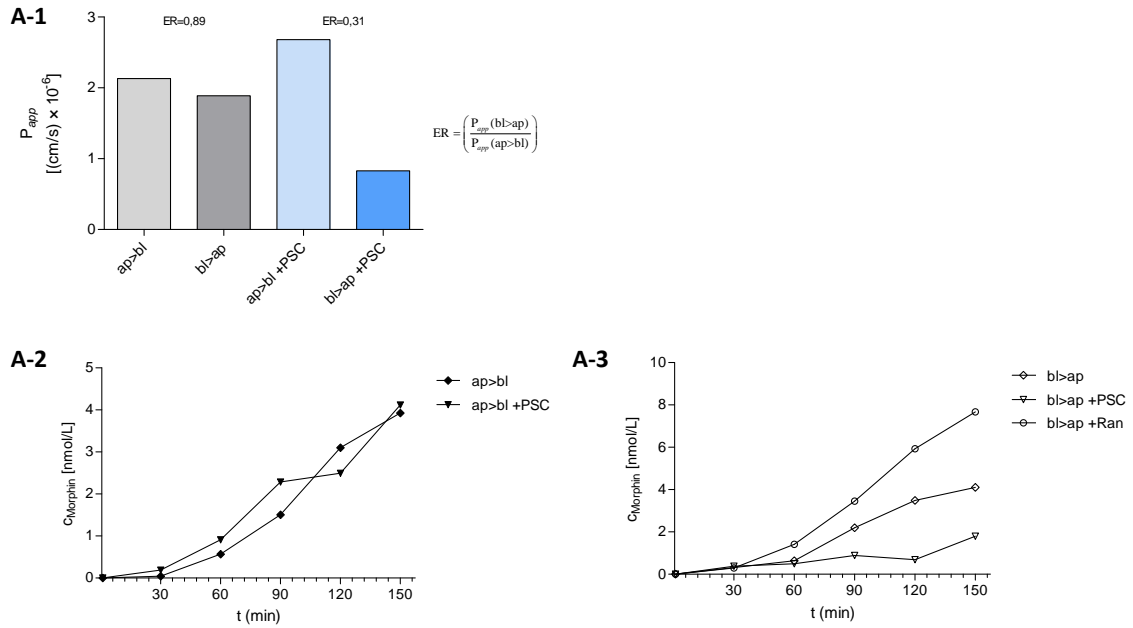
**Abb. 25:** Versuch A und B: Transwellassay des vektoriiellen Transportes von Morphin über einen MDCKII-Zell-Monolayer in An- bzw. Abwesenheit von PSC833 und/oder Ranitidin (oder MPP), jeweils im Duplikat, n=1;  $P_{app}$ -Werte und resultierende *Efflux Ratio* (ER)



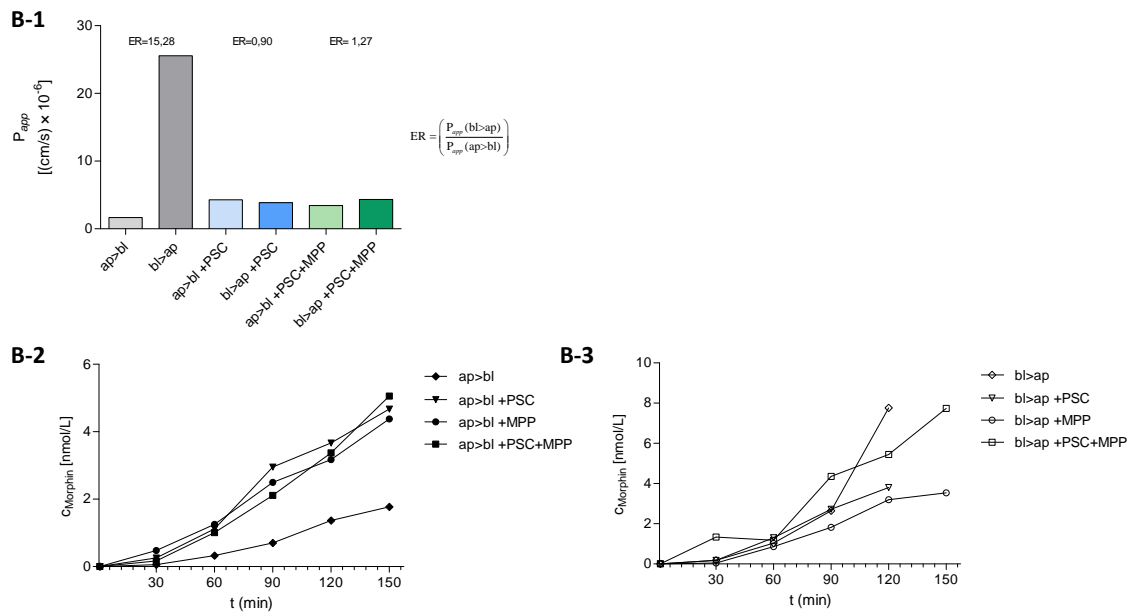
**Abb. 26:** Versuch A:(1) Vektorieller Transport ( $P_{app}$ -Werte) von Morphin in der Ussing-Kammer unter Verwendung humanen intestinalen Gewebes in An- bzw. Abwesenheit von PSC833 und/oder MPP und die daraus resultierende *Efflux Ratio* (ER); (2) zeitabhängiger Verlauf des vektoriellen Transportes (ap>bl); (3) zeitabhängiger Verlauf des vektoriellen Transportes (bl>ap); n=1



**Abb. 27:** Versuch B: (1) Vektorieller Transport ( $P_{app}$ -Werte) von Morphin in der Ussing-Kammer unter Verwendung humanen intestinalen Gewebes in An- bzw. Abwesenheit von PSC833 und/oder MPP und die daraus resultierende *Efflux Ratio* (ER); (2) zeitabhängiger Verlauf des vektoriellen Transportes (ap>bl); (3) zeitabhängiger Verlauf des vektoriellen Transportes (bl>ap); n=1



**Abb. 28:** Versuch A:(1)Vektorieller Transport ( $P_{app}$ -Werte) von Morphin in der Ussing-Kammer unter Verwendung porcinen intestinalen Gewebes in An- bzw. Abwesenheit von PSC833 und die daraus resultierende *Efflux Ratio* (ER); (2) zeitabhängiger Verlauf des vektoriellen Transportes (ap>bl); (3) zeitabhängiger Verlauf des vektoriellen Transportes (bl>ap); n=1



**Abb. 29:** Versuch B:(1) Vektorieller Transport ( $P_{app}$ -Werte) von Morphin in der Ussing-Kammer unter Verwendung porcinen intestinalen Gewebes in An- bzw. Abwesenheit von PSC833 und/oder MPP und die daraus resultierende *Efflux Ratio* (ER); (2) zeitabhängiger Verlauf des vektoriellen Transportes (ap>bl); (3) zeitabhängiger Verlauf des vektoriellen Transportes (bl>ap); n=1

**Tab. 16:** Übersicht über die Mitglieder der SLC22-Familie [17; 18]

<b>Gene name</b>	<b>Approved name</b>	<b>Protein name</b>	<b>Chromosome</b>
SLC22A1	<i>solute carrier family 22 member 1</i>	OCT1	6q25.3
SLC22A2	<i>solute carrier family 22 member 2</i>	OCT2	6q25.3
SLC22A3	<i>solute carrier family 22 member 3</i>	OCT3	6q25.3
		EMT	
SLC22A4	<i>solute carrier family 22 member 4</i>	OCTN1	5q31.1
		MGC34546	
SLC22A5	<i>solute carrier family 22 member 5</i>	OCTN2	5q31.1
		SCD	
SLC22A6	<i>solute carrier family 22 member 6</i>	ROAT1	11q12.3
		PAHT	
		OAT1	
SLC22A7	<i>solute carrier family 22 member 7</i>	NLT	6p12.3
		OAT2	
SLC22A8	<i>solute carrier family 22 member 8</i>	OAT3	11q12.3
SLC22A9	<i>solute carrier family 22 member 9</i>	OAT4	11q12.3
		FLJ23666	
		UST3	
		OAT7	
SLC22A10	<i>solute carrier family 22 member 10</i>	OAT5	11q12.3
		hOAT5	
SLC22A11	<i>solute carrier family 22 member 11</i>	OAT4	11q13.1
SLC22A12	<i>solute carrier family 22 member 12</i>	OAT4L	11q13.1
		RST	
		URAT1	
SLC22A13	<i>solute carrier family 22 member 13</i>	OCTL1	3p22.2
		OCTL3	
		OAT10	
SLC22A14	<i>solute carrier family 22 member 14</i>	OCTL2	3p22.2
SLC22A15	<i>solute carrier family 22 member 15</i>	FLIPT1	1p13.1
SLC22A16	<i>solute carrier family 22 member 16</i>	FLIPT2	6q21
		CT2	
		OKB1	

---

		OAT6	
SLC22A17	<i>solute carrier family 22 member 17</i>	BOCT	14q11.2
		BOIT	
		NGALR	
SLC22A18	<i>solute carrier family 22 member 18</i>	BWR1A	11p15.4
		TSSC5	
		ITM	
SLC22A20p	<i>solute carrier family 22 member 20, pseudogene</i>	Oat6	11q13.1
		FLJ16331	
SLC22A23	<i>solute carrier family 22 member 23</i>	FLJ22174	6p25.2
SLC22A24	<i>solute carrier family 22 member 24</i>	MGC34821	11q12.3
		NET46	
SLC22A25	<i>solute carrier family 22 member 25</i>	UST6	11q12.3
		HIMTP	
		MGC120420	
SLC22A31	<i>solute carrier family 22 member 31</i>		16q24.3

---

# DANKSAGUNG

An erster Stelle gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Stefan Oswald für die Überlassung dieses interessanten Themas und die stete Begleitung während der letzten fünf Jahre.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. vet. Markus Keiser für seine Betreuung, sowie unermüdliche wissenschaftliche und methodische Unterstützung bei der Planung und Durchführung dieser Promotionsarbeit.

Außerdem danke ich allen Mitarbeitenden der Abteilung für klinische Pharmakologie des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der Universitätsmedizin Greifswald, die zu der freundlichen Atmosphäre während meiner praktischen Arbeit am Institut beigetragen und mir mit zahlreichen Hilfestellungen zur Seite gestanden haben.

Meiner Familie und meinen Freunden möchte ich für ihre großartige Unterstützung sowohl während des Studiums als auch in allen anderen Lebenslagen danken  
- ohne euch wäre ich nicht da, wo ich heute bin.

*Danke!*