

Aus der Abteilung für Allgemeine Pharmakologie  
(Leiter Univ. – Prof. Dr. med. Bernhard H. Rauch)  
dem Institut für Pharmakologie  
(Direktor: Univ. - Prof. Dr. rer. nat. Mladen V. Tzvetkov)  
der Universitätsmedizin der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald



**Thema: Molekularbiologische Analysen zur Interaktion zwischen dem CAR-Induktor Efavirenz und dem Cholesterolresorptionshemmer Ezetimib**

Inaugural – Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

der

Universitätsmedizin

der

Ernst-Moritz-Arndt-Universität

Greifswald

2019

vorgelegt von:

Christopher Allan Henry Bresser

geb. am: 06.05.1984

in: Witten, Deutschland

Dekan: Prof. Dr. med. Karlhans Endlich  
1. Gutachter: Prof. Dr. Henriette Meyer zu Schwabedissen  
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Leszek Wojnowski

Ort, Raum: Greifswald, Seminarraum 1 C\_DAT

Tag der Disputation: 29.03.2019

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b><i>Einleitung und Hintergrund</i></b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Arzneimetabolismus</b>	<b>5</b>
1.1.1	Transportproteine	5
1.1.2	Cytochrom P450 Monooxygenasen	9
1.1.3	Enzyme der Phase II-Biotransformation	12
<b>1.2</b>	<b>Nukleäre Rezeptoren</b>	<b>12</b>
<b>1.3</b>	<b>Hypothese der Studie</b>	<b>19</b>
<b>2</b>	<b><i>Material und Methoden</i></b>	<b>24</b>
<b>2.1</b>	<b>Aufbau der klinischen Studie</b>	<b>24</b>
<b>2.2</b>	<b>Gewinnung und Aufbereitung humaner Proben aus der Studie</b>	<b>26</b>
2.2.1	Präparation der PBMCs aus Buffy Coat	27
2.2.2	Isolation der RNA aus den humanen Proben (Darm und PBMCs)	28
2.2.3	Proteingewinnung aus Darmproben	29
<b>2.3</b>	<b>Kultur von PBMCs</b>	<b>31</b>
<b>2.4</b>	<b>Western Blot Analyse</b>	<b>31</b>
2.4.1	Vorbereitung und Ausführung der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	33
2.4.2	Blotting	34
2.4.3	Semiquantitative Analysen der Proteinbanden	35
<b>2.5</b>	<b>Behandlung CAR-transfizierter Caco2 Zellen (in vitro)</b>	<b>35</b>
2.5.1	Transformation und Selektion	37
2.5.2	Gewinnung der reinen Plasmid-DNA	38
2.5.3	Konzentrationsbestimmung der DNA (RNA)	39
2.5.4	Transfektion von CAR in Caco2-Zellen	39
2.5.5	Isolation von RNA aus Caco2-Zellen mittels PeqLABGold	40
2.5.6	Quantitative Bestimmung der mRNA-Expression	41

<b>3 Ergebnisse</b>	<b>42</b>
3.1 Expression von bekannten Zielgenen des Nukleären Rezeptors CAR in Darmproben	42
3.2 In vitro Induktion der Expression von CYP2B6 in Caco2-Zellen	44
3.3 Nachweis des Einflusses von Efavirenz auf die Expression von Zielgenen in kultivierten PBMCs	46
3.4 PBMCs von Probanden der Studie: Expression von Zielgenen von CAR	47
<b>4 Diskussion</b>	<b>49</b>
<b>5 Ausblick</b>	<b>59</b>
<b>Zusammenfassung</b>	
<b>Danksagung</b>	

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung von der Vielfalt der Transporter anhand eines Enterozyten (P-gp – P-Glykoprotein; MRP – <i>multidrug resistance-associated protein</i> ; BCRP – <i>breast cancer resistance protein</i> ; OATPs – <i>organic anion transporting polypeptides</i> ; PEPT – <i>peptide transporter protein</i> ; OCTNs – <i>organic cation/carnitine transporters</i> ; MCT – <i>monocarboxylate transporter protein</i> ; PMAT – <i>plasma membrane monoamine transporter</i> ; OCT – <i>organic cation transporter</i> ) (29).....	6
Abbildung 2: Übersicht der regulierenden Funktion der nukleären Rezeptoren (68), (69), (70), (71), (72).....	13
Abbildung 3: Skizzierter allgemeiner Aufbau eines NR.....	15
Abbildung 4: Strukturformel von CITCO (97).....	17
Abbildung 5: Verstoffwechslung von Efavirenz im Arzneimetabolismus.....	20
Abbildung 6: Strukturformel von Ezetimib (124). ....	22
Abbildung 7: Schematische Darstellung des Aufbaus der klinischen Studie. ....	25
Abbildung 8: Funktionsweise des <i>Bicinchoninacid</i> -Assays zur Proteinquantifizierung. ....	30
Abbildung 9: Auswertung der Western Blots der Darm-Proteine von 8 Probanden im Vergleich GZ und ssZ. Actin dient als Kontrolle zur Beurteilung der generellen Übertragung der Proteine.....	43
Abbildung 10: Proteinexpression bei 2 Probanden mit größerer Ausbeute im intraindividuellen Vergleich vor (-) und nach (+) mehrtägiger Efavirenzeinnahme. Actin dient als Kontrolle zur Beurteilung der generellen Übertragung der Proteine.....	44
Abbildung 11: Induktionsverhältnisse von CYP2B6 in den Caco2-Zellreihen unter DMSO als Basiswert fürs Medium, Efavirenz in 2 Konzentrationen und CITCO, einerseits transfektiert mit CAR und andererseits transfektiert mit einem Kontrollvektor. ....	45
Abbildung 12: Semiquantitative PCR Analyse der mRNA von menschlichen PBMCs, die für 48 h <i>in vitro</i> mit Efavirenz 10 µmol/l inkubiert wurden. CAR	

*unterliegende Zielgene von Transportern und Enzymen wurden  
miteinbezogen..... 47*

*Abbildung 13: Gegenüberstellung der Expression der Gene CYP2B6, ABCC1,  
UGT1A1 und ABCB1 im Laufe der Studie zu den verschiedenen Zeitpunkten  
A (EFA-sd), B (EZE-md) und D (EZE-md / EFA-md). ..... 48*

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: <i>Übersicht über ausgewählte Liganden der nukleären Rezeptoren PXR und CAR (25), (102), (98), (103)</i> .....	18
Tabelle 2: Zusammenfassung der Zielgene von PXR und CAR, geordnet nach der zugehörigen Funktion im Arzneimittelmetabolismus (82), (25), (105), (106), (102), (107).....	19
Tabelle 3: <i>Vergleich der eingeordneten, zu 18S-rRNA normalisierten mRNA Expression in den Darmproben der Probanden vor und nach Einnahme des CAR-Induktors Efavirenz mittels Mann-Whitney-U-Test und der Berechnung der Signifikanz (p-Wert &lt; 0,05) Dargestellt sind der Mittelwert der mRNA-Expression ± Standardabweichung.</i>	42

## Abkürzungsverzeichnis

AA	-	<i>Amino acid</i>
ABC	-	<i>ATP binding cassette</i>
ADH	-	Anti-diuretisches Hormon
ADME	-	Absorption, Distribution, Metabolismus (und) Elimination
AIDS	-	<i>Acquired immunodeficiency syndrome</i>
APS	-	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	-	Adenosintriphosphat
BCA	-	<i>Bicinchoninic acid</i>
BCRP	-	<i>Breast cancer resistance protein</i>
°C	-	Grad Celsius
CAR	-	<i>Constitutive androstane receptor</i>
CFTR	-	<i>Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
CITCO	-	<i>6-(4-Chlorophenyl)imidazo[2,1-b][1,3]thiazole-5-carbaldehyde-O-(3,4-dichlorobenzyl)oxime</i>
CO <sub>2</sub>	-	Kohlenstoffdioxid
CYP	-	Cytochrom-P-450-Enzyme
DBD	-	<i>Domain binding domain</i>
DMEM	-	<i>Dulbecco's modified eagle's medium</i>
DMSO	-	Dimethylsulfoxid (H <sub>3</sub> CSOCH <sub>3</sub> )
DNA	-	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
EDTA	-	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EFA	-	Efavirenz
EZE	-	Ezetimib
FCS	-	<i>Fetal calf serum</i>
FXR	-	<i>Farnesoid X receptor</i>
g	-	<i>Gravitational-force, unit of acceleration</i>
GAPDH	-	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GB	-	Großbritannien
GR	-	<i>Glucocorticoid receptor</i>
H <sub>2</sub> O	-	Wasser
HAART	-	<i>Highly active antiretroviral therapy</i>
HBSS	-	<i>Hank's balanced salt solution</i>
HIV	-	<i>Human immunodeficiency virus</i>
HNF4 $\alpha$	-	<i>Hepatocyte nuclear factor 4<math>\alpha</math></i>



HRE	-	<i>hormone response elements</i>
HRP	-	<i>Horseradish peroxidase</i>
INR	-	<i>International normalized ratio</i> (vgl. Quick)
INSTI	-	<i>Integrase strand transfer inhibitor</i>
LB (Medium)	-	Luria Bertani Medium
LBD	-	<i>Ligand binding domain</i>
MCT	-	<i>Monocarboxylate transporter protein</i>
md	-	<i>Multi dose</i>
MDB	-	<i>Membrane desalting buffer</i>
MDR 1	-	<i>Multi drug resistance protein 1</i>
min	-	Minuten
MRP	-	<i>Multidrug resistance-associated protein</i>
N <sub>2</sub>	-	Stickstoff
NH <sub>4</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> NH <sub>4</sub>	-	Ammoniumpersulfat
NATs	-	<i>N-Acetyltransferasen</i>
NC-IUPHAR	-	<i>International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification</i>
NEAA	-	<i>Non-essential amino acid solution</i>
NNRTI	-	Nichtnukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren
NR(s)	-	<i>Nuclear receptor(s)</i>
NRNC	-	<i>Nuclear Receptors Nomenclature Committee</i>
NRTI	-	Nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren
OATP	-	<i>Organic anion transporting polypeptide</i>
OCT	-	<i>Organic cation transporter</i>
OCTNs	-	<i>Organic cation/carnitine transporters</i>
PBMCs	-	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PCR	-	<i>Polymerase chain reaction</i>
PEPT	-	<i>Peptide transporter protein</i>
PI	-	Proteaseinhibitoren
P-gp	-	<i>P-Glykoprotein</i>
PMAT	-	<i>Plasma membrane monoamine transporter</i>
PXR	-	<i>Pregnane X receptor</i>
RNA	-	<i>Ribonucleic acid</i>
rpm	-	<i>Revolutions per minute</i>
RPMI	-	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	-	Raumtemperatur

## VIII

RU-486	-	Mifepriston
sec	-	Sekunden
SD	-	<i>Standard deviation</i>
sd	-	<i>Single dose</i>
SDS	-	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SG-Puffer	-	Sammelgelpuffer
SLCO	-	<i>Solute carrier organic anion</i>
SULT	-	Sulfotransferasen
TBS	-	<i>Tris-buffered saline</i>
TCPOBOP	-	1,4-Bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzen
TEMED	-	Tetramethylethylendiamin
TG-Puffer	-	Trenngelpuffer
UGT	-	Uridin-5'-diphospho-glucuronosyltransferase
VDR	-	<i>Vitamin D receptor</i>

# 1 Einleitung und Hintergrund

Die Entwicklung von Arzneistoffen mit unterschiedlichsten Angriffspunkten und damit medizinischen Indikationen hat die Signifikanz und Beurteilung der medikamentösen Therapie in der Medizin verändert. Neben der Vielzahl an verfügbaren Medikamenten beeinflusst die demographische Entwicklung mit einer zunehmenden Alterung der Bevölkerung und die damit assoziierten Bedingungen (Zunahme von chronischen Erkrankungen des Alters) die Relevanz der Pharmakotherapie in der Medizin. Ein Begriff, welcher sich in diesem Zusammenhang entwickelt hat, ist die Polypharmazie. Als Polypharmazie wird die gleichzeitige Einnahme von mindestens fünf Medikamenten bezeichnet (1). Bei der gleichzeitigen Einnahme unterschiedlicher Medikamente ist deren gegenseitige Verträglichkeit von ausschlaggebender Relevanz für die Arzneimittelsicherheit. Denn neben den Vorteilen der medikamentösen Therapie kann eine hohe Anzahl gleichzeitig verabreichter Medikamente auch zu einer erhöhten Mortalität (2) oder einer Minderung der Lebensqualität führen (3). Grundsätzlich steigt mit einer Polypharmazie das Auftreten von etwaigen Interaktionen der Medikamente untereinander (4), (5). Die Angaben zur Häufigkeit solcher Interaktionen schwanken zwischen 5,4% und 63%, wobei diese Unterschiede nicht zuletzt aus uneinheitlichen Patientenpools mit verschiedenen Endpunkten und auch aus einer fehlenden allgemeingültigen Einteilung der Arzneimittelinteraktionen herrühren (6), (7). Generell besteht durch die höhere Sensitivität und durch die teils in den Krankenhausalltag integrierten Erkennungssysteme für Interaktionen der Medikamente untereinander eine gewisse Dynamik, aber weiterhin existiert eine gewisse Varianz bei den Erkennungssystemen, die weiterhin als Werkzeug zur Quantifizierung herangezogen werden (7). Bei stationären Patienten, die wissenschaftlich betrachtet am besten erfasst werden können, liegt der Anteil derer, die eine Medikamentenliste mit Potential zu Interaktionen haben, bei etwa 37-60% (8). Allgemein ist davon auszugehen, dass rund ein Viertel der Arzneimittelwechselwirkungen, die nicht nur zu höheren Behandlungskosten, sondern auch zu einer höheren Mortalität führen können (9), vermeidbar wären. Deshalb wurden in den vergangenen Jahren verstärkt Programme (*F(it)f*ORT(*he*)A(*ged*)-Projekt entwickelt von der Universitätsmedizin Mannheim, *HeiCARE*-Projekt des Universitätsklinikums Heidelberg) aufgelegt und gesicherte Datenbanken (SCHOLZ Datenbank) angelegt, um die Pharmakotherapie

im Allgemeinen zu verbessern aber auch um mögliche Interaktionen besser erfassen und nachverfolgen zu können (10), (11). Im Allgemeinen nimmt die Wahrscheinlichkeit von Arzneimittel-Interaktionen bei längeren stationären Aufenthalten und mit steigendem Lebensalter zu (6). Ebenfalls begünstigend für das Auftreten von (vermeidbaren) Arzneimittelinteraktion wirkt sich die medizinische Versorgung eines Patienten durch verschiedene medizinische Abteilungen aus (6).

Neben dem zunehmenden Alter als begünstigender Faktor für eine Polypharmazie sind chronische Erkrankungen zu nennen. Eine heutzutage als chronisch anzusehende Erkrankung ist die Infektion mit dem HI-Virus (*Human immunodeficiency virus*). Diese Betrachtung als chronische Krankheit anstatt einer akuten Infektionskrankheit geht von der im Jahre 1996 eingeführten HAART (Abkürzung von *highly active antiretroviral therapy*) - Therapie aus. Hierbei bilden verschiedene Medikamente aus den Gruppen der Protease-Inhibitoren (PI), der Nicht-nukleosidischen Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NNRTI), der *Integrase strand transfer inhibitors* (INSTI) und der Nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NRTI) das Fundament. Substanzen der verschiedenen Substanzklassen werden zur Reduktion der Viruslast und aufgrund des Risikos der Resistenzentwicklung in Kombination eingesetzt (12). Die zusätzlich mit HIV vergesellschafteten Krankheiten (teilweise selbst therapiebedürftig) (13), (14), (15), (16) und das im Verlauf der Therapie zunehmende Alter der Patienten, die ohnehin schon Hauptzielgruppe von pharmakologischen Substanzen und durch deren gemeinsame Einnahme gefährdet sind (17), bedingen insgesamt ein hohes Maß an Wechselwirkungen (18).

Insgesamt gesehen führen somit eine zunehmend alternde Gesellschaft und die daraus resultierende Vielfalt der Diagnosen in Kombination mit verbesserten medizinischen Möglichkeiten zu einer zunehmenden Einnahme von Medikamenten, die ein stetig ansteigendes Potential von wechselseitiger Beeinflussung verschiedener Medikamente mit sich bringt. Diese wechselseitige Beeinflussung kann einerseits pharmakodynamischer Natur sein, andererseits aber auch die Pharmakokinetik betreffen.

Bei pharmakodynamischen Interaktionen handelt es sich in erster Linie um Prozesse, die unmittelbar vom Wirkstoff ausgehend auf den Organismus Wirkung zeigen, wobei in Anbetracht der Komplexität und Einheit des menschlichen Organismus nach Gabe

des Arzneimittels die Angriffsstellen eines Wirkstoffes meist vielfältig sind.

Man unterscheidet hier antagonistische von synergistischen pharmakodynamischen Interaktionen (19). Im Rahmen dieser Interaktion wird die Gesamtwirkung des Wirkstoffes bei gleicher Aktivität lokal oder global verändert. Folglich werden auf der einen Seite häufig verschiedene Wirkstoffe miteinander kombiniert, um mögliche unerwünschte Nebenwirkungen zu vermeiden. Beispielsweise wird bei einer Medikation mit nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR) über einen längeren Zeitraum hinweg häufig ein Protonen-Pumpen-Inhibitor zugesetzt, um Komplikationen, die im Rahmen der Hemmung der Cyclooxygenasen durch NSAR und damit einhergehender verminderter Synthese von Prostaglandinen entstehen, im Gastrointestinaltrakt vorbeugend entgegenzuwirken (20). Die Vermeidung von eventuellen Folgekosten ist ein positiver Begleiteffekt (21). Im Falle der etablierten Kombination von Oxycodon und Naloxon wird die Opioidwirkung auf den Darm unterbunden ohne die analgetische Wirkung zu reduzieren. Auf der anderen Seite kann es bei zufälligen Kombinationen von beispielsweise Acetylsalicylsäure und einem anderen NSAR je nach Affinität zur Cyclooxygenase zur Beeinträchtigung der Thrombozytenaggregationshemmung (Hemmung von Thromboxan  $A_2$ ) durch Acetylsalicylsäure kommen (22).

Unter Pharmakokinetik versteht man den Umgang der menschlichen Physiologie mit einem Arzneimittel beginnend mit der Absorption, gefolgt von der Verteilung (Distribution) im Körper, der etwaigen Umbauprozesse (Metabolismus) und letztendlich die Ausscheidung (Elimination). Jeder dieser sogenannten ADME-Prozesse (Absorption, Distribution, Metabolismus (und) Elimination) wird durch unterschiedliche molekulare Mechanismen beeinflusst, welche Zielstruktur einer Arzneimittelwechselwirkung sein können. Bei der Betrachtung von pharmakologischen Arzneimittelinteraktionen wird besonders dem Arzneimittelmetabolismus Bedeutung beigemessen, weshalb dieser im Folgenden genauer beschrieben wird.

Die Absorption beschreibt alle Prozesse, die die Aufnahme eines Arzneistoffs vom Ort der Applikation beeinflussen, hierbei spielen Mechanismen wie Diffusion und Transport eine Rolle. Dies beinhaltet im Detail unter anderem das Resorptionsverhalten, welches sowohl von den Eigenschaften des Pharmakons als auch von den lokalen Gegebenheiten am Applikationsort abhängig ist. Hierbei sind

die beiden gängigsten Methoden der Applikation sicherlich die intravenöse Verabreichung - bei der die Resorption naturgemäß keine Rolle spielt, was *per definitionem* einer 100%igen Bioverfügbarkeit entspricht - sowie die orale Gabe, bei der, bedingt durch die Passage des Verdauungstraktes und den dortigen Begleitumständen, in der Regel keine 100%ige Absorption erreicht wird. Bei Letzterer kann der *First-pass-Metabolismus* auch in Abhängigkeit von der vorhandenen Leberfunktion und dem Medikament an sich die Bioverfügbarkeit noch weiter reduzieren.

Die anschließende Verteilung im Körper wird im Wesentlichen durch die dem Pharmakon innewohnenden Eigenschaften bestimmt. Dieses breitet sich entsprechend aus und zwar abhängig von Membranen oder auch vorhandenen Schrankensystemen (zum Beispiel die Blut-Hirn-Schranke oder die Plazentaschranke), von dem Durchblutungsanteil des jeweiligen Organs oder auch der Affinität des Pharmakons zu den Plasmaproteinen.

Die Biotransformation fasst jede chemische Modifikation eines Arzneistoffs durch Organismus-eigene Mechanismen zusammen und wird generell in drei Phasen unterteilt, auf die im späteren Verlauf noch genauer eingegangen wird. In Phase 0 findet der Ein- bzw. Ausstrom in die Zelle bzw. aus der Zelle oder ins Gewebe statt. Dieser wird durch Membranproteine (sog. Transporter) kontrolliert, die sich je nach Organ an die spezifische zelluläre Kommunikation angepasst und ausdifferenziert haben. Einmal von der Zelle aufgenommen, werden Arzneistoffe in Phase I durch Enzym-katalysierte Reaktionen funktionalisiert (d.h. hydrolysiert, reduziert oder oxidiert) und so für etwaige Konjugationsreaktionen, katalysiert durch Enzyme der Phase II, vorbereitet. In Phase II schließlich, die je nach Art und Eigenschaften des Medikaments auch direkt auf Phase 0 folgen kann, wird dann in einer Konjugationsreaktion eine Trägersubstanz angefügt. Generell handelt es sich bei den letzten beiden Phasen um automatisiert-ablaufende enzymatische Prozesse, die folglich mitunter nicht nur die gewünschte physiologisch zuträgliche Wirkung (Entgiftung oder pharmakologisch-erwünschte Synthese (bei Prodrugs)), sondern in bestimmten Fällen auch schädliche Auswirkungen auf den Organismus haben können. Die Art der anschließenden Ausscheidung richtet sich nach den chemischen Eigenschaften der Substanz - beispielsweise ob der Wirkstoff hydrophil oder eher hydrophob ist. Entsprechend werden die Wirkstoffe renal (über die Niere → Urin) oder biliär (über die Gallenblase → Stuhlgang) ausgeschieden.

Somit ergibt sich aus der oben beschriebenen Pharmakokinetik die zweite Möglichkeit einer Interaktion verschiedener Wirkstoffe. In diesem Fall kommt es zu einer Veränderung des An- bzw. des Abflutens eines Wirkstoffes. Beispielsweise kann eine reduzierte Bioverfügbarkeit von Efavirenz unter Therapie mit Rifampicin auftreten (23) oder unter Ritonavir im Rahmen einer HIV-Therapie die Wirkung von Prasugrel im akuten Koronarsyndrom herabgesetzt werden (24).

Beide Interaktionsmöglichkeiten – die pharmakokinetischen und die pharmakodynamischen – sind nicht vollkommen unabhängig voneinander und bedingen einander, da je nach Kinetik die Dosis im Rahmen der Schwellen die Dynamik verändert. Um im ersten Schritt ein grundlegendes Verständnis für die verschiedenen Vorgänge im menschlichen Organismus von der Tabletteneinnahme bis hin zur eigentlichen Wirkung zu vermitteln, soll in den folgenden Abschnitten genauer auf den Arzneimetabolismus eingegangen werden.

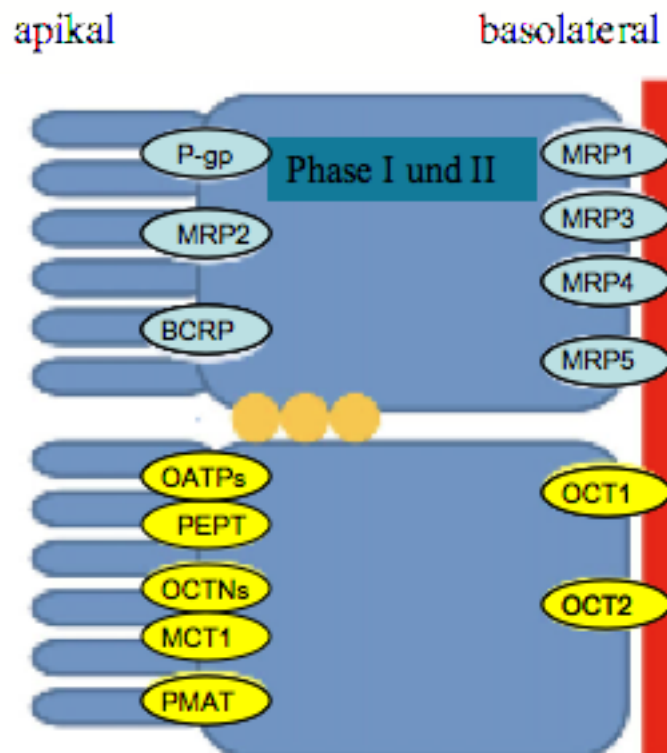
## **1.1 Arzneimetabolismus**

Der Arzneimetabolismus wird in verschiedene Phasen unterteilt, wobei Transportprozesse und metabolische Prozesse unterschieden werden. Zum Verständnis des Arzneimetabolismus hat sicherlich Richard Tecwyn Williams wesentlich beigetragen, der in seinem Buch *Detoxication mechanisms*, erschienen im Jahre 1947, die Erkenntnisse der Organischen Chemie auf die Vorgänge im menschlichen Körper angewendet hat (25).

### **1.1.1 Transportproteine**

Ende des 19. Jahrhunderts stellte Charles Ernest Overton die These auf, dass die Permeabilität einer Substanz durch die Zellmembran maßgeblich von ihrer Lipophilie abhängt (26). Dieser grundlegende Zusammenhang zwischen den physikochemischen Eigenschaften einer Substanz und deren Transport durch eine Zellmembran mittels passiver Diffusion ist auch heutzutage gültig, wurde jedoch um den Beitrag von Transportproteinen erweitert (27). Demzufolge spielen neben der passiven Diffusion, welche aus dem Konzentrationsgradienten resultiert, spezialisierte Membranproteine für den Stofftransport eine zentrale Rolle. Diese spezialisierten Proteine werden im Allgemeinen in der Gruppe der sog. Transport-

Proteine zusammengefasst, die die Aufnahme und Abgabe von Substanzen in die Zelle und aus der Zelle realisieren (28) (s. **Abbildung 1**).



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung von der Vielfalt der Transporter anhand eines Enterozyten (*P-gp* – *P*-Glykoprotein; *MRP* – multidrug resistance-associated protein; *BCRP* – breast cancer resistance protein; *OATPs* – organic anion transporting polypeptides; *PEPT* – peptide transporter protein; *OCTNs* – organic cation/carnitine transporters; *MCT* – monocarboxylate transporter protein; *PMAT* – plasma membrane monoamine transporter; *OCT* – organic cation transporter) (29).

Transportproteine nehmen eine Vielzahl von Funktionen wahr. Sie bilden die Grundlage der Kommunikation der Zelle mit der Umgebung (Extrazellulärraum, andere Zellen, etc.); außerdem sind sie verantwortlich für das Gleichgewicht zwischen dem für die Zelle elementaren inneren und dem äußeren Milieu. Im Hinblick auf die Arzneimitteltherapie wird angenommen, dass Transportproteine eine entscheidende Rolle bei der Resorption, Verteilung und Elimination von endogenen und exogenen Substanzen spielen (30). Das Hauptaugenmerk hinsichtlich der Absorption und Elimination von Arzneimitteln gilt hierbei Organen wie der Leber, den Nieren oder dem Darm. Es ist bekannt, dass Zellen dieser Organe über spezifische Mechanismen zur Aufnahme und Elimination von Substanzen verfügen.



Bei Membranproteinen mit Transportfunktion werden ganz allgemein Kanäle, Carrier und Pumpen voneinander unterschieden. Bei den Kanälen gibt es zum Beispiel die Aquaporine und die Ionenkanäle. Diese können gezielt aktiviert (geöffnet) werden, sodass sie für bestimmte Teilchen oder Stoffgruppen durchlässig werden ohne eine weitere Änderung der Konformation zu durchlaufen. Je nach Konzentrationsgradient kann hierdurch eine hohe effektive Transportgeschwindigkeit erreicht werden (31). Carrier hingegen weisen aufgrund der für den Transport notwendigen Konformationsänderung eine deutlich geringere Transportgeschwindigkeit auf. Generell werden Carrier weiter unterteilt in Uniporter, Symporter und Antiporter. Allen ist gemein, dass nur eine limitierte Anzahl von Teilchen pro Konformation transportiert wird. Die Konzentrationsdifferenz ist dabei für den Transport an sich entscheidend, sofern nicht durch eine Kopplung ein sekundär-aktiver Transport gewährleistet wird (31). Sofern die Carrier jedoch ATP als Energieträger nutzen, werden sie als Pumpen bezeichnet. In diesem Fall kann die Diffusionsrichtung primär von der Richtung des Konzentrationsgradienten abweichen. Der wohl bekannteste Vertreter dieser Klasse der Transportproteine ist die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase.

Arzneimitteltransporter haben das pharmakologische Interesse insbesondere durch die Entdeckung des P-Glykoproteins (P-gp), auch bekannt als ABCB1 (32), erregt. Dieses ist vermutlich der „berühmteste“ Vertreter der *ATP binding cassette* (ABC)-Transporter. P-Glykoprotein wurde erstmals im Jahre 1976 aus den Ovarienzellen des chinesischen Hamsters isoliert (33), und mit der Entstehung von Arzneimittelresistenzen von Krebszellen in Zusammenhang gebracht, was auch der ursprüngliche Name *multidrug resistance protein 1* (MDR1) andeutet (34), (35). Heute weiß man, dass P-Glykoprotein nicht nur in Tumoren eine Schutzfunktion einnimmt, sondern auch in gesunden Organen. Zudem weiß man heute, dass ABCB1 ein Mitglied einer phylogenetisch stark konservierten Proteinfamilie ist, deren Mitgliedern die Verwendung der Energie der ATP-Hydrolyse für einen aktiven Transport gemein ist. Die Gruppe der ABC-Transporter umfasst insgesamt 48 Proteine, die in 7 Subfamilien untergliedert werden (ABCA - ABCG) (36). Die Größe der Substrate reicht von Ionen und Aminosäuren bis hin zu Proteinen und Polysacchariden, die sowohl in die Zelle hinein, als auch aus der Zelle heraustransportiert werden (37). Wichtige Repräsentanten dieser Familie sind z.B. ABCC1 (MRP1), ABCC2 (MRP2) und ABCC7 (besser bekannt als CFTR (*Cystic*

*fibrosis transmembrane conductance regulator*)-Kanal), von denen ABCC2 und ABCG2 (BCRP) auch Gegenstand dieser Arbeit sind.

Da diese Gruppe der ABC-Transporter auf die Pharmakokinetik von Medikamenten dem Beispiel entsprechend einen erheblichen Einfluss hat, soll auf diese kurz eingegangen werden. So tragen diese Transporter generell zur verminderten Absorption von Medikamenten / Substraten im Darm bei oder hemmen den Übertritt in andere Kompartimente (vgl. Blut-Hirn-Schranke) bzw. fördern (Urogenitaltrakt und Gallenwege) diesen (38). Konkret sitzen beispielsweise Transporter, wie ABCG2, ABCB1, ABCC1 und ABCC2, in der apikalen Membran des Darms und begrenzen dort eine Vielzahl von Medikamenten (unter anderem PI oder NNRTI in der HIV-Therapie oder Statine) in ihrer Absorption und reduzieren so deren orale Bioverfügbarkeit (29). Ebenso können höhere Expressionen von ABCB1 (P-gp) auch im Bereich der Tumorerkrankungen, zum Beispiel bei akuter myeloischer Leukämie, zum Versagen der Therapie beitragen oder zumindest zu schlechteren Therapieergebnissen führen (39). Dies ist naheliegend, wenn man berücksichtigt, dass Chemotherapeutika, wie Anthracycline, Irinotecan oder Vinblastin Substrate dieses Efflux-Transporters sind. Durch die höhere Aktivität von ABCB1 kommt es intrazellulär zu entsprechend niedrigeren Konzentrationen der Chemotherapeutika, als es allgemein zu erwarten ist; folglich wird die Therapie in ihrer Effektivität negativ beeinflusst (40). Diese Erkenntnis stellt ein weiteres gutes Beispiel dafür dar, wie das detaillierte Verständnis der Vorgänge innerhalb der Tumorzellen aufgrund deren jeweilig entarteten Eigenschaften zur Entwicklung und Gestaltung von besseren Therapieansätzen bzw. zu einer individuellen Therapieplanung führen kann (41).

Aufgrund ihrer Funktionen führen etwaige Defekte oder Störungen dieser Proteine zu einer Vielzahl von verschiedenen Krankheitsformen. Bei der Mukoviszidose beispielsweise liegt letztendlich eine genetisch bedingte Funktionsstörung des bereits erwähnten CFTR-Kanals (ABCC7 dient als Ionenkanal ohne eine Pumpfunktion zu besitzen) vor, dessen Gensequenz schon 1989 von Riordan identifiziert wurde (42). Weitere Beispiele für derartige Dysfunktionen sind das Dubin-Johnson-Syndrom, das eine Form der hereditären Hyperbilirubinämie mit autosomal rezessivem Erbgang darstellt und vorwiegend in persisch-jüdischen Bevölkerungsgruppen auftritt. Genauer gesagt handelt es sich um einen Defekt auf dem Chromosom 10q 24, der bewirkt, dass ABCC2/MRP2 nicht vollfunktionsfähig

vorhanden ist (43), was die elementare Funktion von MRP2 (+MRP1, BCRP) als Eliminationstransporter für Arzneistoffe oder Toxine widerspiegelt (44).

Im Hinblick auf die vorgestellten Transportmöglichkeiten ist allerdings immer zu bedenken, dass die Transporter kein starres System darstellen. Vielmehr sind sie durch eine Reihe von Faktoren beeinflussbar, wie beispielsweise Hormone, das Tumorsuppressor-Protein p53 (45), im allgemeinen Stresssituationen über inflammatorische Prozesse (45), Mediatoren, wie bspw. das Antidiuretische Hormon (ADH) (46) oder die Gruppe der Eikosanoide (47). Derartige Mechanismen, die regulierend auf die Transporter wirken, sei es durch Stabilisierung, Transport oder Spleißen der RNA, und somit in den Metabolismus des Organismus eingreifen (45), sind nicht nur für den Ansatzpunkt des Arzneimittels an sich wichtig, sondern auch von herausragender Bedeutung für die Vorhersagbarkeit von Arzneimittelwirkungen bzw. von deren Interaktionen. Denn variable Expressionen von Transportern jedweder Art und Genese mit dadurch limitierten oder erweiterten Funktionen können zum Teil signifikanten Einfluss auf den menschlichen Organismus haben. Daher soll im Weiteren (Kapitel **1.2 Nukleäre Rezeptoren**) noch einmal genauer hierauf eingegangen werden.

Generell ist hierbei zu berücksichtigen, dass neben den Fehlfunktionen und den endogenen Regulationsmöglichkeiten, die einen Einfluss auf die Wirkung auf den Arzneimetabolismus (Aktivität der Transporter) haben, auch genetische Polymorphismen eine Rolle spielen. Letztere sind schließlich das Fundament der Vielfalt der Individuen (48). Daher ist die Vielfalt der aktuell existierenden Transporter nicht zuletzt auch eine Folge für die der Evolution geschuldeten Anpassung der Zellen - alleine oder im Zellverband (27).

### **1.1.2 Cytochrom P450 Monoxygenasen**

Neben dem erleichterten Transport spielt auch die chemische Modifikation (Metabolismus) zugeführter Substanzen eine entscheidende Rolle im Wechselspiel zwischen Arzneistoff und dem menschlichen Organismus. Vor allem die Leber sowie das Intestinum können mit ihrer hohen metabolischen Aktivität in besonderer Weise das Anfluten und damit die Exposition des Organismus gegenüber exogen zugeführten Substanzen modulieren. Eine zentrale Rolle in dem ineinandergreifenden Räderwerk metabolisierender Enzyme spielen hierbei die

sogenannten Cytochrom P450-Enzyme (CYP-Enzyme), die in allen Eukaryonten, vielen Prokaryonten und in Urbakterien vorkommen (49). Bei den CYP-Enzymen handelt es sich um eine Familie von Hämproteinen (Monooxygenasen) deren wichtigste Vertreter aus Sicht des Arzneistoffmetabolismus das CYP3A4, CYP2D6 und die Mitglieder der CYP2C-Familie sind. Diese dienen unter anderem als Katalysatoren für Oxidationsreaktionen der Phase I des Arzneimetabolismus (Anbindung der funktionellen Gruppe (Hydroxylgruppe) an die verschiedenen (Arznei-)Stoffe), um dadurch Angriffsstellen für die in Phase II hinzugefügten funktionellen Gruppen bereitzustellen, auf die im folgenden Kapitel **1.1.3 Enzyme der Phase II-Biotransformation** nochmal kurz eingegangen wird. Als Energielieferant bzw. als Elektronendonator wird hierbei von den Monooxygenasen im endoplasmatischen Retikulum das reduzierende Potential von NADPH genutzt, welches hauptsächlich im Pentosephosphatweg generiert wird. Generell sollte immer berücksichtigt werden, dass die Abfolge von Phase II auf Phase I, wie bereits erwähnt, nicht immer zwingend erforderlich ist. So kann bei entsprechender Beschaffenheit des Agens Phase II direkt nach der Aufnahme (Phase 0) die Ausscheidung einläuten. Die veränderte chemische Struktur des Wirkstoffes kann neben einer pharmakologischen Inaktivierung auch zu einer Verstärkung bzw. erst zur Entfaltung oder gar zu einer neuen zusätzlichen Wirkung führen. Beispiele hierfür sind die unerwünschte Toxizität von Paracetamol oder die erwünschte Wirkung von Clopidogrel am GpIIb/IIIa-Rezeptor aktiviert durch CYP2C19 (50).

Die Veränderung der metabolischen Aktivität eines Cytochrom P450 Enzyms kann die Wirkungen einer Substanz auf den Körper signifikant beeinflussen. Ein wichtiger Mechanismus, der die Veränderung der metabolischen Kapazität beeinflussen kann, ist die (nicht-) kompetitive Hemmung durch die gleichzeitige Gabe von zwei Substraten. Im Falle einer Therapie mit dem Antiarrhythmikum der Klasse III Amiodaron mit seinem Metaboliten Desethylamiodaron beispielsweise kann durch die Inhibition von verschiedenen CYP-Enzymen die Clearance der Ko-Medikation (Theophyllin, Ciclosporin oder Phenytoin) beeinträchtigt werden bzw. bedingt es einen Anstieg des Plasmaspiegels der Ko-Medikation (51).

Ein anderer Mechanismus der Veränderungen der metabolischen Aktivität von Cytochrom P450-Enzymen findet seinen Ursprung in der genetischen Information. Genetisch bedingte diskrepante Wirkungen von CYP-Enzymen wurden unter anderem in den 80iger Jahren im Zusammenhang mit dem Einsatz von Mephenytoin

beschrieben. In der Folge wurden auch die beiden Begriffe „*poor metabolizers*“ und „*extensive metabolizers*“ geprägt (52), (53). So war aufgefallen, dass die genetische Genese und Verteilung je nach Herkunft und Rasse der Patienten unterschiedlich ausfällt. In Bezug auf das Cytochrom 2C19 zum Beispiel sind bei den Kaukasiern etwa 2-5% den „*poor metabolizers*“ zuzuordnen, während es bei den Asiaten etwa 13-23% sind (54). Die damit einhergehenden Funktionsunterschiede im Ausmaß der metabolischen Aktivität auf der zugrundeliegenden Vielfalt an Polymorphismen in den Cytochromen 2C9 und 2C19 sorgen in der medikamentösen Behandlung für eine starke Variation der schlussendlichen Konzentration der Wirkstoffe im Blut. So kann beispielsweise die Gabe der gleichen Dosis Mephenytoin je nach genetischer Information von CYP2C19 in einem Fall zu toxischen Konzentrationen und im anderen Fall zu Konzentrationen unterhalb der antikonvulsiv-therapeutischen Grenze führen (55). Auch beim CYP2B6 wurde nachgewiesen, dass mit bestimmten Polymorphismen *in vivo* in der schwarzen Bevölkerung merkliche Veränderungen im Arzneimittelmetabolismus – in diesem Fall an dem Beispiel von Efavirenz in der HIV-Therapie - vergesellschaftet sind (56).

Auch bei dem zuvor erwähnten und von Cytochromen abhängigen Clopidogrel (Prodrug) kann voraussichtlich dessen positive Wirkung auf die kardiovaskuläre Ereignisrate bei interventionsbedürftiger Koronarsklerose bedingt durch bestimmte individuelle Allele in der Bevölkerung variieren (57), sodass die Anwendung anderer Plättchenhemmer, wie Ticagrelor in dieser Hinsicht vielversprechender erscheint (58).

Ein weiterer Mechanismus, welcher die Aktivität von Cytochromen beeinflusst, ist auf der Ebene der Transkription zu finden. Es handelt sich um eine Modulation der Expression durch liganden-aktivierte Transkriptionsfaktoren, die in allen ADME-Prozessen ansetzen können (59). Die Induktion und Hemmung der CYP-Enzyme werden dabei häufig insbesondere durch die Substrate derselben CYP-Enzyme hervorgerufen (z.B. Dexamethason (im Allgemeinen: Glukokortikoide), RU-486, Rifampicin oder Phenobarbital; diese erhöhen generell den Umsatz der CYP3A Enzyme (60)). Diese Modulation durch nukleäre Rezeptoren (NR) wird in dem Abschnitt **1.3 Nukleäre Rezeptoren** genauer betrachtet.

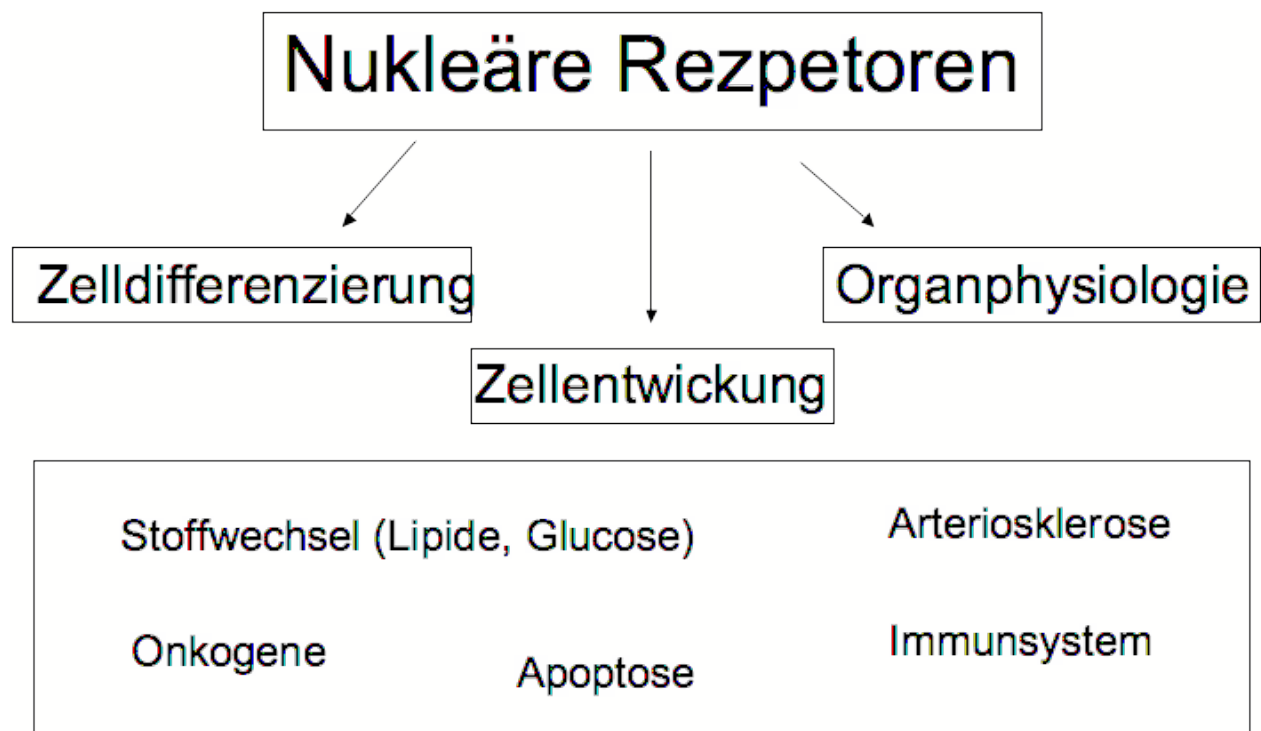
### 1.1.3 Enzyme der Phase II-Biotransformation

Dieser (letzte) Schritt der Biotransformation wird überwiegend durch Transferasen getragen und bezweckt hauptsächlich eine Umwandlung (oder auch Konjugation) zur Vorbereitung der Exkretion oder auch zur pharmakologischen Inaktivierung. Beispiele hierfür sind Konjugationen mit Glukuronsäure, Sulfat, Alkylen (Methyl- und Acetyl-) und Aminosäuren. Durch die Konjugation kann die Polarisierung abgeschlossen werden, sodass eine renale oder biliäre Elimination möglich ist. In der Forschung haben bis *dato* diese Enzyme nicht sehr häufig im Fokus gestanden, denn im Vergleich zu den Cytochromen sind die Transferasen bislang seltener als Beteiligte von Interaktionen aufgefallen und somit in diesem Zusammenhang von weniger Interesse (61). Die größte Gruppe der Transferasen bilden die UDP-glucuronosyltransferasen (UGTs), die etwa 40-70% der angewendeten Medikamente metabolisieren (62). Diese Familie der UGTs besteht aus zwei Mitgliedern, UGT1 und UGT2, und beim Menschen unterscheidet man noch drei Subfamilien: UGT1A, UGT2A und UGT2B (63). Weitere Vertreter der Enzyme der Phase II der Biotransformation sind unter anderem Sulfotransferasen (SULTs), Glutathion-S-Transferasen und N-Acetyltransferasen (NATs). Auch hier wirken sich genetische und äußere Faktoren auf die Transferasen aus und können beispielsweise die endotheliale Zellfunktion mit beeinflussen (64). Ebenso sind Induktionen, wie z.B. von UGT1A1 durch Kaffee, *in vitro* (Caco2- und HepG2-Zellen) und *in vivo* im Magen und Darm bei genetisch veränderten Mäusen beschrieben worden, wobei die entsprechende physiologische Auswirkung noch nicht eindeutig geklärt ist (65). Generell gestalten sich klare Aussagen zu Medikamenten-Interaktionen, die von der Induktion von Transferasen ausgehen, bislang sehr schwierig (63). Neben den konstitutiven Regulationsmöglichkeiten der Transferasen mittels Transkriptionsfaktoren, wie *octamer transcription factor 1*, können die Enzyme, wie auch schon die Transportproteine und die Cytochrom P450 Monooxygenasen, in ihrer Expression auch mittels der Transkriptionsfaktoren der nukleären Rezeptoren verändert werden (63), die im folgenden Abschnitt vorgestellt werden.

## 1.2 Nukleäre Rezeptoren

Unter dem Begriff der nukleären Rezeptoren werden Transkriptionsfaktoren zusammengefasst, die aufgrund der liganden-abhängigen Aktivierung auch als

Rezeptoren fungieren (66). Nukleäre Rezeptoren erhöhen die Transkription ihrer Zielgene und beeinflussen damit die Expression. Einige der in den vorherigen Kapiteln erwähnten Proteine und Enzyme des Metabolismus werden durch die Gruppe der nukleären Rezeptoren (NR) gesteuert bzw. in ihrer Aktivität angepasst. NRs erfüllen auf vielfältige Weise biologische Funktionen und greifen durch Ihren Einfluss auf die Transkription regulierend in zentrale zelluläre Prozesse ein. Sie koordinieren Anpassungsreaktionen und erhalten das Gleichgewicht des Organismus auf die verschiedenen Einflüsse. Zu den modulierten Prozessen gehören neben der Proliferation und der zellulären Differenzierung auch verschiedene metabolische Prozesse (67) (s. **Abbildung 2**); die Wirkung einzelner nukleärer Rezeptoren ist hierbei von den regulierten Genen abhängig.



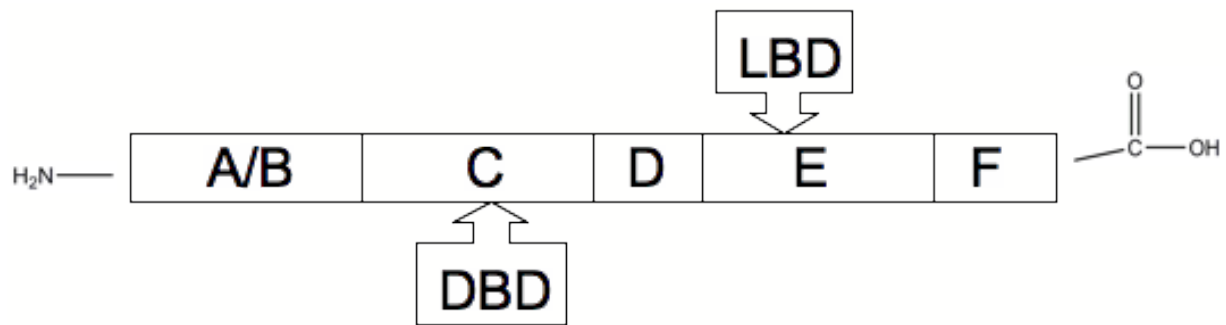
**Abbildung 2:** Übersicht der regulierenden Funktion der nukleären Rezeptoren (68), (69), (70), (71), (72).

Mittlerweile sind im Menschen 48 NRs identifiziert worden (73), die teils ein sich gegenseitig bedingendes Netzwerk bilden (74). Ein charakteristisches Beispiel für das vielschichtige, eng verzahnte, überlappende und regulierende Gebilde der NRs ist das Zielgen CYP3A4 erwähnt, dem wegen seiner hohen Expressionsrate und somit der Fähigkeit eine Vielzahl an Medikamenten (>50%) zu verstoffwechseln eine

enorme Bedeutung zukommt. Die Expression und die Aktivität des CYP3A4 werden durch unterschiedliche NRs reguliert. Hierzu zählen nicht nur die sog. Arzneimittelsensoren PXR und CAR, sondern auch NRs, deren Funktion hauptsächlich in der Physiologie des Organismus liegt, nämlich dem GR, dem VDR, dem FXR sowie dem HNF4 $\alpha$  (gehört wie CAR zu den *enigmatic orphan receptors*, s. folgender Abschnitt) (75).

Die ersten NRs, die entdeckt wurden, waren der Glukokortikoidrezeptor (GR) (76), der Vitamin D-Rezeptor und der Thyroid-Hormon-Rezeptor (77). Diese liganden-aktivierten Transkriptionsfaktoren wurden entsprechend Ihrer Liganden benannt. Später in den 90iger Jahren ermöglichte die Entwicklung neuer technischer Verfahren die zunehmend rasantere Entdeckung vieler neuer NRs, ohne sie jedoch in einen physiologischen Kontext einordnen zu können. Dadurch wurden viele NRs, deren Liganden noch nicht bekannt waren, zunächst als „*orphan receptors*“ bezeichnet. Teilweise erfolgte die Benennung der neu entdeckten NRs ohne strikte Regeln. So ist zum Beispiel PXR (*pregnane X receptor*) - nach aktueller Nomenklatur als NR1I2 eingeordnet - auch unter PAR und SXR bekannt (74). Um nun den wissenschaftlichen Diskurs zwischen verschiedenen Forschungsgruppen zu erleichtern und möglichen Missverständnissen vorzubeugen, wurde schließlich durch einige Forscher, im Zusammenschluss des *Nuclear Receptors Nomenclature Committee* und des *International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification*, eine allgemeingültige Nomenklatur eingeführt (78). Als Grundlage für die der Klassifikation zugrundeliegenden Einteilung diente der Aufbau der NRs, begünstigt insbesondere durch die Entschlüsselung ihrer prinzipiellen Struktur (s. **Abbildung 3**). Allgemein ist der Aufbau wie folgt: A/B, C, D, E, F (66), wobei insbesondere die Region C, bestehend aus 2 Zinkfingern (DNA binding domain = DBD), sowie die Region E (Ligand binding domain = LBD + AF-2) als Dreh- und Angelpunkt im Hinblick auf die Regulierungsfunktion von Transportern und anderen Enzymen angesehen werden können. Die zwischen C und E befindliche Region D ermöglicht als Gelenk die Änderung der Formation des NR im Rahmen der Ligandenbindung (66).





**Abbildung 3:** *Skizzierter allgemeiner Aufbau eines NR.*

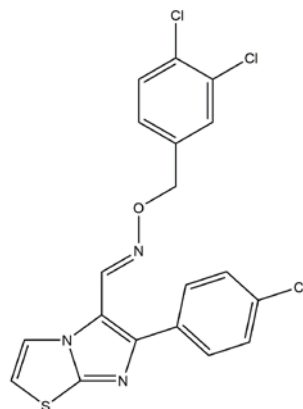
Die Region C wurde im Verlauf der Evolution am meisten vor Veränderungen geschützt (66). So variieren die Anteile der Differenzen in der Sequenz der DBD beim Menschen im Vergleich zu häufig verwandten Tiermodellen (Mäuse, Ratte, Hase) lediglich zwischen 4,6 bis 6,2%, wohingegen die Unterschiede in der LBD zwischen 18,9 und 27,4% betragen (79). Das voneinander abweichende Induktionsverhalten der NRs verschiedener Spezies hierbei resultiert am ehesten aus Unterschieden hinsichtlich der liganden-bindenden Bereiche (LBD), beinhaltend AF-2, welches sich am distalen Carboxyl-Ende befindet und die transkriptionale Transaktivierung übernimmt (80), als aus Unterschieden hinsichtlich der DNA-bindenden Bereiche (DBD) (81). Denn die Differenzen auf Ebene der LBD korrelieren mit der jeweiligen Induktionsantwort in den Spezies, was nur logisch und konsequent erscheint, da die vermehrte Transkription von Genen durch die direkte oder indirekte Aktivierung der NRs vermittelt von den endogenen und exogenen Stoffen veranlasst wird.

In der Forschung haben die NRs zunehmend an Bedeutung gewonnen. Dies nicht zuletzt auch deshalb, weil sie als Transkriptionsfaktoren agieren und somit die Grundlage für ein differenziertes Verständnis der Wechselwirkung der Medikamente mit dem Organismus und der Medikamente untereinander innerhalb des Individuums bilden. Auf die nukleären Rezeptoren PXR und CAR, die u.a. eine große Schnittmenge bezüglich ihrer Zielgene haben und daher häufig in einem Atemzug genannt werden, soll nun näher eingegangen werden. Im Gegensatz zu den zunächst bekannten NRs, beispielsweise den Steroidrezeptoren, übernehmen eine Vielzahl ihrer gemeinsamen Zielgene eine Funktion in der Elimination von endogenen und exogenen Substanzen und sind somit im Arzneimetabolismus von immenser Bedeutung. Daher sind sie auch maßgeblicher Gegenstand dieser Arbeit.

Beide gehören zur Familie NR11 und bilden Heterodimere mit RXR, bevor sie mit der DNA wechselwirken (prinzipiell ist die Interaktion der NRs mit der in der DNA sitzenden *hormone response elements* (HRE) als Heterodimer, Homodimer oder Monomer möglich). Dazu ist anzumerken, dass - abweichend von dem üblichen Aufbau eines NR aus fünf Bestandteilen - CAR lediglich aus drei Bausteinen (den Domänen C, D und E) besteht. Sowohl die sonst übliche A/B-Domäne, die ligandenunabhängig agiert, als auch die in hohem Maße variable F-Domäne, deren genaue Funktion noch weitgehend unbekannt ist, fehlen gänzlich (82). Entsprechend divergieren die Größen der beiden nukleären Rezeptoren (CAR: Isoform-3: mRNA: 1381bp und Proteingröße: 348 AS (25) gegenüber PXR: Isoform-1: mRNA: 4446bp und Proteingröße: 434 AS (25)). Beide NRs befinden sich im inaktiven Zustand überwiegend im Zytoplasma und pendeln zum Nukleus, um das Zielgen anzusteuern (83). Der Ort und die Aktivität von CAR wird ergänzend zu den Liganden durch verschiedene Phosphorylierungen gesteuert (84).

In Anbetracht der Funktionen von CAR und PXR den Metabolismus von Arzneimitteln in Ihrer Absorption und Elimination zu modulieren, ist es nicht überraschend, dass beide NR in hoher Menge in der Leber und im Dünndarm zu finden sind. Darüber hinaus wird CAR (erstmalig von Baes im Jahre 1994 als MB67 beschrieben (85)) noch in geringerem Maße im Herzen, in den Skelettmuskeln, im Gehirn, in der Niere und in der Lunge exprimiert, während PXR (erstmalig entdeckt von Kliewer und Blumberg (86), (87)) primär noch in der Niere und im gesamten Darmtrakt vorkommt, in geringeren Konzentrationen auch in Geweben, wie Lunge, Magen, Uterus, Ovarien, Plazenta, Herz, Brust, Knochenmark, einigen Gebieten im Gehirn und in den Nebennieren sowie in Zellen, wie beispielsweise den Osteoklasten oder Monozyten aus dem peripheren Blut und in der Bluthirnschranke (25). Neben der Funktion in der Regulation des Arzneimittelmetabolismus sind CAR und PXR regulierende Akteure im Bereich des Energiehaushaltes der Leber (Glukoneogenese, Glukogenolyse,  $\beta$ -Oxidation, Ketogenese, etc.) (88), im Cholesteroll- und Gallensäuregleichgewicht (89) und mischen in der Antwort des Körpers auf Entzündungsreaktionen mit (84). Sowohl PXR als auch CAR werden endogen hauptsächlich durch Liganden aktiviert, die sich vom Cholesteroll ableiten (90), was typische Rückkoppelungsreaktionen ermöglicht (solche Mechanismen (Autoinduktionen/-regulationen) existieren auch im Hormonhaushalt und triggern auch NR-NR-Regulierungen (91)).

Aufgrund des Umstandes, dass man lange annahm, dass CAR im Gegensatz zu PXR von Natur aus liganden-unabhängig hoch aktiv ist (CAR gehört zu den *enigmatic orphan receptors*, PXR zu den *adopted orphan receptors* (92); die Aktivität kann durch spezifische van-der Waals Kräfte zwischen den AS der LBD und der AF-2 hervorgerufen werden (93)) und zunächst nur bekannt war, dass zwei endogene Zwischenprodukte von Androstan erwiesenermaßen eine unterdrückende Funktion auf CAR haben (25), war die Entdeckung der Induktion im Falle der Maus von TCPOBOP (94) der Anlass zu prüfen, inwiefern CAR auch beim Menschen induzierbar ist. Mit Phenobarbital ist ein Induktor identifiziert worden, der CAR zwar aktiviert, aber, wie wenig später festgestellt wurde, auch auf PXR induzierenden Einfluss hat (95), (96). Erst mit CITCO, einem Imidazothiazol-Derivat (s. **Abbildung 4**), ist ein selektiver Induktor gefunden worden (keine besondere Aktivität gegenüber 16 NR) (97). Bislang ist abgesehen von CITCO lediglich beim Antiepileptikum Phenytoin bekannt, dass die Induktion von CYP3A4 und CYP2B6 hauptsächlich durch CAR vermittelt wird (98). Auf den bekannten Induktor von CAR Efavirenz, das zur Substanzklasse der nicht-nukleosidische Reverse Transkriptase-Inhibitoren NNRTI gehört, wird im Rahmen der Hypothese (Abschnitt **1.3**) dieser Arbeit näher eingegangen.



**Abbildung 4:** Strukturformel von CITCO (97).

Beide NRs (CAR und PXR) besitzen einige identische Liganden, was vermutlich aus einer relativ hohen Gemeinsamkeit hinsichtlich der in der LBD enthaltenen Aminosäuren (etwa 40%) resultiert (99). Aufgrund der Bindung der Liganden kommt es zu großen Faltungsunterschieden in der LBD, was die mannigfaltigen

Eigenschaften der LBD, speziell auch AF-2 mit seinen Co-Aktivatoren wie SRC-1 und p300/CBP, und dessen teils extrem kompatible Funktion unterstreicht (100). Als Beispiel hierfür ist das durch sehr unterschiedlichen Liganden (de-)aktivierende PXR mit seinen 5 wichtigen Hotspots prädestiniert, welche von der Evolution möglicherweise aus gewinnbringenden Gründen vor Veränderungen bewahrt wurden (101). Die jeweiligen NR-spezifischen Ligandenspektren sind in **Tabelle 1** aufgeführt.

**Tabelle 1:** Übersicht über ausgewählte Liganden der nukleären Rezeptoren PXR und CAR (25), (102), (98), (103).

Nukleäre Rezeptoren	CAR	PXR
Deaktivierende Liganden	<b>Clotrimazol</b> , Meclozin, Steroide	Ketoconazol, Ecteinascidin 743
Aktivierende Liganden	CITCO, Carbamazepin, Efavirenz, Nevirapin, Phenytoin, Phenobarbital, Testosteronmetabolite, Progesteronmetabolite, Artemisinin, Methoxychlor	Hyperforin, Rifampicin, Artemisinin, Verapamil, Protonenpumpeninhibitoren, Nitrendipin, Nifedipin, Statine, Carbamazepin, Phenobarbital, <b>Clotrimazol</b> , Paclitaxel, Dexamethason, Ritonavir, Cyclophosphamid, TCOPOBOP, Methoxychlor, Warfarin, Johanniskraut, Progesteronmetabolite

Die zunächst nicht berücksichtigte Induktionsfähigkeit von CAR erschwerte entsprechend – bei Fehlen dieses wesentlichen Bausteins zum Aufbau einer Kausalkette – das detaillierte Verständnis der endgültigen Induktion der Enzyme und Proteine des Metabolismus. Denn die Korrelation zwischen der Induktion des jeweiligen NR und der entsprechenden Transkription der etwaigen Zielgene bzw. seiner Expression auf Proteinebene (Übersicht der Zielgene von CAR und PXR s. **Tabelle 2**) erlaubt alleine keine exakte Aussage darüber, ob nicht aufgrund des überlappenden Systems der NR, wie z. B. bei Phenobarbital (99), (104), noch andere NR ebenfalls Einfluss auf die Transkription nehmen.

**Tabelle 2:** Zusammenfassung der Zielgene von PXR und CAR, geordnet nach der zugehörigen Funktion im Arzneimittelmetabolismus (82), (25), (105), (106), (102), (107).

	PXR	CAR
<b>Uptake transporters:</b>	OATP1A2,	SLC21A6 (OATP2)
<b>Phase I enzymes</b>	CYP1A1/2/6, CYP2B6, CYP3A4/7, CYP2C8/9/19, CYP7A1, CYP24A1	CYP2B6/10, CYP2C9/19, CYP3A4, CYP2A6
<b>Phase II enzymes</b>	SULT2A1, UGT1A1/3/4	UGT1A1
<b>Efflux transporters:</b>	ABCC1, ABCC2, ABCB1, ABCC3, ABCG2	MRP2 (ABCC2), ABCC3, ABCC4; ABCB1, ABCG2

Die hohe Komplexität der NR mit ihren mehr als 200 Co-Aktivatoren, in die sich die enge Verstrickung von CAR und PXR einreicht, kann zwar einerseits als ein Vorteil, i.e. Schutz / Absicherung gegen den Ausfall eines einzelnen NR, betrachtet, aber andererseits aus pharmakologischer Sicht auch als Nachteil gewertet werden, da dem Körper zugeführte Medikamente immer mit mehreren NR wechselwirken, deren Interaktionen häufig zu weiteren Induktionen physiologischer Prozesse führen können. Dies erschwert generell gesehen die isolierte Untersuchung einzelner Prozesse und Zusammenhänge, welche es aufzudecken gilt.

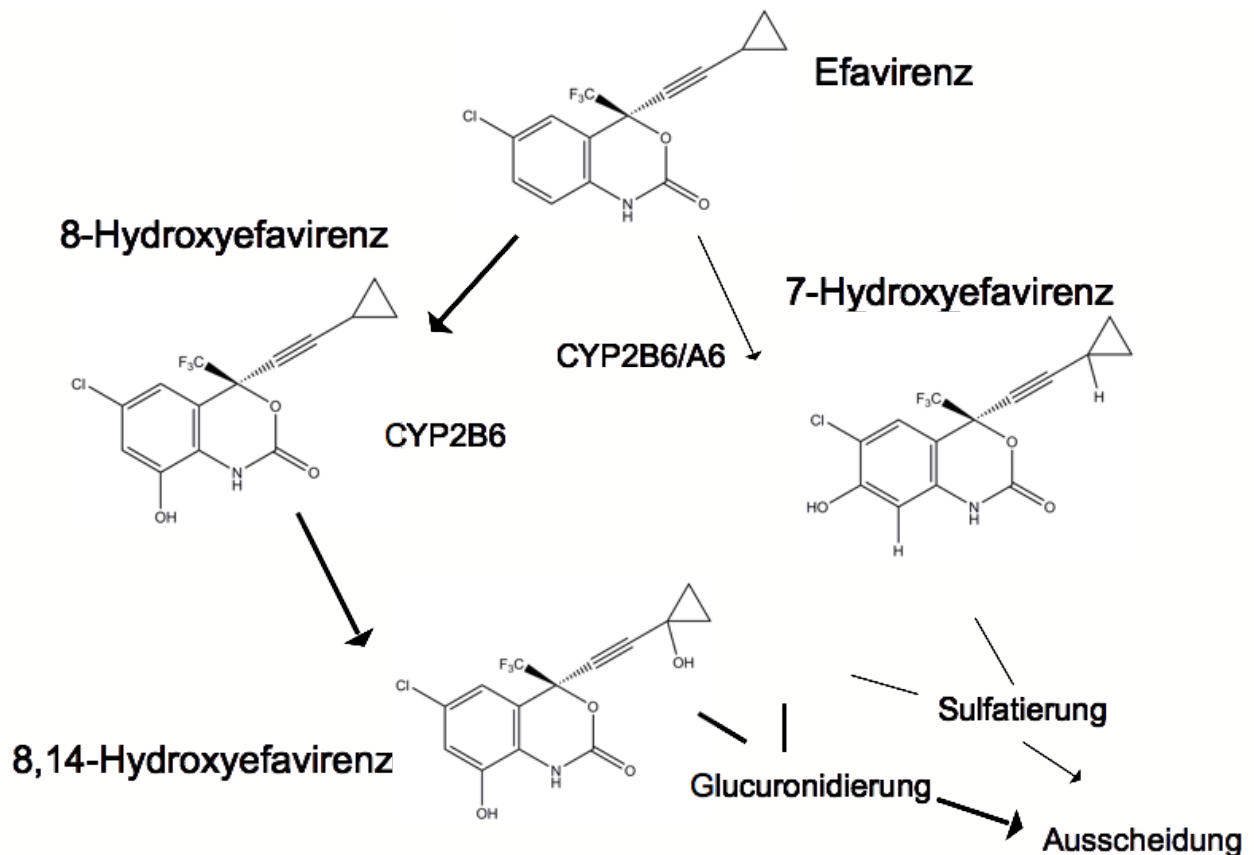
### 1.3 Hypothese der Studie

In dieser Arbeit steht das Interaktionspotential des Efavirenz (s. **Abbildung 5**), ein bekannter Induktor des nukleären Rezeptors CAR, im Mittelpunkt der Untersuchung. Efavirenz (EFA) findet Anwendung in der bereits erwähnten multimodalen, hochaktiven antiretroviralen HIV-Langzeit-Therapie (HAART), die darauf ausgelegt ist, der Entwicklung von Resistenzen entgegenzuwirken (108), aber dabei des Öfteren zu einer Induktionsbasierten, interaktionsgefährdeten Polypharmazie führen kann. Die generell notwendige Kombination mit anderen Wirkstoffen im Rahmen der Behandlung HIV-positiver Patienten erfordert eine genaue Kenntnis und somit ein besseres Verständnis des Interaktionspotentials von Efavirenz. Diesbezüglich

erschwerend kommt hinzu, dass mit der HIV-Infektion weitere teils medikamentös zu behandelnde Krankheiten assoziiert sind.

Die Nebenwirkungen von Efavirenz resultieren vor allem aus seiner Teratogenität (daher kontraindiziert bei Schwangerschaft und Kinderwunsch) und seiner Depressionen-begünstigenden Wirkung, weshalb eine Anwendung bei psychiatrischen Vorerkrankungen des Patienten nur unter bestimmten Bedingungen erfolgen sollte. In jedem einzelnen Fall muss der Nutzen den möglichen Nebenwirkungen gegenübergestellt werden. Weitere mögliche Nebenwirkungen betreffen insbesondere das Nervensystem (109) sowie den Lipidstoffwechsel, wobei die Auswirkungen auf letzteren noch nicht endgültig geklärt sind (110), (111), (112).

Efavirenz selbst wird durch CYP2B6 zu 8-Hydroxyefavirenz und 8,14-Hydroxyefavirenz sowie durch CYP2B6 und CYP2A6 zum 7-Hydroxyefavirenz katalytisch umgesetzt. Letzteres Produkt ist für die Ausscheidung von Efavirenz aus dem Organismus allerdings von vergleichsweise geringerer Bedeutung.



**Abbildung 5:** Verstoffwechslung von Efavirenz im Arzneimetabolismus.

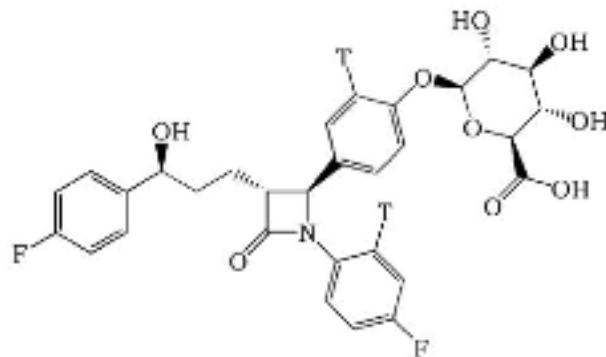
Der Metabolismus von Efavirenz über CYP3A4/5 und CYP1A2 scheint ebenfalls eine untergeordnete Rolle zu spielen, wie *in vitro* Studien an menschlichen Isoformen ergaben (113). Generell gesehen werden die Metabolite vornehmlich glukoroniert und weniger sulfatiert mit dem Urin ausgeschieden (114) (s. **Abbildung 5**).

Die Ausscheidung bzw. der Metabolismus der meisten Medikamente, die in der HIV-Therapie kumulativ zum Einsatz kommen, wird über P-gp sowie über Proteine der Phase I und II abgewickelt. Aufgrund der von den Medikamenten ausgehenden Regulierungen auf diese Proteine bzw. diesen Transporter kann es zu Verschiebungen der Plasmakonzentration kommen (115). So ist es essentiell, die Regulationsmechanismen im Detail zu verstehen, um so die Therapie zu optimieren und pharmakokinetische Interaktionen aufzuzeigen und ihnen ggf. vorzubeugen. Insbesondere das Lipodystrophie-Syndrom mit all seinen Folgen gesundheitlicher und gesellschaftlicher Art (116) oder die dem Efavirenz zugeschriebene seltene, dafür aber schwerwiegende, Hypersensibilitätsreaktion verbunden mit Hautausschlag und Hepatitis (117) geben Anreiz zu weiteren Forschungsanstrengungen in diesem Bereich. Insgesamt entsteht im Organismus aufgrund der fortdauernden HIV-Infektion aber auch der Therapie eine Dysbalance, sei es im Stoffwechsel oder im Hormonhaushalt (118).

Das Cholesterin-Gleichgewicht wird bekanntlich durch drei Haupthebel koordiniert, die ‚*de novo* Synthese‘, die Freisetzung aus den aufgenommenen Nahrungsmitteln und die Ausscheidung über die Galle als freies Cholesterin oder verpackt in Gallensalzen. Somit existieren mehrere Angriffspunkte, um den Stoffwechsel des Cholesterins zu verändern, weshalb im Falle einer Monotherapie prinzipiell auch endogene Kompensationsmechanismen auftreten können (119).

Beispielsweise bekämpfen die Statine und Fibrate ihrerseits die Hypercholesterinämie *via* Hemmung der 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-Reduktase bzw. die Hypertriglyceridämie *via* Aktivierung des nukleären Rezeptors PPAR $\alpha$  (120). Einen weiteren Ansatzpunkt zur Behandlung von Störungen im Fettstoffwechsel bietet das Ezetimib, das ein Inhibitor des Cholesterin-Aufnahmetransporters Niemann-Pick C1-like Protein (NPC1L1) ist und im Gegensatz zu den endogen intervenierenden Statinen oder auch Fibraten beeinträchtigend (-18%) auf die Cholesterinzufuhr wirkt (121). Der NPC1L1 wird wahrscheinlich durch Ezetimib direkt blockiert, indem beide einen Komplex bilden (119). In der klinischen Medizin wird

aktuell Ezetimib hauptsächlich den mehr etablierten Statinen und eventuell auch den Fibraten aus Gründen der Ergänzung (122) oder zur Reduktion der Nebenwirkungen zur Seite gestellt. Des Weiteren wird Ezetimib im Falle von Schwangerschaften bzw. Stillzeiten oder in Folge eines Abbruches der Behandlung mit Statinen - sei es aufgrund erhöhter Werte der Transaminasen oder einer neu aufgetretenen Myopathie - als alternative Therapie eingesetzt (120). Da Statine aufgrund ihres Interaktionspotentials und ihrer Nebenwirkungen in der HIV-Therapie nur mit Vorsicht und unter Monitoring eingesetzt werden sollten (123), ist Ezetimib eine probate und vielversprechende Option. Auch in Anbetracht des möglichen Benefits, der laut der IMPROVE-IT-Studie bei der Kombination von Ezetimib mit dem CYP3A4 Induktor Simvastatin im Rahmen der Prophylaxe kardiovaskulärer Ereignisse angenommen wird, scheint Ezetimib ein interessanter Ansatzpunkt zu sein (122), um die Therapie der HIV-Infektion ganzheitlicher zu gestalten. Solange beide Strategien sich nicht gegenseitig beeinträchtigen, könnte von einer Kombination des Efavirenz mit einem anderen Medikament, das die Fettexposition senkt, profitiert werden.



**Abbildung 6:** Strukturformel von Ezetimib (124).

Ezetimib (s. **Abbildung 6**) selbst, das unter anderem sowohl ein Substrat der Effluxtransporter ABCB1 und ABCC2, als auch ein Substrat des hepatischen Aufnahmetransporters OATP1B3 (125) ist, wurde daher in der klinischen Studie (s. **Abbildung 7** im folgenden Kapitel) in Beziehung zu Efavirenz gesetzt.

Neben den erwähnten Transportern sind auch die in der Phase II der Biotransformation anzusiedelnden Uridindiphosphat-glucuronyltransferase1A1 (UGT1A1), UGT1A3 und ein wenig untergeordnet UGT2B15 für den Metabolismus des Ezetimibs von entscheidender Bedeutung sowie für dessen Wirkungsweise



(126). Cytochrome P450 (Phase I) sind hingegen generell am Stoffwechsel des Ezetimibs nicht beteiligt (127).

Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung bzw. das Offenlegen des Potentials eines möglichen Mechanismus für einen negativen Einfluss von Efavirenz im Rahmen der antiviralen Arzneimittelkombinationstherapie auf den menschlichen Metabolismus über die Induktionsfähigkeit von CAR. Hinsichtlich der Wirkungsweise wird derzeit angenommen, dass Efavirenz in hohem Maße als potenter Aktivator des nukleären Rezeptors CAR (NR 113) fungiert und nur eine schwach aktivierende Wirkung auf PXR zeigt (98). Dies hat zur Folge, dass insbesondere CAR einen regulierenden Einfluss auf die Funktion und Expression der Arzneimittel-Transporter und der metabolisierenden Enzyme ausübt.

Einige Zielgene von CAR, nämlich UGT1A1 sowie ABCB1 und ABCC2, können in einen Zusammenhang mit der Verstoffwechslung von Ezetimib im Darm gebracht werden (126), sodass Ezetimib initial auch als Marker des Metabolismus in die Studie eingeschlossen wurde.

Betrachtet wurden hier *in vivo* Gene aus den Geweben Blut und Intestinum, die bekanntermaßen einer Regulation durch den nukleären Rezeptor CAR unterliegen (metabolisierende Enzyme CYP3A4 und CYP2B6 sowie AM-Transporter ABCC2 und ABCB1) – und zwar vor und nach Applikation von Efavirenz – auf RNA-Ebene sowie auf Proteinebene. Anschließend wurden *in vitro* Zellmodelle mit Efavirenz und zum Vergleich ein Modell mit dem hoch selektiven CAR-Induktor CITCO behandelt. Hierbei wurde CITCO aufgrund seiner Eigenschaften als eine geeignete Vergleichssubstanz oder der derzeit bestmögliche Indikator für CAR-Induktion ausgewählt, um die Wirkung von Efavirenz auf CAR zumindest *in vitro* beurteilen zu können. Die Analysen, sei es im Modell oder in den erhaltenen Gewebeproben *in vivo*, wurden dann mittels Real-Time-PCR, Western Blot Analyse und Statistik vorgenommen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Aufbau der klinischen Studie

#### Materialien

Medikamente:	
Ezeterol® 10 mg Tabletten (Ezetimib)	MSD Sharp & Dohme, Haar
Sustiva® 400 mg Kapseln (Efavirenz)	Bristol – Myers Squibb, München

Die Studie mit dem Titel „*Pharmacokinetic and pharmacodynamic interactions between the cholesterol-lowering ezetimibe and the non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor efavirenz during chronic treatment in healthy volunteers with reference to intestinal expression of CYP3A4, UGT1A1, ABCB1 and ABCC2*“ wurde im Institut für klinische Pharmakologie der Universitätsmedizin Greifswald unter der Leitung von Prof. Werner Siegmund durchgeführt.

Im Zeitraum von Anfang April bis Ende Juli 2009 wurden 12 gesunde, männliche, kaukasische, nicht rauchende Probanden im Alter von 20 bis 36 Jahren mit einem BMI von 19,9 bis 27,2 kg/m<sup>2</sup> in die Studie eingeschlossen. Alle Probanden nahmen während der Studie keine weiteren Medikamente zu sich. Untersucht wurden Stuhl-, Urin-, Plasma-, Darm- und PBMC-Proben (s. **Abbildung 7**).

Das Hauptaugenmerk wurde hierbei auf die PBMCs, die aus dem Serum generiert wurden, und die Darmproben gelegt. Die Studie ist in 4 Phasen unterteilt, in denen die beiden Medikamente Efavirenz und Ezetimib einmalig (sd) und mehrfach (md) eingenommen wurden. Zunächst wurde drei Tage vor Studienbeginn bei jedem der Probanden eine Duodenalbiopsie mittels Gastroduodenoskopie durchgeführt, wobei jeweils sechs Proben entnommen wurden. Die Proben der ersten Biopsie dienen zur Ermittlung des basalen bzw. unbehandelten Zustandes des Darmes d.h. als Referenz, um die Auswirkungen der Medikamente auf jede einzelne Person erfassen zu können; insbesondere mit Fokus auf die Induktion *via* CAR. Eine zweite Biopsie des Duodenum erfolgte am 29ten Tag, *i.e.* nach neuntägiger kontinuierlicher Einnahme von Efavirenz, und wurde der Ersten gegenübergestellt, sodass auf der Darnebene ein Vergleich angestellt werden konnte, mit dem Ziel mögliche

Behandlungs- periode	Studientag	Efavirenz 400 mg	Ezetimib 10 mg	Enzym Induk-tion Serum und Urin	Sterole	Leberenzyme	Duodenal-biopsie	Ausscheidun-gen		
									Prä	
Prä	-3						◆			
	-2									
	-1							◆		
A	1	◆		◆	◆			◆		EFA-sd
	2			◆	◆			◆		
	3							◆		
	4							◆		
	5							◆		
B	6		◆		◆					
	7		◆							
	8		◆							
	9		◆							
	10		◆		◆	◆				
	11		◆					◆		
	12		◆					◆		
	13		◆					◆		
	14		◆					◆		
	15		◆	◆	◆	◆	◆		◆	EZE-md
C	16	◆	◆					◆		EFA-sd/EZE-md
	17		◆	◆	◆			◆		
	18		◆					◆		
	19		◆					◆		
	20		◆					◆		
D	21	◆	◆	◆	◆	◆				
	22	◆	◆							
	23	◆	◆							
	24	◆	◆							
	25	◆	◆	◆	◆	◆				
	26	◆	◆					◆		
	27	◆	◆					◆		
	28	◆	◆					◆		
	29	◆	◆				◆	◆		
	30	◆	◆	◆	◆	◆		◆	◆	EFA-md/EZE-md

Abbildung 7: Schematische Darstellung des Aufbaus der klinischen Studie.

gegenseitige Einflüsse evident zu machen. Am ersten Tag der Studie erhielten die Probanden einmalig 400 mg Efavirenz und es wurde entsprechend Blut abgenommen (EFA-sd). Ab dem sechsten Tag der Studie wurde jedem Probanden täglich 10 mg Ezetimib oral verabreicht. Am 15. Tag erfolgte dann eine weitere Blutentnahme, um die Wirkung von Ezetimib nach mehrmaliger Gabe untersuchen zu können (EZE-md) bzw. einen Vergleich mit den anderen drei Momentaufnahmen anzustellen. Einen Tag später, *i.e.* am 16. Tag der Studie, wurden noch mal einmalig 400 mg Efavirenz appliziert und erneut Blut abgenommen (EFA-sd/EZE-md), analog zur Vorgehensweise bei den anderen Abnahmen. Vom 21. bis zum 30. Tag der Studie wurden den Probanden dann täglich beide Medikamente verabreicht. Eine vierte und letzte Blutentnahme erfolgte schließlich am letzten Tag der Studie (EFA-md/EZE-md).

## 2.2 Gewinnung und Aufbereitung humaner Proben aus der Studie

### Materialien

<b>Chemikalien:</b>	
Lymphoprep®	Axis-Shield, Oslo, Norwegen
Casyton®	Schärfe System, Reutlingen
RNA-Later-Lösung	Qiagen, Hilden
β-Mercaptoethanol	Roth®, Karlsruhe
<i>NucleoSpin® RNA XS</i>	Macherey-Nagel, Düren
Leupeptin	Sigma-Aldrich, St. Louis (MO), USA
Aprotinin	Sigma-Aldrich, St. Louis (MO), USA
Phenylmethylsulfonylfluorid	Sigma-Aldrich, St. Louis (MO), USA
BCA™ Protein Assay	Sigma-Aldrich, St. Louis (MO), USA
<b>Geräte:</b>	
Potter-System	Sartorius, Göttingen
Plattenlesegerät Infinite M200	Tecan, Crailsheim
CASY1 Zellgerät	Schärfe System, Reutlingen
Biofuge Fresco	Heraeus Instruments, Hanau
Mikrotiterplatten, 96-Well	Nunc, Roskilde, Dänemark
<b>Software:</b>	
Microsoft Excel 2007	Microsoft, Redmond (WA), USA

Die Darmproben der Probanden wurden mittels Gastroduodenoskopie in der Inneren Medizin der Universitätsklinik Greifswald entnommen und in RNA-Later-Lösung aufgenommen. Während der Gastroduodenoskopien, am dritten Tag vor Studienbeginn bzw. am 29ten Tag der Studie wurden die später verwendeten leeren Eppendorfgefäße vor der Biopat-Entnahme auf Trockeneis gelagert. Die mit

Formaldehyd (1 ml, 70%ig) oder RNA-Later-Lösung (Qiagen, Hilden) befüllten Gefäße wurden bei RT entsprechend dem Versuchsaufbau systematisch im Ständer organisiert und vorbereitet. Der Transfer der Bioplate erfolgte unter Verwendung jeweils neuer Kanülen in die vorgesehenen Gefäße, wobei die leeren Gefäße vor der Entgegennahme mit flüssigem Stickstoff gefüllt wurden. Sobald der Stickstoff vollständig verdampft war, wurden letztere dann mit dem Deckel verschlossen. Als Zwischenlager für diese Proben diente Trockeneis bevor sie schließlich bis zur weiteren Verarbeitung in einem Behälter mittels flüssigen Stickstoffs gekühlt aufbewahrt wurden. Die beiden Gefäße mit jeweils 0,5 ml RNA-Later wurden im Anschluss ebenso auf Trockeneis und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert. Die in Formaldehyd eingelegten Proben wurden der Pathologie in Greifswald zur Erstellung von Schnitten für mögliche Färbungen übergeben. Insgesamt wurden somit drei Proben für mögliche Proteinbestimmungen und zwei weitere Proben zur RNA-Bestimmung gewonnen. Auf die weiterführende Behandlung der zwei RNA-Proben wird im Kapitel **2.2.2 Isolation der RNA aus den humanen Proben (Darm und PBMCs)** näher eingegangen. Die Wirkung der Medikamente Efavirenz und Ezetimib (einzeln oder in Kombination) im Kompartiment der *peripheral blood mononuclear cells* (PBMCs) auf die Genexpression bzw. Proteinebene der Transporter ABCB1 (P-Glykoprotein (P-gp), MDR1), ABCC2 (MRP2), OATP1B1 und den Enzymen CYB2B6 und UGT1A1 wurde in vier verschiedenen Behandlungsphasen (s. **Abbildung 7**) untersucht. An den Tagen 1 (EFA-sd), 15 (EZE-md), 16 (EFA-sd/EZE-md) und 30 (EFA-md/EZE-md) wurde über einen Zeitraum von insgesamt sechs Stunden den Probanden im Intervall von 0 min, 30 min, 1 h, 1,5 h, 2 h, 2,5 h, 3 h, 3,5 h, 4 h, 5 h und 6 h Blut abgenommen. Diese Blutproben wurden entsprechend **2.2.1 Präparation der PBMCs aus Buffy Coat** aufgearbeitet um die PBMCs zu isolieren.

### **2.2.1 Präparation der PBMCs aus Buffy Coat**

Die in EDTA-Röhrchen (5 ml) abgenommenen Blutproben der Probanden aus den Abschnitten A, B, C und D wurden unmittelbar nach der Entnahme zentrifugiert und das Plasma für weitere Analysen archiviert. Das nach dem Zentrifugieren erhaltene Sediment wurde kurzzeitig in einer 0,9%igen NaCl-Lösung aufgenommen und erneut zentrifugiert (1500 x g, 4°C, 15 min). Bei den innerhalb der ersten 6 Stunden gewonnenen Zentrifugate wurden die PBMCs mit einer Pipette abgetragen und in auf

Eis vorgekühlten 50ml-Reaktionsgefäßen gesammelt. Die weitere Isolation der PBMCs wurde zeitnah vollzogen. Hierzu wurde zunächst der Buffy Coat mit 0,9%iger Natriumchlorid-Lösung auf 15 ml verdünnt. Das Lymphoprep<sup>®</sup> wurde in einem 50ml-Reaktionsgefäß vorgelegt und anschließend der Buffy Coat vorsichtig überschichtet, hierbei wurde das Verhältnis Lymphoprep<sup>®</sup> zur Lösung von 2:1 festgesetzt. Bei der darauffolgenden Zentrifugation unter Verwendung eines Swing-out-Rotors (ohne Bremse) wurden letztlich die Parameter 700 x g, 20°C, 16 min gewählt. Ein größerer Teil der oberen, wässrigen Phase wurde dann vorsichtig abgesaugt, um den Anteil an Thrombozyten in der Probe zu verringern. Hiernach wurde die weiße Mittelschicht abgetragen. Die gesammelten Lymphozyten wurden mit 0,9%iger NaCl-Lösung versetzt und bei 700 x g und RT für 15 Minuten erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet (die PBMCs) wurde zur Zellzahlbestimmung in 20 ml NaCl aufgenommen. 50 µl der möglichst homogenen Zellsuspension wurden mit 10 ml Casyton<sup>®</sup> vermischt und dann unter Verwendung des CASY1 Zellgerätes die Anzahl der isolierten Zellen bestimmt. Die restliche Zellsuspension wurde erneut zentrifugiert und das Zellpellet entsprechend der Anzahl der isolierten Zellen (fünf Millionen Zellen/ml) in 10% DMSO- hitzeinaktiviertes fetales Kälber Serum (Hitze inaktiviert durch 30-minütige Inkubation bei 56°C) aufgenommen. Nachfolgend wurde die Zellsuspension unter Verwendung eines Isopropanolbads auf -80°C abgekühlt (Kühlrate circa 1°C min<sup>-1</sup>). Nach etwa einem Tag wurden dann die isolierten und aliquotierten PBMCs in flüssigem Stickstoff bei -175 °C gelagert.

### **2.2.2 Isolation der RNA aus den humanen Proben (Darm und PBMCs)**

Die Isolation der enthaltenen mRNA erfolgte unter Anwendung des *NucleoSpin RNA XS Kit*. Die in RNAlater-Lösung enthaltenen Darmproben bzw. die PBMCs wurden aufgetaut und ohne weitere Aufbereitungsschritte in eine Mischung aus 350 µl RA1-Puffer (*NucleoSpin<sup>®</sup> RNA XS*) und 3,5 µl β-Mercaptoethanol überführt. Die erhaltenen Proben des Darmes wurden anschließend schockgefroren, im gefrorenen Zustand unter Anwendung einer Gewebemühle geschreddert und dann wieder zurück in ein vorgekühltes Eppendorf-Gefäß überführt (das „Schreddern“ entfällt bei den PBMCs bei der Probenaufbereitung).

In ein neues Eppendorf-Gefäß wurde ein NucleoSpin<sup>®</sup> Filter zur Filtration eingebracht. Anschließend wurde das im Eiswasser aufgetaute Produkt vom

Schreddern bzw. das Lysat der PBMCs hineingegeben und für 30 Sekunden lang zentrifugiert (11.000 x g und 5°C).

Der verwendete NucleoSpin® Filter wurde verworfen. Das erhaltene Filtrat wurde mit 100 µl 70%igem Ethanol versetzt. Um eine möglichst homogene Vermischung der Substanzen zu erhalten, wurde die Mischung mehrere Male (mindestens 5x) mit einer Pipette zügig aufgenommen. Im Anschluss wurde das Gemisch unter Verwendung eines NucleoSpin® RNA XS Column Filters für 30 Sekunden bei 5°C und 11.000 x g zentrifugiert, sodass die RNA im Filter aufgefangen wurde.

Die Membran wurde in Gegenwart von 100 µl MDB bei 11.000 x g und 5°C Umgebungstemperatur für einen Zeitraum von 30 Sekunden zentrifugiert was letztendlich eine Entsalzung vollzog, um den nächsten Schritt effektiver zu gestalten. Direkt auf die Membran wurden 25 µl von der vorbereiteten DNase Reaktionsmischung (in einem sterilen Eppendorfgefäß wurden 3 µl rDNase und 27 µl Reaktionspuffer für rDNase leicht, der Vermischung dienend geschüttelt) gegeben und bei RT für 15 Minuten inkubiert.

Nach erfolgter Zugabe von 100 µl RA2 Puffer (dient der Inaktivierung der rDNase) in den NucleoSpin® RNA XS Column Filter wurde ein erster Waschvorgang mittels Zentrifugation (11.000 x g, 30 Sekunden) durchgeführt. Anschließend wurden 400 µl RA3 durch den Filter in 30 Sekunden unter 11.000 x g zentrifugiert, um die DNA-Reste in die Auffangbehälter zu spülen, die letztendlich verworfen wurden. Beim letzten Waschvorgang wurde der mit 200 µl RA3 aufgefüllte NucleoSpin® RNA XS Column Filter 2 Minuten bei 11.000 x g und 5°C in der Zentrifuge belassen. Dieser Vorgang diente neben dem Waschen auch dem Trocknen der RNA.

Um die im Filter gebundene RNA zu lösen, wurde sie mittels 50 µl RNA-freiem H<sub>2</sub>O in ein RNA-freies Eppendorf-Gefäß zentrifugiert bzw. in diesem aufgefangen. Die erhaltene Probe wurde anschließend wiederholt bei 11.000 x g und bei 5°C für 30 Sekunden durch den Filter zentrifugiert, um möglichst die gesamte RNA aus dem Filter zu mobilisieren (zweifache Eluierung).

### **2.2.3 Proteingewinnung aus Darmproben**

Die Darmproben der Probanden, die nach der Entnahme zuvor im flüssigen Stickstoff gelagert worden sind, wurden in ein Eppendorf-Gefäß überführt, welches eine Mischung aus 250 µl 5 mmol/l Tris HCl pH 7,4 und jeweils 25 µl der Proteasehemmer

Aprotinin (0,3  $\mu\text{mol/l}$ ), Leupeptin (1  $\mu\text{mol/l}$ ) und Phenylmethylsulfonylfluorid (0,1  $\text{mmol/l}$ ) enthielt. Anschließend wurde die Mischung unter Verwendung von flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Die Darmproben wurden für die folgenden Aufbereitungsschritte bei 2 x 10 Schlägen und 1000 rpm gepottert und anschließend für 15 min bei 4°C und 9.000 x g zentrifugiert, sodass sich die Proteine, sowohl die intrazellulären, als auch die Membranproteine, im Überstand (im Lysat) anreicherten. Dieser wurde im nächsten Schritt vom Pellet getrennt.

Für die Proteinbestimmung wurden die Lysate im Verhältnis 1:10 mit Puffer versetzt, damit die Proben-Proteinkonzentrationen nicht den entsprechenden Bereich der verwendeten Standardreihe überschritten. Für die Proteinbestimmung wurde die von Smith 1985 entwickelte BCA-Methode (Bicinchoninicacid Assay) angewendet (128). Vermessen wurden jeweils 10  $\mu\text{l}$  jeder Probe in einer Doppelbestimmung. Diese wurden mit 200  $\mu\text{l}$  des Färbereagenzes versetzt. Letzteres wurde kurz zuvor im Verhältnis von 50:1 aus BCA und 4%iger Kupfer-II-Sulfat-Lösung hergestellt. Die Mikrotiterplatten wurden vor der Messung für 30-60 min bei 37°C Umgebungstemperatur inkubiert. Die zugrundeliegende chemische Reaktion ist in **Abbildung 8** dargestellt.



**Abbildung 8:** Funktionsweise des Bicinchoninacid-Assays zur Proteinquantifizierung.

Der Absorptionspeak des erhaltenen  $\text{Cu}^+\text{-BCA-Komplexes}$  liegt bei einer Wellenlänge von 562 nm. Ausgehend von der in **Abbildung 8** dargestellten Reaktionsgleichung und unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die BCA-Reagenz und  $\text{Cu}^+$  im Verhältnis 2:1 einen violetten Komplex bilden, können somit aus der Intensität der Färbung indirekt Rückschlüsse auf die Proteinkonzentration gezogen werden. Mittels linearer Regression der Messwerte des Mikrotiterplatten-Lesegerätes, erstellt auf Basis der Daten der Standardreihe, erfolgt schließlich die Quantifizierung des Proteingehalts.



## 2.3 Kultur von PBMCs

### Materialien

<b>Chemikalien:</b>		
Efavirenz	Sigma-Aldrich, St. Louis (MO), USA	
DMSO	Roth, Karlsruhe	
FCS	Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt	
<b>Geräte:</b>		
Multiwell 24-Well-Platten	BD Falcon, Heidelberg	
Sterilwerkbank	HER Asafe, Heraeus Instruments, Hanau	
Brutschrank BBD 6220 (CO <sub>2</sub> -Inkubator)	Heraeus Instruments, Hanau	
<b>Medium:</b>		
<u>Zellkulturmedium:</u>		Endkonzentration:
RPMI-1640	450 ml	
Hitze-inaktiviertes FCS	50 ml	10%
Natriumpyruvat	5 ml	1%
L-Glutamin	5 ml	1%

Im Rahmen der Kultivierung erfolgte jeder Arbeitsschritt unter der Sterilwerkbank, um die zwingend erforderliche Sterilität zu gewährleisten. Die aus dem Buffy Coat isolierten PBMCs wurden in dem Kulturmedium entsprechend der Zählung im Casy1-Zytometer in 24-Well Zellkulturplatten mit einer Zellzahl von  $1 \times 10^6$ /Well ausgelegt. Nach einer 24-stündigen Anpassungsphase für die PBMCs wurden zu dem Kulturmedium 10  $\mu\text{mol/l}$  Efavirenz oder das Lösungsmittel DMSO als Referenz hinzugefügt. Die Klimabedingungen für die Inkubation waren 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Die mRNA wurde analog zu dem oben beschriebenen Verfahren (s. **2.2.2 Isolation der RNA aus den humanen Proben**) nach 48 h (post-expositionell) gewonnen. Nachfolgend wurde die mRNA-Menge mittels real-time PCR bestimmt, wie in Abschnitt (s. **2.5.6 Quantitative Bestimmung der mRNA-Expression**) beschrieben.

## 2.4 Western Blot Analyse

### Materialien

<b>Puffer:</b>	
Trenngelpuffer (TG-Puffer)	375 mM Tris-HCl, pH 8.8
Sammelgelpuffer (SG-Puffer)	0.5 M Tris-HCl, pH 6.8
<u>TANK-Puffer:</u>	248 mM Tris-Base, 1.5 M Glycin, 0,1%SDS
<u>TOWBIN-Puffer:</u>	250 mM Tris HCl,

	1.92 M Glycin 20% Methanol
<u>Laemmli-Puffer:</u>	0.25 M Tris HCL pH 6.8 8% SDS, 40% Glycerol, 0.05% Bromphenolblau, 20% $\beta$ -Mercaptoethanol
<u>TBS-T:</u>	248 mM Tris HCl 1,4 M NaCl 27 mM KCl 0.4% Tween20
Blockierlösung	5% Magermilchpulver in TBST
Stripping-Puffer	62,5mM Tis-Ultra 20% SDS
<b>Gele:</b>	
<u>Trenngel (7,5%):</u> <i>Aqua dest.</i> Acrylamid TG-Puffer 10% SDS 10% $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2\text{NH}_4$ TEMED	7,1 ml 3,8 ml 3,8 ml 150 $\mu\text{l}$ 150 $\mu\text{l}$ 15 $\mu\text{l}$
<u>Sammelgel:</u> <i>Aqua dest.</i> Acrylamid SG-Puffer 10% SDS 10% $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2\text{NH}_4$ TEMED	3 ml 650 $\mu\text{l}$ 1,23 ml 50 $\mu\text{l}$ 50 $\mu\text{l}$ 5 $\mu\text{l}$
<b>Chemikalien:</b>	
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	
APS ( $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2\text{NH}_4$ )	
TEMED	
ECL <sup>TM</sup> Plus Western Blot	Amersham Biosciences Freiburg
Rotiphorese® Gel 30 (Bis)acrylamid)	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe
<b>Geräte</b>	
Blot-Apparatur	Bio-RAD, München
SDS-PAGE Elektrophoresekammer	Biometra, Göttingen
Standard Power Pack 25T	Biometra, Göttingen
Gel Logic 200 Imaging System	Raytest, Straubenhardt
Heizblock Grant QBT	Grant Instruments, Cambridgeshire, GBR
Magnetrührgerät MR 3001	Heidolph Instruments, Schwabach
Schüttler Rocking Plattform	Biometra, Göttingen
Analysenwaage research R200D	Sartorius, Göttingen
pH-Meter	pH526, WTW, Weilheim

<b>Material:</b>	
Protran Nitrozellulose-Membran	Schleicher & Schüll BioScience GmbH, Dassel
Filterpapier	Whatman® International, Buckinghamshire, GBR
<b>Antikörper:</b>	
Anti-UGT1A1	PRS Sigma-Aldrich, St. Louis (MO), USA
Anti-CYP3A4	ab22704, abcam, Cambridge GBR
Anti-ABCB1	C-219 Calbiochem, Darmstadt
Anti-ABCG2	BXP-21 Alexis Biochemicals, Lörrach
Anti-ABCC2	M2 III-6 Alexis Biochemicals, Lörrach
Anti-UGT2B	sc-23479 Santa Cruz (CA), USA
HRP- markierte Sekundärantikörper	Bio RAD, München

Western Blot ist ein Verfahren in der Molekularbiologie zum Transfer von Proteinen auf eine Membran, das erstmalig 1979 von Renart und Towbin (129) beschrieben wurde. Der Nachweis der spezifischen Proteine erfolgt unter der Verwendung von spezifischen Antikörpern.

#### **2.4.1 Vorbereitung und Ausführung der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Die beiden Glasplatten der Blot-Apparatur und der dazwischenliegende Rahmen aus Gummi wurden vorschriftsmäßig zusammengelegt und mit 3 Klemmen in Position gehalten. Die Dichtigkeit der Apparatur wurde mit *Aqua dest.* überprüft. Aufgrund der Tatsache, dass Acrylamid gemäß der CLP-Verordnung als krebserzeugend und erbgutverändernd (Kategorie 1 B) eingestuft ist, erfolgte die Herstellung der Gele in einem Abzug. Das 7,5%ige Trenngel wurde eingegossen, wobei wie auch später beim Sammelgel das TEMED jeweils zum Schluss dazugegeben wurde, da dieses als Katalysator zur Entstehung von Radikalen aus APS dient. Diese Radikale beschleunigen den Prozess der Polymerisation, der nach einer guten halben Stunde beendet ist. Um sicher zu sein, dass die Polymerisation vollständig abgelaufen ist, wurde das restliche, im Erlenmeyerkolben verbliebene Gel auf genügende Festigkeit hin getestet. Direkt nach dem Einfüllen des Trenngels und der Zugabe des TEMED bzw. zu Beginn der Polymerisation wurde es mit sich verflüchtigendem Isopropanol überschichtet, um eine glatte Ebene zu erhalten. Noch vorhandenes Isopropanol wurde nach vollständiger Polymerisation verworfen. Das feinporige Trenngel wurde

mit *Aqua dest.* gewaschen, bevor das grobporige Sammelgel aufgegossen wurde. In dieses wurde ein entsprechender Kamm eingesetzt, der die Schablone für die Probestaschen war. Das Gel wurde in die Elektrophoresekammer mit dem Tankpuffer eingebaut. Die mit Lämmli Puffer versetzten Proben – Unterschiede der Proteinmenge innerhalb der Proben wurden entsprechend in diesem Schritt ausgeglichen – wurden im Heizblock bei 95°C für 5 min denaturiert. Insgesamt wurden jeweils 50 µg des Proteins in die Taschen eingebracht. Durch das SDS wurden die Proteine zusätzlich denaturiert und Interaktionen zwischen den Proteinen verhindert, indem sogenannte SDS-Protein-Komplexe gebildet werden. Verstärkt wurde dies durch die Reduktion von  $\beta$ -Mercaptoethanol. Die Ladung, die jedem Protein mit seinen Aminosäuren (AA) zu eigen ist, wurde durch die Komplexbildung und die basische Atmosphäre egalisiert, sodass die Auftrennung hauptsächlich durch die Molekülgröße bestimmt wurde oder auch durch den fiktiven Stokes-Radius bzw. die Eigenschaften des Gels (Porengröße, etc). Die nativen Proteine wurden zunächst in der ersten Stunde bei 150 V gen Pluspol gesammelt und in den nächsten zwei Stunden bei 170 V im Trenngel aufgetrennt.

### **2.4.2 Blotting**

Die im Trenngel enthaltenen und aufgeschlüsselten Proteine wurden auf die Nitrozellulosemembran mittels der Blot-Apparatur (Aufbau innerhalb des Spannungsfeldes (Anordnung von der Anode gen Kathode gesehen): 3 Schichten Filterpapier (9\*7cm<sup>2</sup>), Blotmembran(9\*7cm<sup>2</sup>), Gelschicht und 3 Schichten Filterpapier (9\*7cm<sup>2</sup>)) übertragen, um sie für weitere Analysen zugänglich zu machen. Die Filterpapiere und die Blotmembran wurden im Towbinpuffer (1\*) eingelegt. Bei der weiteren Handhabung wurde die Blotmembran stets vor dem Austrocknen bewahrt. Methanol ist essentiell für die optimale Vorbereitung der Blotmembran für die Bindung der zu übertragenden Proteine. Bei der Blotordnung wurde darauf geachtet und ggf. mit einer Tapezierrolle dafür gesorgt, dass sich zwischen Gel und Blotmembran keine Luftblasen bilden, wodurch ansonsten Übertragungslöcher entstehen. Das Blotten fand über zwei Stunden bei maximaler Voltzahl und 370 mA sowie unter permanenter Kühlung mittels Eis statt. Zwecks Überprüfung der Übertragung der Proteinbanden auf den Blot wurden 10 ml Ponceau S auf den Blot gegeben und kurze Zeit unter Schwenken inkubiert. Die unspezifische Färbung der übertragenen Proteinbanden wurde dokumentiert, dann der Blot mit TBS-T

gewaschen und nachfolgend die Blockierung vollzogen. Letzteres erfolgte mit einer 5%igen Magermilchlösung in TBS-T über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler bis zur vollständigen Übersättigung der Bindungsstellen der Proteine.

### 2.4.3 Semiquantitative Analysen der Proteinbanden

Überschüssiges Blockierungsmittel wurde durch dreimaliges Waschen à 15 Minuten bei RT mit reinem TBS-T entfernt. Die primären Antikörper (AK) wurden mittels TBS-T und 0,1%igem Rinderserumalbumin verdünnt und die Membran darin über Nacht bei einer Temperatur von 4°C inkubiert. Diese Antikörper binden während der Inkubation spezifisch und sind in der Lage die unspezifischen Bindungen zwischen den Proteinen und der Blockierlösung zu lösen. Die primären AK wurden anschließend wieder gesammelt und der Blot wurde einem, wie oben erwähnten, Waschprozess unterzogen. Mit dem Meerrettich-Peroxidase-Label, als sekundärem AK, wurde die Möglichkeit einer Chemolumineszenzreaktion geschaffen, welche auch in der Kriminalistik Anwendung findet. Die Inkubation mit dem sekundären AK erfolgte über mindestens 10 Stunden. Nach dem standardmäßigen Waschvorgang, der sich jeder Inkubation mit einem Antikörper anschloss, wurde die Reaktion mit dem HRP als Katalysator unter Ausschluss von Licht eingeleitet und nach dreiminütiger Reaktionszeit in der Dunkelkammer entwickelt.

Damit der Blot wieder frei von allen Antikörpern vorlag, wurde das Stripping durchgeführt. Dazu wurden 50 ml des Strippingpuffers auf 37°C vorgewärmt und anschließend mit 350 µl β-Mercaptoethanol versetzt; und zwar kurz bevor der Blot für 20 min bei 52°C gestrippt wurde. Dem Stripping folgte ein gründliches Waschen (4 x 10 min mit TBS-T), sodass die Detektion weiterer spezifischer Antikörper möglich war, um somit das Vorhandensein weiterer Proteine nachweisen zu können.

## 2.5 Behandlung CAR-transfizierter Caco2 Zellen (in vitro)

### Materialien

<b>Puffer:</b>	
<u>LB-Kulturmedium:</u>	
Trypton	100 g
Hefeextrakt	50 g
NaCl	100 g
<b>Material:</b>	
Superkompetente E. coli	SoloPack Gold Agilent Technologies USA

Caco2-Zellen	ATCC, Teddington, GBR
pEF6-V5/HIS	Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt
CAR-pEF6-V5/HIS	Labor Meyer zu Schwabedissen
Zellkulturflaschen, 75 cm <sup>2</sup>	BD Falcon, Heidelberg
Zellkulturplatten	Nunc, Wiesbaden
Multiwell 12-Well-Platten	BD Falcon, Heidelberg
NucleoSpin Plasmid QuickPure	Macherey-Nagel, Dürren
TaqMan reverse Transkriptions Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
MicroAmp Optical 96-Well	Applied Biosystems, Weiterstadt
<b>TaqMan® Gen Expression Assays:</b>	
Human 18S	Applied Biosystems, Weiterstadt
ABCB1	Applied Biosystems, Weiterstadt
ABCC2	Applied Biosystems, Weiterstadt
CYP3A4	Applied Biosystems, Weiterstadt
CYP2B6	Applied Biosystems, Weiterstadt
UGT1A1	Applied Biosystems, Weiterstadt
<b>Chemikalien und Lösungen:</b>	
Efavirenz	Sigma Aldrich, St. Louis (MO), USA
Ezetimibe	Sigma-Aldrich, St. Louis (MO), USA
CITCO	Sigma-Aldrich, St. Louis (MO), USA
DMSO	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Sigma-Aldrich, St. Louis (MO), USA
Agar Select	Sigma-Aldrich, St. Louis (MO), USA
Glycerol	
Lipofectin	Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt
Phosphate-Buffered saline (PBS)	PAA Laboratories GmbH, Österreich
DMEM ohne L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Österreich
FCS	Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt
Trypsin/EDTA	PAA Laboratories GmbH, Österreich
OptiMEM	Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt
NEAS	Sigma Aldrich, St. Louis (MO), USA
PeqGOLD RNA-Kit	PeqLab, Erlangen
Isopropanol	
Chloroform	
Ethanol	
<b>Curry-Master-Mix:</b>	
1 M TrisHCl	46 µl
2 M KCl	57,5 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	276 µl
Glycerol	92 µl
10 mM dNTP	46 µl
Rox-dye	23 µl
H <sub>2</sub> O	595,75 µl
<b>Geräte:</b>	
Analysenwaage research	Sartorius, Göttingen

R200D	
Heizblock Grant QBT	Grant Instruments, Cambridgeshire, GBR
Sterilwerkbank	HERASafe, Heraeus Instruments, Hanau
Brutschrank BBD 6220 (CO <sub>2</sub> -Inkubator)	Heraeus Instruments, Hanau
Zellzählgerät Casy 1	Schärfe System, Reutlingen
Wasserbad	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach
Vortex Reax <sub>top</sub>	Heidolph, Schwabach
Biofuge fresco	Heraeus Instruments, Hanau
Schüttelinkubator KS-15 Control	Edmund Bühler GmbH, Hechingen
Trockenschrank	Memmert, Schwabach
NanoDrop ND 1000	PeqLab, Erlangen
MasterCycler Random RT	
7900HT Fast Real-Time PCR-System	Applied Biosystems, Weiterstadt
<b>Medium:</b>	
<u>Zellkulturmedium:</u>	Endkonzentration
DMEM	425 ml
FCS	75 ml 15%
L-Glutamin	11 ml 2%
NEAS	11 ml 2%

### 2.5.1 Transformation und Selektion

Um bestimmte gewünschte DNA-Abschnitte in beliebigen Mengen zu produzieren, ist die Verwendung von Bakterien geeignet, da diese generell über ein hohes Vermehrungspotential verfügen und unvoreingenommen des Ursprungs der DNA gegenüber dieser begegnen können. Hierbei bedient man sich der plasmiden Eigenschaften superpotenter E. coli, da sie über die Fähigkeit verfügen *via* Vektoren Fremd-DNA aufzunehmen. Unter Plasmiden versteht man prinzipiell eine ringförmige DNA, die ungebunden bzw. selbständig im Bakterium existiert.

Als erstes wurden 25 µl-Aliquots dieser Bakterienstämme im Eisbad aufgetaut, die zuvor bei -80°C gelagert wurden. Nach Zusatz von 1 µl der Vektoren hCAR-pEF6-V5/HIS oder pEF6-V5/His, als späterem Kontrollvektor, wurden sie noch 20 min lang im Eisbad belassen. In dieser Zeit tritt der Vektor mit der Zellwand der Bakterien in Kontakt. Um nun den Vektor in die Zelle einzuschleusen, wird Energie benötigt. Diese lieferte im vorliegenden Fall für eine Zeit von 30 Sekunden ein auf 42°C erwärmter Heizblock. Anschließend wurden die Bakterien für weitere 5 min im Eisbad belassen. Nach der Aufnahme der Zellen in 250 µl LB-Medium wurden sie bei 250

rpm und 37°C Umgebungstemperatur für 90 min geschüttelt. Auf Agarplatten wurden dann 50 µl bzw. 75 µl des Ansatzes ausplattiert und bei 37°C im Trockenschrank über Nacht (circa 13 h) inkubiert. Durch den Zusatz von Ampicillin überlebten selektiv nur die Zellen, die den Vektor im Vorhinein aufgenommen hatten. Das Überleben eben dieser Zellen beruht hierbei darauf, dass in dem Vektor nicht nur die gewünschte Information steckt, sondern auch der Pass für die Resistenz gegenüber Ampicillin. Dieses gehört der Gruppe der Aminopenicilline an, die ein erweitertes Spektrum gegenüber dem gramnegativen Bereich aufweisen, aber dennoch wie jedes andere Penicillin – aufgrund des  $\beta$ -Laktamrings - das Enzym der D-Alanin-Transpeptidase inaktiviert und somit die Zellwandsynthese unterbindet. Diese Transpeptidase ist für die Vermehrung essentiell (bakteriostatisch).

Die Einzelkolonien wurden zwecks höherer Ausbeute an Plasmid-DNA in eine, die Vermehrung unterstützende Umstände überführt. Dies erfolgte durch Aufnahme mittels einer Einweg-Pipettenspitze, die in ein jeweils mit 5 ml 1fach LB gefülltes 15 ml Falcon-Röhrchen eingetaucht wurde. Für die Kultivierung zur Schaffung der bereits erwähnten Umstände wurden die Falcon-Röhrchen bei 37°C und 250 rpm für circa 13 h (über Nacht) inkubiert. Bei entsprechender Trübung des Ansatzes wurde direkt im Anschluss die Plasmid-DNA isoliert oder jeweils 750 µl vom Ansatz mit 750 µl 80%igem Glycerol zusammengeführt, kurz vorsichtig gevortext und anschließend bei -80°C aufbewahrt.

### **2.5.2 Gewinnung der reinen Plasmid-DNA**

Die Anleitung des Protokolls „5.1 NucleoSpin Plasmid: Isolation of high-copy plasmid DNA from *E. coli*“ (Macherey-Nagel – 03/2008/ Rev. 05) galt hier als Grundlage. Seine Grundprinzipien mit kleinen Änderungen werden nachfolgend kurz beschrieben, ebenso die Art und Weise der Durchführung: Zunächst wurden die Bakterien im Medium 30 sec lang bei 11.000 x g zu einem Pellet konzentriert. Dann wurde nach Möglichkeit die gesamte Flüssigkeit dekantiert, bevor die Lyse mit Hilfe der Puffer A1-3 in einem Eppendorfgefäß eingeleitet wurde. Die festen Bestandteile der Lyse wurden bei 11.000 x g und RT durchschnittlich 7 min lang abzentrifugiert bis das Lysat klar war. Die DNA, die sich im Lysat befand, wurde in einer Sammelsäule gebunden, gewaschen und getrocknet. Mittels 75 µl RNA-freiem *Aqua dest.* wurde diese dann aus der Sammelsäule in einer gekühlten Zentrifuge (4°C) herausgelöst



und daraufhin im Eisbad gelagert, um eine durchgehende Kühlkette zu gewährleisten. Anschließend wurde die DNA bei  $-20^{\circ}\text{C}$  bis zur nächsten Anwendung aufbewahrt.

### **2.5.3 Konzentrationsbestimmung der DNA (RNA)**

Zur Konzentrationsmessung der DNA (RNA) bzw. zur Evaluation ihrer Gewinnung kam der NanoDrop ND 1000 zum Einsatz. Hierbei wurde die DNA photometrisch quantifiziert und ihr Reinheitsgrad anhand der optischen Dichte der DNA (spezifische Schwächung des Lichtstrahls) oder auch seines Absorptionsmaximums bestimmt. Das Absorptionsmaximum sowohl für DNA als auch für RNA liegt bei einer Wellenlänge im ultravioletten Bereich von 260 nm. Aus den Messwerten wurde mit Hilfe einer in das Gerät eingebauten Software, die einen Verdünnungsfaktor und einen standardisierten, empirischen Umrechnungsfaktor berücksichtigt, die Konzentration in der Probe berechnet. Als Maß für die Reinheit wurde der Quotient  $A_{260}/A_{280}$  herangezogen. Gemäß der Erfahrung liegt er optimaler Weise bei 1,8 (DNA) oder 2,0 (RNA), sodass höhere Werte auf Verunreinigungen durch RNA hinweisen und niedrigere Werte auf das Vorhandensein von Proteinen oder anderen aromatischen Verbindungen (höhere Absorptionsmaxima).

### **2.5.4 Transfektion von CAR in Caco2-Zellen**

Unter Transfektion versteht man im Allgemeinen das Einbringen von fremder DNA in eine Zelle eukaryotischer Bauart. Die Transfektion lässt sich in eine transiente (vorübergehender Aufenthalt in der Zelle) und eine stabile (Integration ins Genom) Form unterteilen. Abhängig von den Eigenschaften der eukaryoten Zelle existieren verschiedene Verfahren, die das Einschleusen ermöglichen. In dieser Arbeit ist die Lipofektion gewählt worden. Der Umgang mit den Zellen bzw. ihre Aufarbeitung für die Transfektion erfolgte ausschließlich an der Sterilwerkbank. Die Caco2-Zellen (Passage 42) wurden zunächst bei Konfluenz in Ihrer Stammflasche (inkubiert bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$ ) mit vorgewärmten PBS zweimal gewaschen und schwenkend mit 3 ml Trypsin von der Oberfläche gelöst. Nach kontrollierter Auflösung des Zellverbandes wurde Trypsin mittels 7 ml des Kulturmediums DMEM deaktiviert. Die gesamte Zellsuspension wurde in ein steriles Falcon überführt. 2 ml in Kombination mit 10 ml Kulturmedium wurden daraufhin wieder in eine neue Zellkulturflasche umgesetzt. Mit Hilfe des Casy1-Zytometers wurde nun die Zelldichte bestimmt - das

Casy1-Zytometer ist ein elektronischer Zellzähler, dessen Ergebnisse auf dem Widerstands-Messprinzip beruhen. Es wurden pro Well 75.000 Zellen in einer 12-Well-Platte ausgesät und im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt der Luft inkubiert, bis 80% des Wells mit einem Zellrasen bedeckt waren. Zur Transfektion wurden 350 µg der Plasmide (hCAR-pEF6-V5/HIS oder pEF6-V5/His) und 3 µl Lipofektin eingesetzt. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen mit Efavirenz in Konzentrationen von 1 oder 10 µmol/l, mit CITCO 1 µmol/l als Positivprobe, oder mit DMSO als Negativprobe über 24 h in 400 µl OptiMEM im Brutschrank unter den oben beschriebenen Bedingungen erneut inkubiert und nachfolgend die mRNA isoliert.

### **2.5.5 Isolation von RNA aus Caco2-Zellen mittels PeqLABGold**

Das Medium, in dem die Zellen inkubiert worden waren, wurde abgesaugt und die Zellen wurden mit vorgewärmten PBS einem Waschvorgang unterzogen. Die Monolayer-Zellen wurden dann homogenisiert, indem 500 µl (1ml pro 10 cm<sup>2</sup> Zellkulturschale) PeqGOLD RNAPure hinzugefügt und mit der Pipette aufgezogen und wieder abgegeben wurden. Dadurch wurde einerseits eine Lyse hervorgerufen und andererseits die Gesamt-RNA einschließlich mRNA und rRNA extrahiert.

Nach der Lyse wurde das Produkt für 5 Minuten bei RT stehen gelassen (Dissoziation der Nukleotidkomplexe). Anschließend erfolgte eine Zugabe von 0,1 ml Chloroform (0,2 ml pro eingesetztem PeqGOLD RNAPure) und kräftiges Schütteln für 15 sec. Danach wurde die Probe für 8 (3-10) min auf Eis gelagert und im Anschluss wurde zur Phasentrennung für 5 Minuten bei 12.000 x g und 4°C zentrifugiert. Es resultieren 3 Phasen, eine wässrige Phase (enthält RNA), eine Interphase (enthält DNA, Proteine, etc.) und eine gelbe Phenol-Chloroform-Phase (enthält DNA, Proteine, etc.). Die wässrige Phase wurde zusammen mit dem gleichen Volumen an Isopropanol (gelartige Konsistenz erwünscht!) in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß gegeben, 15 min auf Eis gehalten und 10 min bei 12.000 x g und 4°C zentrifugiert. Die resultierende Lösung ist nun frei von DNA und Proteinen und wurde in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Der Überstand wurde diskret abgenommen und das Pellet zweimal mit 500 µl 75-%igem Ethanol (vorher kühl lagern) gewaschen. Anschließend wurde die Probe für 10 min bei 12.000 x g und 4°C zentrifugiert. Das RNA-Pellet nach der RNA-Präzipitation ließ man an der Luft antrocknen. Zur Aufnahme in 50 µl H<sub>2</sub>O bidest. (RNA-frei) wurde es für 1 h im Eisbad

belassen; bei noch existenten Resten des Pellets wurden diese bei 55-60°C endgültig gelöst. Die nachfolgende Lagerung erfolgte bei -80°C.

### **2.5.6 Quantitative Bestimmung der mRNA-Expression**

Mittels der „*Real-time Polymerase chain reaction*“ (PCR), für deren Einführung im Jahre 1984 Kary Mullis 1993 den Nobelpreis für Chemie erhielt, wurde die mRNA quantifiziert. Zu Beginn der Entwicklung war diese Technik in Sachen qualitativer Analysen zwar eine bahnbrechende Neuerung der Diagnostik. Was jedoch quantitative Aussagen anbetrifft, so war sie dafür mangels standardisierter Maßstäbe zunächst nicht geeignet. Diesbezüglich entwickelte Howard Wong die PCR 1994 mit seiner „*Primer Dropping*“ Methode (130) entscheidend weiter.

Grundvoraussetzung für die Anwendung der „Real-Time PCR“ ist die Herstellung der cDNA mittels der reversen Transkriptase, die das komplementäre Pendant zur RNA darstellt. Zur Generierung der cDNA wurden 1.500 ng der RNA-Probe eingesetzt. Dem Ansatz in  $\mu\text{l}$  und der Probenzahl entsprechend wurden mit einem Sicherheitsfaktor von 1,06 die Komponenten angesetzt und zwar 10 x RT-Puffer, 50 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2,5 mM NTP und Random-Hexamere, RNase-Inhibitor und ReverseTranskriptase, wobei die beiden letzteren erst aufgetaut wurden, wenn die Proben selbst dazugegeben wurden. Alles zusammen (ad  $\text{H}_2\text{O}$  bidest 20  $\mu\text{l}$ ) wurde bei 1000 x g für 1 min zentrifugiert und dann für etwa 90 min in den Mastercycler Random RT überführt. Im Anschluss wurden noch  $\text{H}_2\text{O}$  bidest (ad 50  $\mu\text{l}$ ) hinzugefügt und das Produkt bei -50°C eingefroren. Im nächsten Schritt wurde die cDNA mit dem Curry Master Mix (Sicherheitsfaktor von 1,2),  $\text{H}_2\text{O}$  und dem jeweiligen kommerziellen Primer-Probe-Mix in eine MicroAmpPlatte pipettiert (Doppelbestimmung à 10  $\mu\text{l}$  pro Well), wobei die Reihenfolge  $\text{H}_2\text{O}$ , MasterMix und Probe streng eingehalten und somit die PCR in Gang gesetzt wurde. Die quantitative Bestimmung wurde entsprechend der vergleichenden C(T)-Methode durchgeführt (131). Als Standard wurde zum Vergleich jeweils 18S hinzugezogen.

### 3 Ergebnisse (132)

#### 3.1 Expression von bekannten Zielgenen des Nukleären Rezeptors CAR in Darmproben

In einem ersten Schritt wurde der Einfluss des CAR Induktors Efavirenz auf die Expression bekannter Zielgene im Kompartiment des Duodenums *in vivo* untersucht. Verglichen wurde die anfängliche Expression mit der in Darmproben nach Langzeiteinnahme (9 Tage). Da Efavirenz seinen Gleichgewichtszustand (*steady-state* (ssZ)) nach etwa 6-10 Tagen erreicht, ist die gewählte Zeitspanne von 9 Tagen ausreichend, um Aussagen über die Auswirkungen des Efavirenz zu treffen (133). Der intraindividuelle Vergleich dient hierbei dazu die interindividuellen Unterschiede zu relativieren. Für die statistische Auswertung wurde der Mann-Whitney-U-Test herangezogen. Mit diesem wurde ein Vergleich zwischen den in Rangreihen eingeordneten Ergebnissen der Darmproben zum jeweiligen Zeitpunkt auf RNA-Ebene hinsichtlich der Expression von ABCB1, ABCC2, CYP3A4, CYP2B6 und UGT1A1 angestellt. Besonders das letztgenannte Zielgen UGT1A1 war im Hinblick auf die Tatsache, dass es in den Metabolismus des gleichzeitig eingenommenen Ezetimibs involviert ist, von großer Bedeutung.

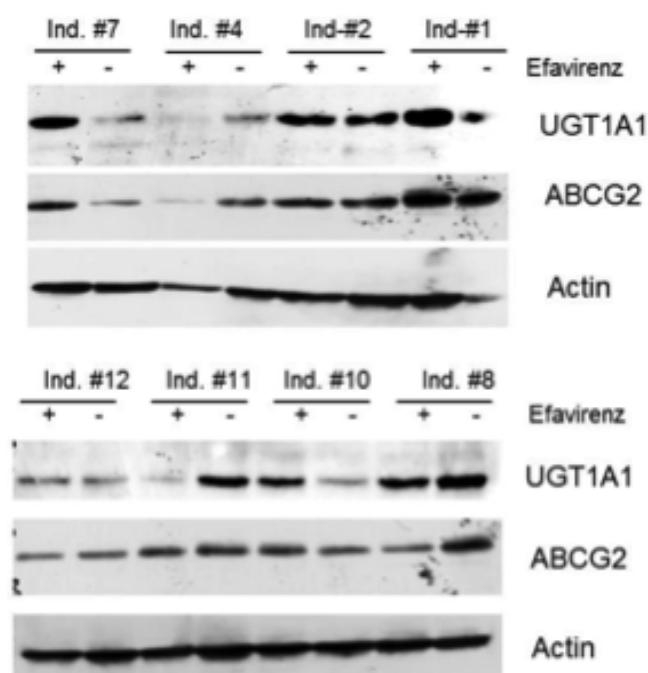
**Tabelle 3:** Vergleich der eingeordneten, zu 18S-rRNA normalisierten mRNA Expression in den Darmproben der Probanden vor und nach Einnahme des CAR-Induktors Efavirenz mittels Mann-Whitney-U-Test und der Berechnung der Signifikanz ( $p$ -Wert  $< 0,05$ ) Dargestellt sind der Mittelwert der mRNA-Expression  $\pm$  Standardabweichung.

Zielgen	mRNA Menge im Darm vor der Einnahme Efavirenz	mRNA Menge im Darm nach der Einnahme Efavirenz	p-Wert vom Mann-Whitney-U-Test
ABCB1	1,76 +/- 2,04	0,58 +/- 0,39	0,099
ABCC2	2,39 +/- 2,32	4,19 +/- 6,16	0,694
CYP3A4	1,54 +/- 1,56	0,61 +/- 0,37	0,126
CYP2B6	1,50 +/- 1,30	0,71 +/- 0,42	0,126
UGT1A1	1,66 +/- 1,51	1,46 +/- 1,40	0,645

Es ist bekannt, dass UGT1A1 in erheblicher Menge im Dünndarm vorhanden ist (63) und erscheint daher prädestiniert zum Nachweis des Einflusses von Efavirenz auf die Transkription.

Die Auswertung der Resultate der *real-time* PCR erbrachte das in **Tabelle 3** zusammengefasste Ergebnis. Es zeigte sich keine signifikante Veränderung der mRNA-Expression (s. **Tabelle 3**).

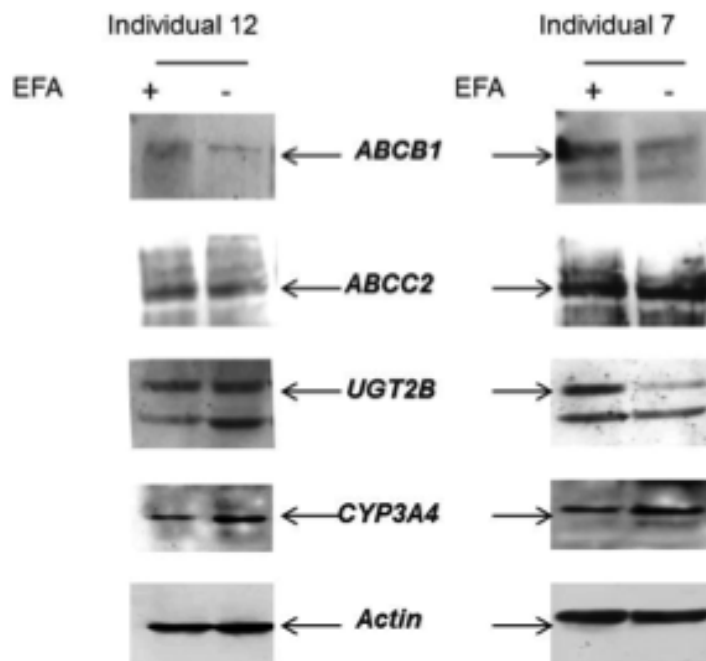
Dies ergänzend wurde auch der Einfluss von Efavirenz auf die Gene des Arzneimittelmetabolismus auf Proteinebene im Darm untersucht. ABCG2 wurde hierbei zusätzlich zu den bekannten Zielgenen als negative Probe miteingeschlossen, da eine Assoziation zwischen CAR und ABCG2 bislang nicht bekannt war. Es zeigten sich auf Proteinebene im Western Blotting von UGT1A1 sowie auch von ABCG2 keine aufschlussreichen oder verwertbaren Veränderungen.



**Abbildung 9:** Auswertung der Western Blots der Darm-Proteine von 8 Probanden im Vergleich GZ und ssZ. Actin dient als Kontrolle zur Beurteilung der generellen Übertragung der Proteine.

Insgesamt waren nur bei drei Probanden vereinzelt Induktionen messbar. Singulär war eine Induktion nach Efavirenzeinnahme nur bei Proband 7 bei ABCG2

feststellbar. Bei dem schon erwähnten Proband 7 und 10 erwies sich UGT1A1 positiv bezüglich einer Induktion. Die anderen bekannten CAR-abhängigen Zielgene blieben zumindest bei Proband 7 davon unbeeinflusst und bei Proband 10 fehlte leider weiteres Material. Im Falle des Probanden 12 wurde eine isolierte Induktion von ABCB1 festgestellt, wie es in den beiden folgenden Abbildungen (**10** und **11**) zur Geltung kommt. Sowohl für Proband 7 als auch für Proband 12 konnte hinsichtlich ABCC2, CYP3A4 und UGT2B keinerlei Induktion festgestellt werden. Bei den anderen Probanden konnten aufgrund der mäßigen Ausbeute bei der Proteingewinnung nicht alle Proben bezüglich aller Gene (CYP3A4, ABCC2, ABCB1 und UGT2B) untersucht werden.

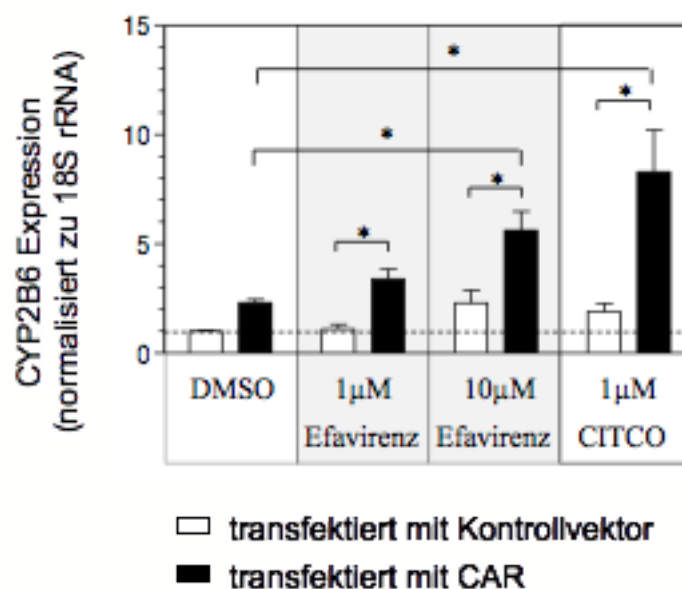


**Abbildung 10:** Proteinexpression bei 2 Probanden mit größerer Ausbeute im intraindividuellen Vergleich vor (-) und nach (+) mehrtägiger Efavirenzeinnahme. Actin dient als Kontrolle zur Beurteilung der generellen Übertragung der Proteine.

### 3.2 *In vitro* Induktion der Expression von CYP2B6 in Caco2-Zellen

Caco2-Zellen wurden von Jörgen Fogh in den 1970igern ursprünglich für neue Erkenntnisse in der Krebsforschung kultiviert (134). Später hat man sie auch

erfolgreich als Modell für die Barrierefunktion des Darms (135) verwendet und etabliert. Caco2-Zellen werden mittlerweile in der präklinischen Arzneimitteltestung als intestinales Modell angewandt. Um zu untersuchen, ob Efavirenz hier eine Transaktivierung von CAR und damit den hinlänglich beschriebenen Effekt auf die Zielgene aufweist, wurde ein entsprechendes *in vitro* Experiment durchgeführt. Hierzu wurden die Caco2-Zellen, von denen bekannt ist, dass sie im Gegensatz zu Enterozyten nicht unbedingt CAR exprimieren (136), zunächst mit dem entsprechenden Expressionsvektor CAR-pEF6 transfiziert. Diese derart transfizierten Caco2-Zellen wurden in einen direkten Vergleich mit dem Kontrollvektor pEF6-V5/His transfizierter Caco2-Zellen gesetzt, um zu eruieren, ob mittels CAR in Darmzellen das Zielprotein CYP2B6 durch Efavirenz induziert werden kann. Aus dem Vergleich der Caco2-Zellen unabhängig der Behandlung oder der Konzentration von CITCO oder Efavirenz ergibt sich, dass bei den mit dem Vektor hCAR-pEF6-V5/HIS transfizierter Zellen im Vergleich zu denen, die mit dem Kontrollvektor transfiziert sind, sich nach 48h eine Zunahme in der Expression von CYP2B6 in Höhe vom Mittelwert von 2,30 (+/- 0,26 [SD]) einstellt.



**Abbildung 11:** Induktionsverhältnisse von CYP2B6 in den Caco2-Zellreihen unter DMSO als Basiswert fürs Medium, Efavirenz in 2 Konzentrationen und CITCO, einerseits transfiziert mit CAR und andererseits transfiziert mit einem Kontrollvektor.

Im Einzelnen aufgeschlüsselt zeigt sich unter der Behandlung mit 10  $\mu\text{mol/l}$  Efavirenz und 1  $\mu\text{mol/l}$  CITCO eine signifikante Erhöhung der Expression von CYP2B6 im Vergleich zur Kontrolle (Mittelwert  $\pm$  SD; 5,63  $\pm$  1,49, Ergebnis vom t-Test:  $P=0,033$  bzw. 8,29  $\pm$  3,33 [SD], Ergebnis vom t-Test  $P=0,031$ ; s. **Abbildung 13**). Und auch der Einsatz von 1  $\mu\text{mol/l}$  Efavirenz erweist sich als ausreichend, um - wenn auch nur mit geringerem Effekt - auf CAR auszulösen bzw. die Expression von CYP2B6 zu steigern (Mittelwert  $\pm$  SD: 2,30  $\pm$  0,26, t-Test  $P=0,001$ ). Insgesamt betrachtet ist die Potenz der Induktion von CAR von CITCO höher als die von Efavirenz auch bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{mol/l}$ .

### **3.3 Nachweis des Einflusses von Efavirenz auf die Expression von Zielgenen in kultivierten PBMCs**

Ein weiteres Zellmodell, gewonnene PBMCs von zwei gesunden Probanden, die aktuell unter keinerlei Medikamentenwirkung stehen, wurde herangezogen, um das Induktionspotential von Efavirenz *via* CAR in diesem Kompartiment zu eruieren. Entsprechend der durchschnittlichen Kinetik und daraus folgenden Konzentrationen von Efavirenz, die in der Studie aufgetreten und dokumentiert sind, und anderen Erfahrungen von Plasmaleveln unter der Gabe von 600 mg Efavirenz (137), werden die PBMCs standardisiert in einem kontrollierten Umfeld 10 $\mu\text{mol/l}$  Efavirenz ausgesetzt. Einige bekannte Zielgene von CAR, wie in **Tabelle 2** aufgelistet, wurden hinsichtlich ihrer Induktionsfähigkeit nach diesem Modell auf RNA-Ebene untersucht. Dabei wurde bei beiden Probanden eine signifikante Induktion, wie es in **Abbildung 12** zur Darstellung kommt, in der Expression von CYP2B6, ABCB1 und UGT1A1 registriert. CYP3A4, OATP1B1 und auch UGT1A4 waren unabhängig vom Probanden in den PBMCs überhaupt nicht nachweisbar. Bezüglich der mRNA von ABCC1 zeigte sich nach Inkubation mit Efavirenz eine unverändert-konstante Expression.



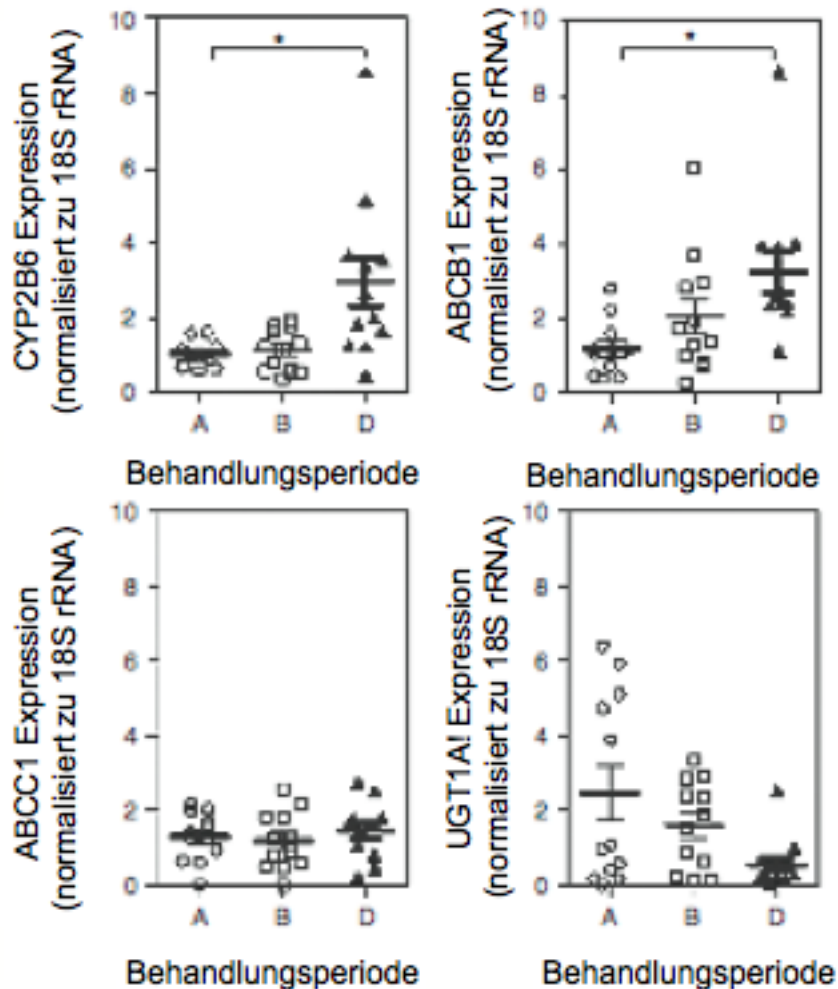


**Abbildung 12:** *Semiquantitative PCR Analyse der mRNA von menschlichen PBMCs, die für 48 h in vitro mit Efavirenz 10  $\mu\text{mol/l}$  inkubiert wurden. CAR unterliegende Zielgene von Transportern und Enzymen wurden miteinbezogen.*

### **3.4 PBMCs von Probanden der Studie: Expression von Zielgenen von CAR**

In Anbetracht der Erkenntnisse aus Ergebnisteil **3.3 Nachweis des Einflusses von Efavirenz auf die Expression von Zielgenen in kultivierten PBMCs**, dass *in vitro* CYP2B6, ABCB1 und UGT1A1 durch Efavirenz über CAR in PBMCs von gesunden, nicht unter Medikamenteneinfluss stehenden Probanden prinzipiell eine Induktion möglich ist, sollen diese Einflüsse auch *in vivo* untersucht werden. Dafür sind die Zeitpunkte der Studie EFA-sd (A), EZE-md (B) und EFA-md/EZE-md (C) ausgewählt worden und sollen miteinander verglichen werden. Hierbei dient der Moment EZE-md als negativ Probe bzw. als Maßstab für den Vergleich mit den anderen beiden Momenten, in denen im Gegensatz zu EZE-md eine Induktion *via* CAR möglich ist.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung, bestimmt mittels PCR und normalisiert durch 18S-rRNA, sind graphisch in **Abbildung 13** dargestellt.



**Abbildung 13:** Gegenüberstellung der Expression der Gene CYP2B6, ABCC1, UGT1A1 und ABCB1 im Laufe der Studie zu den verschiedenen Zeitpunkten A (EFA-sd), B (EZE-md) und D (EZE-md / EFA-md).

Im Moment EFA-sd lässt sich in keinerlei Weise eine signifikante Veränderung im Sinne einer Induktion oder auch Inhibition auf die mRNA ABCB1, ABCC1, CYP2B6 und UGT1A1 im direkten Vergleich zur Expression zum Zeitpunkt EZE-md, 15. Tag der Studie beobachten. In der Momentaufnahme des EFA-md/EZE-md ist eine signifikante Induktion von ABCB1 und CYP2B6 mittels Mann-Whitney-U-Test (p-Werte: 0,001 und 0,002) darstellbar, jedoch keine solche feststellbar bei den Genen UGT1A1 (p-Wert: 0,100) und ABCC1. Dies bestätigt somit, dass die Ergebnisse der

Kultur von den PBMCs zumindest hinsichtlich der Induktion von ABCB1 und CYP2B6, aber nicht bezüglich UGT1A1 über das Modell hinaus aussagekräftig sind bzw. das Modell der Realität nahekommt.

## 4 Diskussion

Für den Erfolg oder Misserfolg der HIV-Therapie, sprich der (Serum-) Konzentration von Efavirenz (138), (139), sind die Kompartimente, wie Darm, Leber (entscheidend für die Pharmakokinetik von EFA) und die PBMCs/Zentrales Nervensystem (prägend für die Pharmakodynamik von EFA), wichtig, die hier daher primär betrachtet werden.

Aus den Ergebnissen dieser Studie folgt, dass in den intestinalen Proben nach wiederholter, regelmäßiger Einnahme von Efavirenz keine Regulation seitens der mRNA der Transporter ABCB1 und ABCC2 sowie der Enzyme CYP3A4, CYP2B6 und UGT1A1 stattfindet. Wie auch auf mRNA Ebene zeigt sich keinerlei Regulation bezüglich der Proteine ABCC2, CYP3A4 und UGT2B. Ein uneinheitliches Bild präsentiert sich im Falle von ABCG2 und ABCB1 (Induktion bei einem Anteil von 12,5% bzw. 50% nachgewiesen) sowie von UGT1A1 (Nachweis einer Induktion bei 25% der untersuchten Probanden). Das Phänomen der Induktion bestätigend ist zumindest auch bei Ratten im Intestinum durch die fünftägige Einnahme von Efavirenz eine höhere Genexpression von ABCG2 aufgefallen, welche sich aber innerhalb von 24 Stunden pharmakokinetisch bezüglich Efavirenz wieder egalisierte (140).

Zur Bestätigung der erhaltenen Ergebnisse sowie der weiteren Untersuchung und zur Identifikation der zugrundeliegenden Mechanismen, die den Effekt dieser Interaktion erklären können, d.h. zur Erforschung der spezifischen Regulationen des NR CAR und seiner physiologischen Funktion, wurde die *in vivo* Situation im Darm durch ein zelluläres System abgebildet. Hierfür wurden Caco2-Zellen - stammend aus intestinalem Adenokarzinom - verwendet, um weitere Daten zu erhalten. Im Fall von Methotrexat in Caco2-Zellen hat Chen schon 2006 angenommen, dass zusätzlich zu PXR und VDR, *via* CAR, hSULT2A1, das zur Gruppe der metabolisierenden Enzyme der Phase II gehört, mit induzierbar ist, sodass die Kaskade Ligand, NR und Zielgen in den Caco2-Zellen keinen Pioniergeist weckt

(141). Nach der Transfektion mit dem NR CAR ist in den Caco2-Zellen eine Induktion von CYP2B6 auch bei geringeren Konzentrationen von Efavirenz möglich, sodass grundsätzlich CAR Zielgene in Enterozyten aktivierbar sind. Auch in der Zelllinie der LS180V, ein weiteres Zellmodell des Darms, konnte eine gewisse Induktion, u.a. seitens Efavirenz auf P-gp (ABCB1), festgestellt werden (142). Dies prinzipiell unterstützend konnte bei Weiss nach 4-wöchiger Inkubation von Efavirenz eine Induktion von ABCB1, ABCG2, ABCC2 und ABCC3 in den LS180 nachgewiesen werden (143). Eine Induktion von CYP2B6 ließ sich jedoch nicht feststellen (143). Generell müssen bei dem Kompartiment der Caco2-Zellen die folgenden Aspekte bezüglich der Reproduzierbarkeit der Resultate beachtet werden, wie Randbedingungen (Aussaat, Temperatur und Volumen des Mediums) mit Auswirkungen auf Wachstum und metabolische Aktivität (144), (145), als auch die Anzahl der Passagen dieser unsterblichen Zellreihen verbunden mit Unterschieden in den Ausgangsleveln von Transkriptionen (103) sowie die niedrigere Genexpression des Transporters BCRP (ABCG2) im Vergleich zum Jejunum (146) zusätzlich zur Schwankungsbreite bedingt durch uneinheitliche Standards verschiedener Labore (147). Des Weiteren fehlen dem Modell Faktoren, wie Motilität des Darms, die gegenüber der Realität viel geringere Fläche, die Größe der *tight junctions* (Caco-2-Zellen: 4,5 A und Darmzellen 8-13 A) (148) und die fehlende Mucosaschicht, sodass die Auswertung oder gar Übertragung kritisch betrachtet werden muss, um die Aussagekraft der gewonnenen Daten korrekt zu bewerten. Zur Annäherung an physiologische Gegebenheiten gibt es bereits schon Anätze, diesem Modell mehr Komplexität zu verleihen (149) oder neue Modelle neben den schon etablierten Zellreihen zu kreieren, wie zum Beispiel die Stammzellen von erwachsenen Menschen (150). Hinzu kommt, dass im Körper im Gegensatz zum Modell überwiegend, je nach Organ, die konstitutive Funktion von CAR aktiv sein könnte, denn in diesem Modell wurde CAR auch losgelöst von seiner physiologischen Funktion hineingetragen. Was die Relevanz der Ergebnisse aber letztendlich nicht schmälert, da die Caco2-Zellen das meistgenutzte Modell für die Untersuchung der Aufnahme von Medikamenten im Darm sind (151). Dies resultiert auch daraus, dass das Jejunum (152) bzw. der Dünndarm (153) ähnliche Transkriptionen aufweisen, wobei es den Caco2-Zellen, wie oben erwähnt, an dem BCRP-Transporter mangelt. Dadurch fehlt ihnen auch ein zusätzlicher Schutzfaktor, der für den Transport aus der Zelle heraus verantwortlich ist und höhere

Konzentrationen beispielsweise von Efavirenz unter der Annahme von Peroni des Transports von diesem via ABCG2 (140) ermöglicht.

Im Kompartiment der PBMCs *in vitro* ließ sich beobachten, dass neben ABCB1 und CYP2B6 UGT1A1 durch Efavirenz induziert werden konnte. Dieses Ergebnis unterstützt den Regulationsnachweis – Induktion von ABCB1 und CYP2B6, a.e. gesteuert durch CAR (Efavirenz besitzt eine gewisse Affinität zu PXR und entsprechendes Induktionspotential (154)) – nach mehrtägiger Einnahme von Efavirenz innerhalb der Studie *in vivo* in den PBMCs. Im *steady state* unter Efavirenzgabe müssen also ähnlich hohe oder höhere Konzentrationen, wie in den Modellen (Induktion hervorgerufen bei Konzentrationen von 10 µmol/l Efavirenz in PBMCs bzw. ab 1 µmol/l in Caco2-Zellen) vorgelegen haben. Diese Induktion innerhalb der PBMCs ist jedoch umso erstaunlicher, da die Transkriptionsrate von CAR in den PBMCs um einen Faktor von 130 im Vergleich zur Leber (155) oder anderen Geweben (156) niedriger ist.

Im Gegensatz dazu konnte *in vivo* bei UGT1A1 in den PBMCs keine Induktion festgestellt werden, was zu den unveränderten Serumspiegeln von Ezetimib sowie Efavirenz *in vivo* passt (116), da der CytochromP450-unabhängige (127) Stoffwechsel von Ezetimib zumindest *via* UGT1A1 (157) durch Efavirenz (UGT1A1 spielt zumindest *in vitro* keine oder nur eine geringe Rolle in dem Metabolismus von Efavirenz (158)) nicht gravierend beeinträchtigt wird. Was das Potential der Induktion von Efavirenz in den PBMCs, sei es *in vivo* oder *in vitro*, bezüglich ABCB1 anbetrifft, so ist dies mit den *in vitro* Daten von Chandler im Einklang (159). Eine weitere *in vivo* Studie von Burhenne hat teils gegensätzlich zu den eigenen Ergebnissen (Induktion von ABCB1) gezeigt, dass die intrazelluläre Konzentration von Efavirenz, die für den Therapieerfolg entscheidend ist, keine Induktion der Transporter von P-gp (ABCB1) und MRP2 (ABCC2) in den PBMCs verursacht, und zwar nach 14 Tagen Einnahme von Efavirenz (die Abnahmen erfolgten 5-14h nach der Exposition) (160). Hingegen ist die fehlende Induktion von MRP1 (ABCC1) bei Burhenne mit den hier gewonnenen Ergebnissen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* deckungsgleich. Betreffend ABCC1 konnte aber zumindest in Caco2-Zellen und HepG2 eine Regulation von Phenobarbital, auch ein bekannter CAR-Induktor, eine Induktion des Proteins auslösen (103). Da die Gewinnung der PBMCs bei Burhenne und in der vorliegenden Studie unterschiedlich ist, könnte je nach Methode der Anteil der T-Lymphozyten variieren, die einen vergleichsweise höheren Anteil an Cytochromen haben als

andere Fraktionen in den PBMCs (161). Entsprechend kann ebenso die Expression von mRNA von CAR insgesamt je nach Anteil der Zellreihen (Heterogenität), abgesehen von den T-Lymphozyten und Monozyten ist die Expression der mRNA von CAR in den PBMCs eher niedrig, unterschiedlich (Selektion) ausgeprägt sein (156). Widersprüchliche Resultate in Bezug auf die Induktion von ABCB1 in PBMCs gibt es auch bei weiteren bekannten Induktoren der NRs von CAR/PXR Phenobarbital und Rifampicin (keinerlei Wirkung (155)) bzw. Rifampicin und Carbamazepin (potente Aktivatoren (162)). In diesem Zusammenhang ist jedoch zu betonen, dass es hinsichtlich der Probandenzahl (8 bzw.4), der Konzentration von Rifampicin (20 $\mu$ M bzw. 25 $\mu$ M) und letztendlich des Mediums (RPMI1640 bzw. HBSS) Unterschiede gibt. *Ergo* muss erst eine vollständige Evaluation der Modelle erfolgen, um eine fundierte Aussage machen zu können bzw. die Ergebnisse eindeutig zu werten.

Das CYP3A4 war im Einklang mit Siest nicht in PBMCs detektierbar (161). Dies könnte damit begründet werden, dass CYP3A bislang nur in B-Zellen (163) nachgewiesen wurde, die jedoch nur einen geringen Anteil der PBMCs ausmachen (161). Das Fehlen eines Nachweises von OATP1B1 in PBMCs ist nicht verwunderlich, da OATP1B1 (SLCO1B1) leberspezifisch ist (164) und beispielsweise alternativ aus der Familie der OATPs bzw. SLCOs in PBMCs OATP3A1 (165) nachgewiesen wurde, welches (SLCO3A1) im Zellmodell der LS180 durch Efavirenz bereits schon induziert werden konnte (143). Im Zusammenhang mit der hier mangelnden Präsenz von UGT1A4 in PBMCs sind in der Literatur bislang keine anderslautenden Ergebnisse zu finden. Der hier vorzufindende Nachweis von UGT1A4 hätte bei mittlerweile erwiesenermaßen nicht unerheblicher Inhibition in Leberzellen *in vitro* (zusätzlich UGT1A9) durch Efavirenz (166) für neue interessante Erkenntnisse und Zusammenhänge sorgen können.

Die Einzeldosis von Efavirenz (sd) zeigte im Gegensatz zu dem schon erwähnten Ergebnis im Abschnitt D der Studie (Efavirenz md) keine Auswirkung auf die mRNA-Expression in den PBMCs, da anscheinend erst durch eine stabile Konzentration die Induktion gewährleistet ist, welche sich vermutlich abhängig von der Zeit und Dosis flexibel anpasst. Diese Kontakttheorie wäre auch vereinbar mit den Resultaten im Darm. Aufgrund der kurzen Verweildauer von Efavirenz in den Darmzellen und der Funktion des Darms als Schaltzentrale für die Aufnahme und Abgabe, könnten die oben genannten Ergebnisse begründet werden. Die relativ schnelle Absorptionszeit

von 2-3 Stunden (167) und die vollständige renale Elimination lassen dem Efavirenz nicht viel Zeit zur Induktion im Darm. Im Hinblick darauf stellt sich auch die Frage, wie schnell die NRs generell ihre Regulation ändern und welche Dynamik sie haben. Beim GR zum Beispiel, sind es anscheinend nur Sekunden, in denen die Antwort vermittelt wird (168). Die Zeit betreffend konnte gezeigt werden, dass der *steady state* der Autoinduktion von Efavirenz (600 mg/d) erst nach drei Monaten der Therapie erreicht wird (137). Nach 10 Tagen der Therapie, was dem Zeitpunkt der Duodenumbiopsie in unserer Studie und der letzten Entnahme der PBMCs entspricht, wurde nur etwa die Hälfte der Endinduktion erreicht (137). Dabei muss noch generell berücksichtigt werden, dass ein Zusammenhang zwischen der Autoinduktion und dem genetischen Hintergrund (CYP2B6 und UGT2B7) der Individuen sowie dem Geschlecht gefunden wurde (133). Aufgrund der ausschließlichen Einbeziehung von männlichen Probanden in dieser Studie sollten interindividuelle Unterschiede geringer ausfallen. Es ist aber davon auszugehen, dass zum Zeitpunkt der letzten Abnahme oder der Betrachtung das Level der Induktion nicht sein Maximum erreicht hat und der Vorgang längere Zeit in Anspruch nimmt und somit die Kontakttheorie unterstützt. Dies könnte mit eine Erklärung dafür sein, dass im Darm *in vivo* keine durchgehende Induktion feststellbar war. Im Zellexperiment von Weiss wurden die LS180 und die *Jurkat cells* auch 4 Wochen lang dem Einfluss von Efavirenz ausgesetzt, was letztlich die mRNA einer Vielzahl von Transportern induziert hat (143). Hierbei hätte eine Aufschlüsselung über das Induktionsverhalten in Abhängigkeit von der Kontaktzeit (2h,...24h,...72h,...) neue interessante Aufschlüsse erbringen können. Auch nach zwei Wochen von 600 mg/d Efavirenz, was als äquivalent zur Konzentration von 10 $\mu$ mol/l angesehen wird (137), konnte sowohl im Intestinum als auch in der Leber eine Induktion von CYP3A4 (169) festgestellt werden, sodass entweder die längere Exposition und/oder die höhere Dosis (etwa 10 $\mu$ mol/l) zur kompartimentübergreifenden Induktion beigetragen haben könnten. Denkbar wäre, dass evtl. auch die Zytokine je nach zeitlicher Exposition, um das Gleichgewicht aufrecht zu erhalten und zu regulieren, dafür sorgen, dass eine ausgelöste Induktion (Maximum nach 12h) schon fast wieder verblasst ist (170). Der Darm ist offensichtlich ein sehr flexibles, anpassungsfähiges Gebilde, das heißt eine Probenentnahme sollte idealerweise eine Stunde nach der Einnahme von Efavirenz erfolgen sollen, da nach 24h der Exposition sich die Transportkapazitäten für Efavirenz wieder normalisieren (140). Sinnbildlich für diese Flexibilität ist auch die

kurze Lebenszeitspanne der Darmzellen von vier Tagen (171), was immer wieder einen Erneuerungsprozess ermöglicht mit neuen Generationen von Zellen. Was beim Darm noch dazukommt, ist der unmittelbare Einfluss der aufgenommenen Lebensmittel (172), was in dieser Studie nicht in vollem Umfang berücksichtigt wurde (nur der Verzehr von Grapefruit und erhöhter Konsum von Tee oder Kaffee oder Zigaretten wurden ausgeschlossen). Erschwerend kommt beim Darm zusätzlich hinzu, dass jedes Individuum seine eigene Bakterienflora hat, die die Resorption von Medikamenten beeinflussen kann (173). Was den Ort der Biopsie im Darm angeht, wäre es vielleicht besser gewesen, diese nicht im Duodenum, sondern im Ileum vorzunehmen. Dort können weniger interindividuelle Unterschiede in der Expression der Transporter beobachtet werden (38) und zwar trotz der allgemeinen variablen Expression und Enzymaktivität (UGTs (174), CYP3A (175)) des Dünndarms im Vergleich zu anderen Kompartimenten. Allerdings wäre dies weniger praktikabel gewesen. In Anbetracht der teils geringen Ausbeute und der dadurch stark schrumpfenden Probandenzahl ist die Aussagefähigkeit insgesamt gesehen etwas eingeschränkt.

Weiterhin ist zum Beispiel der Transporter ABCG2, der in größerem Maße im Darm exprimiert ist, insbesondere im Übergang des distalen Jejunum und Ileum stark vertreten (140). Unter der Annahme von Peroni, dass dieser hinsichtlich der Bioverfügbarkeit nach oraler Einnahme von Efavirenz zu einer Modulierung von dessen Serumkonzentration in der Lage ist (140), existieren für Efavirenz evtl. (spezifische) Aufnahmeeregionen im Darm, wo eventuell höhere zelluläre Konzentrationen durch die dort vermehrt vorhandenen Transportkapazitäten erreicht werden. Dies könnte logischerweise auch den Mangel an Induktion zumindest in der untersuchten Darmregion erklären. Dem widersprechend blieb bei Weiss trotz der Induktion von den Transportern ABCB1, ABCC1, 2, 3 und ABCG2 die Konzentration von Efavirenz innerhalb der Zelle unverändert (143). Auch Störmer ist der Meinung, dass evtl. die passive Diffusion dominant ist, da in diesem Fall Efavirenz nicht von der Aktivität P-gp (ABCB1) in Bezug auf den Transport beeinflusst wird (142). Somit könnte aufgrund der lipophilen Eigenschaften (176) von Efavirenz die transzelluläre passive Diffusion und nicht der oben genannte Weg bevorzugt werden oder die Transporter haben einen unerheblichen Anteil am Transport von Efavirenz oder auch einfach nur gute Kompensationskapazitäten. Der parazelluläre Weg ist generell nur in geringem Ausmaße möglich, da die *tight junctions* insbesondere kleinen,



hydrophilen Molekülen aber auch großen Molekülen diesen Weg versperren (177). Dies hätte prinzipiell niedrigere Konzentrationen in den Darmzellen zur Folge und daher eine Abnahme des Induktionspotentials, was bislang aber im Falle von Efavirenz nicht endgültig als möglicher Weg identifiziert wurde.

Die Ergebnisse der Induktion der Expression von nur vereinzelten Proteinen bei den Probanden Nr. 7 und Nr. 12 reihen sich letztendlich aber gut in solche von vorigen Veröffentlichungen ein. Carbamazepin gehört, wie Rifampicin oder Spironolacton, im Gegensatz zu Efavirenz oder Phenobarbital, welche über CAR ihre Wirkung auf die Genexpression entfalten, zu Liganden von PXR (178). Im Darm ist bei Carbamazepin nur eine Induktion von MRP2 (ABCC2) und nicht von MDR1 (ABCB1) festgestellt worden (179). Dies unterstützend stellte Giessmann fest, dass Carbamazepin zur Induktion im Intestinum auf Proteinebene von ABCC2, aber nicht von ABCB1 fähig ist trotz der gleichzeitig nachgewiesenen Induktion der mRNA von ABCB1 und ABCC2 (180). Letztere Induktion war hierbei von pharmakologischer Relevanz (steigende Clearance von Talinolol iv und sinkende orale Verfügbarkeit von Talinolol po) (180). Von der Induktion von ABCB1, ABCC2 und UGT1A1 durch Rifampicin im Darm *in vivo* auf mRNA Ebene (126) kann also nicht zwangsläufig auf Reaktionen auf der Ebene der Proteine geschlossen werden, da sich auch in den festzustellenden Ergebnissen keine korrelierenden Induktionen zwischen mRNA und Proteinen herausgestellt haben. Die Induktion von ABCC2 hierbei könnte als Ursache für entsprechend niedrigen Konzentration von Ezetimib verantwortlich sein (126), da sowohl Tacrolimus (181), Sirolimus (125) und schließlich in dieser Studie mit Efavirenz kein Einfluss auf ABCC2 im Intestinum gesichert werden konnte und daher möglicherweise der Ezetimibi Stoffwechsel unbeeinträchtigt blieb.

Daraus, dass die mRNA-Expression von CAR, worüber Efavirenz seine Induktionsfähigkeit entfaltet, in der Leber und im Dünndarm in einem Verhältnis von 72:1 und im Dickdarm gar nicht detektierbar ist, folgt, dass CAR im Darm von vornherein physiologisch einen niedrigeren Stellenwert hat als in der Leber. Bei PXR hingegen beträgt das Verhältnis Leber / Dün- bzw. Dickdarm in etwa 5:1 / 8:1 (182). Da Rifampicin dafür bekannt ist, über PXR Gene zu induzieren (183), könnte es sein, dass die NR in verschieden differenzierten Zellen eventuell mengenbedingt anders agieren und somit Liganden von PXR zur Induktion im Darm fähig sind, in diesem Fall von CYP3A4 (184) sowie UGT1A1, ABCB1 und ABCC2 (126). Eine Induktion durch Efavirenz ist dagegen nicht nur in den vorliegenden Experimenten nicht

schlüssig nachweisbar (167), wobei die Affinität von Efavirenz zu PXR zumindest in dem Modell Leber bei Hariparsad der Affinität von Phenobarbital und Rifampicin ähnelt (185). Faucette hingegen hat im Modell der Leber bei gleicher Dosis (5-10 $\mu$ M) eine geringe Affinität von Efavirenz zu hPXR festgestellt und dargelegt, dass bei höheren Konzentrationen (25 $\mu$ M) die Toxizität überwiegt (98). Dabei ist aufgefallen, dass Carbamazepin genauso wie Efavirenz eine geringe Affinität zu PXR hat (98), aber Carbamazepin dennoch in der Lage ist, im Darm *in vivo* auf mRNA-Ebene MRP2 (ABCC2) und MDR1 (ABCB1) sowie die Proteinexpression von MRP2 (ABCC2) hochzuregulieren (179). In Ratten ist nachgewiesen worden, dass Dexamethason in der Lage ist, im Darm die Funktion von CYP3A zu verstärken (170), wobei dieses Phänomen wahrscheinlich *via* PXR hervorgerufen wird (103). *Ergo* kann bislang nicht eindeutig herausgestellt werden, auf welchem Wege letztendlich die Induktion genau stattfindet.

Diese Studie („*Pharmacokinetic and pharmacodynamic interactions between the cholesterol-lowering ezetimibe and the non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor efavirenz during chronic treatment in healthy volunteers with reference to intestinal expression of CYP3A4, UGT1A1, ABCB1 and ABCC2*“) zeigt zusätzlich zu den Ergebnissen der hiesigen Arbeit eine erhöhte metabolische Aktivität von CYP3A4 (indirekt nachgewiesen mittels der Serumlevel von 4- $\beta$ -Hydroxycholesterol bzw. des Verhältnisses von  $\beta$ -Hydroxycholesterol zu Cholesterol) und erniedrigte Billirubinspiegel, was für eine *in vivo* Induktion seitens von Efavirenz im Kompartiment Leber spricht. Diese Annahme wird durch die Ergebnisse bezüglich der Leber *in vitro* (CYP2B6) untermauert (132). Darüber hinaus steht dies im Einklang mit den Resultaten von zwei klinischen Studien an gesunden Probanden, in denen ebenfalls geringere Billirubinspiegel im Serum unter Einwirkung von Efavirenz (600 mg/Tag) beobachtet werden konnten (186), (187). Entsprechend kann vor allem die Induktion von UGT1A1 in der Leber und eventuell von weiteren Transportern im Gallengangssystem ein Ausgangspunkt für eine mögliche Interaktionsgefährdung von Medikamenten darstellen. Insbesondere bei einer additiven Verabreichung von Substanzen, die über UGT1A1 verstoffwechselt werden - was im Falle des Ezetimibs zutreffend ist, könnten u.a. Efavirenz oder Ezetimib in ihrer pharmakodynamischen Wirkung moduliert werden (187). Aus den Versuchsergebnissen folgt aber, dass die Kombination von Efavirenz und Ezetimib zu keinem Zeitpunkt in der klinischen Studie pharmakologisch relevante Auswirkungen auf die Serumspiegel dieser beiden

Wirkstoffe hatte (116), wobei aufgrund der etwaigen Autoinduktion auch schon Resultate veröffentlicht worden sind, die bis zu 16 Wochen nach Beginn der Einnahme noch sich ändernde Plasmalevel belegen und *per definitionem* jederzeit auftreten können (188). Die Kombination von Rifampicin und Ezetimib hingegen wies ein deutliches Interaktionspotential niederschlagend in die Pharmakokinetik und – dynamik von Ezetimib auf (126). Rifampicin, ein Ligand von PXR, sorgt aber auch für eine Induktion von UGT1A1, P-gp (ABCB1) und MRP2 (ABCC2) im Intestinum *in vivo* (126). Ob und in welchem Ausmaß die in der Leber oder im Darm lokalisierten ABCB1, ABCC2 und UGT1A1 in den Ezetimib-Stoffwechsel involviert sind und in welchem Organ letztendlich therapierelevante, durch medikamentöse Interaktionen induzierte Wirkungen ausgelöst werden können, ist derzeit eine noch offene Frage. Ezetimib seinerseits nimmt dabei, soweit bekannt, keinerlei Einfluss auf NRs. Bei Gabe von Rifampicin konnte aber nicht nur im Fall von Ezetimib, sondern auch von Efavirenz, eine gewisse pharmakokinetische Wechselwirkung gezeigt werden (189).

Efavirenz besitzt aber auch im Allgemeinen ein sehr hohes Interaktionspotential, da der Metabolismus von Statinen beispielsweise deutlich beeinflusst wird (190). Dies zeigt sich auch bezüglich der Transferase UGT2B7, welche im Lebermodell schon ein erhebliches Potential zur Interaktion zwischen Efavirenz und dem NRTI Zidovudin aufweist (158). So hemmt Efavirenz die Glucuronidierung von Zidovudin um 47% und im umgekehrten Fall zeigt sich eine Hemmung um 23%.

Die Idee, die PBMCs als Screening-Methode in Kombination mit einem Gewebefaktor oder Ähnlichem zu nutzen, um die Expression von Enzymen oder Transportern in der Leber oder dem Darm abzuschätzen, hat sich bei Albermann im Hinblick auf vier wichtige ABC-Transporter als nicht praktikabel erwiesen (38). Des Weiteren konnten die in der Untersuchung an Lymphozyten generierten Daten nicht auf das Lungengewebe und die Empfänglichkeit für Lungenkrebs übertragen werden (191). Hingegen kann bezüglich der Cytochrome mit Hilfe der Expression von CYP2E1 in PBMCs auf die Toxizität von Alkohol oder Benzol für den Körper geschlossen werden (192), (193). Den erzielten Ergebnissen dieser Arbeit zufolge kann prinzipiell (Induktion von CYP2B6 sowohl in den PBMCs *in vivo* / *in vitro* als auch in den Caco2-Zellen) auf andere Induktionen geschlossen werden. Die Induktion der Enzymaktivität von CYP3A4 in der Leber konnte aber nicht endgültig in den PBMCs parallel bestätigt werden. Folglich müssen, abgesehen vom allgemeinen Induktionspotential, konkrete Übertragungen von den PBMCs mit ihren

nachgewiesenermaßen Geflecht von 23 NRs (unter anderem CAR und PXR) (156) im Einzelfall geprüft werden, um anhand der prinzipiell unkomplizierten Gewinnung der PBMCs beispielsweise eine Feinjustierung der medikamentösen Einstellung zu ermöglichen. Hierbei erschweren Vorgänge des gewebespezifischen Spleißens (194) mit daraus folgenden unterschiedlichen spezifischen Aktivitäten (136) eine der Logik folgende Übertragung. So kann die Differenzierung zwischen den verschiedenen Kompartimenten und die ureigene Individualität (interindividuelle genetische Varianten von CAR und PXR (195)) zu gewissen Abweichungen führen.

Generell ist einschränkend anzumerken, dass alle diese PBMCs natürlich nicht frei von Polymorphismen sind, die für erhebliche Konzentrationsunterschiede im Serum sorgen können (196), was hier aber nicht untersucht wurde. In diesem Zusammenhang hätten hinsichtlich der Eliminierung von Efavirenz bzw. dessen Konzentration im Blutserum noch zwei Wege näher betrachtet und diese auf ihre genetischen Polymorphismen und Varianten hin untersucht werden können. Dies wären zum einen der oxidative Weg (CYP2B6 und CYP2A6) gewesen, der insbesondere mit dem CYP2B6 516TT für Ausreißer nach oben sorgt (durchschnittlich 345%-höhere Efavirenzkonzentrationen), und zum anderen der Scheitelpunkt der Glukoronidierung mit seinem UGT2B7\*1a Allel, das für bis zu 32%-höhere Efavirenzkonzentrationen verantwortlich ist (197). Diese Polymorphismen können divergierende Ergebnisse verschiedener Untersuchungen in einen erklärbareren Rahmen stellen, da die interindividuellen Unterschiede in der Kinetik nicht unerheblich sind (Variationskoeffizient von 118%) und somit bei einer Einnahme von 600 mg/d Efavirenz Konzentrationen von 125 bis zu 15.230 µg/l (0,39 µmol/l - 48 µmol/l) gemessen wurden (139). Aber anhand des Beispiels von CYP2B6 516TT für Kaukasier wären in dieser Studie weniger als ein Proband betroffen (198), sodass diese Variationen im Gegensatz zu afrikanischen Populationen vernachlässigbar erscheinen. Die Erkenntnis, dass durch eine einmalige, gleichzeitige Bestimmung der intrazellulären Konzentration und der Plasmakonzentration, bei womöglich gleich bleibendem Konzentrationsverhältnis (1,3-1,8), über die Plasmakonzentration die intrazelluläre Konzentration in den PBMCs für die genaue Überwachung der HIV-Therapie wegen dieser interpersonellen Schwankungen bestimmt und monitorisiert werden könnte, erweist sich im Einzelfall als sehr nützlich (160).

Letztendlich sind die Ergebnisse dieser Arbeit Anreiz weitere Forschung auf diesem Gebiet zu betreiben, um dann nach Möglichkeit eine sichere und individuelle pharmakologische Therapie auf der Grundlage genauen Wissens über die zellspezifischen Mechanismen zu entwickeln.

## 5 Ausblick

Das Interaktionspotential zwischen verschiedenen Medikamenten ist in den letzten Jahrzehnten immer mehr in den Focus gerückt. Die Gründe hierfür sind die höhere Lebenserwartung, die Multimorbidität und neue medizinische Erkenntnisse im Hinblick auf die Pathophysiologie der Krankheiten mit teils einhergehenden neuen Therapieansätzen. Die Kompensation von ungewünschten Nebenwirkungen erfordert die Gabe von weiteren Arzneien, sodass am Ende der Kausalkette die Menge der Tabletten einer kleinen Mahlzeit ähnelt.

Da viele Medikamente nicht nur lokal, sondern je nach Applikation systemisch wirken und im Körper ähnliche Wege und Prozesse durchlaufen, ist die Wahrscheinlichkeit ziemlich hoch, dass sie sich gegenseitig in verschiedener Weise beeinflussen und physiologische Funktionsketten aus dem Gleichgewicht bringen können. So sind zusätzlich zum Arzneimetabolismus beispielsweise die CYP-Enzyme an der Synthese von vielen körpereigenen Stoffen (Thromboxane und Prostacycline (100), Steroide (199)) oder allgemein im deren Metabolismus (Gallensäuren, Eikonasoide und Vitamine oder ebenso andere exogene Substanzen der Umwelt (100)) beteiligt. Die körpereigenen Stoffe wiederum, wie Gallensäuren oder weibliche Hormone, selbst induzieren im Gegenzug wieder CYP-Enzyme (CYP3A4 (200) bzw. CYP2B6 und CYP3A4 (201)). Solche Regelkreise machen generell die Interaktionen *in vivo* merklich komplexer.

Erschwerend zu der dem Menschen innewohnenden Komplexität offenbaren Umweltstudien weitere Einflüsse, sei es ausgehend aus der Umwelt oder von industriell hergestellten Produkten, auf die NRs und somit auf den menschlichen Metabolismus. So ist z.B. Triclocarban (TCC) in 76% aller flüssigen Seifen und vielen Deodorants enthalten und darüber hinaus in der Hygienebranche generell als antibakterieller Inhaltsstoff stark vertreten. Dieser Wirkstoff führt vermutlich über die NR CAR und ER $\alpha$  zu einer Aktivierung von wichtigen Abläufen im Körper (202) (vgl.

Wirkung auf die Bakterien). Dies kann möglicherweise auf Dauer die Gesundheit schädigen und die physiologischen Prozesse des Gleichgewichts berauben. Die Aufnahme erfolgt in relevantem Ausmaß über die Haut und es scheint, dass mehrmaliges Duschen mit einem Produkt, das TCC enthält, dazu führt, dass es sich in einem Umfang im menschlichen Körper anreichert, der einen Nachweis im Urin ermöglicht (203). Bei regelmäßiger Nutzung solcher Produkte und anschließender Freisetzung in die Umwelt *via* Abwasser besteht auf Dauer die Gefahr, dass die Aufnahme nicht nur direkt über die Haut erfolgt, sondern auch indirekt über die Umwelt, z.B. über die Nahrung. Daher raten diesbezügliche Studien zur Sanierung der Umwelt - in dieser Studie mittels geeigneter Bakterien (204). Eine Verwendungsbeschränkung wäre allerdings in jedem Fall effektiver.

Interessant in diesem Zusammenhang sind auch einige dynamische Aspekte innerhalb des Menschen. Beginnend mit der folgenden Frage, ob CAR nämlich, da es durch GR und Glukortikoide beeinflusst wird (205), (206), einer zirkadianen Rhythmik unterworfen ist. Dies hieße, dass auch die Transporter einer Tagesrhythmik unterliegen. Somit müsste in jeder Studie, die Uhrzeit berücksichtigt und dokumentiert werden. Weitere kleine Stellschrauben, die auf CAR einen Einfluss nehmen können sind das Lebensalter (207) und die Jahreszeit. Das intestinale CYP3A4, gesteuert von VDR, variiert nämlich je nach Jahreszeit (Sonnenexposition). Dadurch unterliegt die orale Bioverfügbarkeit von Medikamenten, wie Midazolam, entsprechend einer gewissen Dynamik (208). Insbesondere in Anbetracht der gemeinsamen Zielgene von VDR, CAR und PXR (CYP3A4, CYP2B6 und CYP2C9) sind folglich jahreszeitliche Einflüsse denkbar und könnten insgesamt Einfluss nehmen auf die Expression dieser Zielgene (209).

Bereits dieser kurze Einblick in die mannigfaltigen Einflussfaktoren auf den Metabolismus des Menschen sowie der Arzneimittel verdeutlicht, dass Forschung *in vivo* durch das multifunktionale Potential der Medikamente im Becken des vielschichtigen, empfindlichen, in der Evolution perfektionierten Regulierungsgebildes von den NRs schwer zu vereinheitlichen ist. Mit wachsendem Verständnis der Abläufe und Mechanismen im Körper wird das Geflecht der vielen Bedingungen, die für jedes Kompartiment separat und in Verbindung mit anderen Kompartimenten in Betracht gezogen werden müssen, transparenter.

Jedes Individuum bringt dabei seine eigene Genetik mit, die u.a. durch herkunftsbedingte Eigenheiten mitgeprägt wird. Die Art von Medizin, die einen jeden Einzelnen betrachtet und seine Behandlung effizient und zielgerichtet anpasst, ist bislang noch Zukunftsmusik, aber die ersten Schritte in diese Richtung sind beispielsweise unterstützt durch die Pharmakogenomik (210) gemacht. Der Ausgang dieser Entwicklung der personalisierten Medizin wird aber stark vom Kosten-Nutzen-Verhältnis abhängen: d.h., die Kosten, die durch Nebenwirkungen von Medikamenten hervorgerufen werden (211), (212), sei es wegen individueller genetischer Gegebenheiten oder Interaktionen der Medikamente untereinander, müssen letztendlich mit den Kosten der individuellen Therapie verglichen werden. Dabei dürfen aber auch ethische Aspekte nicht außer Acht gelassen werden. Die Frage allerdings, ob auf diese Weise flächendeckend eine medizinische Versorgung gewährleistet werden kann oder ob es einer privilegierten Gruppe vorbehalten sein wird, wird und kann hier nicht beantwortet werden.

Bezogen auf den konkreten Fall von Efavirenz, das trotz gleich hoher Verabreichung eine äußerst ausgeprägte Variabilität in der Serumkonzentration aufweist, tendieren die Schlussfolgerungen daraus zu einer individualisierten Therapie (213), (197). Auf diese Weise könnte einerseits die Gefahr der Ausbildung von Resistenzen aufgrund zu niedriger Spiegel von Efavirenz und andererseits das Auftreten unerwünschter Nebenwirkungen bedingt zu hohe Konzentrationen im Blut minimiert werden. Folglich sollte eine individuelle Therapie - über die bislang nach der Nieren- und Leberfunktion ausgerichtete sowie insbesondere in der Pädiatrie gewichtsadaptierte Dosistitration hinaus - angestrebt werden. Da die Werte innerhalb eines Individuums einer deutlich geringeren Schwankungsbreite unterliegen (213), könnte eine initiale Einschätzung und Planung bei konstanten Parametern ausreichen. In dieser Hinsicht können bei einer solchen Therapie mit Efavirenz mögliche Interaktionen mit anderen Medikamenten von vornherein mitberücksichtigt werden, wie zum Beispiel mit Rifampicin, welches u.a. bei einer (Reaktivierung einer) Tuberkuloseinfektion unter einhergehender Immunsuppression im Laufe der HIV-Infektion eingesetzt wird, und eine erhöhte Tagesdosis von Efavirenz erforderlich macht (189). Überdies können negative Folgen für den Fettstoffwechsel, mündend in ein höheres kardiovaskuläres Risiko (214), bei Patienten, die sich mit HIV infiziert haben, - sei es bedingt durch eine langjährige Behandlung mit z.B. Efavirenz (190) oder als Effekt durch die Krankheit HIV selbst gedeutet werden kann, welcher erst bei gutem

medikamentösem Ansprechen und guter Kontrolle der Viruslast nach langjähriger Krankheitsdauer entschleiert wird (215), in einer Weise des pharmakokinetisch nicht beeinträchtigenden Nebeneinanders begegnet werden. In diesem Nebeneinander scheint Ezetimib laut den Daten der Studie eine Option zu sein.

Aber nicht nur in der HIV-Therapie zur Optimierung der medikamentösen Versorgung des Patienten bietet die Forschung Möglichkeiten, sondern die Erkenntnisse über die NRs liefern mit wachsendem Verständnis der relevanten Prozesse auch Ansatzpunkte für neue/alternative Therapiemöglichkeiten, beispielsweise bei leberspezifischen Erkrankungen, wie der nicht-alkoholbedingten Fettleber oder dem hepatozellulären Karzinom (92), oder bei der Behandlung von Brustkrebs (72). Interessanterweise offenbaren sie darüber hinaus auch einige, bis dahin unbekannte Zusammenhänge zwischen der westlichen, Evidenz-basierten Medizin und der asiatischen, eher pflanzlich-orientierten Medizin. So gilt beispielsweise bei neonataler Gelbsucht bislang die UV-Licht-Therapie als Standardtherapie. Das Wissen, dass CAR in der Clearance von Billirubin involviert ist und längst (unbewusst) in der chinesischen Medizin Anwendung findet, ist äußerst bemerkenswert. Denn das unter anderem im chinesischen Yin-Zhi-Huang-Tee enthaltene 6,7-Dimethylesculetin kann *via* CAR CYP2B10 induzieren und dadurch die Billirubin Clearance steigern, um die von erhöhten Billirubinspiegeln ausgehende Neurotoxizität zu vermeiden (107). Dieser Mechanismus könnte analog die Billirubinspiegel-senkende Wirkung von Phenobarbital (bekannter CAR-Induktor) und Clofibrat (216) (bislang nur bekannt als CAR-Induktor in der Mausleber (217)) erklären.

Auf dem Feld der Cytochrome gibt es ähnliche Bemühungen. Da die Cytochrome darüber hinaus auch Kanzerogene verstoffwechseln, wird aktuell untersucht, ob es einen Zusammenhang zwischen bestimmten Allelen und beispielsweise Lungenkrebs gibt (218). Auch bezüglich der Genese des Kolon-Karzinoms könnte ein möglicher Pathomechanismus mittels der CYP-Enzyme, in diesem Fall CYP2E1, eine Erklärung liefern und somit die Gestaltung präventiver Maßnahmen ermöglichen (219). Ob Polymorphismen von CYP-Enzymen auch im pathophysiologischen Prozess der kardiovaskulären Krankheiten, losgelöst von Behandlungsansätzen, eine derart entscheidende Rolle spielen, lässt sich derzeit noch nicht endgültig beantworten. Sicher ist zwar, dass die Cytochrome an der Metabolisierung endogener Stoffe, wie z.B. Cholesterol und Arachidonsäurederivaten, die kardiovaskuläre Risiken (beispielsweise cerebrale ischämische Ereignisse (220))



begünstigen, beteiligt sind, die Formulierung konkreter, allgemeingültiger Aussagen über die ethnische Herkunft hinaus oder sonstige nicht beherrschte bzw. unwissentlich unberücksichtigte Umweltfaktoren oder (Tier-) Modelle ist derzeit jedoch noch nicht möglich (221).

Schlussendlich ist festzustellen, dass die Erforschung von NRs für die Gewinnung neuer Erkenntnisse über die Komplexität des menschlichen Organismus und die (möglichen) Wechselwirkungen verschiedener (Wirk-) Stoffe unverzichtbar ist.

## Literaturverzeichnis

1. Hoffmann F, Schmiemann G, Dörks M. Untersuchungen zu Polypharmazie: Eine Frage der Definition und der verwendeten Daten. *Zeitschrift für Evidenz, Fortbildung und Qualität im Gesundheitswesen* 2016;113:27–35.
2. Benetos A, Labat C, Rossignol P. Treatment With Multiple Blood Pressure Medications, Achieved Blood Pressure, and Mortality in Older Nursing Home Residents: The PARTAGE Study. *JAMA Internal Medicine* 2015;175(6):989–995.
3. Dagli RJ, Sharma A. Polypharmacy: A Global Risk Factor for Elderly People. *Journal of International Oral Health: JIOH* 2014;6(6):i–ii.
4. Pergolizzi Jr JV, Ma L, Foster DR, Overholser BR. The Prevalence of Opioid-Related Major Potential Drug-Drug Interactions and Their Impact on Health Care Costs in Chronic Pain Patients. *Journal of Managed Care & Specialty Pharmacy* 2014 Mai;20(5):467–476.
5. Ahmad A, Khan MU, Haque I, Ivan R, Dasari R, Revanker M, Pravina A, Kuriakose S. Evaluation of Potential Drug - Drug Interactions in General Medicine Ward of Teaching Hospital in Southern India. *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR* 2015 Feb;9(2):FC10–FC13.
6. Moura C, Acurclo F, Belo N. Drug-drug interactions associated with length of stay and cost of hospitalization. *Journal of Pharmacy Pharmaceutical Sciences* 2009;(12(3)):266–72.
7. Muhič N, Mrhar A, Brvar M. Comparative analysis of three drug–drug interaction screening systems against probable clinically relevant drug–drug interactions: a prospective cohort study. *European Journal of Clinical Pharmacology* 2017;1–8.
8. Egger S, Drewe J, Schlienger R. Potential drug–drug interactions in the medication of medical patients at hospital discharge. *European Journal of Clinical Pharmacology* 2003 März;58(11):773–778.
9. Pinzón JF, Maldonado C, Díaz JA, Segura O. Costos directos e impacto sobre la morbimortalidad hospitalaria de eventos adversos prevenibles a medicamentos en una institución de tercer nivel de Bogotá. *Biomédica* 2011 Sep;31:307–15.
10. Wehling M, Burkhardt H, Kuhn-Thiel A, Pazan F, Throm C, Weiss C, Frohnhofen H. VALFORTA: a randomised trial to validate the FORTA (Fit fOR The Aged) classification. *Age and Ageing* 2016;45(2):262–267.

11. Mahler C, Jank S, Pruszydlo MG, Hermann K, Gärtner H, Kaltschmidt J, Ludt S, Bertsche T, Haefeli WE, Szecsenyi J. HeiCare®: ein Projekt zur Verbesserung der sektorenübergreifenden Arzneimittelkommunikation. *Deutsche medizinische Wochenschrift* 2011 Okt;136(44):2239–2244.
12. Johnson JA, Sax PE. Beginning Antiretroviral Therapy for Patients with HIV. *Infectious Disease Clinics of North America* 2014 Sep;28(3):421–438.
13. Nobakht E, Cohen SD, Rosenberg AZ, Kimmel PL. HIV-associated immune complex kidney disease. *Nature Reviews Nephrology* 2016 Jan;12:291–300.
14. Carbone A, Cesarman E, Spina M, Gloghini A, Schulz TF. HIV-associated lymphomas and gamma-herpesviruses. *Blood* 2009;113(6):1213–1224.
15. Kelesidis T, Papakonstantinou V, Detopoulou P, Fragopoulou E, Chini M, Lanzas M, Antonopoulou S. The Role of Platelet-Activating Factor in Chronic Inflammation, Immune Activation, and Comorbidities Associated with HIV Infection. *AIDS Review* 2015 Dez;17(4):191–201.
16. Navarrete-Dechent C, Ortega R, Fich F, Concha M. Manifestaciones dermatológicas asociadas a la infección por VIH/SIDA. *Revista chilena infectiología* 2015 Feb;32(1):57–71.
17. Doan J, Zakrzewski-Jakubiak H, Roy J, Turgeon J, Tannenbaum C. Prevalence and Risk of Potential Cytochrome P450-Mediated Drug-Drug Interactions in Older Hospitalized Patients with Polypharmacy. *The Annals of Pharmacotherapy* 2013;47(3):324–332.
18. Greene M, Steinman MA, McNicholl IR, Valcour V. Polypharmacy, Drug-Drug Interactions, and Potentially Inappropriate Medications in Older Adults with Human Immunodeficiency Virus Infection. *Journal of the American Geriatrics Society* 2014;62(3):447–453.
19. Gunasekaran T, Dejene N, Satyaveni VV, Dhanaraju MD. Occurrence of drug-drug interactions in Adama Referral Hospital, Adama city, Ethiopia. *Journal of Drug Assessment* 2015;4(1):19–23.
20. Graham DY, Agrawal NM, Campbell DR. Ulcer Prevention in Long-term Users of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs. *Internal Medicine* 2002 Jan;162(19):2248–9.
21. El-Serag HB, Graham DY, Richardson P, Inadomi JM. Prevention of Complicated Ulcer Disease Among Chronic Users of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs The Use of a

- Nomogram in Cost-effectiveness Analysis. *Archives of Internal Medicine* 2002 Okt;62(18):2105–2110.
22. Capone ML, Sciulli MG, Tacconelli S, Grana M, Ricciotti E, Renda G, Di Gregorio P, Mercia G. Pharmacodynamic interaction of naproxen with low-dose aspirin in healthy subjects. 2005 Apr;45(8):1295–1301.
  23. Yenny, Nafrialdi, Djoerban Z, Setiabudy R. Pharmacokinetic interaction between efavirenz and rifampicin in healthy volunteers. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics* 2011 Feb;49(2):162–168.
  24. Ancrenaz V, Déglon J, Samer C, Staub C, Dayer P, Daali Y, Desmeules J. Pharmacokinetic Interaction Between Prasugrel and Ritonavir in Healthy Volunteers. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 2013 Feb;112(2):132–137.
  25. di Masi A, Marinis ED, Ascenzi P, Marino M. Nuclear receptors CAR and PXR: Molecular, functional, and biomedical aspects. *Molecular Aspects of Medicine* 2009 Okt;30(5):297–343.
  26. Overton C. On the general osmotic properties of the cell, their probable origin, and their significance for physiology. *Vierteljahrsschrift der Naturforschenden Gesellschaft Zürich* 1899;44:88–135.
  27. Al-Awqati Q. One hundred years of membrane permeability: does Overton still rule? *Nat Cell Biol* 1999 Dez;1(8):E201–E202.
  28. Handschin C, Meyer UA. Induction of drug metabolism: the role of nuclear receptors. *Pharmacological Reviews* 2003;55(4):649 – 673.
  29. Estudante M, Morais JG, Soveral G, Benet LZ. Intestinal drug transporters: An overview. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2013 Okt;65(10):1340–1356.
  30. Shu Y. Research progress in the organic cation transporters. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban - Journal of central South University. Medical Sciences* 2011 Okt;36(10):913–26.
  31. Klinke R, Pape H-C, Silbernagl S. *Physiologie*. 5. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2005.
  32. Danø K. Active outward transport of daunomycin in resistant ehrlich ascites tumor cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1973 Okt;323(3):466–483.

33. Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1976 Nov;455(1):152–162.
34. Jones PM, George AM. The ABC transporter structure and mechanism: perspectives on recent research. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 2004 März;61(6):682–699.
35. Ueda K, Cardarelli C, Gottesman MM, Pastan I. Expression of a full-length cDNA for the human „MDR1“ gene confers resistance to colchicine, doxorubicin, and vinblastine. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1987;84(9):3004–3008.
36. Hwang T-C, Kirk KL. The CFTR Ion Channel: Gating, Regulation, and Anion Permeation [Internet]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2013;3(1) Available from: <http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/content/3/1/a009498.abstract>
37. Saurin W, Hofnung M, Dassa E. Getting In or Out: Early Segregation Between Importers and Exporters in the Evolution of ATP-Binding Cassette (ABC) Transporters. *Journal of Molecular Evolution* 1999 Jan;48(1):22–41.
38. Albermann N, Schmitz-Winnenthal FH, Z'graggen K, Volk C, Hoffmann MM, Haefeli WE, Weiss J. Expression of the drug transporters MDR1/ABCB1, MRP1/ABCC1, MRP2/ABCC2, BCRP/ABCG2, and PXR in peripheral blood mononuclear cells and their relationship with the expression in intestine and liver. *Biochemical Pharmacology* 2005 Sep;70(6):949–958.
39. Wuchter C, Leonid K, Ruppert V, Schrappe M, Buchner T, Schoch C, Haferlach T, Harbott J, Ratei R, Dorken B, Ludwig WD. Clinical significance of P-glycoprotein expression and function for response to induction chemotherapy, relapse rate and overall survival in acute leukemia. *Haematologica* 2000 Juli;85(7):711–721.
40. Marzolini C, Paus E, Buclin T, Kim RB. Polymorphisms in Human MDR1 (P-glycoprotein): Recent Advances and Clinical Relevance[ast]. *Clin Pharmacol Ther* 2004 Jan;75(1):13–33.
41. Couvelard A, Hu J, Steers G, O'Toole D, Sauvanet A, Belghiti J, Bedossa P, Gatter K, Ruszniewski P, Pezzella F. Identification of Potential Therapeutic Targets by Gene-Expression Profiling in Pancreatic Endocrine Tumors. *Gastroenterology* [date unknown];131(5):1597–1610. [zitiert 2016 Jan 26 ]
42. Riordan J, Rommens J, Kerem B, Alon N. Identification of the Cystic Fibrosis Gene: Cloning and Characterization of Complementary DNA. *Science* 1989;1066–73.

43. Paulusma CC, Kool M, Bosma PJ, Scheffer GL, ter Borg F, Scheper RJ, Tytgat GN, Borst P, Baas F, Elferink RO. A mutation in the human canalicular multispecific organic anion transporter gene causes the Dubin-Johnson syndrome. *Hepatology* 1997;25(6):1539–1542.
44. Mottino AD, Catania VA. Hepatic drug transporters and nuclear receptors: Regulation by therapeutic agents. *World Journal of Gastroenterology: WJG* 2008 Dez;14(46):7068–7074.
45. Scotto KW. Transcriptional regulation of ABC drug transporters. *Oncogene* 2003;22(47):7496–7511.
46. Wilson J, Miranda C, Knepper M. Vasopressin and the regulation of aquaporin-2. *Clinical Experimental Nephrology* 2013 Dez;17(6):751–764.
47. Mason CW, Lee GT, Dong Y, Zhou H, He L, Weiner CP. Effect of Prostaglandin E2 on Multidrug Resistance Transporters In Human Placental Cells. *Drug Metabolism and Disposition* 2014;42(12):2077–2086.
48. Ute I Schwarz, Henriette E Meyer zu Schwabedissen, Rommel G Tirona, Atsuko Suzuki, Brenda F Leake, Younes Mokrab, Kenji Mizuguchi, Richard H Ho, Richard B Kim. Identification of novel functional organic anion-transporting polypeptide 1B3 polymorphisms and assessment of substrate specificity. *Pharmacogenet Genomics* 2011 März;21(3):103–114.
49. Sirim D, Widmann M, Wagner F, Pleiss J. Prediction and analysis of the modular structure of cytochrome P450 monooxygenases. *BMC Structural Biology* 2010;10(1):34.
50. Fontana P, Senouf D, Mach F. Biological effect of increased maintenance dose of clopidogrel in cardiovascular outpatients and influence of the cytochrome P450 2C19\*2 allele on clopidogrel responsiveness. *Thrombosis Research* 2008;121(4):463–468.
51. Ohyama K, Nakajima M, Suzuki M, Shimada N, Yamazaki H, Yokoi T. Inhibitory effects of amiodarone and its N-deethylated metabolite on human cytochrome P450 activities: Prediction of in vivo drug interactions. *British Journal of Clinical Pharmacology* 2000 März;49(3):244–253.
52. Wilkinson GR, Peter Guengerich F, Branch RA. Genetic polymorphism of S-mephenytoin hydroxylation. *Pharmacology & Therapeutics* 1989;43(1):53–76.

53. Kupfer A, Branch R. Stereoselective mephobarbital hydroxylation cosegregates with mephenytoin hydroxylation. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 1985 Okt;38(4):414–418.
54. Goto S, Seo T, Murata T, Nakada N, Ueda N, Ishitsu T, Nakagawa K. Population Estimation of the Effects of Cytochrome P450 2C9 and 2C19 Polymorphisms on Phenobarbital Clearance in Japanese. *Therapeutic Drug Monitoring* 2007;29(1):118–121  
10.1097/FTD.0b013e318030def0.
55. Goldstein JA. Clinical relevance of genetic polymorphisms in the human CYP2C subfamily. *British Journal of Clinical Pharmacology* 2001;52(4):349–355.
56. Mukonzo JK, Röshammar D, Waako P, Andersson M, Fukasawa T, Milani L, Svensson JO, Ogwal-Okeng J, Gustafsson LL, Aklillu E. A novel polymorphism in ABCB1 gene, CYP2B6\*6 and sex predict single-dose efavirenz population pharmacokinetics in Ugandans. *British Journal of Clinical Pharmacology* 2009;68(5):690–699.
57. Ellis KJ, Stouffer GA, McLeod HL, Lee CR. Clopidogrel pharmacogenomics and risk of inadequate platelet inhibition: US FDA recommendations. *Pharmacogenomics* 2009 Nov;10(11):1799–1817. [zitiert 2015 Jan 11 ]
58. Wallentin L, James S, Storey RF, Armstrong M, Barratt BJ, Horrow J, Husted S, Katus H, Steg PG, Shah SH, Becker RC. Effect of CYP2C19 and ABCB1 single nucleotide polymorphisms on outcomes of treatment with ticagrelor versus clopidogrel for acute coronary syndromes: a genetic substudy of the PLATO trial. *The Lancet* 2010 Okt;376(9749):1320–1328. [zitiert 2010 Okt 22 ]
59. Prakash C, Zuniga B, Song CS, Jiang S, Cropper J, Park S, Chatterjee B. Nuclear Receptors in Drug Metabolism, Drug Response and Drug Interactions. *Nuclear receptor research* 2015;2:101178.
60. Xie W, Barwick JL, Simon CM, Pierce AM, Safe S, Blumberg B, Guzelian PS, Evans RM. Reciprocal activation of Xenobiotic response genes by nuclear receptors SXR/PXR and CAR. *Genes & Development* 2000 Dez;14(23):3014 –3023.
61. Jancova P, Anzenbacher P, Anzenbacherova E. Phase II drug metabolizing enzymes. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky Czech Repub.* 2010;154(2):103–116.
62. Wells PG, Mackenzie PI, Roy Chowdhury J, Guillemette C, Gregory PA, Ishii Y, Hansen AJ, Kessler FK, Kim PM, Roy Chowdhury N, Ritter JK. Glucuronidation and the UDP-

- Glucuronosyltransferases in health and disease. *Drug Metabolism and Disposition* 2004;32(3):281–290.
63. Kiang TKL, Ensom MHH, Chang TKH. UDP-glucuronosyltransferases and clinical drug-drug interactions. *Pharmacology & Therapeutics* 2005 Apr;106(1):97–132.
64. Xu Y, Yang X, Wang Z, Li M, Ning Y, Chen S, Yin L, Li X. Estrogen sulfotransferase (SULT1E1) regulates inflammatory response and lipid metabolism of human endothelial cells via PPAR $\gamma$ . *Molecular and Cellular Endocrinology* 2013 Apr;369(1–2):140–149.
65. Kalthoff S, Ehmer U, Freiberg N, Manns MP, Strassburg CP. Coffee Induces Expression of Glucuronosyltransferases by the Aryl Hydrocarbon Receptor and Nrf2 in Liver and Stomach. *Gastroenterology* 2010 Nov;139(5):1699–1710.e2. [zitiert 2015 Okt 5 ]
66. Bunce C, SpringerLink (Online service). Nuclear receptors current concepts and future challenges. Dordrecht, Heidelberg London New York: Springer; 2010.
67. Berrabah W, Aumercier P, Lefebvre P, Staels B. Control of nuclear receptor activities in metabolism by post-translational modifications. Turin Special Issue: Biochemistry for Tomorrow's Medicine (FEBS Letters) 2011 Juni;585(11):1640–1650.
68. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM. The nuclear receptor superfamily: The second decade. *Cell* 1995 Dez;83(6):835–839.
69. Ranhotra HS. The NR4A orphan nuclear receptors: mediators in metabolism and diseases. *Journal of Receptors and Signal Transduction* 2015 März;35(2):184–188.
70. Gao J, Xie W. Pregnane X Receptor and Constitutive Androstane Receptor at the Crossroads of Drug Metabolism and Energy Metabolism. *Drug Metabolism and Disposition* 2010;38(12):2091–2095.
71. Niu G, Lu L, Gan J, Zhang D, Liu J, Huang G. Chapter Seven - Dual Roles of Orphan Nuclear Receptor TR3/Nur77/NGFI-B in Mediating Cell Survival and Apoptosis. In: Kwang WJ, herausgeber. *International Review of Cell and Molecular Biology*. Elsevier Verlag; 2014 p. 219–258.
72. Garattini E, Bolis M, Gianni' M, Paroni G, Fratelli M, Terao M. Lipid-sensors, enigmatic-orphan and orphan nuclear receptors as therapeutic targets in breast-cancer. *Oncotarget* 2016;7(27):42661–42682.



73. Stoner MA, Auerbach SS, Zamule SM, Strom SC, Omiecinski CJ. Transactivation of a DR-1 PPRE by a human constitutive androstane receptor variant expressed from internal protein translation start sites. *Nucleic Acids Research* 2007;35(7):2177–2190.
74. Handschin C, Meyer UA. Regulatory network of lipid-sensing nuclear receptors: roles for CAR, PXR, LXR, and FXR. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2005 Jan;433(2):387–396.
75. Urquhard BL, Tirona RG, Kim RB. Nuclear receptors and the regulation of drug-metabolizing enzymes and drug transporters: implications for interindividual variability in response to drugs. *The Journal of Clinical Pharmacology* 2007;47:566–78.
76. Hollenberg SM, Weinberger C, Ong ES, Cerelli G, Oro A, Lebo R, Brad Thompson E, Rosenfeld MG, Evans RM. Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature* 1985 Dez;318(6047):635–641.
77. Aranda A, Pascual A. Nuclear Hormone Receptors and Gene Expression. *Physiological Reviews* 2001;81(3):1269–1304.
78. A Unified Nomenclature System for the Nuclear Receptor Superfamily. *Cell* 1999 Apr;97(2):161–163.
79. Jones SA, Moore LB, Shenk JL, Wisely GB, Hamilton GA, McKee DD, Tomkinson NCO, LeCluyse EL, Lambert MH, Willson TM, Kliewer SA, Moore JT. The Pregnane X Receptor: A Promiscuous Xenobiotic Receptor That Has Diverged during Evolution. *Molecular Endocrinology* 2000 Jan;14(1):27–39.
80. Maglich J, Sluder A, Guan X, Shi Y, McKee D, Carrick K, Kamdar K, Willson T, Moore J. Comparison of complete nuclear receptor sets from the human, *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila* genomes. *Genome Biology* 2001;2(8):research0029.1 – research0029.7.
81. LeCluyse EL. Pregnane X receptor: molecular basis for species differences in CYP3A induction by xenobiotics. *Chemico-Biological Interactions* 2001 Mai;134(3):283–289.
82. Pascussi JM, Dvorák Z, Gerbal-Chaloin S, Assenat E, Maurel P, Vilarem MJ. Pathophysiological Factors Affecting CAR Gene Expression. *Drug Metabolism Reviews* 2003;35(4):255–268.
83. Kanno Y, Inouye Y. Mechanism for subcellular localization of nuclear receptor CAR. *YAKUGAKU ZASSHI* 2011;131(3):359–365.

84. Moreau A, Vilarem MJ, Maurel P, Pascussi JM. Xenoreceptors CAR and PXR Activation and Consequences on Lipid Metabolism, Glucose Homeostasis, and Inflammatory Response. *Molecular Pharmaceutics* 2008 Feb;5(1):35–41.
85. Baes M, Gulick T, Choi HS, Martinoli MG, Simha D, Moore DD. A new orphan member of the nuclear hormone receptor superfamily that interacts with a subset of retinoic acid response elements. *Mol Cell Biol* 1994;14:1544–1552.
86. Blumberg B, Sabbagh W, Juguilon H, Bolado J, van Meter CM, Ong ES, Evans RM. SXR, a novel steroid and xenobioticsensing nuclear receptor. *Genes & Development* 1998;12(20):3195–3205.
87. Kliewer SA, Moore JT, Wade L, Staudinger JL, Watson MA, Jones SA, McKee DD, Oliver BB, Willson TM, Zetterström RH, Perlmann T, Lehmann JM. An Orphan Nuclear Receptor Activated by Pregnanes Defines a Novel Steroid Signaling Pathway. *Cell* 1998 Jan;92(1):73–82.
88. Konno Y, Negishi M, Kodama S. The roles of nuclear receptors CAR and PXR in hepatic energy metabolism. *Drug Metab Pharmacokinet* 2008;23:8–13.
89. Rezen T, Rozman D, Pascussi J-M, Monostory K. Interplay between cholesterol and drug metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics* 2011 Jan;1814(1):146–160.
90. Krasowski MD, Ni A, Hagey LR, Ekins S. Evolution of promiscuous nuclear hormone receptors: LXR, FXR, VDR, PXR, and CAR. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2011 März;334(1-2):39–48.
91. Bagamasbad P, Denver RJ. Mechanisms and significance of nuclear receptor auto- and cross-regulation. *General and Comparative Endocrinology* 2011 Jan;170(1):3–17.
92. Rudraiah S, Zhang X, Wang L. Nuclear Receptors as Therapeutic Targets in Liver Disease: Are We There Yet? *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 2016;56(1):605–626.
93. Windshügel B, Jynkkäinen J, Poso A, Honkakoski P, Sippl W. Molecular dynamics simulations of the human CAR ligand-binding domain: deciphering the molecular basis for constitutive activity. 2005 Dez;11(1):69–79.

94. Tzamelis I, Pissios P, Schuetz EG, Moore DD. The Xenobiotic Compound 1,4-Bis[2-(3,5-Dichloropyridyloxy)]Benzene Is an Agonist Ligand for the Nuclear Receptor CAR. *Molecular and Cellular Biology* 2000;20(9):2951–2958.
95. Zelko I, Negishi M. Phenobarbital-Elicited Activation of Nuclear Receptor CAR in Induction of Cytochrome P450 Genes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2000;277(1):1–6.
96. Sueyoshi T, Negishi M. Phenobarbital Response elements of cytochrome P450 genes and nuclear receptors. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 2001;41(1):123–143.
97. Maglich JM, Parks DJ, Moore LB, Collins JL, Goodwin B, Billin AN, Stoltz CA, Kliewer SA, Lambert MH, Willson TM, Moore JT. Identification of a Novel Human Constitutive Androstane Receptor (CAR) Agonist and Its Use in the Identification of CAR Target Genes. *Journal of Biological Chemistry* 2003;278(19):17277–17283.
98. Faucette SR, Zhang T-C, Moore R, Sueyoshi T, Omiecinski CJ, LeCluyse EL, Negishi M, Wang H. Relative Activation of Human Pregnane X Receptor versus Constitutive Androstane Receptor Defines Distinct Classes of CYP2B6 and CYP3A4 Inducers. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2007;320(1):72–80.
99. Moore LB, Parks DJ, Jones SA, Bledsoe RK, Consler TG, Stimmel JB, Goodwin B, Liddle C, Blanchard SG, Willson TM, Collins JL, Kliewer SA. Orphan Nuclear Receptors Constitutive Androstane Receptor and Pregnane X Receptor Share Xenobiotic and Steroid Ligands. *Journal of Biological Chemistry* 2000;275(20):15122–15127.
100. Honkakoski P, Negishi M. Regulation of cytochrome P450 (CYP) genes by nuclear receptors. *Biochem. J.* 2000;347(2):321–337.
101. Ngan C-H, Beglov D, Rudnitskaya AN, Kozakov D, Waxman DJ, Vajda S. The Structural Basis of Pregnane X Receptor Binding Promiscuity. *Biochemistry* 2009;48(48):11572–11581.
102. Lim Y-P, Huang J-D. Interplay of Pregnane X receptor with Other Nuclear Receptors on Gene Regulation. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 2008;23(1):14–21.
103. Martin P, Riley R, Back DJ, Owen A. Comparison of the induction profile for drug disposition proteins by typical nuclear receptor activators in human hepatic and intestinal cells. *British Journal of Pharmacology* 2008;153(4):805–819.

104. Kawamoto T, Sueyoshi T, Zelko I, Moore R, Washburn K, Negishi M. Phenobarbital-Responsive Nuclear Translocation of the Receptor CAR in Induction of the CYP2B Gene. *Molecular and Cellular Biology* 1999;19(9):6318–6322.
105. Moore JT, Moore LB, Maglich JM, Kliewer SA. Functional and structural comparison of PXR and CAR. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 2003 Feb;1619(3):235–238.
106. Fromm M. *Drug Transporters*. 1. Aufl. Berlin: Springer Berlin; 2010.
107. Lazar MA. East meets West: an herbal tea finds a receptor. *The Journal of Clinical Investigation* 2004 Jan;113(1):23–25.
108. Asghar A, Gorski JC, Haehner-Daniels B, Hall SD. Induction of Multidrug Resistance-1 and Cytochrome P450 mRNAs in Human Mononuclear Cells by Rifampin. *Drug Metabolism and Disposition* 2002;30(1):20–26.
109. Shubber Z, Calmy A, Andrieux-Meyer I, Vitoria M, Renaud-Thery F, Shaffer N, Hargreaves S, Mills EJ, Ford N. Adverse events associated with nevirapine and efavirenz-based first-line antiretroviral therapy: a systematic review and meta-analysis. *AIDS* 2013 Juni;27(9):1403–1412.
110. Stein JH, Komarow L, Cotter BR, Currier JS, Dubé MP, Fichtenbaum CJ, Gerschenson M, Mitchell CKC, Murphy RL, Squires K, Parker RA, Torriani FJ. Lipoprotein changes in HIV-infected antiretroviral-naïve individuals after starting antiretroviral therapy: ACTG Study A5152s. *Journal of Clinical Lipidology* 2008 Dez;2(6):464–471.
111. Tohyama J, Billheimer JT, Fuki IV, Rothblat GH, Rader DJ, Millar JS. Effects of nevirapine and efavirenz on HDL cholesterol levels and reverse cholesterol transport in mice. *Atherosclerosis* 2009 Juni;204(2):418–423.
112. McComsey G, Bhumbra N, Ma J-F, Rathore M, Alvarez A. Impact of Protease Inhibitor Substitution With Efavirenz in HIV-Infected Children: Results of the First Pediatric Switch Study. *Pediatrics* 2003;111(3):e275–e281.
113. Ward BA, Gorski JC, Jones DR, Hall SD, Flockhart DA, Desta Z. The Cytochrome P450 2B6 (CYP2B6) Is the Main Catalyst of Efavirenz Primary and Secondary Metabolism: Implication for HIV/AIDS Therapy and Utility of Efavirenz as a Substrate Marker of CYP2B6 Catalytic Activity. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2003;306(1):287–300.

114. Bae SK, Jeong Y-J, Lee C, Liu K-H. Identification of human UGT isoforms responsible for glucuronidation of efavirenz and its three hydroxy metabolites. *Xenobiotica* 2011;41(6):437–444.
115. Berruet N, Sentenac S, Auchere D, Gimenez F, Farinotti R, Fernandez C. Effect of efavirenz on intestinal p-glycoprotein and hepatic p450 function in rats. *J Pharm Pharm Sci* 2005;8(2):226–234.
116. Oswald S, Meyer zu Schwabedissen HE, Nassif A, Modess C, Desta Z, Ogburn ET, Mostertz J, Keiser M, Jia J, Hubeny A, Ulrich A, Runge D, Marinova M, Lutjohann D, Kroemer HK, Siegmund W. Impact of Efavirenz on Intestinal Metabolism and Transport: Insights From an Interaction Study With Ezetimibe in Healthy Volunteers. *Clin Pharmacol Ther* 2012 März;91(3):506–513.
117. Leung JM, O'Brien JG, Wong HK, Winslow DL. Efavirenz-Induced Hypersensitivity Reaction Manifesting in Rash and Hepatitis in a Latino Male. *The Annals of Pharmacotherapy* 2008;42(3):425–429.
118. Fichtenbaum CJ, Gerber JG. Interactions Between Antiretroviral Drugs and Drugs Used for the Therapy of the Metabolic Complications Encountered During HIV Infection. *Clin Pharmacokinet.* 2012;41(14):1195–1211.
119. Weinglass AB, Kohler M, Schulte U, Liu J, Nketiah EO, Thomas A, Schmalhofer W, Williams B, Bildl W, McMasters DR, Dai K, Beers L, McCann ME, Kaczorowski GJ, Garcia ML. Extracellular loop C of NPC1L1 is important for binding to ezetimibe. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2008;105(32):11140 –11145.
120. Scholz H, Schwabe U. Taschenbuch der Arzneibehandlung: angewandte Pharmakologie. 13., überarb. und aktualisierte Aufl. Berlin: Springer; 2005.
121. Knopp RH, Gitter H, Truitt T, Bays H, Manion CV, Lipka LJ, LeBeaut AP, Suresh R, Yang B, Veltri EP. Effects of ezetimibe, a new cholesterol absorption inhibitor, on plasma lipids in patients with primary hypercholesterolemia. *European Heart Journal* 2003 Apr;24(8):729 –741.
122. Tenenbaum A, Klempfner R, Fisman EZ. Hypertriglyceridemia: a too long unfairly neglected major cardiovascular risk factor. *Cardiovasc Diabetol* 2014;13(1)
123. Chauvin B, Drouot S, Barrail-Tran A, Taburet A-M. Drug–Drug Interactions Between HMG-CoA Reductase Inhibitors (Statins) and Antiviral Protease Inhibitors. *Clinical Pharmacokinetics* 2013 Okt;52(10):825–831.

124. Garcia-Calvo M, Lisnock J, Bull HG, Hawes BE, Burnett DA, Braun MP, Crona JH, Davis HR, Dean DC, Detmers PA, Graziano MP, Hughes M, MacIntyre DE, Ogawa A, O'Neill KA, Iyer SPN, Shevell DE, Smith MM, Tang YS, Makarewicz AM, Ujjainwalla F, Altmann SW, Chapman KT, Thornberry NA. The target of ezetimibe is Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005;102(23):8132–8137.
125. Oswald S, Nassif A, Modess C, Keiser M, Hanke U, Engel A, Lutjohann D, Weitschies W, Siegmund W. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Interactions Between the Immunosuppressant Sirolimus and the Lipid-Lowering Drug Ezetimibe in Healthy Volunteers. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 2010 Juni;87(6):663–667.
126. Oswald S, Haenisch S, Fricke C, Sudhop T, Remmler C, Giessmann T, Jedlitschky G, Adam U, Dazert E, Warzok R, Wacke W, Cascorbi I, Kroemer HK, Weitschies W, von Bergmann K, Siegmund W. Intestinal expression of P-glycoprotein (ABCB1), multidrug resistance associated protein 2 (ABCC2), and uridine diphosphate-glucuronosyltransferase 1A1 predicts the disposition and modulates the effects of the cholesterol absorption inhibitor ezetimibe in humans. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 2006 Feb;79(3):206–217.
127. Patrick JE, Kosoglou T, Stauber KL, Alton KB, Maxwell SE, Zhu Y, Statkevich P, Iannucci R, Chowdhury S, Affrime M, Cayen MN. Disposition of the Selective Cholesterol Absorption Inhibitor Ezetimibe in Healthy Male Subjects. *Drug Metabolism and Disposition* 2002 Apr;30(4):430–437.
128. Keller RP, Neville MC. Determination of total protein in human milk: comparison of methods. *Clinical Chemistry* 1986 Jan;32(1):120–123.
129. Renart J, Reiser J, Stark GR. Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1979;76(7):3116–3120.
130. Wong H, Anderson WD, Cheng T, Riabowol KT. Monitoring mRNA Expression by Polymerase Chain Reaction: The „Primer-Dropping“ Method. *Analytical Biochemistry* 1994 Dez;223(2):251–258.
131. Schmittgen T, Livak K. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 2008;3(6):1101–8.

132. Meyer zu Schwabedissen HE, Oswald S, Bresser C, Nassif A, Modess C, Desta Z, Ogburn ET, Marinova M, Lutjohann D, Spielhagen C, Nauck M, Kroemer HK, Siegmund W. Compartment-Specific Gene Regulation of the CAR Inducer Efavirenz In Vivo. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 2012 Juli;92(1):103–111.
133. Habtewold A, Amogne W, Makonnen E, Yimer G, Riedel K-D, Ueda N, Worku A, Haefeli WE, Lindquist L, Aderaye G, Burhenne J, Aklillu E. Long-term effect of efavirenz autoinduction on plasma/peripheral blood mononuclear cell drug exposure and CD4 count is influenced by UGT2B7 and CYP2B6 genotypes among HIV patients. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2011;66(10):2350–2361.
134. Fogh J, Wright WC, Loveless JD. Absence of HeLa Cell Contamination in 169 Cell Lines Derived From Human Tumors. *Journal of the National Cancer Institute* 1976;58(2):209–214.
135. Hidalgo IJ, Raub TJ, Borchardt RT. Characterization of the Human Colon Carcinoma Cell Line (Caco-2) as a Model System for Intestinal Epithelial Permeability. *Gastroenterology* 1989;96:736–749.
136. Arnold KA, Eichelbaum M, Burk O. Alternative splicing affects the function and tissue-specific expression of the human constitutive androstane receptor. *Nuclear Receptor* 2004;2:1–1.
137. Zhu M, Kaul S, Nandy P, Grasela DM, Pfister M. Model-Based Approach To Characterize Efavirenz Autoinduction and Concurrent Enzyme Induction with Carbamazepine. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2009 Juni;53(6):2346–2353.
138. Avery LB, Zarr MA, Bakshi RP, Siliciano RF, Hendrix CW. Increasing Extracellular Protein Concentration Reduces Intracellular Antiretroviral Drug Concentration and Antiviral Effect. *AIDS Research Human Retroviruses* 2013 Nov;29(11):1434–14421.
139. Marzolini C, Telenti A, Decosterd LA, Greub G, Biollaz J, Buclin T. Efavirenz plasma levels can predict treatment failure and central nervous system side effects in HIV-1-infected patients. *AIDS* 2001;15(1):71–75.
140. Peroni RN, Di Gennaro SS, Hocht C, Chiappetta DA, Rubio MC, Sosnik A, Bramuglia GF. Efavirenz is a substrate and in turn modulates the expression of the efflux transporter ABCG2/BCRP in the gastrointestinal tract of the rat. *Biochemical Pharmacology* 2011 Nov;82(9):1227–1233.

141. Chen X, Maiti S, Zhang J, Chen G. Nuclear receptor interactions in methotrexate induction of human dehydroepiandrosterone sulfotransferase (hSULT2A1). *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 2006;20(6):309–317.
142. Störmer E, von Moltke LL, Perloff MD, Greenblatt DJ. Differential Modulation of P-Glycoprotein Expression and Activity by Non-Nucleoside HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitors in Cell Culture. *Pharmaceutical Research* 2002 Juli;19:1038–1045.
143. Weiss J, Herzog M, König S, Storch C, Ketabi-Kiyanvash N, Haefeli W. Induction of Multiple Drug Transporters by Efavirenz. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2009 Feb;109:242–50.
144. Ledda M, Lazzari CD, Lisi A, Fresiello L. The role of extracellular conditions during CaCo-2 cells growth: a preliminary study for numerical model validation. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 2011;61–70.
145. Hayeshi R, Hilgendorf C, Artursson P, Augustijns P, Brodin B, Dehertogh P, Fisher K, Fossati L, Hovenkamp E, Korjamo T, Masungi C, Maubon N, Mols R, Müllertz A, Mönkkönen J, O'Driscoll C, Oppers-Tiemissen HM, Ragnarsson EGE, Rooseboom M, Ungell A-L. Comparison of drug transporter gene expression and functionality in Caco-2 cells from 10 different laboratories. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2008 Dez;35(5):383–396.
146. Taipalensuu J, Törnblom H, Lindberg G, Einarsson C, Sjöqvist F, Melhus H, Garberg P, Sjöström B, Lundgren B, Artursson P. Correlation of Gene Expression of Ten Drug Efflux Proteins of the ATP-Binding Cassette Transporter Family in Normal Human Jejunum and in Human Intestinal Epithelial Caco-2 Cell Monolayers. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2001;299(1):164–170.
147. Sambuy Y, De Angelis I, Ranaldi G, Scarino M, Stamatii A, Zucco F. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biol Toxicol* 2005;21 (1):1–26.
148. Sun H, Chow EC, Liu S, Du Y, Pang KS. The Caco-2 cell monolayer: usefulness and limitations. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 2008;4(4):395–411.
149. Nollevaux G, Deville C, El Moulaj B, Zorzi W, Deloyer P, Schneider Y-J, Peulen O, Dandrifosse G. Development of a serum-free co-culture of human intestinal epithelium cell-lines (Caco-2/HT29-5M21). *BMC Cell Biology* 2006;7(1):20.



150. Takenaka T, Harada N, Kuze J, Chiba M, Iwao T, Matsunaga T. Human Small Intestinal Epithelial Cells Differentiated from Adult Intestinal Stem Cells as a Novel System for Predicting Oral Drug Absorption in Humans. *Drug Metabolism and Disposition* 2014;42(11):1947–1954.
151. Ingels FM, Augustijns PF. Biological, pharmaceutical, and analytical considerations with respect to the transport media used in the absorption screening system, Caco-2. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2003;92(8):1545–1558.
152. Lennernäs H, Palm K, Fagerholm U, Artursson P. Comparison between active and passive drug transport in human intestinal epithelial (caco-2) cells in vitro and human jejunum in vivo. *International Journal of Pharmaceutics* 1996 Jan;127(1):103–107.
153. Englund G, Rorsman F, Rönnblom A, Karlbom U, Lazorova L, Gråsjö J, Kindmark A, Artursson P. Regional levels of drug transporters along the human intestinal tract: Co-expression of ABC and SLC transporters and comparison with Caco-2 cells. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2006 Nov;29(3–4):269–277.
154. Sharma D, Lau AJ, Sherman MA, Chang TKH. Agonism of human pregnane X receptor by rilpivirine and etravirine: Comparison with first generation non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Biochemical Pharmacology* 2013 Juni;85(11):1700–1711.
155. Manceau S, Giraud C, Declèves X, Batteux F, Chouzenoux S, Tang R, Dauchy S, Scherrmann JM, Weill B, Morini JP, Perrot JY, Tréluyer JM. Lack of P-glycoprotein induction by rifampicin and phenobarbital in human lymphocytes. *International Journal of Pharmaceutics* 2010 Aug;395(1-2):98–103.
156. Schote AB, Turner JD, Schiltz J, Muller CP. Nuclear receptors in human immune cells: Expression and correlations. *Molecular Immunology* 2007 Feb;44(6):1436–1445.
157. Ghosal A, Hapangama N, Yuan Y, Achanfuo-Yeboah J, Iannucci R, Chowdhury S, Alton K, Patrick JE, Zbaida S. Identification of human UDP-Glucuronosyltransferase enzyme(s) responsible for the Glucuronidation of Ezetimibe (ZETIA). *Drug Metabolism and Disposition* 2004;32(3):314–320.
158. Bélanger A-S, Caron P, Harvey M, Zimmerman PA, Mehlotra RK, Guillemette C. Glucuronidation of the Antiretroviral Drug Efavirenz by UGT2B7 and an in Vitro Investigation of Drug-Drug Interaction with Zidovudine. *Drug Metabolism and Disposition* 2009;37(9):1793–1796.

159. Chandler B, Almond L, Ford J, Owen A, Hoggard PG, Khoo SH, Back D. The Effects of Protease Inhibitors and Nonnucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors on P-Glycoprotein Expression in Peripheral Blood Mononuclear Cells In Vitro. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 2003;33(5):551–556.
160. Burhenne J, Matthée A-K, Pasáková I, Röder C, Heinrich T, Haefeli WE, Mikus G, Weiss J. No Evidence for Induction of ABC Transporters in Peripheral Blood Mononuclear Cells in Humans after 14 Days of Efavirenz Treatment. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2010 Okt;54(10):4185–4191.
161. Siest G, Jeannesson E, Marteau J-B, Samara A, Marie B, Pfister M, Visvikis-Siest S. Transcription Factor and Drug-Metabolizing Enzyme Gene Expression in Lymphocytes from Healthy Human Subjects. *Drug Metabolism and Disposition* 2008;36(1):182–189.
162. Owen A, Goldring C, Morgan P, Park BK, Pirmohamed M. Induction of P-glycoprotein in lymphocytes by carbamazepine and rifampicin: the role of nuclear hormone response elements. *British Journal of Clinical Pharmacology* 2006;62(2):237–242.
163. Sempoux C, Stärkel P, Stevens M, Van Den Berge V, Horsmans Y. Cytochrome P450 3A proteins are expressed in B lymphocytes but not in T lymphocytes. *Pharmacogenetics* 1999;9(2):263–266.
164. Hagenbuch B, Gui C. Xenobiotic transporters of the human organic anion transporting polypeptides (OATP) family. *Xenobiotica* 2008;38(7-8):778–801.
165. Janneh O, Jones E, Chandler B, Owen A, Khoo SH. Inhibition of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated proteins modulates the intracellular concentration of lopinavir in cultured CD4 T cells and primary human lymphocytes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2007;60(5):987–993.
166. Ji H, Lee H, Lim S, Kim J, Lee H. Effect of Efavirenz on UDP-Glucuronosyltransferase 1A1, 1A4, 1A6, and 1A9 Activities in Human Liver Microsomes. *Molecules* 2012;17(1):851–860.
167. Mouly S, Lown KS, Kornhauser D, Joseph JL, Fiske WD, Benedek IH, Watkins PB. Hepatic but not intestinal CYP3A4 displays dose-dependent induction by efavirenz in humans. *Clinical Pharmacology* 2002;72:1–9.
168. De Angelis RW, Maluf NK, Yang Q, Lambert JR, Bain DL. Glucocorticoid Receptor–DNA Dissociation Kinetics Measured in Vitro Reveal Exchange on the Second Time Scale. *Biochemistry* 2015 Sep;54(34):5306–5314.

169. Kharaschi ED, Campbell S, Stubbert K, Crafford A, London A, Kim T, Whittington D, Ensign D, Hoffer C, Sheffels Bedynek P. Mechanism of efavirenz influence on methadone pharmacokinetics and pharmacodynamics II: Hepatic and intestinal CYP2B6, CYP3A and transporter activities. *Clin Pharmacol Ther* 2012;91(4):673–684.
170. Iwanaga K, Honjo T, Miyazaki M, Kakemi M. Time-dependent changes in hepatic and intestinal induction of cytochrome P450 3A after administration of dexamethasone to rats. *Xenobiotica* 2013;43(9):765–773.
171. Kaminsky LS, Zhang Q-Y. The small intestine as a xenobiotic - metabolizing organ. *Drug Metabolism and Disposition* 2003;31(12):1520–1525.
172. Won CS, Oberlies NH, Paine MF. Influence of Dietary Substances on Intestinal Drug Metabolism and Transport. *Current Drug Metabolism* 2010 Nov;11(9):778–792.
173. Flint HJ, Scott KP, Duncan PL, Duncan SH. The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* 2012 Sep;9(10):577–589.
174. Strassburg CP, Kneip S, Topp J, Obermayer-Straub P, Barut A, Tukey RH, Manns MP. Polymorphic Gene Regulation and Interindividual Variation of UDP-glucuronosyltransferase Activity in Human Small Intestine. *Journal of Biological Chemistry* 2000;275(46):36164–36171.
175. Paine MF, Khalighi M, Fisher JM, Shen DD, Kunze KL, Marsh CL, Perkins JD, Thummel KE. Characterization of Interintestinal and Intraintestinal Variations in Human CYP3A-Dependent Metabolism. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1997;283(3):1552–1562.
176. Viera A, Fontes D, Chaves L, Alves L, de Freitas Neto J, de La Roca Soares M, Soares-Sobrinho J, Rolim L, Rolim-Neto P. Multicomponent systems with cyclodextrins and hydrophilic polymers for the delivery of Efavirenz. *Carbohydrate Polymers* 2015 Okt;130:133–140.
177. Fearn RA, Hirst BH. Predicting oral drug absorption and hepatobiliary clearance: Human intestinal and hepatic in vitro cell models. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2006 Feb;21(2):168–178.
178. Tocchetti G, Rigalli J, Arana M, Villanueva S, Mottino A. Modulation of expression and activity of intestinal multidrug resistance-associated protein 2 by xenobiotics. *Toxicology and Applied Pharmacol.* 2016 Juli;303:45–57.

179. Simon C, Stieger B, Kullak-Ublick GA, Fried M, Mueller S, Fritschy J-M, Wieser HG, Pauli-Magnus C. Intestinal expression of cytochrome P450 enzymes and ABC transporters and carbamazepine and phenytoin disposition. *Acta Neurologica Scandinavica* 2007;115(4):232–242.
180. Giessmann T, May K, Modess C, Wegner D, Hecker U, Zschiesche M, Dazert P, Grube M, Schroeder E, Warzok R, Cascorbi I, Kroemer HK, Siegmund W. Carbamazepine regulates intestinal P-glycoprotein and multidrug resistance protein MRP2 and influences disposition of talinolol in humans[ast]. *Clin Pharmacol Ther* 2004 Sep;76(3):192–200.
181. Oswald S, Nassif A, Modess C, Keiser M, Ulrich A, Runge D, Hanke U, Lütjohann D, Engel A, Weitschies W, Siegmund W. Drug interactions between the Immunosuppressant Tacrolimus and the cholesterol absorption inhibitor ezetimibe in healthy volunteers. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 2011 Apr;89(4):524–528.
182. Nishimura M, Naito S, Yoko T. Tissue-specific mRNA Expression Profiles of Human Nuclear Receptor Subfamilies. *Drug Metab Pharmacokinet* 2004;(19 (2)):135–49.
183. Waxman DJ. P450 Gene Induction by Structurally Diverse Xenochemicals: Central Role of Nuclear Receptors CAR, PXR, and PPAR. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1999 Sep;369(1):11–23.
184. Kolars JC, Schmiedlin-Ren P, Schuetz JD, Fang C, Watkins PB. Identification of rifampin-inducible P450III A4 (CYP3A4) in human small bowel enterocytes. *The Journal of Clinical Investigation* 1992 Nov;90(5):1871–1878.
185. Hariparsad N, Nallani SC, Sane RS, Buckley DJ, Buckley AR, Desai PB. Induction of CYP3A4 by Efavirenz in Primary Human Hepatocytes: Comparison With Rifampin and Phenobarbital. *The Journal of Clinical Pharmacology* 2004;44(11):1273–1281.
186. Metzger IF, Quigg TC, Epstein N, Aregbe AO, Thong N, Callaghan JT, Flockhart DA, Nguyen AT, Stevens CK, Gupta SK, Desta Z. Substantial Effect of Efavirenz Monotherapy on Bilirubin Levels in Healthy Volunteers. *Current Therapeutic Research* 2014 Dez;76(0):64–69.
187. Lee L, Pham P, Flexner C. Unexpected Drug-Drug Interactions in Human Immunodeficiency Virus (HIV) Therapy: Induction of UGT1A1 and Bile Efflux Transporters by Efavirenz. *Annals Academy of Medicine Singapore* 2012 Dez;41:559–62.

188. Ngaimisi E, Mugusi S, Minzi OM, Sasi P, Riedel K-D, Suda A, Ueda N, Janabi M, Mugusi F, Haefeli WE, Burhenne J, Aklillu E. Long-Term Efavirenz Autoinduction and Its Effect on Plasma Exposure in HIV Patients. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 2010 Nov;88(5):676–684.
189. Matteeli A, Regazzi M, Villani P. Multiple-Dose Pharmacokinetics of Efavirenz with and without the Use of Rifampicin in HIV-Positive Patients | BenthamScience. *Current HIV Research* 2007 Mai;5(3):349–353.
190. Gerber JG, Rosenkranz SL, Fichtenbaum CJ, Vega JM, Yang A, Alston BL, Brobst SW, Segal Y, Aberg JA, Team for the ACTGA. Effect of Efavirenz on the Pharmacokinetics of Simvastatin, Atorvastatin, and Pravastatin: Results of AIDS Clinical Trials Group 5108 Study. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 2005;39(3):307–312.
191. Hukkanen J, Hakkola J, Anttila S, Piipari R, Karjalainen A, Pelkonen O, Raunio H. Detection of mRNA encoding xenobiotic-metabolizing cytochrome P450s in human bronchoalveolar macrophages and peripheral blood lymphocytes. *Molecular Carcinogenesis* 1997;20(2):224–230.
192. Raucy JL, Schultz ED, Wester MR, Arora S, Johnston DE, Omdahl JL, Carpenter SP. Human Lymphocyte Cytochrome P450 2E1, a Putative Marker for Alcohol-Mediated Changes in Hepatic Chlorzoxazone Activity. *Drug Metabolism and Disposition* 1997;25(12):1429–1435.
193. Zhang J, LiHong Y, Liang G, Liu R, Fan K, Pu Y. Detection of CYP2E1, a Genetic Biomarker of Susceptibility to Benzene Metabolism Toxicity in Immortal Human Lymphocytes Derived from the Han Chinese Population. *Biomedical and Environmental Sciences* 2011;24(3):300–309.
194. Savkur RS, Wu Y, Bramlett KS, Wang M, Yao S, Perkins D, Totten M, Searfoss G, Ryan TP, Su EW, Burris TP. Alternative splicing within the ligand binding domain of the human constitutive androstane receptor. *Molecular Genetics and Metabolism* 2003;80(1-2):216 – 226.
195. Lamba J, Lamba V, Schuetz E. Genetic Variants of PXR (NR1I2) and CAR (NR1I3) and Their Implications in Drug Metabolism and Pharmacogenetics. *Current Drug Metabolism* 2005 Aug;6(4):369–83.

196. Gandhi M, Greenblatt RM, Bacchetti P, Jin C, Huang Y, Anastos K, Cohen M, DeHovitz JA, Sharp GB, Gange SJ, Liu C, Hanson SC, Aouizerat B, Study for the WIH. A Single-Nucleotide Polymorphism in CYP2B6 Leads to >3-Fold Increases in Efavirenz Concentrations in Plasma and Hair Among HIV-Infected Women. *Journal of Infectious Diseases* 2012;206(9):1453–1461.
197. Kwara A, Lartey M, Sagoe KW, Kenu E, Court MH. CYP2B6, CYP2A6 and UGT2B7 genetic polymorphisms are predictors of efavirenz mid-dose concentration in HIV-infected patients. *AIDS* 2009;23(16):2101–2106.
198. Uttayamakul S, Likanonsakul S, Manosuthi W, Wichukchinda N, Kalambaheti T, Nakayama EE, Shioda T, Khusmith S. Effects of CYP2B6 G516T polymorphisms on plasma efavirenz and nevirapine levels when co-administered with rifampicin in HIV/TB co-infected Thai adults. *AIDS Research and Therapy* 2010;7(1):8.
199. Löffler G. *Biochemie und Pathobiochemie: mit 192 Tabellen*. 8., vollst. neu bearb. Aufl. Heidelberg: Springer; 2007.
200. Chen J, Zhao K-N, Chen C. The role of CYP3A4 in the biotransformation of bile acids and therapeutic implication for cholestasis. *Annals of Translational Medicine* 2013;2(1):7.
201. Choi S-Y, Koh KH, Jeong H. Isoform-Specific Regulation of Cytochromes P450 Expression by Estradiol and Progesterone. *Drug Metabolism and Disposition* 2013 Feb;41(2):263–269.
202. Yueh M-F, Li T, Evans RM, Hammock B, Tukey RH. Triclocarban Mediates Induction of Xenobiotic Metabolism through Activation of the Constitutive Androstane Receptor and the Estrogen Receptor Alpha. *Vasu D. Appanna, Laurentian University, Canada* 2012;
203. Schebb NH, Inceoglu B, Ahn KC, Morisseau C, Gee SJ, Hammock BD. Investigation of Human Exposure to Triclocarban after Showering and Preliminary Evaluation of Its Biological Effects. *Environmental Science & Technology* 2011 März;45(7):3109–3115. [zitiert 2013 Feb 19 ]
204. Miller TR, Colquhoun DR, Halden RU. Identification of wastewater bacteria involved in the degradation of triclocarban and its non-chlorinated congener. *Journal of Hazardous Materials* 2010 Nov;183(1–3):766–772.
205. Sugatani J, Nishitani S, Yamakawa K, Yoshinari K, Sueyoshi T, Negishi M, Miwa M. Transcriptional Regulation of Human UGT1A1 Gene Expression: Activated Glucocorticoid Receptor Enhances constitutive Androstane Receptor/Pregnane X

- Receptor-Mediated UDP-Glucuronosyltransferase 1A1 Regulation with Glucocorticoid Receptor-Interacting Protein 1. *Molecular Pharmacology* 2005;67(3):845–855.
206. Pascussi J-M, Gerbal-Chaloin S, Fabre J-M, Maurel P, Vilarem M-J. Dexamethasone Enhances Constitutive Androstane Receptor Expression in Human Hepatocytes: Consequences on Cytochrome P450 Gene Regulation. *Molecular Pharmacology* 2000;58(6):1441–1450.
207. Pascussi J, Roben A, Moreau A, Ramos J, Bioulac-Sage P, Navarro F, Blanc P, Assenat E, Maurel P, Vilarem M. Differential regulation of constitutive androstane receptor expression by hepatocyte nuclear factor4alpha isoforms. *Hepatology* 2007 Mai;45(5):1146–53.
208. Thirumaran RK, Lamba JK, Kim RB, Urquhart BL, Gregor JC, Chande N, Fan Y, Qi A, Cheng C, Thummel KE, Hall SD, Schuetz EG. Intestinal CYP3A4 and midazolam disposition in vivo associate with VDR polymorphisms and show seasonal variation. *Biochemical Pharmacology* 2012 Juli;84(1):104–112.
209. Drocourt L, Ourlin J-C, Pascussi J-M, Maurel P, Vilarem M-J. Expression of CYP3A4, CYP2B6, and CYP2C9 Is Regulated by the Vitamin D Receptor Pathway in Primary Human Hepatocytes. *Journal of Biological Chemistry* 2002 Juli;277(28):25125–25132.
210. Evans WE, Relling MV. Moving towards individualized medicine with pharmacogenomics. *Nature* 2004 Mai;429(6990):464–468.
211. Suh DC, Woodall BS, Shin SK, Hermes-De Santis ER. Clinical and economic impact of adverse drug reactions in hospitalized patients. *The Annals of Pharmacotherapy* 2000;34(12):1373–1379.
212. White T, Arakelian A, Rgo J. Counting the costs of drug-related adverse events. *Pharmacoconomics* 1999;15(5):445–58.
213. Csajka C, Marzolini C, Fattinger K, Decosterd L, Fellay J, Telenti A, Biollaz J, Buclin T. Population pharmacokinetics and effects of efavirenz in patients with human immunodeficiency virus infection. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 2003;73(1):20–30.
214. Kaplan RC, Hanna DB, Kizer JR. Recent Insights Into Cardiovascular Disease (CVD) Risk Among HIV-Infected Adults. *HIV Pathogenesis and Treatment* 2016;13(1):44–52.

215. Zanni MV, Schouten J, Grinspoon SK, Reiss P. Risk of coronary heart disease in patients with HIV infection. *Nature Reviews Cardiology* 2014 Okt;11:726–741.
216. Hamidi M, Zamanzad B, Mesripour A. Comparing the effect of clofibrate and phenobarbital on the newborns with hyperbilirubinemia. *EXCLI Journal* 2013;12:75–78.
217. Guo D, Sarkar J, Suino-Powell K, Xu Y, Matsumoto K, Jia Y, Yu S, Khare S, Haldar K, Rao MS, Foreman JE, Monga SPS, Peters JM, Xu HE, Reddy JK. Induction of Nuclear Translocation of Constitutive Androstane Receptor by Peroxisome Proliferator-activated Receptor  $\alpha$  Synthetic Ligands in Mouse Liver. *Journal of Biological Chemistry* 2007;282(50):36766–36776.
218. García-Martín E, Martínez C, Ladero JM, Gamito FJG, Rodríguez-Lescure A, Agundez JAG. Influence of cytochrome P450 CYP2C9 genotypes in lung cancer risk. *Cancer Letters* 2002 Juni;180(1):41–46.
219. Chen J, Huang X-F. The signal pathways in azoxymethane-induced colon cancer and preventive implications. *Cancer Biology & Therapy* 2009 Juli;8(14):1313–1317.
220. Moon K, LEE H, Hong S, Kim H, Um J. CYP1A1 and GSTM1/T1 genetic variation in predicting risk for cerebral infarction. *Journal of molecular Neuroscience* 2007;32(2):155–9.
221. Zordoky BNM, El-Kadi AOS. Effect of cytochrome P450 polymorphism on arachidonic acid metabolism and their impact on cardiovascular diseases. *Pharmacology & Therapeutics* 2010 März;125(3):446–463.



# Molekularbiologische Analysen zur Interaktion zwischen dem CAR-Induktor Efavirenz und dem Cholesterolsresorptionshemmer Ezetimib

Christopher Bresser

## Zusammenfassung:

Die Bedeutung der Einschätzung von Interaktionen verschiedener Medikamente und der hiermit potentiell einhergehenden Nebenwirkungen nehmen aufgrund der stetigen Entwicklung neuer medikamentöser Therapieansätze und der hierdurch bedingt vermehrt auftretenden Polypharmazie kontinuierlich zu. Die Grundlage für das Verständnis dieser Interaktionen bilden die Pharmakokinetik und die Pharmakodynamik. Wichtige Einflussfaktoren im Hinblick auf die Regulation dieser beiden Prozesse sind die nukleären Rezeptoren CAR und PXR, die als ligandenabhängige Transkriptionsfaktoren entsprechend der anfallenden Metaboliten den Metabolismus mitbestimmen. Ein bekannter Induktor von CAR mit seinen Zielgenen in der Pharmakokinetik ist Efavirenz – ein wichtiger Bestandteil der HIV-Therapie. Hierauf basierend wurde in einer klinischen Studie mit 12 Probanden u.a. Gewebe (PBMCs und Intestinum) unter der kontrollierten Gabe von Efavirenz mit Ezetimib untersucht. Letzteres Medikament wurde zum einen als Parameter für den Metabolismus der zahlreichen Zielgene von CAR und zum anderen als eine mögliche Option zur Behandlung der Dyslipidämie – der Entstehung einer Dysbalance als vermeintliche Nebenwirkung von Efavirenz – eingesetzt. Diese klinische Studie ergab, dass Efavirenz keine Regulation im Intestinum auf die mRNA bewirken konnte, jedoch vereinzelt Induktionen auf Proteinebene. Im Modell der Caco2-Zellen ließ sich prinzipiell nach Exposition von Efavirenz eine Induktion feststellen. Auch im Kompartiment der PBMCs ließ sich generell – innerhalb der Studie und auch *in vitro* – eine Induktion detektieren. Dabei konnte jedoch weder eine relevante pharmakokinetische noch eine pharmakodynamische Interaktion zwischen Efavirenz und Ezetimib eindeutig nachgewiesen werden. Insgesamt scheinen gleiche Zielgene von CAR abhängig vom Kompartiment regulationsfähig zu sein. Ob letztendlich die Distribution von Efavirenz über die Induktion oder auch das Kompartiment und dessen Umstände an sich die Induktion beeinflussen bleibt offen. Die Feststellung grundlegender Schlussfolgerungen ist somit aufgrund der derzeit noch unklaren Confounder noch nicht möglich, weshalb weitere komplementäre Forschungsvorhaben erforderlich sind, um zusätzliche Erkenntnisse zu erzielen.



## **Danksagung**

An erster Stelle gilt der Dank meiner Betreuerin Henriette Meyer zu Schwabedissen, die unermüdlich und mit viel Geduld die Arbeit mit Rat und Tat begleitet und jederzeit unterstützt hat.

Desweiteren möchte ich allen im Labor meinen Dank aussprechen, da ohne das erlebte Miteinander Hand in Hand eine effiziente Arbeit und zufriedenstellende Ergebnisse im wissenschaftlichen Bereich nicht möglich sind.

Schließlich möchte ich besonders meiner Familie danken, die diese Arbeit überhaupt ermöglicht hat. Mit viel Verständnis und immer wieder neuen Denkanstößen wurde die Entwicklung dieser Arbeit maßgeblich vorangetrieben und letztendlich vollendet.