

**Expression und Funktion
arzneimittelmetabolisierender Enzyme
und des ABC-Transporters P-Glykoprotein
in Dünndarm und Leber des Menschen**

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2000

vorgelegt von

OLIVER VON RICHTER

Tag der mündlichen Prüfung:

04. Juli 2000

Dekan:

Prof. Dr. U. Nagel

1. Berichterstatter

Prof. Dr. K. W. Bock

2. Berichterstatter

Prof. Dr. M. Eichelbaum

Meinen Eltern in Liebe und Dankbarkeit gewidmet

Diese Arbeit wurde am Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institut für Klinische Pharmakologie in Stuttgart vom Februar 1997 bis Februar 2000 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. M. Eichelbaum angefertigt und von Herrn Prof. Dr. K. W. Bock vom Institut für Toxikologie der Universität Tübingen betreut.

Danksagung

Meinem Lehrer, Prof. Dr. M. Eichelbaum, danke ich für das Thema, die Gewährung von Freiräumen, die entscheidenden Anregungen und den fortwährenden Enthusiasmus an dieser Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. K.W. Bock bedanke ich mich für seine Bereitschaft und sein Interesse, die Arbeit von seiten des Instituts für Toxikologie der Universität Tübingen zu betreuen und für die Hilfe und Zusammenarbeit auf dem Gebiet der Morphinglucuronidierung.

Der Robert-Bosch-Stiftung danke ich für die finanzielle Unterstützung.

Meinen Kollegen Dr. O. Burk und Dr. M. Fromm möchte ich für das Erlernen der praktischen und theoretischen Grundlagen dieser Arbeit danken. Das kreative und angenehme Arbeitsklima und die unendliche Geduld sowie das Mut-Machen, vor allem in Zeiten der Krise, waren vorbildlich und werden mir in Erinnerung bleiben.

Für die Zusammenarbeit beim Aufbau der Gewebebank, welche die Grundlage für diese Arbeit liefert, möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. K. P. Thon, den Ärzten des Zentrums für Operative Medizin und Frau Strohm bedanken.

Als technische Mitarbeiterinnen haben mir in erster Linie Frau S. Johnson und Frau A. Ziegler zur Seite gestanden. Besonders herzlich danke ich für die Geduld und die Ausdauer bei der Anfertigung der Western Blots.

Frau Dr. C. Pauli-Magnus danke ich für die Kooperation und die Durchführung der Transportversuche an polarisierten Zelllinien. Die L-MDR1 und LLC-PK1 Zelllinien wurden mir großzügigerweise von Herrn Prof. Dr. A. Schinkel, Nederlands Kanker Center, Amsterdam, Niederlande zur Verfügung gestellt.

Bei Dr. G. Mikus bedanke ich mich für die Ratschläge in Praxis wie in Theorie zu allen Aspekten der Enzymkinetik.

Ferner danke ich Frau Dr. U. Hofmann und Herrn Dr. T. Mürdter für die stete Hilfsbereitschaft in allen Fragen der Arzneistoffanalytik.

Herrn Prof. Dr. H. K. Kroemer, Herrn Dr. P. Fritz, Herrn Dr. M. Schwab, Herrn Dr. U. Zanger, Herrn PD Dr. P. Münzel und Herrn PD Dr. Mettang danke ich für die vielen Diskussionsbeiträge – nicht nur zu wissenschaftlichen Fragen.

Bei Frau E. Golbs bedanke ich mich für das Verständnis, daß alle meine Bestellungen immer „äußerst dringend“ waren und für die Tolerierung meiner Unfähigkeit jegliches Büromaterial innerhalb der dafür vorgesehen Ausgabezeiten anzufordern.

Allen Mitarbeitern des Dr. Margarete Fischer-Bosch-Instituts danke ich für die gute interdisziplinäre Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG	1
1.1 Orale Bioverfügbarkeit von Arzneimitteln	1
1.2 Arzneimittelmetabolismus im Dünndarm	1
1.2.1 Der Beitrag intestinaler Phase I und II Enzyme zum First-Pass Effekt: Pharmakokinetische Betrachtungen	2
1.2.2 Intestinaler Phase I Metabolismus: Cytochrom P450 Enzyme	4
1.2.3 Intestinaler Phase II Metabolismus: UDP-Glucuronosyltransferasen	5
1.3 Resorption von Arzneistoffen – Die Rolle von ABC-Transportern	7
1.4 Ziele der Arbeit	9
1.5 Experimentelle Vorgehensweise	9
2 ERGEBNISSE	14
2.1 Methodvalidierung	14
2.1.1 Proteinanalytik	14
2.1.1.1 Proteinbestimmung	14
2.1.2 Analytik	15
2.1.2.1 Bestimmung der Verapamil Metabolite D-620, D-617, D-702, D-703 und Norverapamil aus Inkubationslösungen	15
2.1.2.1.1 <i>Chromatographie</i>	16
2.1.2.1.2 <i>Massenspektrometrie</i>	18
2.1.2.1.3 <i>Richtigkeit und Präzision</i>	18
2.1.2.2 Bestimmung von 4'-OH-Diclofenac aus Inkubationslösungen	19
2.1.2.2.1 <i>Chromatographische Trennung</i>	20
2.1.2.2.2 <i>Massenspektrometrie</i>	22
2.1.2.2.3 <i>Richtigkeit und Präzision</i>	22
2.1.2.3 Bestimmung von Morphin-3- und Morphin-6-glucuronid aus Inkubations- lösungen	23
2.1.2.3.1 <i>Chromatographische Trennung</i>	23
2.1.2.3.2 <i>Massenspektrometrie</i>	24
2.1.2.3.3 <i>Richtigkeit und Präzision</i>	24
2.1.2.4 Einfluß von Proteasehemmstoffen und Hyaluronidase auf Enzymaktivitäten	26
2.1.3 Immunoblots	27
2.1.3.1 Validierung des Proteintransfers auf PVDF-Membranen	27
2.1.3.2 Auswahl des geeigneten Detektionsverfahrens	29

2.1.3.3 Validierung der CYP2C8 Quantifizierung	30
2.1.3.4 Validierung der CYP2C9 Quantifizierung	31
2.1.3.5 Validierung der CYP2C19 Quantifizierung	32
2.1.3.6 Validierung der CYP3A4 Quantifizierung	33
2.1.3.7 Validierung der CYP3A5 Quantifizierung	34
2.2 Isolierung von Enterozyten	35
2.2.1 Proteinausbeute aus isolierten Enterozyten und Leberbiopsien	37
2.3 Untersuchungen zur Enzymspezifität der am Verapamil Metabolismus Cytochrom P450 Enzyme	38
2.3.1.1 Untersuchungen mit rekombinant exprimierten Cytochrom P450 Isoenzymen	38
2.3.1.2 Untersuchungen mit spezifischen Hemmstoffen	41
2.4 Verapamil Metabolismus in Enterozyten und Leber	43
2.4.1 Inkubationsbedingungen	43
2.4.2 CYP3A4 Aktivität und Expression	44
2.4.2.1 Verapamil N-Desalkylierung	44
2.4.2.2 CYP3A4 Proteinexpression	46
2.4.2.3 Korrelation zwischen D-617- und Norverapamil Aktivität und CYP3A4 Proteinexpression	47
2.4.3 CYP3A5 Proteinexpression	47
2.4.4 CYP2C8 Aktivität und Expression	48
2.4.4.1 Verapamil O-Demethylierung	48
2.4.4.2 CYP2C8 Proteinexpression	50
2.4.4.3 CYP2C18 Proteinexpression	50
2.4.4.4 Korrelation zwischen D-703 Aktivität und CYP2C8 Proteinexpression	50
2.4.5 Bildung von D-702 und Norverapamil in Enterozyten und Leber	51
2.4.6 Intrinsische Clearance von Verapamil in Enterozyten und Leber	54
2.5 Diclofenac Metabolismus in Enterozyten und Leber	55
2.5.1.1 Diclofenac-4-hydroxylierung	55
2.5.1.2 CYP2C9 Proteinexpression	57
2.5.1.3 Korrelation zwischen 4'-OH-Diclofenac Aktivität und CYP2C9 Proteinexpression	57
2.6 CYP2C19 Proteinexpression	58
2.7 Morphinglucuronidierung in Enterozyten und Leber	61
2.7.1 Identifizierung und Untersuchungen von Hemmstoffen der Morphinglucuronidierung	64

2.8 Expression des ABC-Transporters MDR1 P-Glykoprotein in Enterozyten und Leber	66
2.8.1 Untersuchungen zur Glycosylierung von P-Glykoprotein	66
2.8.2 Bestimmung der P-Glykoprotein Proteinexpression in Enterozyten- und Leberhomogenat	67
2.8.3 Untersuchungen zum gerichteten Transport von Verapamil und seiner Metabolite an Zellmonolayern	69
3 DISKUSSION	72
3.1 Gewebesammlung/ Isolierung von Enterozyten	72
3.2 Untersuchungen zur Cytochrom P450 Enzymspezifität des Verapamil Metabolismus	74
3.3 Expression und Aktivität von CYP3A4 und CYP3A5 in Enterozyten und Lebern	76
3.4 Expression und Aktivität von CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18 und CYP2C19 in Enterozyten und Lebern	79
3.5 Verapamil Metabolismus in Enterozyten und Lebern	81
3.6 Untersuchungen zur Morphinglucuronidierung in Enterozyten und Lebern	81
3.7 Expression des ABC-Transporters MDR1 P-Glykoprotein in Enterozyten und Leber: Konsequenzen für den intestinalen First-Pass Effekt von Verapamil	84
4 ZUSAMMENFASSUNG	88
5 MATERIAL UND METHODEN	91
5.1 Chemikalien, Antikörper, Enzyme, Zelllinien	91
5.2 Lösungen, Puffer, Nährmedien	93
5.2.1 Puffer und Lösungen für SDS-Page und Western Blot	93
5.2.2 Puffer und Lösungen für die Isolierung von Enterozyten und Gewebeaufarbeitung	94
5.2.3 Puffer und Lösungen für Proteinanalytik	95
5.3 Nährmedien	95
5.4 Geräte und Hilfsmittel	96

5.5 Gewebebank	97
5.5.1 Isolierung von Enterozyten	100
5.5.2 Aufarbeitung der Leberbiopsien	101
5.5.3 Proteinpräparation aus Enterozyten und Lebergewebe	101
5.6 Proteinanalytische Methoden	102
5.6.1 Quantifizierung des Proteingehalts	102
5.6.2 Vorbereitung der Proteinhomogenate zur elektrophoretischen Trennung	102
5.6.3 Herstellung von Eichlösungen aus rekombinanten Enzymen	103
5.6.4 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese	104
5.6.5 Proteinquantifizierung mittels Immunoblotanalyse	105
5.6.6 Deglycosylierung von P-Glykoprotein mit Endo- β -N-acetyl-glucosaminidase	108
5.7 Analytische Methoden	109
5.7.1 Bestimmung der Verapamil Metabolite D-620, D-617, D-702, D-703 und Norverapamil aus Inkubationslösungen und Zellkulturmedium	109
5.7.1.1 Reinsubstanzen	109
5.7.1.2 Lösungen	109
5.7.1.3 Probenaufbereitung	109
5.7.1.4 HPLC-Bedingungen	110
5.7.1.5 MSD-Bedingungen	110
5.7.1.6 Quantifizierung	111
5.7.2 Bestimmung von 4'-OH-Diclofenac aus Inkubationslösungen	111
5.7.2.1 Reinsubstanzen	111
5.7.2.2 Lösungen	111
5.7.2.3 Probenaufbereitung	112
5.7.2.4 HPLC-Bedingungen	112
5.7.2.5 MSD-Bedingungen	112
5.7.2.6 Quantifizierung	113
5.7.3 Bestimmung von Morphin-3- und Morphin-6-glucuronid aus Inkubationslösungen	113
5.7.3.1 Reinsubstanzen	113
5.7.3.2 Lösungen	113
5.7.3.3 Probenaufbereitung	114
5.7.3.4 HPLC-Bedingungen	114
5.7.3.5 MSD-Bedingungen	114
5.7.3.6 Quantifizierung	115
5.7.4 Validierung analytischer Methoden	115
5.7.5 Inkubationen, Enzymkinetik	116
5.7.5.1 Lösungen	116
5.7.5.2 Verapamil Inkubationen	119
5.7.5.3 Verapamil Inkubationen mit spezifischen Inhibitoren	119
5.7.5.4 Verapamil Inkubationen mit in SF9-Zellen rekombinant exprimierten	

Cytochrom P450 Enzymen	119
5.7.5.5 Upscaling der mit rekombinant exprimierten Cytochrom P450 Enzymen ermittelten intrinsischen Clearance	120
5.7.5.6 Diclofenac Inkubationen	120
5.7.5.7 Morphin Inkubationen	120
5.7.5.8 Morphin Inkubationen mit Inhibitoren	120
5.7.5.9 Einfluß von Proteaseinhibitoren und Hyaluronidase auf Enzymaktivitäten	121
5.7.5.10 Berechnungen	121
5.8 Untersuchungen zum gerichteten Transport von Verapamil und seiner Metabolite an Zellmonolayern	123
5.8.1 Kultivierung von Caco-2, L-MDR1 und LLC-PK1 Zelllinien	123
5.8.2 Messung von gerichtetem Transport an Zellmonolayern	123
5.9 Statistik	124
6 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	127
7 LITERATURVERZEICHNIS	128
8 ABBILDUNGSVERZEICHNIS	144
9 TABELLENVERZEICHNIS	146
10 LISTE DER AKADEMISCHEN LEHRER	149
11 LEBENSLAUF	151

1 Einleitung

1.1 Orale Bioverfügbarkeit von Arzneimitteln

Die orale Gabe von Arzneistoffen wird vom Patienten als die angenehmste Form der Verabreichung empfunden. Sie stellt bis heute die am häufigsten genutzte Applikationsform dar und aus diesem Grunde sind Ausmaß und Geschwindigkeit der Aufnahme von Arzneimitteln in die systemische Zirkulation (Bioverfügbarkeit) von erheblichen Interesse für ihre therapeutische Wirksamkeit. Für eine Vielzahl von Arzneimitteln wie z.B. dem Calciumantagonisten Verapamil, dem Immunsuppressivum Cyclosporin, dem Analgetikum Morphin oder dem HIV1 Proteasehemmer Ritonavir ist die Bioverfügbarkeit nach oraler Gabe gering. Dabei kann eine niedrige Bioverfügbarkeit von Arzneimitteln entweder durch schlechte Resorption bedingt sein oder trotz vollständiger Resorption durch eine ausgeprägten präsystemische Elimination im Dünndarm und in der Leber resultieren.

Interindividuelle Unterschiede im First-Pass Metabolismus sind Ursache dafür, daß nach Gabe gleicher Dosen der o.a. Arzneistoffe bei Patienten erhebliche Schwankungen in den Plasmaspiegeln und damit in der Intensität und Dauer der Wirkung beobachtet werden, die ein Grund für das Auftreten von unerwünschten Wirkungen oder für das Versagen einer Arzneimitteltherapie sein können. Eine rationale Arzneimitteltherapie, d.h. eine den individuellen Bedürfnissen angepaßte Dosierung, ist daher nur möglich wenn die Ursachen für die interindividuelle Unterschiede des First-Pass Effekt in Dünndarm und Leber genau untersucht sind. Der First-Pass Effekt in beiden Organen wird im wesentlichen durch die Expression von arzneimittelmetabolisierenden Enzymen und Transporterproteinen bestimmt.

1.2 Arzneimittelmetabolismus im Dünndarm

Arzneimittelmetabolismus ermöglicht dem Organismus lipophile Xenobiotika in hydrophile, leichter ausscheidbare Substanzen umzuwandeln. Man unterscheidet dabei zwei Arten von Reaktionen: Der Phase I Metabolismus von Xenobiotika umfaßt das Einfügen von polaren Gruppen durch Oxidation, Reduktion oder Hydrolyse. Diese werden anschließend in Phase II Reaktionen mit hydrophilen, körpereigenen Verbindungen konjugiert und damit wasserlöslicher gemacht, um ihre renale Ausscheidung zu verbessern. Bisher geht man davon aus, daß bei Arzneimitteln mit unvollständiger Bioverfügbarkeit aufgrund einer ausgeprägten präsystemischen Elimination die Leber das wesentliche Eliminationsorgan darstellt. In jüngster Zeit gibt es jedoch Hinweise darauf, daß auch die Darmwand in erheblichem Umfang zum First-Pass Metabolismus und damit zur unvollständigen und variablen Bioverfügbarkeit von Arzneimitteln beitragen kann. Über einen möglichen intestinalen Metabolismus berichteten erstmals (Herter and Wakeman 1899), die Kanninchendarm mit einer Phenol-Lösung inkubierten und das „Verschwinden“ des Phenols aus der Lösung bemerkten. Das Interesse am intestinalen Metabolismus wuchs, als sich zeigte, daß im Dünndarm eine

Vielzahl von Phase I und Phase II Reaktionen ablaufen (Hartiala 1973). Dem Metabolismus durch die Darmwand wurde jedoch eine geringe Bedeutung beigemessen, da im Vergleich zur Leber pro Gramm Feuchtgewicht der Gehalt an arzneimittelabbauenden Enzymen, hier insbesondere Cytochrom P450-Enzymen, sehr niedrig ist und nicht alle Cytochrom P450-Enzyme, die in der Leber exprimiert sind, auch in der Darmwand vorkommen.

1.2.1 Der Beitrag intestinaler Phase I und II Enzyme zum First-Pass Effekt: Pharmakokinetische Betrachtungen

Die Leber enthält ca. 90-95% des gesamten Cytochrom P450-Gehaltes des Körpers, nur 1-2% sind dagegen in der Darmwand lokalisiert (McKinnon et al. 1995; Watkins 1992). Vergleichbare Ergebnisse existieren für die Expression der UGT1A Familie in Darm und Leber (Strassburg et al. 1999). Die katalytische Aktivität pro Gramm Darmgewebe ist demnach im Vergleich zur Leber sehr gering. Die Gesamtmenge CYP3A4 ist beispielsweise im Darm um den Faktor 20-30 niedriger als in der Leber (Back and Rogers 1987; de Waziers et al. 1990; Krishna and Klotz 1994). Durch die Bestimmung der enzymkinetischen Parameter V_{\max} und K_m und bei Kenntnis der Proteinbindung kann die intrinsische Clearance, d.h. der Quotient aus V_{\max} über K_m , in-vitro bestimmt und durch Upscaling unter Einsatz eines entsprechenden pharmakokinetischen Modells („well stirred models“) die hepatische in-vivo Clearance vorhergesagt werden. Da die intrinsische Clearance eines CYP3A4 Substrates von der jeweiligen Enzymmenge abhängt, würde man unter Verwendung desselben pharmakokinetischen Modells für den Darm annehmen, daß der Beitrag der Leber am Metabolismus von CYP3A4 Substraten um den Faktor 20-30 größer ist als der des Darms. Neuere Untersuchungen zeigen jedoch, daß 40% einer oralen applizierten Cyclosporindosis (Hebert et al. 1992) durch intestinalen Metabolismus eliminiert werden. Für Midazolam und Verapamil wurden entsprechende Werte von 43% bzw. 47% ermittelt (Thummel et al. 1996; Paine et al. 1996) (Fromm et al. 1998; von Richter et al. 2000). Wendet man das gleiche Vorgehen für das Upscaling von in-vitro Daten auf die in-vivo Situation für den Darm an, zeigt es sich demnach, daß das Ausmaß des Metabolismus von Cyclosporin, Midazolam und Verapamil durch die Darmwand unterschätzt wird. Folgende pharmakokinetischen Überlegungen sind bei der Betrachtung des präsystemischen Metabolismus im Darm zu berücksichtigen:

- Ein Vergleich der Gesamtzymmengen beider Organe ist unzureichend, um den intestinalen First-Pass Metabolismus vorauszusagen. Da im Darm arzneimittelmetabolisierende Enzyme ausschließlich in den Enterozyten exprimiert werden, sollte sich ein Vergleich, der die intrinsische Clearance bestimmenden Enzymmengen, daher ausschließlich auf diesen Zelltyp beschränken. Dabei bestehen allerdings praktische Schwierigkeiten, wie die selektive Isolierung der Enterozyten aus Darmgewebe und die hierbei zu erwartenden sehr geringen Ausbeuten an Zellmaterial.

- Vorausgesetzt ein Arzneistoff wird in Darm und Leber von demselben Enzym metabolisiert, so läßt sich die Stoffwechsellistung dieses Enzyms durch seine intrinsische Clearance beschreiben. Die Geschwindigkeit und das Ausmaß mit der ein Arzneistoff pro Einheit Enzym metabolisiert wird, ist jedoch von weiteren Faktoren, wie der jeweiligen intrazellulären Konzentration und der Verweilzeit eines Arzneistoffs am Enzym abhängig, die aufgrund von unterschiedlicher Anatomie und Gefäßversorgung in Dünndarm und Leber erhebliche Unterschiede aufweisen. Der hepatische Leberblutfluß beträgt im Mittel 1500 ml/min (Wynne et al. 1989), der Blutfluß im Dünndarm jedoch nur 500 ml/min (Tateishi et al. 1997).
- Es ist davon auszugehen, daß die intrazelluläre Konzentration eines Arzneistoffs in Enterozyten in der Regel höher ist als in Hepatozyten und somit bei gleichen Enzymmengen in beiden Zelltypen ein höherer Metabolismus in den Enterozyten im Vergleich zu den Hepatozyten die Folge ist, vorausgesetzt die Konzentration liegt unterhalb des K_m -Werts. Dies ist vor allem für Substanzen der Fall, die eine geringe Affinität, d.h. einen hohen K_m -Wert, zu dem entsprechenden Enzym aufweisen. Für Arzneistoffe die eine hohe Affinität, d.h. einen niedrigen K_m -Wert, zu dem abbauenden Enzym zeigen, wäre eine Sättigung des intestinalen Metabolismus möglich. Die K_m -Werte für die N-Desalkylierung und O-Demethylierung von Verapamil in humanen Lebermikrosomen liegen zwischen 20 und 150 μM (Kroemer et al. 1992). Da die Proteinbindung von Verapamil 80-90% beträgt (Mikus et al. 1990), müßte die Gesamtkonzentration im Pfortaderblut in der Größenordnung von 160-1200 μM liegen, um in den Hepatozyten Substratkonzentrationen zu erreichen, die gleich oder größer K_m sind. In der Regel wird eine orale Dosis von 80 mg Verapamil innerhalb von 60 Minuten resorbiert. Bei einem Pfortaderblutfluß von 1 l/min würde somit diese Dosis in einem portalen Blutvolumen von 60 l verdünnt. Daraus berechnet sich eine mittlere portale Blutkonzentration von 3 μM . Diese Konzentrationen liegen deutlich unter den K_m -Werten der beteiligten Biotransformationsreaktionen. Selbst wenn man eine 10-fach höhere Konzentration während der initialen Phase der Resorption annimmt oder eine höhere Dosis gegeben wird, dürften die Konzentrationen in der Pfortader immer noch deutlich unterhalb K_m liegen. Anders verhält sich die Situation für die Enzyme in den Enterozyten, die lediglich durch die Zellmembran und Mucusschicht getrennt, nach oraler Gabe wesentlich höheren Arzneimittelkonzentrationen ausgesetzt sind, da die gesamte Arzneistoffdosis in freier Form im wässrigen Milieu vorliegt. Geht man davon aus, daß die gleiche Dosis von 80 mg in einem Flüssigkeitsvolumen von 200 ml im Darm gelöst ist, dann ergeben sich Verapamilkonzentrationen die in der Größenordnung von bis zu 900 μM liegen. Im Gegensatz zu Hepatozyten wird in Enterozyten demnach Konzentrationen erreicht, die deutlich über den K_m -Werten liegen. Pharmakokinetische Daten zu Verapamil zeigen eine nichtlineare Beziehung zwischen der Fläche unter der Plasmakonzentrations-Zeit Kurve und der Verapamil Dosis in einem Dosisbereich unterhalb von 120 mg (Eichelbaum et al. 1981). Aufgrund der vorangehenden Überlegungen ist anzunehmen, daß die

nichtlineare Bioverfügbarkeit von Verapamil auf die Sättigung des intestinalen First-Pass Metabolismus zurückzuführen ist. Der K_m -Wert einer Substanz und die verabreichte orale Dosis sind demzufolge entscheidend für das Ausmaß des intestinalen Metabolismus.

1.2.2 Intestinaler Phase I Metabolismus: Cytochrom P450 Enzyme

Phase-I-Reaktionen sind Funktionalisierungsreaktionen. Die Enzyme der Cytochrom P450 Familie (CYPs) spielen für den Phase-I-Stoffwechsel die wichtigste Rolle. Bei diesen Enzymen handelt es sich um membranständige Hämproteine, die auf der cytosolischen Seite des endoplasmatischen Retikulums lokalisiert sind. Funktionell gehören sie zur Gruppe der mischfunktionellen Monooxygenasen. Sie führen funktionelle Gruppen in unpolare Moleküle ein oder legen entsprechende funktionelle Gruppen frei. Die Hydrophilie unpolarer Arzneistoffe wird dadurch erhöht und ihre renale Ausscheidung somit erleichtert. Ferner sind die von diesen Enzymen gebildeten Metabolite in der Mehrzahl der Fälle pharmakologisch weniger aktiv als die Ausgangssubstanzen – die Enzyme stellen folglich auch ein Detoxifikationssystem dar.

Aufgrund ihrer Primärstruktur werden die Cytochrom P450 Enzyme in Familien (Homologie > 36%) und Subfamilien eingeteilt (Homologie > 55%). Von den mehr als 30 im Menschen exprimierten Isoenzymen (Nelson et al. 1996), gehören die am Arzneimittelmetabolismus beteiligten Enzyme den Genfamilien CYP1, CYP2 und CYP3 an. CYP3A4 ist an der Biotransformation von über der Hälfte der bis heute untersuchten Arzneimittel beteiligt. CYP2D6 und die Enzyme der CYP2C Subfamilie katalysieren den Stoffwechsel von etwa jeweils 20% der untersuchten Arzneimittel (Guengerich 1997).

Cyclosporin, Midazolam und Verapamil werden hauptsächlich durch Enzyme der CYP3A Subfamilie metabolisiert (Mangold et al. 1994; Thummel et al. 1994; Kroemer et al. 1993). CYP3A macht nicht nur 30% aller in der Leber exprimierten CYPs aus (Shimada et al. 1994), sondern ist auch im Dünndarm in einem noch höheren Prozentsatz exprimiert (Watkins et al. 1987; de Waziers et al. 1990). Wie auch in der Leber zeichnet sich die CYP3A Expression im Dünndarm durch große interindividuelle Schwankungen aus (Lown et al. 1994; Paine et al. 1997). Innerhalb der CYP3A Subfamilie ist CYP3A4 die dominante Isoform während CYP3A5 nur in geringen Mengen im Darm exprimiert wird (Lown et al. 1994; Kolars et al. 1994). Die intestinale Proteinexpression von CYP3A7 konnte bis heute nicht nachgewiesen werden (Kivistö et al. 1996). Im Gegensatz zur Leber, in der 80% aller Hepatozyten CYP3A exprimieren (Ratanasavanh et al. 1991; Watkins et al. 1990), ist im Darm die Expression dieser Subfamilie auf die Enterozyten, die die einschichtige Epithelschicht dieses Organs bilden, beschränkt (Murray et al. 1988).

Der Dünndarm hat in-vivo eine Gesamtlänge von 250-350 cm, welche mit der Körpergröße korreliert. Der proximale Abschnitt – vom Pylorus bis zum Treitz'schen Band – entspricht

dem Duodenum (20 – 30 cm), ihm folgt das Jejunum (100-150 cm). Das Ileum stellt den distalen Bereich des Dünndarms dar. Der Übergang vom Jejunum zum Ileum ist topographisch nicht festgelegt. Innerhalb des Dünndarm nimmt die CYP3A Proteinexpression vom Duodenum und proximalen Jejunum über das distale Jejunum zum Ileum hin ab. So beträgt der CYP3A Proteingehalt im Ileum nur noch 54% der im Duodenum gemessenen Menge (Paine et al. 1997). Zusätzlich ist die CYP-Proteinexpression entlang der Villi abhängig vom Differenzierungsgrad der Enterozyten. In undifferenzierten Enterozyten der Lieberkünschen Krypten, in denen diese durch Mitose gebildet werden, ist keine CYP-Proteinexpression nachweisbar. In ausdifferenzierten Enterozyten der Villusspitze ist die CYP-Proteinexpression am höchsten (Kaminsky and Fasco 1991; Murray et al. 1988). Die Differenzierung der Enterozyten, die mit einer Migration der Zellen von der Krypte zur Villusspitze verbunden ist, dauert durchschnittlich 4-6 Tage (McDonald et al. 1964). Die intestinalen CYPs werden demnach alle 4-6 Tage erneuert.

Neben CYP3A4 und CYP3A5 sind noch ein oder mehrere Isoenzyme der CYP2C Subfamilie im Dünndarm exprimiert (de Waziers et al. 1990; Zhang et al. 1999). Das polymorph exprimierte CYP2D6 wurde, in sehr geringen Mengen im Vergleich zu seiner Expression in Leber, ebenfalls in Dünndarmgewebe gefunden (Prueksaritanont et al. 1995). Von der CYP1A Subfamilie ist CYP1A1 im Dünndarm zu finden, jedoch sind die Mengen auch bei dieser Isoform so gering, daß sie stellenweise unterhalb der Nachweisgrenze gängiger proteinbiochemischer Methoden liegen (Paine et al. 1999) oder nur nach Induktion durch Rauchen oder den Verzehr von Grillfleisch nachzuweisen sind (Buchthal et al. 1995; Fontana et al. 1999).

1.2.3 Intestinaler Phase II Metabolismus: UDP-Glucuronosyltransferasen

Neben Enzymen des Phase I- werden auch solche des Phase-II-Stoffwechsels im Darm exprimiert (de Waziers et al. 1990; Krishna and Klotz 1994). Phase-II-Reaktionen sind Konjugationsreaktionen, die durch Transferasen katalysiert werden. Im Rahmen dieser Phase-II-Reaktionen werden funktionelle Gruppen mit sehr polaren, negativ geladenen endogenen Molekülen gekoppelt. Die in der Phase I katalysierte Einführung funktioneller Gruppen ist häufig Voraussetzung dafür, daß Arzneistoffe Substrate für Phase II-Reaktionen sind. Besitzt allerdings ein Arzneistoff bereits für die Konjugation geeignete funktionelle Gruppen, kann auch ohne vorgeschaltete Phase-I-Reaktion eine direkte Konjugation erfolgen. Dies ist der Fall für das starke Analgetikum Morphin [7,8-Didehydro-4,5-epoxy-17-methyl-(5 α ,6 α)-morphinan-3,6-diol], dessen Hauptmetabolite Morphin-3-(M3G) [(5 α ,6 α)-7,8-Didehydro-4,5-epoxy-6-hydroxy-17-methylmorphinan-3-yl- β -D-glucuronosyl-säurepyranosid] und Morphin-6-glucuronid (M6G) [(5 α ,6 α)-7,8-Didehydro-4,5-epoxy-3-hydroxy-17-methyl-morphinan-6-yl- β -D-glucuronosylsäurepyranosid] durch Konjugation mit UDP-Glucuronosylsäure gebildet werden. In der Regel sind solche Phase-II-Metabolite unwirksam. M6G zeigt jedoch in Ratten die 2,5-fache analgetische Potenz von Morphin (Easterling and Holtzman 1998) und weist in vitro eine bis zu 100-fach höhere Affinität zu μ -Rezeptoren auf (Shimomura et al. 1971; Gong

et al. 1991). Die Glucuronidierung von Morphin zu Morphin-6-glucuronid trägt somit erheblich zur analgetischen Wirkung bei. Für M3G wird eine Antagonisierung der durch Morphin und M6G hervorgerufenen Atemdepression (Gong et al. 1991) und von Alodynie diskutiert (Halliday et al. 1999). In einer Patientenstudie mit Morphin wurde während der anhepatischen Phase von Lebertransplantationen gezeigt, daß auch Morphin im Dünndarm metabolisiert wird (Bodenham et al. 1989).

Bisher sind drei UDP-Glucuronosyltransferasen (UGTs) bekannt, welche die Glucuronidierung von Morphin katalysieren. Dazu gehören UGT1A3 (Green et al. 1998), UGT1A8 (Cheng et al. 1999) und UGT2B7 (Coffman et al. 1997). Von diesen drei UGT Isoformen wird UGT1A3 ausschließlich in der Leber, UGT1A8 ausschließlich im Darm und UGT2B7 in beiden Organen exprimiert (Cheng et al. 1999; Radomska-Pandya et al. 1998). Die Funktion dieser UGT Isoenzyme ist im Darm im Vergleich zur Leber kaum untersucht. Die differentielle Expression von UGTs in Enterozyten und Leber stellt sich wie folgt dar:

Darm¹:	Leber¹:
UGT1A1	UGT1A1
	UGT1A3 ²
UGT1A4	UGT1A4
UGT1A6	UGT1A6
UGT1A7	
UGT1A8 ²	
	UGT1A9
UGT1A10	
	UGT2B4
UGT2B7 ²	UGT2B7 ²
	UGT2B10
	UGT2B11
	UGT2B15

Erste immunhistochemische Untersuchungen an humanem Dünndarm zeigen eine homogene Verteilung der UGT1A-Proteinexpression entlang der Villusachse (Strassburg et al. 2000). Eine Charakterisierung der UGT-Proteinexpression entlang des gesamten menschlichen Darms ergab, im Gegensatz zur Expression von CYPs, einen Anstieg der UGT Proteinmenge in distalen Abschnitten des Darms mit maximalen Werten im Kolon (Radomska-Pandya et al. 1998 Abb. 1).

¹ Angegebene Daten beziehen sich auf die mRNA-Expression von in Dünndarm und Leber exprimierten UDP-Glucuronosyltransferasen (Radomska-Pandya et al. 1999).

² Morphinglucuronidierung katalysierende UDP-Glucuronosyltransferasen.

1.3 Resorption von Arzneistoffen – Die Rolle von ABC-Transportern

Neben dem First-Pass Metabolismus in Darm und Leber stellt die unvollständige Resorption von Arzneistoffen eine weitere Ursache für eine niedrige und variable Bioverfügbarkeit dar. Die Resorption von Arzneistoffen nach oraler Gabe durch passive Diffusion ist in der Regel abhängig von ihren physikochemischen Eigenschaften. Untersuchungen der letzten Jahre haben jedoch gezeigt, daß in der Darmmukosa lokalisierte ABC-Transporter die Resorption von Arzneistoffen beeinflussen. Von besonderem Interesse ist dabei P-Glykoprotein, das Genprodukt von MDR1, welches in der apikalen Enterozytenmembran lokalisiert aufgenommene Xenobiotika zurück in das Darmlumen transportiert und somit eine aktive Barrierefunktion ausübt (Abbildung 1). In der Leber wird P-Glykoprotein in der kanalikulären Hepatozytenmembran exprimiert und vermittelt die Elimination von Xenobiotika in die Galle. Typische Substrate sind lipophile und basische Arzneistoffe mit planarem Ringsystem und einem Molekulargewicht >400, aber auch neutrale Arzneistoffe wie Digoxin. Die teilweise sehr niedrige Bioverfügbarkeit der HIV1 Proteaseinhibitoren Indinavir, Nelfinavir und Saquinavir ist neben einem ausgeprägten intestinalen First-Pass Effekt auf die Sekretion durch in den Enterozyten exprimiertes P-Glykoprotein ins Darmlumen zurückzuführen (Kim et al. 1998). Die variable Bioverfügbarkeit des Immunsuppressivums Cyclosporin beruht ebenfalls z. T. auf der Beeinflussung der Resorption durch P-Glykoprotein (Lown et al. 1997). Ferner konnte gezeigt werden, daß eine Induktion von intestinale P-Glykoprotein durch Rifampicin, zu einer Abnahme der oralen Bioverfügbarkeit des Herzglykosids Digoxin führte (Greiner et al. 1999). Im Gegensatz zur passiven Diffusion ist die durch Transporter vermittelte Resorption von Arzneistoffen variabel, da durch Induktion, Hemmung oder Sättigung der Transporter variable Resorptionsquoten resultieren können.

P-Glykoprotein weist eine homogene Expression in Enterozyten entlang der Villusachse auf (Cordon-Cardo et al. 1990). Die interindividuellen Schwankungen der intestinalen P-Glykoprotein Expression sind vergleichbar mit für CYP3A4 gefundenen Werten (Lown et al. 1997). Daten über die Expression von P-Glykoprotein in gesundem Lebergewebe sind begrenzt (Schuetz et al. 1995). Ein Vergleich der Expression von P-Glykoprotein in Darm und Leber und die daraus resultierenden Konsequenzen für den Arzneimittelmetabolismus in beiden Organen existiert nicht.

Das Interesse an P-Glykoprotein wuchs als (Lown et al. 1997) sich zeigte, daß die Bioverfügbarkeit von Cyclosporin, das sowohl durch CYP3A4 im Darm metabolisiert wird als auch einem aktiven Transport durch P-Glykoprotein unterliegt, mit der Summe der hepatischen CYP3A4- und intestinalen P-Glykoprotein-Expression korreliert. (Kim et al. 1999) wiesen eine Substratüberlappung mit P-Glykoprotein für weitere durch CYP3A4 metabolisierte Arzneistoffe nach. Seitdem wird über ein Zusammenwirken von im Darm exprimierten CYP3A4 und P-Glykoprotein spekuliert. Die Funktion von P-Glykoprotein besteht darin, in die Enterozyten aufgenommene Fremdstoffe zurück in das Darmlumen zu transportieren. Dadurch wird die intrazelluläre Arzneistoffkonzentration niedrig gehalten und eine Sättigung der arzneistoffmetabolisierenden Enzyme verhindert. Die Folge ist eine

effektivere Metabolisierung von Arzneistoffen (vgl.1.2.1) (Gan et al. 1996; Benet et al. 1999). Zudem werden in den Enterozyten gebildete Metabolite über P-Glykoprotein in das Darmlumen sezerniert und möglicherweise dadurch eine Produkthemmung der Enzyme aufgrund hoher intrazellulärer Metabolitenkonzentrationen verhindert (Watkins 1997) (Abbildung 1). Auch dies würde zu einem erhöhten intestinalen Metabolismus beitragen.

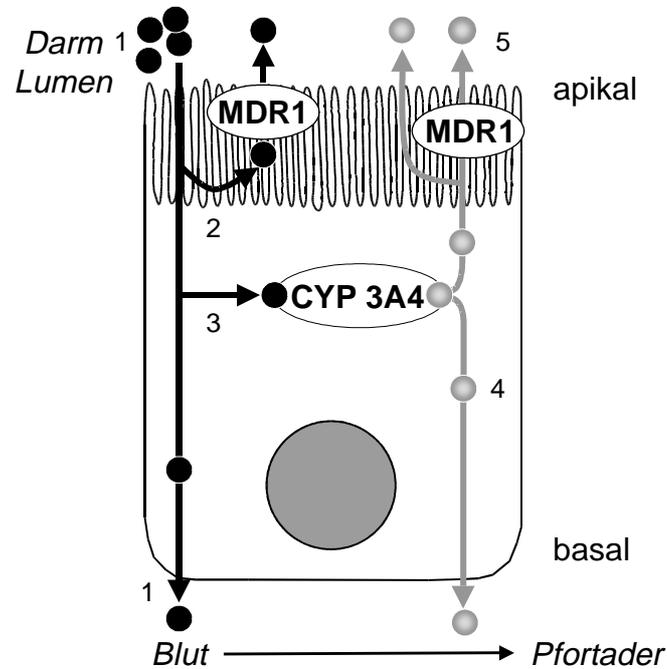


Abbildung 1: (1) Intestinale Sekretion von Arzneistoffen (●) und Metaboliten (●) durch MDR1 P-Glykoprotein. (1) Diffusion des Arzneistoffes in die Enterozyten und Übertritt in das Blut. (2) Sekretion des Arzneistoffes in das Darmlumen. (3) Metabolisierung des Arzneistoffes, wobei (4) ein Teil der Metaboliten in das Blut übertritt und (5) ein Teil in das Darmlumen durch P-Glykoprotein sezerniert wird.

1.4 Ziele der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, durch den Einsatz verschiedener in-vitro Verfahren die Proteinexpression und Funktion von im Darm exprimierten Cytochrom P450 Enzymen und UDP-Glucuronosyl-transferasen zu charakterisieren, um damit das Ausmaß des humanen First-Pass Metabolismus durch den Dünndarm im Vergleich zur Leber in der präklinischen Phase der Arzneimittelentwicklung vorherzusagen. Außerdem sollte die Proteinexpression des ABC-Transporters P-Glykoprotein in beiden Organen und seine Bedeutung für die First-Pass Elimination von Verapamil untersucht werden. Anhand dieser Untersuchungen sollte ebenfalls überprüft werden, ob diese Enzyme in Darm und Leber koreguliert sind.

1.5 Experimentelle Vorgehensweise

Grundlegende Voraussetzung für die vorliegende Arbeit war die Sammlung von Darm- und Lebergewebe eines einzelnen Patienten, um einen intraindividuellen Vergleich von arzneimittelmetabolisierenden Enzymen und ABC-Transportern in Darm und Leber unter Ausschluß interindividueller Schwankungen durchzuführen.

Zur Isolierung des gesamten Villusepithels wurde auf eine von (Hülsmann et al. 1973) entwickelte Methode zurückgegriffen. Die Methode wurde auf den Erhalt von Enzymaktivität hin optimiert. Auf die von (Grafström et al. 1979) entwickelte Abschabetechnik wurde trotz der breiten Anwendung in anderen Arbeitsgruppen verzichtet, da sich mit dieser Methode nur Zellen der Villusspitze mit einer geringen Ausbeute und schlechter Reproduzierbarkeit isolieren lassen (Borm et al. 1983; Fasco et al. 1993). Außerdem ist bei dieser Methode nicht sichergestellt, ob ausschließlich Enterozyten und nicht auch Teile des restlichen Villusgewebes mitentfernt werden, was eine Standardisierung auf enterozytenspezifische Marker wie Alkalische Phosphatase, Sucrase-Isomaltase oder Villin erforderlich macht. Für interindividuelle Vergleiche sind diese Enterozytenmarker ungeeignet, da sie entweder hohe interindividuelle Schwankungen aufweisen (Alkalische Phosphatase, Sucrase-Isomaltase (Van Beers et al. 1998)) oder derartige Unterschiede nicht untersucht sind (Villin).

Da mit der verwendeten Methode zur Isolierung von Enterozyten nur eine geringe Ausbeute an Enterozyten bezogen auf das Feuchtgewicht des eingesetzten Darmgewebes zu erwarten ist, (Borm et al. 1983) und das bei Gastrektomien und Pankreasektomien resizierte Darmgewebe begrenzt ist, können zur Messung der Enzymexpression und -Funktion ausschließlich Methoden eingesetzt werden, die eine größtmögliche Nachweisempfindlichkeit aufweisen.

Zur Messung der Enzymexpression in Enterozyten- und Leberhomogenaten wurde daher auf Immunoblots in Kombination mit durch Chemilumineszenz vermittelter Detektion zurückgegriffen, da Sensitivität herkömmlicher kolorimetrischer Methoden, wie bereits diskutiert (Paine et al. 1997), zum Nachweis von beispielsweise CYP3A5 in

Dünndarmmikrosomen nicht ausreichen. Die absolute Quantifizierung der Proteinmengen wurde mit einem Chemilumineszenzimager durchgeführt, da sich derartige Geräte durch einen größeren dynamischen Bereich im Vergleich zu herkömmlichen Röntgenfilmen auszeichnen und somit eine Quantifizierung mit besserer Richtigkeit und Präzision ermöglichen (vgl. (Lown et al. 1997)).

Für die Bestimmung der Proteinexpression von CYP2C8, 2C9, 2C18, 2C19, 3A4 und 3A5 wurden kommerziell verfügbare Antikörper auf ihre Spezifität hin überprüft und die Versuchsbedingungen für eine absolute Quantifizierung der Enzyme in Enterozyten- und Leberhomogenat optimiert. Die Proteinexpression der einzelnen Isoenzyme der CYP2C Subfamilie im Dünndarm ist bisher nicht untersucht.

Der Calciumantagonist Verapamil weist einen ausgeprägten stereoselektiven First-Pass Metabolismus auf (Schomerus et al. 1976). Die durch N-Demethylierung (Norverapamil [2,8-bis-(3,4-dimethoxyphenyl)-2-isopropyl-6-azaocitanitril]), durch N-Desalkylierung (D-617 [2-(3,4-dimethoxyphenyl)-5-methylamino-2-isopropylvaleronitril]) und durch O-Demethylierung (D-702 [2-(3,4-dimethoxyphenyl)-8-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-6-methyl-2-isopropyl-6-azaocitanitril], D-703 [2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-8-(3,4-dimethoxyphenyl)-6-methyl-2-isopropyl-6-azaocitanitril]) gebildeten Metabolite entstehen durch CYP1A2, CYP2C, CYP3A4 katalysierte Oxidationen (Kroemer et al. 1993; Busse et al. 1995; Tracy et al. 1999). Experimente zum Verapamil-Metabolismus mit rekombinant exprimierten CYP Isoenzymen und spezifischen CYP-Hemmstoffe wurden durchgeführt, um zu entscheiden, ob D-617 oder Norverapamil als metabolischer Marker für CYP3A4-Aktivität verwendet werden kann und den Beitrag von CYP3A5 an der Bildung dieser Metabolite zu untersuchen. Der Einsatz von rekombinant exprimierten CYP Isoenzymen bietet den Vorteil, daß für jedes Isoenzym die kinetische Parameter K_m und V_{max} isoliert von anderen CYP Isoenzymen betrachtet werden können. Untersucht wurden CYP1A1, 1A2, 2C8, 2C9, 2C18, 2C19, 3A4 und 3A5, deren Bedeutung für den Metabolismus von Verapamil bereits durch Kroemer et al. 1993 und (Busse et al. 1995) gezeigt wurde. CYP2B6, 2D6 und 2E1 wurden nicht untersucht, da diese Isoenzyme nach Ergebnissen von (Tracy et al. 1999) keinen Beitrag zum Metabolismus von Verapamil leisten. Des Weiteren wurde die Beteiligung von CYP2C8 und CYP2C9 an den O-Demethylierungen zu D-702 und D-703 untersucht, da hierzu z.T. widersprüchliche Aussagen von (Busse et al. 1995) und (Tracy et al. 1999) bestehen.

Untersucht wurde die Proteinexpression und Funktion der am Verapamil-Metabolismus beteiligten Enzyme der Cytochrom 3A- und 2C-Subfamilie, da diese Enzyme sowohl im Dünndarm und als auch in der Leber exprimiert werden. Außerdem besteht für Verapamil ein ausgeprägter intestinaler First-Pass Metabolismus, vor allem nach Induktion mit Rifampizin (Fromm et al. 1996; Fromm et al. 1998; von Richter et al.).

Zur Charakterisierung der CYP2C9 Funktion in Enterozyten- und Leberhomogenaten wurde die Diclofenac-4-Hydroxylierung verwendet. Das nicht steroidale Antirheumatikum Diclofenac wird in der Leber zu 3'-Hydroxydiclofenac [2-(2,6-Dichlor-3-hydroxy-anilino)-phenylacetat], 4'-Hydroxydiclofenac [2-(2,6-Dichlor-4-hydroxy-anilino)-phenylacetat] und

5-Hydroxydiclofenac [5-Hydroxy-2-(2,6-dichloranilino)-phenylacetat] verstoffwechselt. Die Bestimmung von 4'-Hydroxydiclofenac in Inkubationslösungen ist ein geeigneter Marker für CYP2C9 Aktivität, da CYP2C9 fast ausschließlich die Bildung von 4'-Hydroxydiclofenac in der Leber katalysiert (Transon et al. 1996; Bort et al. 1999). Die von anderen Arbeitsgruppen verwendete Tolbutamidhydroxylierung ist nach neueren Untersuchungen zum gleichen Anteil durch CYP2C19 katalysiert (Lasker et al. 1998; Wester et al. 2000) und daher zur Messung der CYP2C9 Aktivität ungeeignet.

Das CYP3A4 Substrat Verapamil ist als P-Glykoprotein Hemmstoff bekannt und gut charakterisiert (Döppenschmitt et al. 1999). Es existieren jedoch keine Daten zum P-Glykoprotein abhängigen Transport von Verapamil und seiner Phase I Metabolite. Hinweise für einen aktiven renalen Transport der Verapamil Metabolite D-620 und D-617 finden sich bei Mikus et al. (1990). Untersuchungen mit einem Multilumenperfusionskatheter zeigten, daß nach intravenöser Gabe von Verapamil die Metabolite D-620, D-617 und Norverapamil in deutlich höheren Konzentrationen als im Plasma auftraten (von Richter et al.), was die Existenz eines aktiven intestinalen Sekretionsmechanismus wie bereits für Talinolol beschrieben (Gramatté et al. 1996; Gramatté and Oertel 1999; Schwarz et al. 1999) vermuten läßt.

Zum Nachweis von humanem P-Glykoprotein, wurde der gegen ein extrazelluläres Epitop von humanem P-Glykoprotein gerichtete monoklonale Antikörper McAb F4 verwendet. Das von McAb F4 erkannte Epitop ist nicht identisch mit dem anderer Antikörper gegen P-Glykoprotein (C219, MRK16, JSB-1, C494) und nicht in unmittelbarer Nähe zu den hoch konservierten ATP-Bindungsstellen gelegen (Chu et al. 1993). Eine Kreuzreaktivität mit anderen ABC-Transportern, wie für die Antikörper C219 und JSB-1 beschrieben (Okochi et al. 1997), ist daher nicht zu erwarten. Eine Kreuzreaktivität mit MDR-3 P-Glykoprotein kann ausgeschlossen werden (Schinkel et al. 1991).

Des weiteren wurde mithilfe von polarisierten Zelllinien der P-Glykoprotein abhängige Transport von Verapamil und seiner Metabolite D-620, D-617, D-703 und Norverapamil ermittelt. Dazu wurde eine Schweinenierenzelllinie verwendet, die mit humanem L-MDR1 stabil transfiziert ist. Als Negativkontrolle dienten LLC-PK1 Zellen, die kein P-Glykoprotein enthalten. Zur Simulation des Transports im menschlichen Darm wurde die humane Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 verwendet, die neben P-Glykoprotein noch weitere ABC-Transporter wie MRP1, MRP2, MRP3 und MRP 5 exprimiert (Gutmann et al. 1999; Bock et al. 2000; Hirohashi et al. 2000). Alle drei Zelllinien (L-MDR1, LLC-PK1, Caco-2) wachsen auf geeigneten Matrices zu dichten Zellmonolayern heran, die in eine basale und eine apikale Seite polarisieren. Somit kann in diesen Zellen die Translokation von Substanzen in zwei Richtungen, d.h. von apikal nach basal und umgekehrt untersucht werden.

Da mehrere UGT Isoformen die Morphinglucuronidierung katalysieren (Green et al. 1998; Cheng et al. 1999; Coffman et al. 1997), wurde in 4 Enterozyten- und Leberhomogenaten die Morphinglucuronidierung untersucht. Da die vorhandenen Mengen Enterozytenhomogenat für eine detaillierte Analyse der gefundenen biphasischen Enzymkinetik nicht ausreichten,

wurden anstelle dessen Aktivitätsmessungen in Enterozyten- und Leberhomogenaten bei Substratsättigung (20 mM Morphin) durchgeführt. Ziel dieser Untersuchungen war die Ermittlung des Ausmaßes der Morphinglucuronidierung und die Analyse des Verhältnisses der M3G-zu M6G-Bildung in beiden Organen in Hinblick auf die unterschiedlichen pharmakodynamischen Eigenschaften der beiden Metabolite. Da UDP-Glucuronosyltransferasen auf der luminalen Seite des endoplasmatischen Retikulums exprimiert werden, zeigen diese Enzyme eine als Latenzphänomen beschriebene Aktivierung durch nichtionogene Emulgatoren und porenbildende Substanzen (Meech and Mackenzie 1997). Die Morphinglucuronidierung wurde demnach mit und ohne Aktivierung durch das porenbildende Peptid Alamethicin (Little et al. 1997; Fisher et al. 2000) in Enterozyten- und Leberhomogenaten bestimmt. Herkömmliche Emulgatoren wie Brij 58 konnten nicht zur Aktivierung der Morphinglucuronidierung herangezogen werden, da sie mit der Elektronischen Sprühionisation (ESI) des zur Messung von M3G und M6G verwendeten Massenspektrometers interferieren.

Da bislang wenige Erkenntnisse über Arzneimittelinteraktionen existieren, die auf einer Hemmung von UGTs beruhen, wurden vor dem Hintergrund der pharmakodynamischen Effekte von M3G und M6G eine Reihe von Substanzen auf die Hemmung der Morphinglucuronidierung hin getestet. Die Hemmung der Morphinglucuronidierung durch Gabapentin, Codein 1-Naphthol, Testosteron, Naringenin, Grapefruitkernextrakt und Diclofenac wurde untersucht.

Da (Shimoyama et al. 1997) von einer Verstärkung des analgetischen Effekts von Morphin durch die Gabe von Gabapentin berichteten, wurde untersucht, ob dieser Effekt auf einer Hemmung der Morphinglucuronidierung beruht. Codein ist bis auf die Methylierung der Hydroxylgruppe in Position 3 identisch mit Morphin. Der Hauptmetabolit von Codein ist Codein-6-glucuronid, eine Glucuronidierung in Position 3, findet wegen der dort vorhandenen Methoxy-Gruppe nicht statt. Aufgrund dieser Strukturähnlichkeit wurde untersucht, ob Codein selektiv die Morphin-6-glucuronidierung hemmt. 1-Naphthol wird vorwiegend durch UGT1A8 glucuronidiert, die ebenfalls die Glucuronidierung von Morphin katalysiert (Cheng et al. 1999). Durch Hemmversuche mit 1-Naphthol wurde der Anteil von UGT1A8 an der Morphinglucuronidierung ermittelt. Testosteron wird im Körper durch Glucuronidierung eliminiert. Das einzige bis heute identifizierte UGT Isoenzym, das rekombinant exprimiert die Bildung von Morphin-6-glucuronid katalysiert ist UGT2B7 (Coffman et al. 1997). Da Testosteron jedoch nicht durch UGT2B7 glucuronidiert wird (Coffman et al. 1998) wäre eine Hemmung der Morphin-6-glucuronidierung durch Testosteron demzufolge ein Hinweis auf die Existenz weiterer Isoformen, welche die Bildung von Morphin-6-glucuronid katalysieren. Naringenin, das Aglykon des in Pommeranzen (*Citrus aurantium*) gebildeten Flavonoids Naringin, ist als Hemmstoff von CYP1A2, CYP2D6 und CYP3A4 katalysierten Reaktionen in-vitro bekannt (Ameer and Weintraub 1997). Naringenin wird durch UGT1A3 und 1A8 glucuronidiert (Green et al. 1998; Cheng et al. 1999). (Zhu et al. 1998) zeigten, daß Naringenin die Glucuronidierung von Estron und Estradiol mit IC_{50} -Werten von 25 μ M hemmt. Die in Kapselform als Grapefruitkernextrakt verkauften getrockneten Fruchtwände von Pommeranzen (*Citrus aurantium*) werden als Nahrungsmittelzusatz verkauft. Da die

Früchtwände von Pommeranzen einen hohen Naringenin-Gehalt aufweisen, wurde die Hemmung der Morphinglucuronidierung durch einen wässrigen Grapefruitkernextrakt-Auszug bestimmt. Untersuchungen für das dem Morphin strukturell ähnliche Dihydrocodein zeigten eine Hemmung der Dihydrocodeinglucuronidierung durch Diclofenac (Kirkwood et al. 1998). Montgomery et al. (1996) berichteten von der Erhöhung der analgetischen Wirkung von Morphin bei gleichzeitiger Gabe von Diclofenac. Zur Überprüfung, ob diese Interaktion auf einer Hemmung der Morphinglucuronidierung durch Diclofenac beruht, wurden entsprechende Hemmversuche mit Diclofenac durchgeführt.

2 Ergebnisse

2.1 Methodenvalidierung

2.1.1 Proteinanalytik

2.1.1.1 Proteinbestimmung

Die von (Smith et al. 1985) beschriebene Methode der Proteinbestimmung mit Bichinonsäure und Kupfer-II-sulfat, zeichnet sich gegenüber dem von Lowry entwickelten Proteinassay durch eine längere Stabilität des entstehenden Farbkomplexes und eine geringere Störanfälligkeit gegenüber in der Proteinchemie verwendeten Substanzen aus (Lottspeich and Zorbas 1998). Da sehr geringe Proteinmengen insbesondere aus Enterozyten zu erwarten waren, wurde die Proteinbestimmung nach Smith an die Messung in Mikrotiterplatten adaptiert. Die benötigte Proteinmenge pro Messung wurde so um das 5-fache reduziert.

Tabelle 1: Intra-Assay Variabilität der Proteinbestimmung nach Smith.

Kontrolle [µg/ml]	n	Konzentration gemessen [µg/ml]	Richtigkeit Abweichung [%]	Präzision VK [%]
200	5	207	3,7	7,6
600	5	591	-1,6	3,6
1000	5	974	-2,6	4,1

Tabelle 2: Inter-Assay Variabilität der Proteinbestimmung nach Smith, ermittelt an sechs verschiedenen Tagen.

Kontrolle [µg/ml]	n	Konzentration gemessen [µg/ml]	Richtigkeit Abweichung [%]	Präzision VK [%]
400	6	409,2	2,3	8,5
800	6	806,5	0,8	4,7

Die Methode war im Bereich von 200-1000 $\mu\text{g/ml}$ linear. Die Bestimmungsgrenze (LLOQ) wurde bei 200 $\mu\text{g/ml}$ festgelegt. Alle Proben, die außerhalb dieses Bereichs lagen wurden entsprechend verdünnt und ihre Messung wiederholt. Die durchgeführten Proteinbestimmungen wurden als valide angesehen, wenn die Qualitätskontrollen Abweichungen $< \pm 10\%$ von der Richtigkeit aufwiesen.

Die Entstehung des Cu-Farbkomplexes wird u.a. durch EDTA aufgrund seiner komplexierenden Eigenschaften gegenüber zweiwertigen Metallionen gestört (Lottspeich and Zorbas 1998). Da EDTA dem verwendeten Proteinlagerungspuffer in einer Konzentration von 1 mM zugesetzt war, wurden Kontrollmessungen durchgeführt um sicherzustellen, daß keine Beeinträchtigung der Proteinbestimmung besteht. Gegen eine in H_2O bidest. Verdünnte Eichkurve wurden in Proteinlagerungspuffer gelöste BSA-Kontrollen gemessen. Wie aus Tabelle 3 ersichtlich, wurde keine Beeinflussung der Proteinbestimmung nach Smith durch den verwendeten Proteinlagerungspuffer festgestellt. Ein Vergleich mit in H_2O bidest. gelösten Kontrollen ergab keine signifikanten Unterschiede.

Tabelle 3: Einfluß von Proteinlagerungspuffer auf die Proteinbestimmung nach Smith.

Kontrolle [$\mu\text{g/ml}$]	n	Konzentration gemessen [$\mu\text{g/ml}$]	Richtigkeit Abweichung [%]	Präzision VK [%]
200	6	200	0	6,4
600	6	588	-2,0	9,4
1000	6	1093	9,4	7,6

2.1.2 Analytik

2.1.2.1 Bestimmung der Verapamil Metabolite D-620, D-617, D-702, D-703 und Norverapamil aus Inkubationslösungen

Der von (Kroemer et al. 1993) entwickelte HPLC Assay für die Bestimmung von Verapamil Metaboliten weist Laufzeiten von über 60 Minuten auf und war somit angesichts der hohen Anzahl durchzuführender Verapamil-Inkubationen ungeeignet. Daher wurde auf eine mit höherer Trennleistung bei reduzierten Laufzeiten versehene Säule zurückgegriffen. Um die Bestimmungsgrenze (LLOQ) der Verapamil Metabolite von 10 pmol herabzusetzen, wurde ein massenspektrometrischer Detektor verwendet.

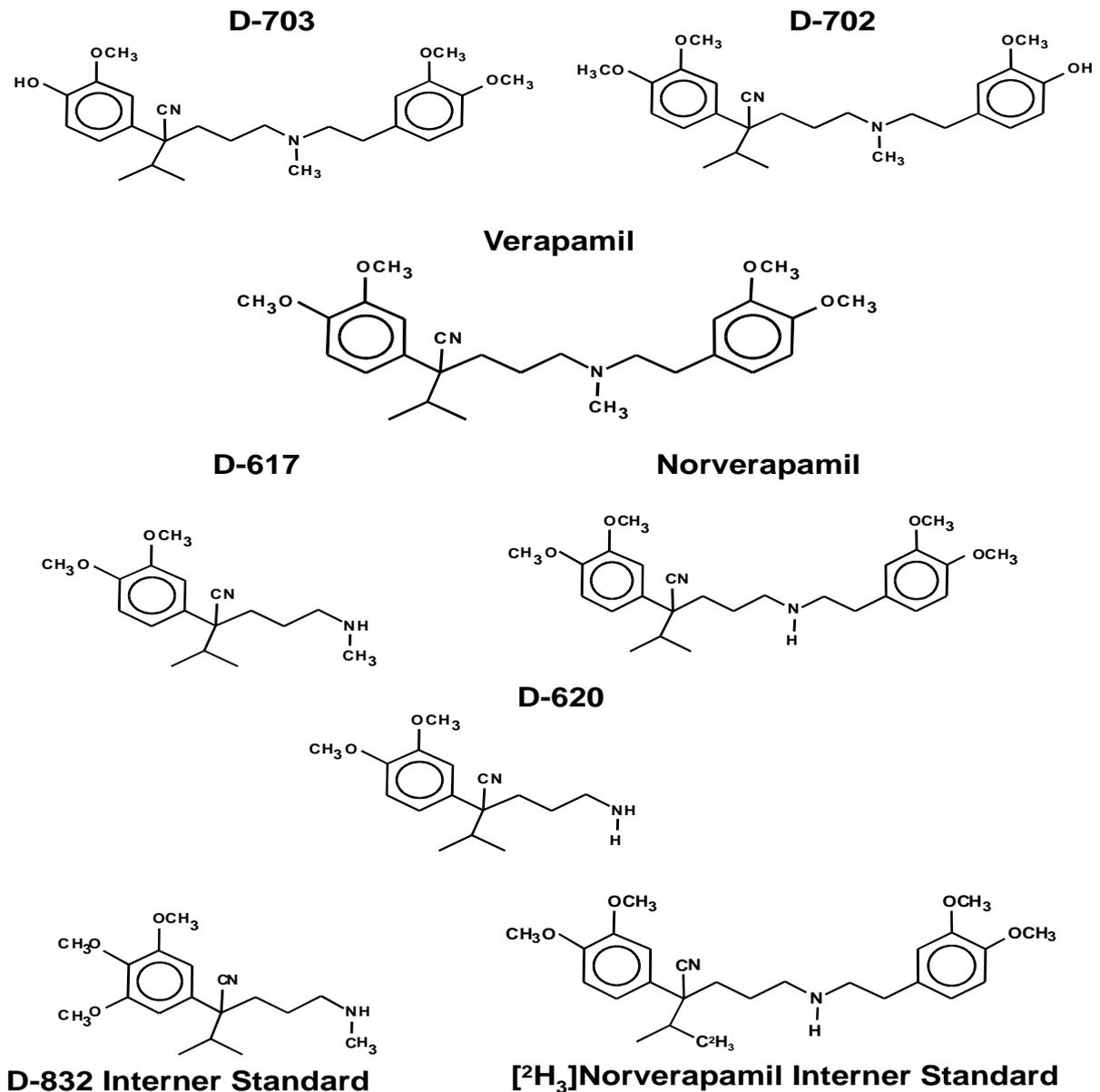


Abbildung 2: Strukturformeln von Verapamil und Metaboliten

2.1.2.1.1 Chromatographie

Da es sich bei den zu messenden Verapamil Metaboliten um primäre und sekundäre Amine (D-620, D-617) als auch um tertiäre Amine (D-702, D-703 und Norverapamil) mit erheblichen Unterschieden in ihren physikochemischen Eigenschaften handelt, wurden zwei interne Standards verwendet. D-832, das Gallopamil Analogon zu D-617, wurde zur Standardisierung von D-620 und D-617 herangezogen, während [2H₃]Norverapamil als interner Standard für D-702, D-703 und Norverapamil benutzt wurde. Die chromatographischen Bedingungen wurden auf eine Trennung von Verapamil und Norverapamil hin optimiert, um Ionensuppressionseffekte durch Verapamil, das als Substrat in hohen Konzentrationen verwendet wurde, zu vermeiden. Zur Kontrolle wurde daher bei allen Messungen Verapamil UV-photometrisch bei 254 nm detektiert. Gleichzeitig mußten D-702, D-703 und

Norverapamil getrennt werden, da alle mit der gleichen Masse m/z 441 detektiert wurden. Die Retentionszeiten waren 8,4 Minuten für D-703, 9,3 Minuten für D-702 und 12,2 Minuten für Norverapamil (Abbildung 3).

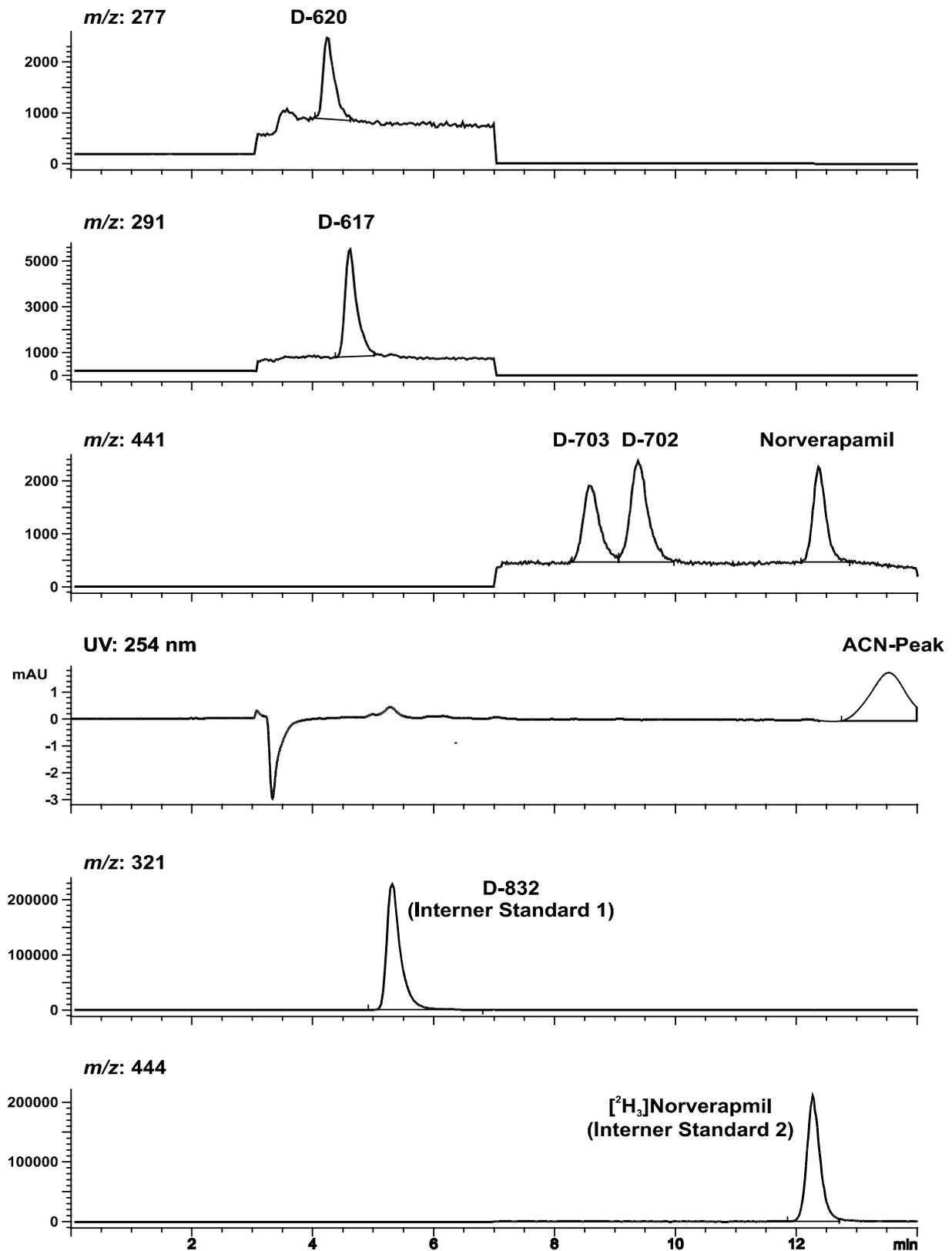


Abbildung 3: Massenspektrometrisches Chromatogramm einer mit 1 pmol D-620, D-617, D-703, D-702, Norverapamil und 50 pmol D-832, [²H₃]Norverapamil versetzten Kontrolllösung.

2.1.2.1.2 Massenspektrometrie

Es wurden die durch positive Ionisierung (ESI) entstehenden protonierten Molpeaks (MH^+) der einzelnen Substanzen zur Detektion verwendet. Unter den angegebenen Bedingungen resultierte für alle Metabolite eine Fragmentierung von weniger als 5% mit der Ausnahme von D-620. Das Massenspektrum von D-620 wies ein Fragment mit m/z 260 auf, welches die Detektion der anderen Metabolite nicht beeinflusste.

2.1.2.1.3 Richtigkeit und Präzision

Die Methode ist für alle Metabolite von 1-500 pmol linear. Angaben zur Intra-Assay Variabilität sind in Tabelle 4 aufgeführt. Die Inter-Assay Variabilität wurde an sechs verschiedenen Tagen ermittelt (Tabelle 5)

Tabelle 4: Intra-Assay Variabilität zur Bestimmung von D-620, D-617, D-702, D-703 und Norverapamil aus Inkubationslösungen.

Metabolit	Kontrolle [pmol]	n	Meßwert [pmol]	Richtigkeit (Abweichung) [%]	Präzision (VK) [%]
D-620	1	4	1,0	3,9	4,4
	5	4	4,8	-3,9	1,9
	50	4	49,2	-1,6	2,3
	250	4	240	-4,0	3,7
D-617	1	4	0,9	-12,7	4,7
	5	4	5,0	0,5	1,1
	50	4	53,3	6,5	1,5
	250	4	255,7	2,3	0,7
D-703	1	4	1,0	-2,5	2,9
	5	4	4,6	-7,1	3,3
	50	4	51,0	1,9	4,2
	250	4	256,5	2,6	1,7
D-702	1	4	1,0	3,4	1,5
	5	4	4,8	-4,6	2,0
	50	4	52,4	4,8	3,8
	250	4	250,8	0,3	2,3
Norverapamil	1	4	1,1	14,1	4,8
	5	4	4,4	-11,0	1,8
	50	4	48,7	-2,7	5,8
	250	4	258,7	3,5	2,8

Tabelle 5: Inter-Assay Variabilität zur Bestimmung von D-620, D-617, D-702, D-703 und Norverapamil aus Inkubationslösungen

Metabolit	Kontrolle [pmol]	n	Meßwert [pmol]	Richtigkeit (Abweichung) [%]	Präzision (VK) [%]
D-620	10	6	9,7	-3,3	4,0
	50	6	49,6	-0,8	3,8
	250	6	256,7	3,2	2,7
D-617	10	6	9,8	-2,0	1,8
	50	6	50,2	0,5	1,9
	250	6	254,5	1,8	1,4
D-703	10	6	9,9	-1,4	5,8
	50	6	51,3	2,6	6,7
	250	6	259,1	3,7	5,1
D-702	10	6	10,2	1,5	5,4
	50	6	52,2	4,4	7,5
	250	6	258,5	3,4	4,7
Norverapamil	10	6	9,5	-4,6	6,9
	50	6	48,7	-2,6	7,4
	250	6	259,3	3,7	6,8

Die untere Quantifizierungsgrenze (LLOQ) lag für alle Verapamil Metabolite bei 1 pmol. Die Nachweisgrenze der Methode (LOD) waren 0,5 pmol für D-620, D-703, D-702 und Norverapamil bzw. 0,25 pmol für D-617.

2.1.2.2 Bestimmung von 4'-OH-Diclofenac aus Inkubationslösungen

(Landsdorp et al. 1990) entwickelten den ersten HPLC Assay zur Messung von Diclofenac und seiner vier hydroxylierten Metabolite. Die hohe Nachweisgrenze von 65 pmol/ml und Laufzeiten von 45 Minuten bei schlechter Trennung der Metabolite machen diese Methode ungeeignet. Die von (Schmitz et al. 1993) veröffentlichte HPLC Methode weist eine gute chromatographische Trennung aller Metabolite bei einer Laufzeit von unter 10 Minuten auf. Die Bestimmungsgrenze mit UV-Detektion von 160 pmol/ml machte allerdings den Einsatz von 1,9 mg Protein pro Inkubation notwendig. Die verwendete UV-Detektion war folglich unzureichend, um 4'-Hydroxydiclofenac mit hoher Sensitivität aus Inkubationslösungen zu messen und somit materialschonend, d.h. mit der geringst möglichen Menge Protein pro Inkubation zu arbeiten. In Anlehnung an die von (Schmitz et al. 1993) beschriebene chromatographische Trennung der Diclofenac Metabolite wurde eine hochsensitive HPLC-MS Methode zur Bestimmung von 4'-Hydroxydiclofenac aus Inkubationslösungen entwickelt.

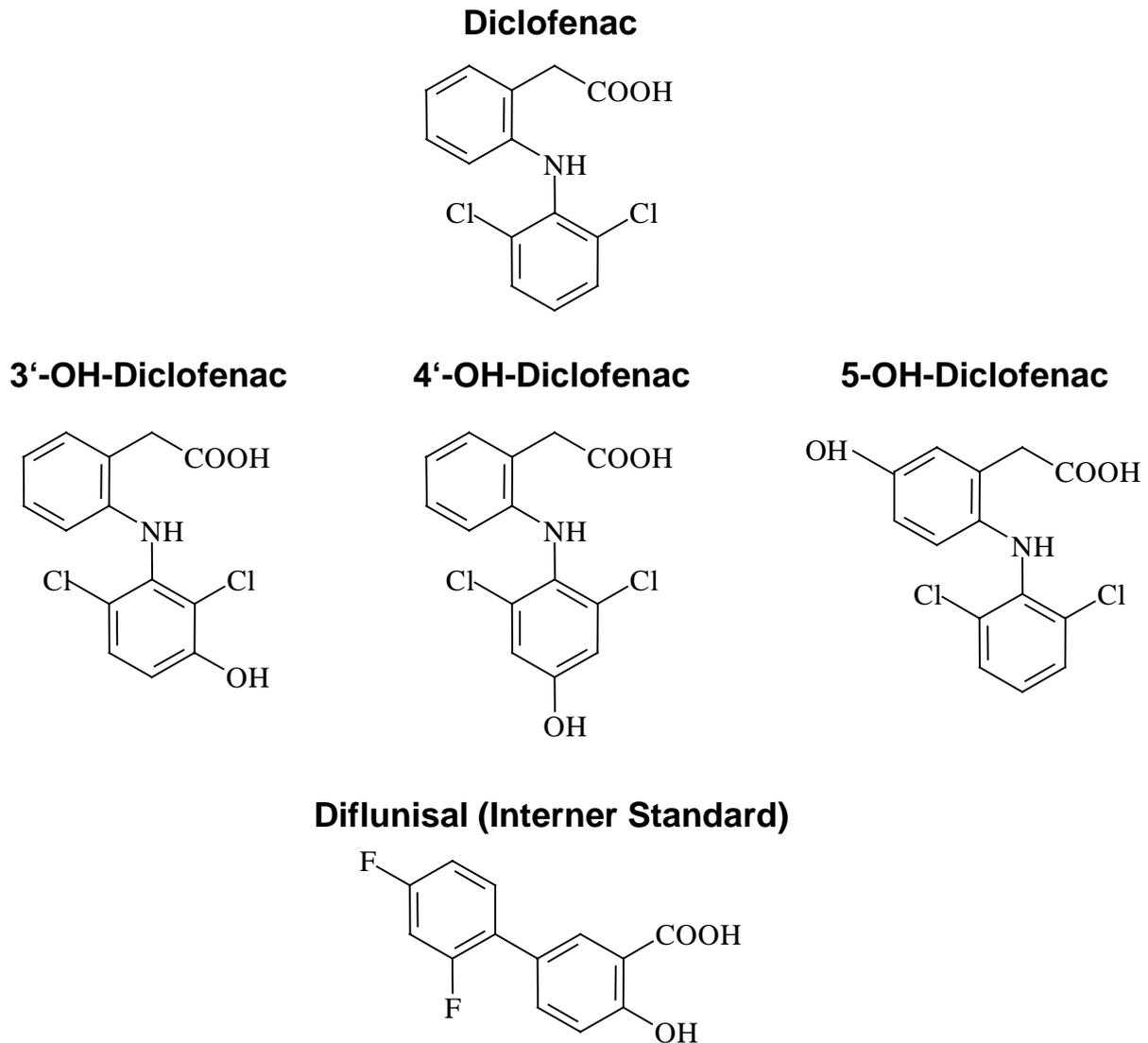


Abbildung 4: Strukturformeln von Diclofenac und Metaboliten.

2.1.2.2.1 Chromatographische Trennung

Der von (Schmitz et al. 1993) verwendete interne Standard Dibromfenac war für eine HPLC-MS Methode unzureichend, da Dibromfenac unmittelbar nach dem Substrat Diclofenac eluiert, so daß Ionensuppressionseffekte in Abhängigkeit von den verwendeten Diclofenackonzentrationen zu erwarten gewesen wären. Daher wurde Diflunisal [2',4'-Difluoro-4-hydroxy-(1,1'-biphenyl)-3-carboxylsäure] als interner Standard ausgewählt, dessen physikochemische Eigenschaften denen der hydroxylierten Diclofenac Metabolite ähneln. Eine chromatographische Trennung von 3'-, 4' und 5-Hydroxydiclofenac war notwendig, weil alle drei Metabolite mit einer Masse von m/z 310 detektiert wurden. Die Chromatographie von Diclofenac und seiner Hydroxylmetabolite ist in Abbildung 5 dargestellt.

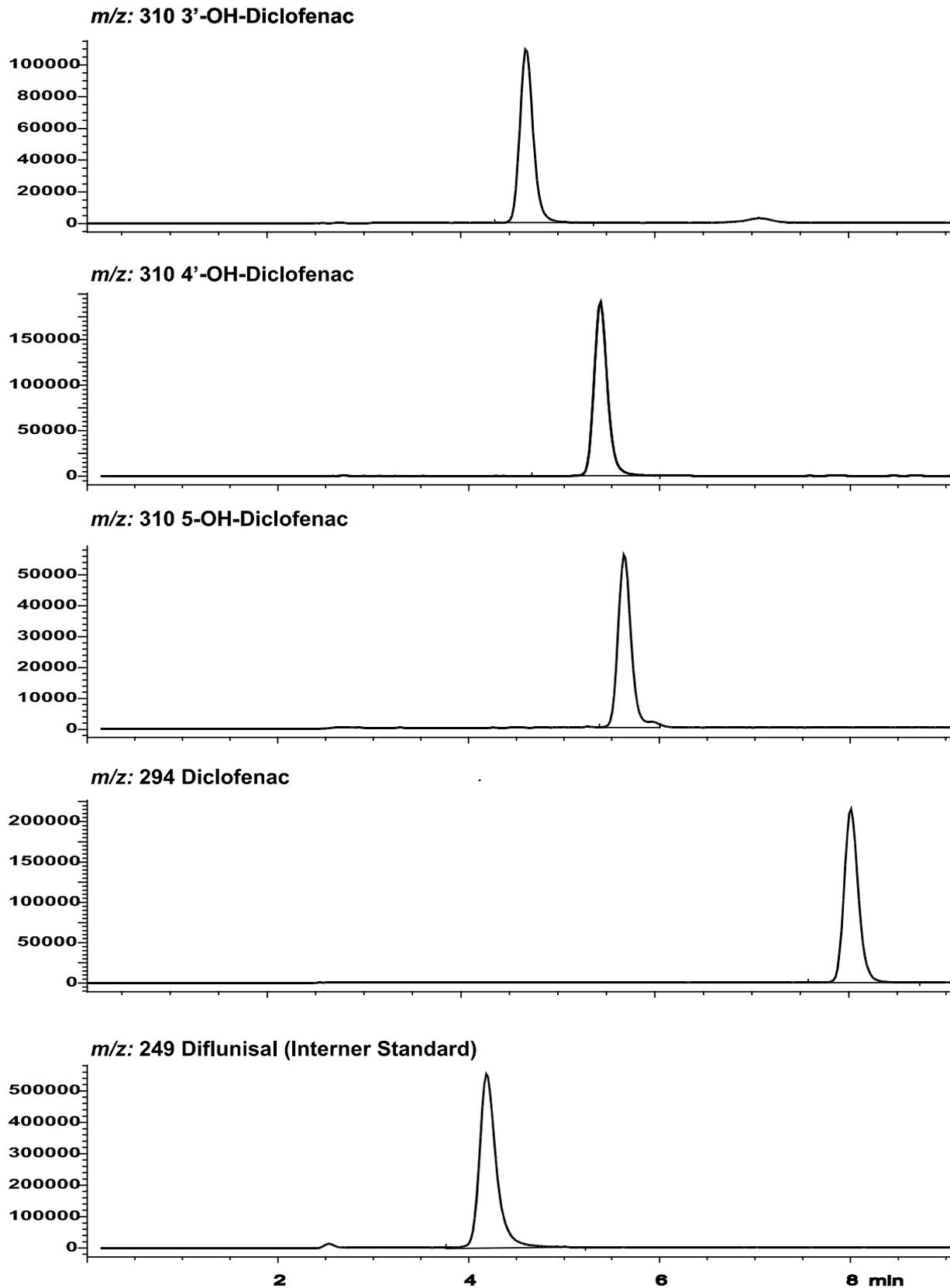


Abbildung 5: Chromatographische Trennung von Diflunisal: (4,2 Min), 3'-Hydroxydiclofenac: (4,7Min), 4'-Hydroxydiclofenac: (5,4 Min), 5-Hydroxydiclofenac: (5,7 Min) und Diclofenac: (7,9 Min).

2.1.2.2.2 Massenspektrometrie

Zur massenspektrometischen Detektion von Diflunisal und 4'-OH-Diclofenac wurden die negativ ionisierten Molpeaks ($[M-H]^-$: m/z 249, m/z 310) verwendet. Unter den angegebenen Bedingungen resultierte für Diflunisal eine Fragmentierung von weniger als 5%. 4'-OH-Diclofenac wurde durch den Abgang der Carboxylgruppe zu einem Fragment mit m/z 266 von gleicher Signalstärke aufgespalten.

2.1.2.2.3 Richtigkeit und Präzision

Die Methode weist einen linearen Bereich von 5-1000 pmol auf. Die Intra-Assay Variabilität ist in Tabelle 6 angegeben. Die Inter-Assay Variabilität wurde durch Messung an sechs verschiedenen Tagen ermittelt (Tabelle 7)

Tabelle 6: Intra-Assay Variabilität der 4'-OH-Diclofenac Bestimmung in Inkubationslösungen.

4'-OH-Diclofenac Kontrolle [pmol]	n	4'-OH-Diclofenac gemessen [pmol]	Richtigkeit (Abweichung) [%]	Präzision (VK) [%]
5	4	5,3	5,5	2,9
50	4	51,5	3,0	1,7
250	4	253,2	1,3	1,3

Tabelle 7: Inter-Assay Variabilität der 4'-OH-Diclofenac Bestimmung in Inkubationslösungen.

4'-OH-Diclofenac Kontrolle [pmol]	n	4'-OH-Diclofenac gemessen [pmol]	Richtigkeit (Abweichung) [%]	Präzision (VK) [%]
5	6	5,8	16,6	12,0
50	6	51,0	2,1	7,4
250	6	250,0	0,0	6,0

Als untere Quantifizierungsgrenze (LLOQ) wurden 5 pmol betrachtet (Abbildung 6). Die Nachweisgrenze der Methode (LOD) war bei 1 pmol. Für Aussagen zur Stabilität der Stamm- und Arbeitslösungen wurde auf Angaben des Herstellers (Gentest, Frankfurt a.M.) zurückgegriffen, der die Stabilität der Lösungen bei einer Lagerungstemperatur von -20°C mit einem Jahr angibt.

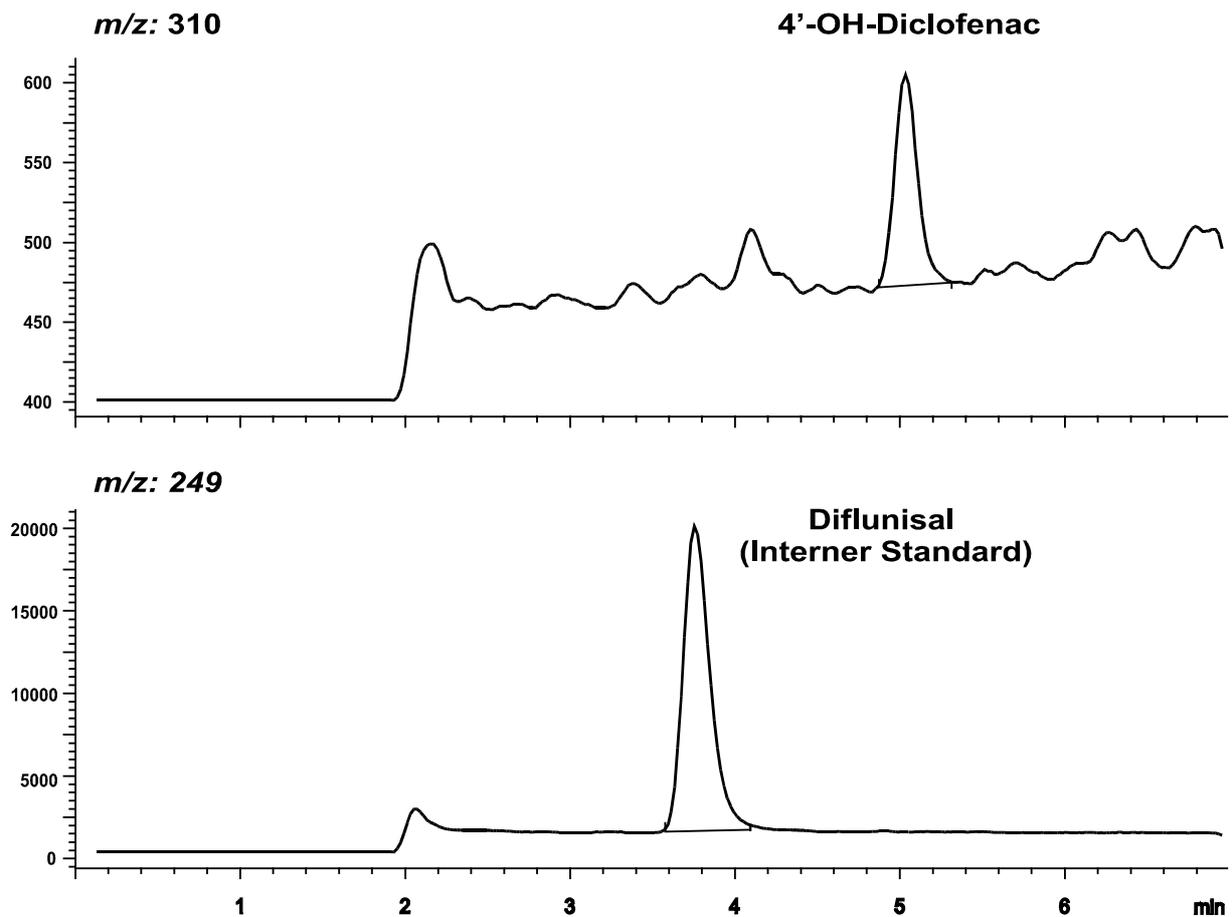


Abbildung 6: Massenspektrometrisches Chromatogramm einer mit 5 pmol 4'-OH-Diclofenac und 50 pmol Diflunisal versetzten Kontrolllösung.

2.1.2.3 Bestimmung von Morphin-3- und Morphin-6-glucuronid aus Inkubationslösungen

Die Bestimmung von M3G und M6G aus Inkubationslösungen beruhte auf einer von (Schänzle et al. 1999) entwickelten LC-MS Methode, die sich durch eine sehr hohe Messempfindlichkeit auszeichnet. Die Methode wurde an die Bestimmung der Morphinglucuronide aus Inkubationslösungen adaptiert.

2.1.2.3.1 Chromatographische Trennung

Die chromatographische Trennung von M3G, M6G und Morphin wurde gegenüber der ursprünglichen Methode optimiert, da Morphin in sehr hohen Konzentration (20 mM) als Substrat in den Inkubationslösungen enthalten war und die Trennung der Morphinglucuronide beeinträchtigte. M3G wurde unter diesen Bedingungen nach 2,7-, M6G nach 4,1 Minuten eluiert (Abbildung 8). Um ein Überladen der Säule durch Morphin zu vermeiden wurde bei Proben in denen 5 mM oder mehr Morphin enthalten war das Injektionsvolumen auf 4 μ l gesenkt.

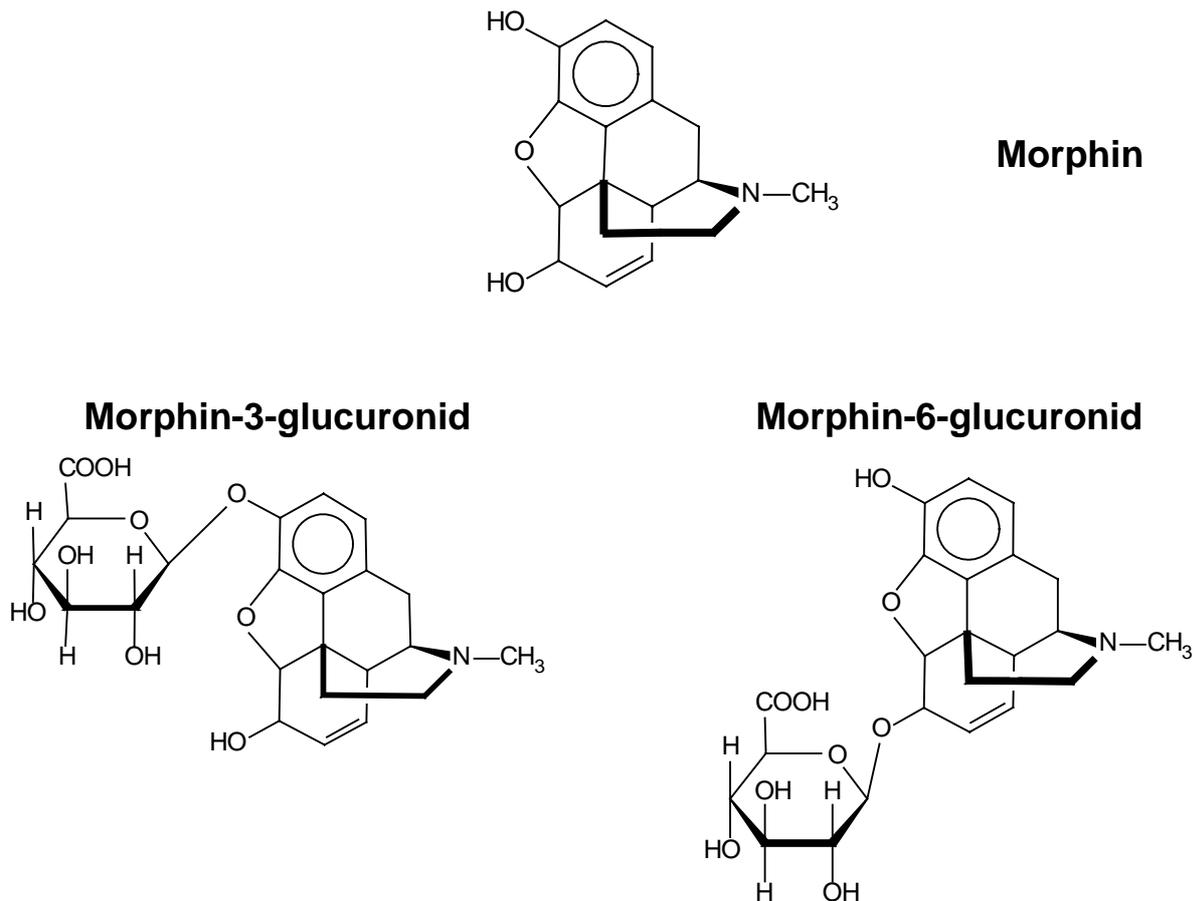


Abbildung 7: Strukturformeln von Morphin und Glucuronosylsäure-Konjugaten.

2.1.2.3.2 Massenspektrometrie

Die Morphinglucuronide enthalten eine tertiäre Aminogruppe mit entsprechenden basischen Eigenschaften und sind daher mittels ESI gut zu ionisieren. Zur massenspektrometrischen Detektion von M3G und M6G wurden demnach die positiv ionisierten Molpeaks (MH^+) mit m/z 462 verwendet. Unter diesen Bedingungen fragmentierten die Morphinglucuronide zu protoniertem Morphin bei m/z 286. Nach Optimierung der MS Parameter (Gas Temperatur, Sprühdruck, N_2 Volumenstrom, Kapillarspannung) konnte die Signalstärke dieses Fragment auf unter 8% des Signals bei m/z 462 gesenkt werden. Die entsprechenden internen Standards $[^2H_3]M3G$ und $[^2H_3]M6G$ wurden bei m/z 465 detektiert.

2.1.2.3.3 Richtigkeit und Präzision

Die Methode ist für M3G von 2,5-2500 pmol und für M6G von 0,5-500 pmol linear. Die Intra-Assay Variabilität ist in Tabelle 8 angegeben. Die Inter-Assay Variabilität wurde durch Messung an sechs verschiedenen Tagen ermittelt (Tabelle 9).

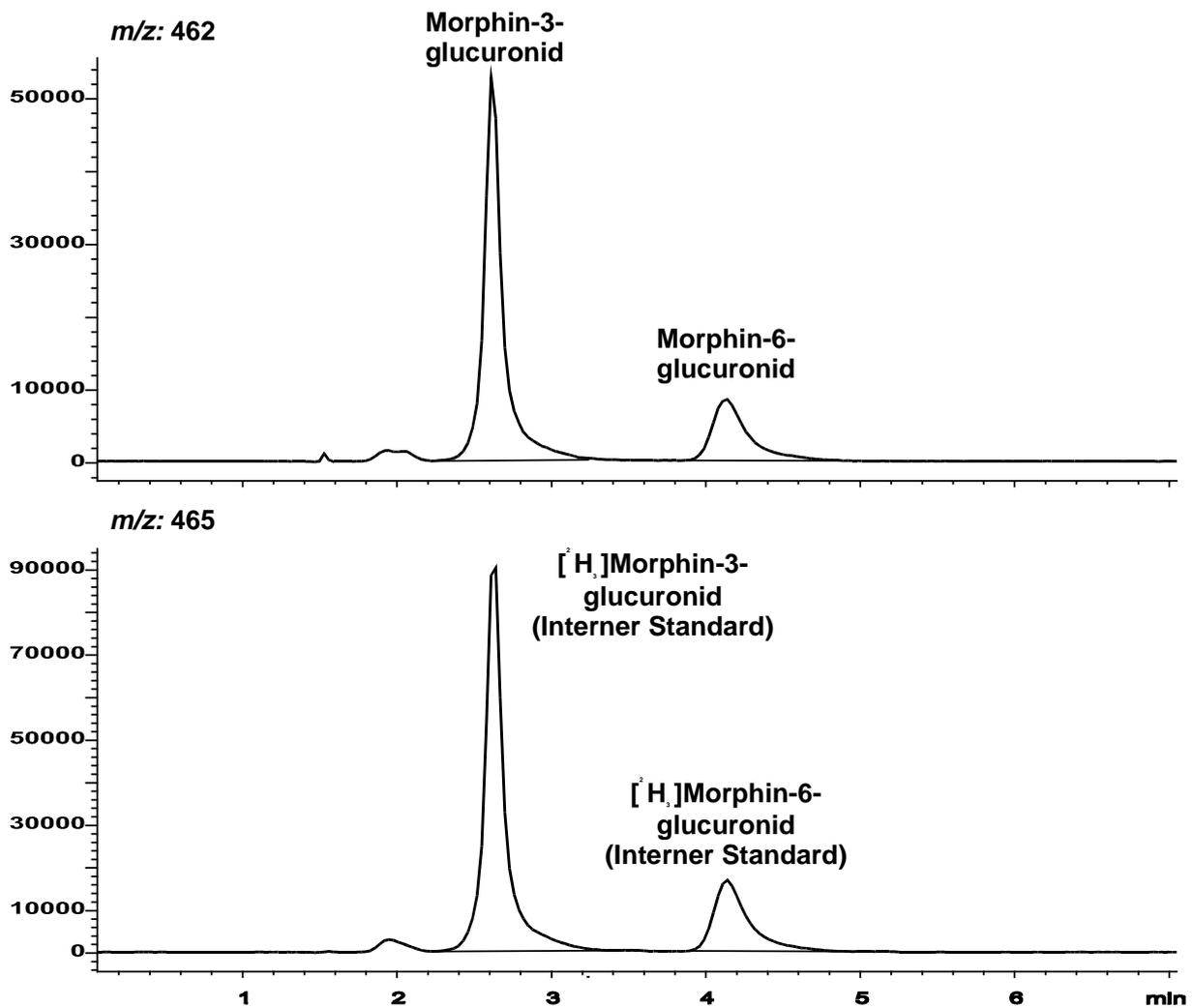


Abbildung 8: Massenspektrometrisches Chromatogramm einer mit 250 pmol M3G, 50 pmol M6G und 500 pmol bzw. 100 pmol der internen Standards $[^2\text{H}_3]\text{M3G}/[^2\text{H}_3]\text{M6G}$ versetzten Kontrolllösung.

Tabelle 8: Intra-Assay Variabilität der M3G und M6G Bestimmung in Inkubationslösungen

	Kontrolle [pmol]	n	Meßwert [pmol]	Richtigkeit (Abweichung) [%]	Präzision (VK) [%]
M3G	3	4	3,1	4,7	3,2
	10	4	9,9	-0,8	6,9
	250	4	250,1	0,04	1,3
	2500	4	2423,0	-3,1	3,4
M6G	1	4	1,1	6,4	1,7
	2	4	2,0	-0,1	2,9
	50	4	52,4	4,7	2,0
	500	4	496,8	-0,7	3,2

Tabelle 9: Inter-Assay Variabilität der M3G und M6G Bestimmung in Inkubationslösungen

	Kontrolle [pmol]	n	Meßwert [pmol]	Richtigkeit (Abweichung) [%]	Präzision (VK) [%]
M3G	12,5	6	13,0	3,9	5,3
	250	6	247,9	-0,8	3,3
	2500	6	2480,3	-0,8	1,1
M6G	2,5	6	2,5	1,7	3,5
	50	6	49,0	-1,9	2,1
	500	6	503,1	0,6	1,0

Die untere Quantifizierungsgrenze (LLOQ) lag für M3G bei 3 pmol und für M6G bei 1 pmol. Die Nachweisgrenze war für beide Glucuronide bei 0,25 fmol.

2.1.2.4 Einfluß von Proteasehemmstoffen und Hyaluronidase auf Enzymaktivitäten

Um einen Einfluß der eingesetzten Proteasehemmstoffe und Hyaluronidase auf die Verapamil- bzw. Diclofenac-Oxidation und Morphin-3/6-glucuronidierung auszuschließen, wurden Kontrollexperimente mit einem Lebermikrosomenmix dreier Leberproben (KL 8, 12, 24) durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 10 dargestellt. Derartige Effekte waren insbesondere für PefaBloc SC zu erwarten, da diese Substanz z.T. irreversibel an die Aminosäure Serin bindet (Markwardt et al. 1974).

Tabelle 10: Einfluß von Proteasehemmstoffen und Hyaluronidase auf den. Verapamil- (250 µM), Diclofenac- (100 µM) und Morphin-(5 mM) Metabolismus. Die Inkubationen wurden mit in 0,1 M Tris-Puffer gelagerten Lebermikrosomenmix durchgeführt. Gezeigt werden die Abweichungen vom Kontrollwert in %.

Protease	Abweichung von D-617 Kontrolle [%]	Abweichung von D-703 Kontrolle [%]	Abweichung von 4-OH-Diclofenac Kontrolle [%]	Abweichung von M3G Kontrolle [%]	Abweichung von M6G Kontrolle [%]
PefaBloc SC 1 mM	10,8 ± 5,8	-7,5 ± 2,1	-3,8 ± 1,2	-10,8 ± 2,8	-11,6 ± 2,2
EDTA 1 mM	2,9 ± 2,9	0,3 ± 3,7	-3,8 ± 0,6	-11,0 ± 5,3	-9,4 ± 6,7
Pepstatin 1 µg/ml	19,8 ± 4,6	0,3 ± 1,8	0,5 ± 1,4	-4,3 ± 3,0	-1,1 ± 4,2
Leupeptin 1 µg/ml	14,0 ± 4,4	8,7 ± 4,7	1,6 ± 5,1	-8,6 ± 0,6	-10,7 ± 0,1
Hyaluronidase 2 I.E./ml	8,7 ± 3,9	8,7 ± 2,1	-5,2 ± 2,4	-7,2 ± 0,3	-10,9 ± 0,4
Proteinlagerungspuffer	10,9 ± 4,4	0,6 ± 3,0	-3,2 ± 2,1	-8,3 ± 3,0	-7,2 ± 3,3

Pepstatin und Leupeptin zeigten bei 1 µg/ml eine Aktivierung der CYP3A4 katalysierten N-Desalkylierung von Verapamil zu D-617. PefaBloc erniedrigte die Morphinglucuronidierung um mehr als 10%. Das Gemisch aller im Proteinlagerungspuffer enthaltenen Proteasehemmstoffen veränderte die Kontrollaktivitäten der D-617-, D-703-, 4'-OH-Diclofenac- und Morphin-3/6-glucuronidbildung jedoch um weniger als ± 10%.

2.1.3 Immunoblots

2.1.3.1 Validierung des Proteintransfers auf PVDF-Membranen

Zur Validierung der absoluten Quantifizierung von Cytochrom P450 Enzymen gegen rekombinante Standards, war die Ermittlung der Transfereffizienz der verwendeten Tankblotapparatur und Transferpuffer im Vorfeld notwendig. Dazu wurden verschiedenen Mengen (10, 25, 50, 100 µg) TN5 Zellhomogenat elektrophoretisch getrennt und aus den entsprechenden Gelen 1-, 2- und 3 h bei einer konstanten Stromstärke von 100 V in einer Tankblotapparatur auf PVDF-Membranen transferiert. Nach beendetem Transfer wurden im Gel verbleibende Proteine mit Coomassie-Blau angefärbt (Nachweisgrenze) und der Transfer auf die Membranen durch Anfärben mit Ponceau S überprüft. Unter den gewählten Transferbedingungen war kein vollständiger Transfer der Proteine aus dem Gel festzustellen, wie

Abbildung 9 zeigt. Eine Erhöhung der Elektrophoretendauer auf 2- bzw. 3 h und die Verwendung von 0,75 mm anstelle von 1,5 mm dicken Gelen hatte keinen Einfluß auf die verbleibenden Proteinmengen im Gel und auf die Transfereffizienz.

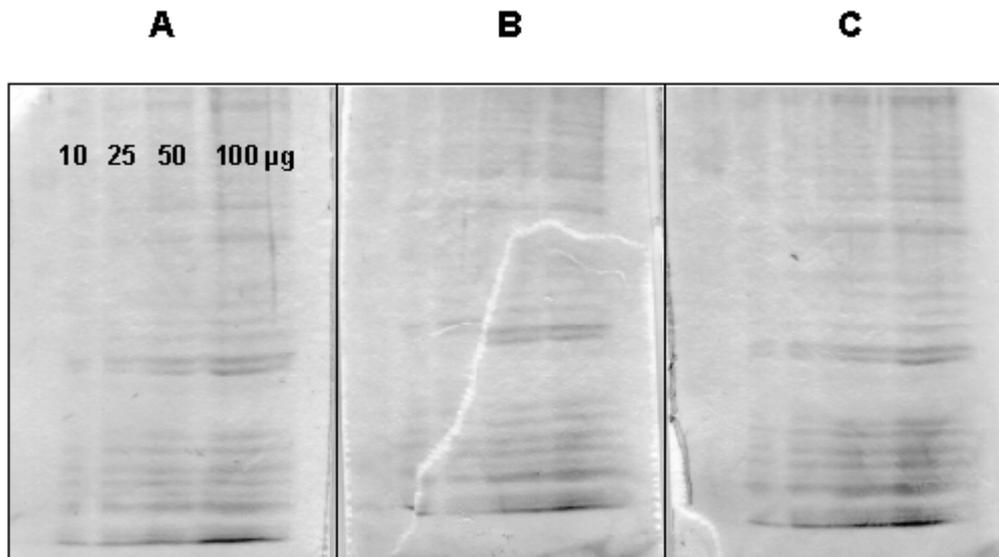


Abbildung 9: Coomassie Färbung von Polyacrylamidgelen (10%; 1,5 mm Dicke) nach 1- (A), 2- (B) und 3-stündigem (C) Transfer bei konst. 100 V in einer Tankblotapparatur. Angefärbt sind im Gel verbliebene, nicht transferierte Proteine TN5 Zellhomogenat (10, 25, 50, 100 µg aufgetragen).

Zur Erhöhung der Transfereffizienz wurden dem Transferpuffer 0,1% SDS zugesetzt und o.a. Experiment wiederholt. Nach einstündigem Transfer war kein Protein mehr im Gel nachzuweisen. Die Ponceau Färbung der entsprechenden Membranen zeigte allerdings wesentlich weniger gebundenes Protein auf der Membran verglichen mit einem Transfer ohne den Zusatz von SDS (Abbildung 10), da SDS das Anhaften der Proteine auf positivierten PVDF Membranen behindert (Ausubel et al. 1998).

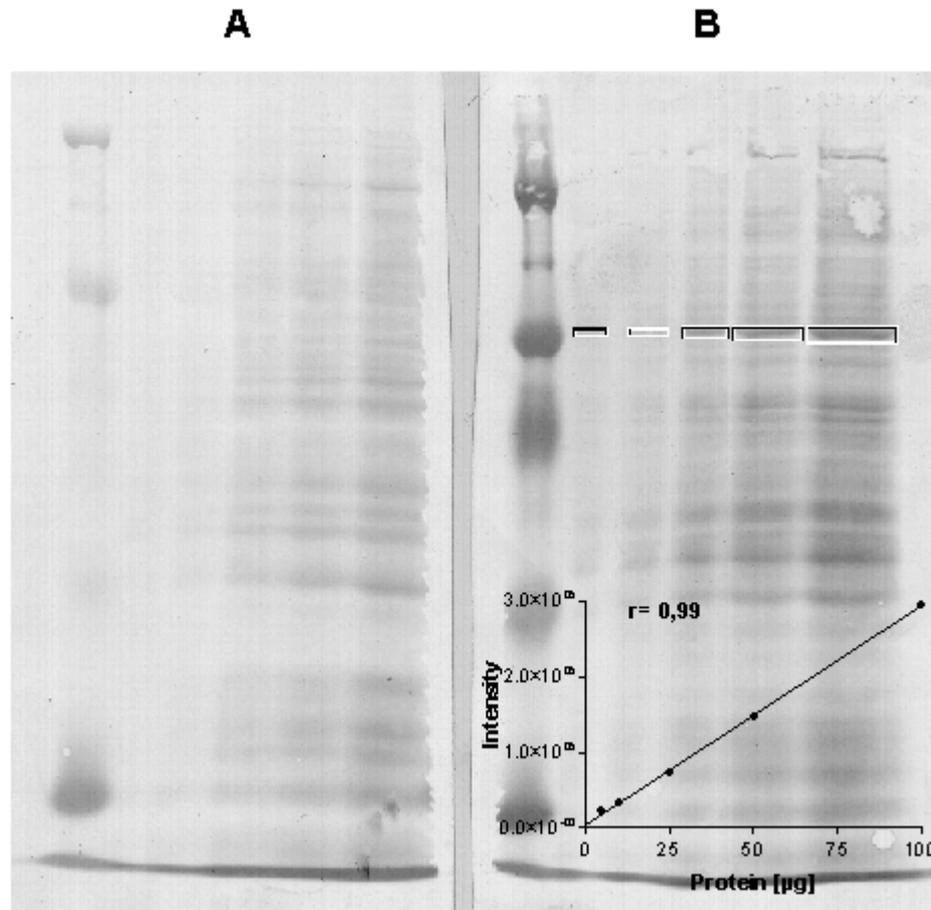


Abbildung 10: Ponceau Färbung von PVDF-Membranen nach Transfer mit 0,1% SDS (A) und ohne (B) von 5, 10, 25, 50 und 100 µg TN5 Zellhomogenat aus Polyacrylamidgelen (10%; 1,5 mm Dicke) einschließlich Korrelation zwischen aufgetragener Proteinmenge TN5 Zellhomogenat und transferierten, auf der Membran gebundenen, mittels Ponceau Färbung detektierten Protein.

Folglich wurde auf Transferpuffer ohne SDS-Zusatz zurückgegriffen. Eine Eichung gegen Slot Blots verschiedener rekombinanter Standards, wie von (Lown et al. 1997) gezeigt, wäre unter diesen Bedingungen aufgrund des unvollständigen Proteintransfers fehlerhaft gewesen. Folglich wurden Eichlösungen entsprechender rekombinanter Standards auf jedem Gel mit aufgetragen und analog zu den Proben transferiert und gemessen.

2.1.3.2 Auswahl des geeigneten Detektionsverfahrens

Zur Detektion aller zu analysierenden Antigene in Enterozyten- und Leberhomogenaten wurde durch Peroxidase (POD) vermittelte Chemilumineszenz eingesetzt, die sich durch eine höhere Nachweisempfindlichkeit gegenüber herkömmlichen kolorimetrischen Verfahren (BCIP/NBT) auszeichnet (Ausubel et al. 1998).

Aus der Vielzahl der kommerziell verfügbaren Chemilumineszenz-Substrate wurden die beiden mit der intensivsten Lichtemission (ECL⁺, AmershamPharmacia und SuperSignal Dura, Pierce) getestet. Die Affinität zur Peroxidase war für beide Substrate vergleichbar

(K_m : ECL⁺: $10,9 \pm 6,5$ mU POD; K_m : SuperSignal Dura: $11,8 \pm 5,3$ mU POD). Die Halbwertszeit der Lichtemission betrug für ECL⁺ 15- und für SuperSignal 90 Minuten. Somit wurde im folgenden SuperSignal als Detektionsreagenz verwendet, da es sich für längere Expositionszeiten eignet, die zur Immunoquantifizierung von geringen Mengen Protein benötigt werden.

2.1.3.3 Validierung der CYP2C8 Quantifizierung

Die Spezifität des verwendeten CYP2C8 Antikörpers (Kaninchen Anti-CYP2C8 IgG; Immunogen: humanes gereinigtes CYP2C8, Research Diagnostic) wurde gegen eine Auswahl der 12 für den Arzneimittelmetabolismus relevantesten CYPs getestet. Die Kreuzreaktivität relativ zu CYP2C8 betrug 63,2% für CYP2D6, 80,7% für CYP2C18 und 25,7% für CYP2C19, die alle aufgrund ihrer höheren Mobilität in dem 10% PAA Gel von der CYP2C8 Hauptbande zu trennen waren. In rekombinatem CYP2C8, 9, 18 und CYP2C19 war eine weitere Bande bei 45 kDa zu erkennen.

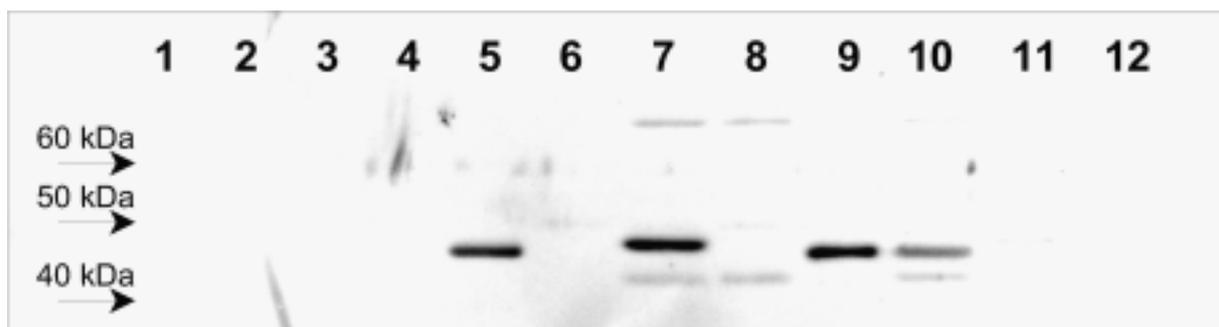


Abbildung 11: Spezifität des Anti-CYP2C8 IgGs. Aufgetragen wurden 500 fmol CYP1A1 (1), CYP1A2 (2), CYP2A6 (3), CYP2B6 (4), CYP2D6 (5), CYP2E1 (6), CYP2C8 (7), CYP2C9 (8), CYP2C18 (9), CYP2C19 (10), CYP3A4 (11), CYP3A5 (12) und in einem 10% PAA Gel elektrophoretisch getrennt.

Da alle CYP-Isoenzyme sowie P-Glykoprotein jeweils an einem Tag mit identischen Geräten und Lösungen gemessen wurden, wurde auf eine Bestimmung der Inter-Assay Variabilität an verschiedenen Tagen verzichtet. Im folgenden sind Angaben zur Richtigkeit und Präzision der CYP2C8 Quantifizierung mittels Immunoblot demnach nur an einem Tag als Intra-Assay Variabilität ermittelt angegeben. Entsprechende Daten zur Bestimmung von CYP2C8 finden sich in Tabelle 11.

Tabelle 11: Intra-Assay Variabilität der CYP2C8 Bestimmung mittels Immunoblot.

Kontrolle [fmol]	n	Enzymmenge gemessen [fmol]	Richtigkeit Abweichung [%]	Präzision VK [%]
100	4	76,1	-23,9	17,6
500	4	579,4	15,9	8,0
1000	4	1165,2	16,5	9,5

2.1.3.4 Validierung der CYP2C9 Quantifizierung

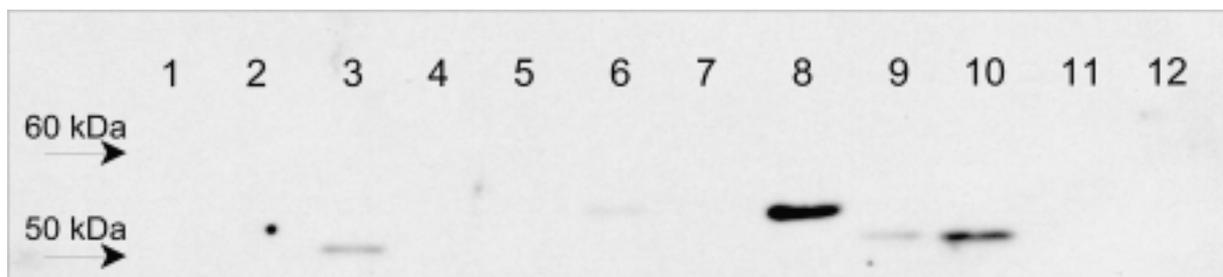


Abbildung 12: Spezifität des Anti-CYP2C9 IgGs. Aufgetragen wurden 500 fmol CYP1A1 (1), CYP1A2 (2), CYP2A6 (3), CYP2B6 (4), CYP2D6 (5), CYP2E1 (6), CYP2C8 (7), CYP2C9 (8), CYP2C18 (9), CYP2C19 (10), CYP3A4 (11), CYP3A5 (12) und in einem 10% PAA Gel elektrophoretisch getrennt.

Der Spezifitätstest des verwendeten CYP2C9 Antikörpers (Kaninchen Anti-CYP2C9 IgG; Immunogen: humanes gereinigtes CYP2C9, Research Diagnostic) ergab eine Kreuzreaktivität von 53,0% für CYP2C19, 7,5% für CYP2C18 und 11,2% für CYP2A6 relativ zu CYP2C9. Die kreuzreagierenden CYPs wiesen in einem 10% PAA Gel alle höhere R_f -Werte auf und waren somit von der CYP2C9 Hauptbande zu trennen, was eine selektive CYP2C9 Messung ermöglichte. Die Richtigkeit und Präzision der CYP2C9 Quantifizierung als Intra-Assay Variabilität ist in Tabelle 12 angegeben.

Tabelle 12: Intra-Assay Variabilität der CYP2C9 Bestimmung mittels Immunoblot.

Kontrolle [fmol]	n	Enzymmenge gemessen [fmol]	Richtigkeit Abweichung [%]	Präzision VK [%]
125	4	141,9	13,5	4,0
500	4	612,9	15,7	5,8
1000	4	1080,1	8,0	15,7

2.1.3.5 Validierung der CYP2C19 Quantifizierung

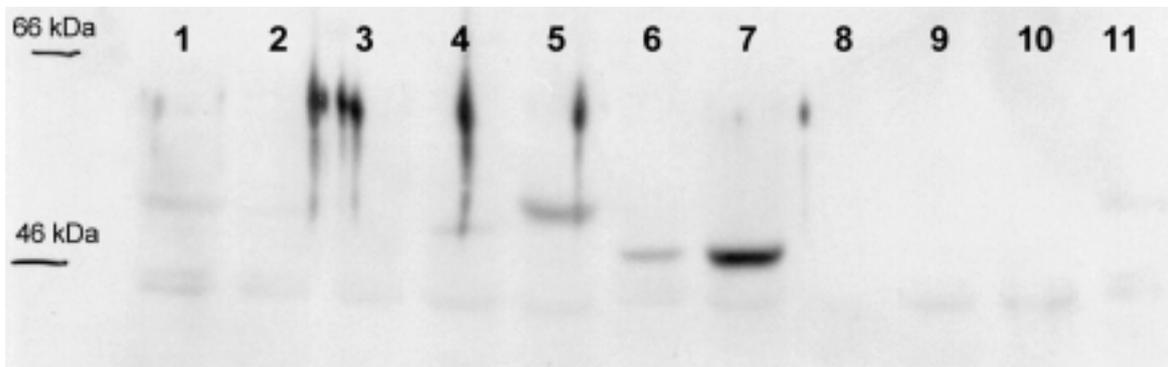


Abbildung 13: Spezifität des Anti-CYP2C19 IgGs. Aufgetragen wurden 500 fmol CYP1A1 (1), CYP1A2 (2), CYP2B6 (3), CYP2C8 (4), CYP2C9 (5), CYP2C18 (6), CYP2C19 (7), CYP2D6 (8), CYP2E1 (9), CYP3A4 (10), CYP3A5 (11) und in einem 10% PAA Gel elektrophoretisch getrennt.

Der Spezifitätstest des verwendeten CYP2C19 Antikörpers (gegen CYP2C8 und CYP2C9 immunoaffinitätsgereinigtes Kaninchen Anti-CYP2C19 IgG; Immunogen: humanes gereinigtes CYP2C19, Research Diagnostic) ergab eine Kreuzreaktivität von 44,5% für CYP2C9 relativ zu CYP2C19. CYP2C9 kann jedoch aufgrund seines höheren Molekulargewichts in den verwendeten 10%igen PAA Gelen von CYP2C19 getrennt werden. Die Kreuzreaktivität des verwendeten Antikörpers mit CYP2C18 belief sich auf 23,6% relativ zu CYP2C19. Die Richtigkeit und Präzision der CYP2C19 Quantifizierung als Intra-Assay Variabilität ist in Tabelle 12 angegeben.

Tabelle 13: Intra-Assay Variabilität der CYP2C19 Bestimmung mittels Immunoblot.

Kontrolle [fmol]	n	Enzymmenge gemessen [fmol]	Richtigkeit Abweichung [%]	Präzision VK [%]
25	4	29,7	18,9	17,4
100	4	114,2	14,2	8,5
500	4	479,2	-4,2	6,5

2.1.3.6 Validierung der CYP3A4 Quantifizierung

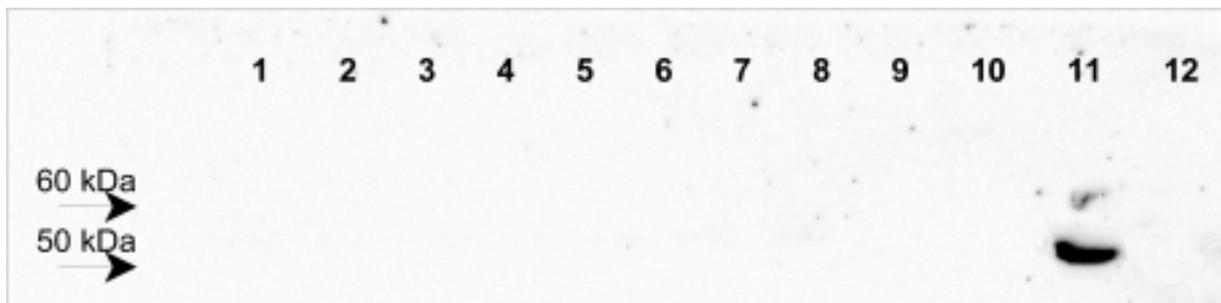


Abbildung 14: Spezifität des Anti-CYP3A4 IgGs. Aufgetragen wurden 500 fmol CYP1A1 (1), CYP1A2 (2), CYP2A6 (3), CYP2B6 (4), CYP2D6 (5), CYP2E1 (6), CYP2C8 (7), CYP2C9 (8), CYP2C18 (9), CYP2C19 (10), CYP3A4 (11), CYP3A5 (12) und in einem 10% PAA Gel elektrophoretisch getrennt.

Der gegen mehrere im C-Terminus gelegene Polypeptidsequenzen von humanem CYP3A4 gerichtete Antikörper (Kaninchen Anti-CYP3A4 IgG WB-3A4, Gentest) erwies sich als hochspezifisch, da keine Kreuzreaktivitäten mit anderen CYPs beobachtet wurden (Abbildung 14). In TN5 Zellhomogenat wurden Kreuzreaktionen mit Banden bei 47 und 90 kDa festgestellt. Die Intra-Assay Variabilität der CYP3A4 Quantifizierung ist in Tabelle 14 aufgeführt.

Tabelle 14: Intra-Assay Variabilität der CYP3A4 Bestimmung mittels Immunoblot.

Kontrolle [fmol]	n	Enzymmenge gemessen [fmol]	Richtigkeit Abweichung [%]	Präzision VK [%]
125	4	131,7	8,4	8,4
500	4	495,0	-0,8	12,7
1000	4	1162	16,2	12,3

2.1.3.7 Validierung der CYP3A5 Quantifizierung

Der gegen eine Polypeptidsequenz aus humanem CYP3A5 gerichtete Antikörper (Kaninchen Anti-CYP3A5 IgG WB-3A5, Gentest) erkennt ausschließlich CYP3A5. Kreuzreaktionen mit anderen CYPs und TN5 Zellen wurden nicht festgestellt (Abbildung 15). Präzision und Richtigkeit der CYP3A5 Bestimmung wurden an einem Tag ermittelt und sind in Tabelle 15 angegeben.

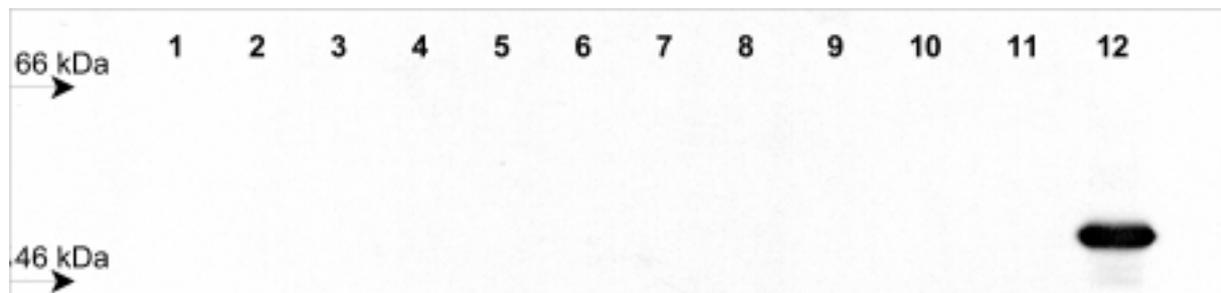


Abbildung 15: Spezifität des Anti-CYP3A5 IgGs. Aufgetragen wurden 500 fmol CYP1A1 (1), CYP1A2 (2), CYP2A6 (3), CYP2B6 (4), CYP2D6 (5), CYP2E1 (6), CYP2C8 (7), CYP2C9 (8), CYP2C18 (9), CYP2C19 (10), CYP3A4 (11), CYP3A5 (12) und in einem 10% PAA Gel elektrophoretisch getrennt.

Tabelle 15: Intra-Assay Variabilität der CYP3A5 Bestimmung mittels Immunoblot.

Kontrolle [fmol]	n	Enzymmenge gemessen [fmol]	Richtigkeit Abweichung [%]	Präzision VK [%]
25	4	27,2	8,6	17,3
100	4	96,9	-3,1	7,8
200	4	222,8	11,4	13,2

2.2 Isolierung von Enterozyten

Zur selektiven Isolierung von Enterozyten wurde auf eine von (Hülsmann et al. 1973) entwickelte Methode zurückgegriffen und in Hinblick auf den Erhalt von Enzymaktivitäten optimiert. Das Darmgewebe wurde zur Entfernung von Nahrungsmittelresten und Mucus mit einem isotonischen, Hyaluronidase (2 I.E./ml) enthaltenen Puffer gewaschen. Die Isolierung der Enterozyten wurde bei 4° C unter Zusatz von 1 mM PefaBloc zur Vermeidung proteolytischer Degradation unter leicht hypotonischen Bedingungen durchgeführt. Zur Verkürzung der Isolierungszeiten wurden die Darmstücke fixiert und in einem Vibrationschüttler mit einer festen Amplitude von 1,5 mm in Schwingungen versetzt. Der Isolierungsprozess wurde exemplarisch an zwei Darmstücken morphologisch und immunhistochemisch kontrolliert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 16 dargestellt.

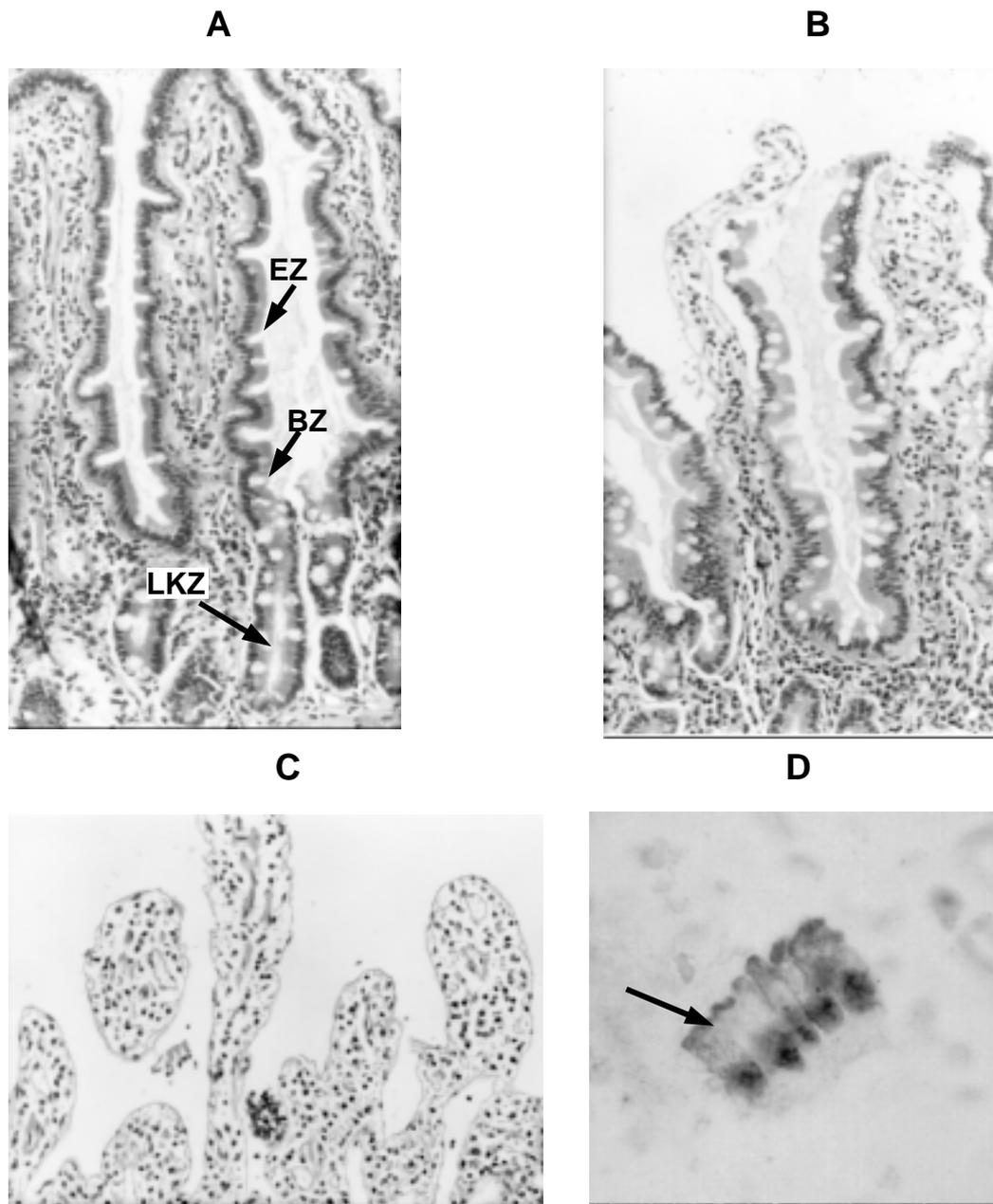


Abbildung 16: (A) Hämatoxyllin/Eosin gefärbter Schnitt durch unbehandelte Darmmukosa. Zu erkennen sind die einzellige intakte Epithelzellschicht differenzierter Enterozyten (EZ) mit eingestreuten ungefärbten Becherzellen (BZ) und das Epithel der Lieberkühnschen Krypten (LKZ), Vergrößerung 100x. (B) Schnitt durch Darmmukosa nach 2-minütiger Vibration. Die Enterozyten sind vom Villusansatz bis zur Villusspitze als ganze Schicht zusammenhängend abgelöst, der Villus jedoch erhalten. (C) Schnitt durch Darmmukosa nach 5-minütiger Vibration. Dargestellt sind intakte Villi mit vollständig abgelöster Epithelzellschicht. Das Epithel der Lieberkühnschen Krypten ist jedoch erhalten. (D) Immunohistochemische Färbung eines Ausstrichs isolierter Zellen mit einem gegen Villin gerichteten monoklonalen Antikörper. Villin ist ein am Aufbau der Bürstensaummembran beteiligtes Strukturprotein und wird daher enterozytenspezifisch exprimiert (West et al. 1988). Zu erkennen ist die für Enterozyten charakteristische rechteckige Form. Villin ist als Strukturprotein durch Quervernetzung von Aktin-Filamenten am Aufbau der Mikrovilli beteiligt. Die positive Villin-Färbung (Pfeil) ist auf die Mikrovilli (Bürstensaum) beschränkt.

2.2.1 Proteinausbeute aus isolierten Enterozyten und Leberbiopsien

Nach erfolgter Homogenisierung wurde der Proteingehalt der Enterozyten- und Leberhomogenate bestimmt. Die Ausbeute an Gesamthomogenat aus beiden Geweben ist in Tabelle 16 aufgeführt. Bezogen auf das Feuchtgewicht des resektierten Gewebes betrug die Proteinausbeute des Leberhomogenats $15,7 \pm 3,0\%$ und die des aus isolierten Enterozyten hergestellten Homogenats lediglich $0,34 \pm 0,2\%$.

Tabelle 16: Aus Enterozyten und Lebern isolierte Gesamtmengen Protein sowie die daraus resultierende Ausbeute an Gesamtprotein bezogen auf das Feuchtgewicht des jeweiligen Gewebes.

Patient	Feuchtgewicht Darm [g]	Gesamtmenge Protein [mg]	Ausbeute %	Feuchtgewicht Leber [mg]	Gesamtmenge Protein [mg]	Ausbeute %
A	3.01	17.9	0.59	445	73.1	16.4
B	1.17	2.4	0.20	699	125.0	17.9
C	14.37	96.4	0.67	123	19.7	16.0
D	7.74	38.3	0.49	406	78.8	19.4
E	7.16	29.7	0.41	49	6.6	13.4
F	2.1	6.4	0.30	124	24.1	19.4
G	7.58	41.4	0.55	132	21.0	15.9
H	2.84	6.7	0.23	189	42.6	22.6
I	6.72	16.2	0.24	421	63.9	15.2
K	1.85	2.4	0.13	310	46.7	15.1
L	9.52	20.7	0.22	87	14.4	16.6
M	30.7	69.7	0.23	342	46.9	13.7
N	2.21	2.0	0.09	333	49.5	14.9
O	5.44	38.3	0.70	515	78.2	15.2
P	5.28	4.3	0.08	247	32.3	13.1
R	10.58	29.0	0.27	81.5	7.9	9.6
S	7.56	32.3	0.43	986.4	128.2	13.0

Die Feuchtgewichte von Darm und Leber korrelierten signifikant ($P < 0,001$) mit den isolierten Gesamtmengen Leber- ($r^2 = 0,94$) und Enterozytenhomogenat ($r^2 = 0,70$). Schwankungen im Proteingehalt durch bei der Enterozytenisolierung unvollständig entfernten Mucusreste konnten somit ausgeschlossen werden.

Infolge der geringen Gesamtmengen isolierter Enterozyten, insbesondere bei gastrektomierten Patienten, war die Messung kompletter Enzymkinetiken mit mehreren Substraten nur durch Anwendung hochsensitiver analytischer Methoden möglich. Aus diesem Grund fanden ausschließlich HPLC Methoden mit massenspektrometrischer Detektion Anwendung.

2.3 Untersuchungen zur Enzymspezifität der am Verapamil Metabolismus Cytochrom P450 Enzyme

2.3.1.1 Untersuchungen mit rekombinant exprimierten Cytochrom P450 Isoenzymen

Die mit rekombinanten CYP-Isoenzymen durchgeführten Versuche zum Metabolismus von Verapamil ergaben, daß die N-Desalkylierung zu D-617 vorwiegend durch CYP3A4 und CYP3A5 katalysiert wird (Tabelle 19).

Tabelle 17: Kinetik der D-617 Bildung aus Verapamil in der mikrosomalen Fraktion von mit humanen CYP-Isoenzymen stabil transfizierten Insektenzellen (SF9 Supersomes, Gentest). Angeben sind die Michaelis Konstante ($K_m \pm$ Standardabweichung), die Maximalgeschwindigkeit ($V_{max} \pm$ Standardabweichung) und die intrinsische Clearance zu D-617 (Cl_{D-617}). *: Upscaling von Cl_{D-617} pro Gramm Feuchtgewicht Leber anhand von Expressionsdaten für CYP1A (Shimada et al. 1994), CYP2C und CYP3A (vgl. 2.4.2 ff.)

CYP Isoenzym	K_m [μ M]	V_{max} [pmol/min/ pmol CYP]	Cl_{D-617} [nl/min/ pmol CYP]	Cl_{D-617}^* [μ l/g/min]
1A1	16,0 \pm 2,1	155,0 \pm 12,6	9,7	-/-
1A2	61,0 \pm 17,3	87,5 \pm 16,3	1,4	3,1
2C8	63,3 \pm 6,1	765,3 \pm 53,1	12,1	45,5
2C9	63,6 \pm 5,2	48,0 \pm 26,4	0,8	2,6
2C18	108,3 \pm 32,7	122,0 \pm 20,9	1,1	-/-
2C19	110,9 \pm 57,5	181,2 \pm 72,5	1,3	0,4
3A4	12,6 \pm 0,7	1989,6 \pm 54,8	158,5	588,1
3A5	5,9 \pm 0,3	140,5 \pm 2,0	24,0	10,2

Die O-Demethylierung von Verapamil zu D-703 verläuft weitgehend über CYP2C8 (Tabelle 18).

Tabelle 18: Kinetik der D-703 Bildung aus Verapamil in der mikrosomalen Fraktion von mit humanen CYP-Isoenzymen stabil transfizierten Insektenzellen (SF9 Supersomes, Gentest). Angeben sind die Michaelis Konstante ($K_m \pm$ Standardabweichung), die Maximalgeschwindigkeit ($V_{max} \pm$ Standardabweichung) und die intrinsische Clearance (Cl_{D-703}). <LLOQ: gebildete Mengen D-703 waren unterhalb der unteren Bestimmungsgrenze. *: Upscaling von Cl_{D-617} pro Gramm Feuchtgewicht Leber anhand von Expressionsdaten für CYP1A (Shimada et al. 1994), CYP2C und CYP3A (vgl. 2.4.2 ff.)

CYP Isoenzym	K_m [μ M]	V_{max} [pmol/min/ pmol CYP]	Cl_{D-703} [nl/min/ pmol CYP]	Cl_{D-703}^* [μ l/g/min]
1A1	-/-	< LLOQ	-/-	-/-
1A2	-/-	< LLOQ	-/-	-/-
2C8	76,4 \pm 14,4	853,8 \pm 118,2	11,2	24,1
2C9	85,8 \pm 8,7	91,5 \pm 6,6	1,1	3,6
2C18	91,4 \pm 13,3	101,3 \pm 10,4	1,1	-/-
2C19	200,6 \pm 44,9	268,3 \pm 47,7	1,3	0,4
3A4	17,8 \pm 3,3	55,5 \pm 3,5	3,1	11,5
3A5	21,6 \pm 7,6	12,4 \pm 1,6	0,6	0,3

Die Bildung von D-702 und Norverapamil war nicht mehrheitlich durch ein einzelnes CYP-Isoenzym katalysiert. Vielmehr trugen CYP2C19 und CYP3A4 zur Cl_{D-702} bei. Im Gegensatz zu D-703 ist das ausschließlich im Darm und nicht in der Leber exprimierte CYP1A1 (Zhang et al. 1999) an der O-Demethylierung von Verapamil zu D-702 beteiligt. Die Bildung von Norverapamil verlief nur über CYP3A4, CYP3A5 und über CYP2C8 (Tabelle 19 und Tabelle 20)

Tabelle 19: Kinetik der D-702 Bildung aus Verapamil in der mikrosomalen Fraktion von mit humanen CYP-Isoenzymen stabil transfizierten Insektenzellen (SF9 Supersomes, Gentest). Angeben sind die Michaelis Konstante ($K_m \pm$ Standardabweichung), die Maximalgeschwindigkeit ($V_{max} \pm$ Standardabweichung) und die intrinsische Clearance (Cl_{D-702}). *: Upscaling von Cl_{D-617} pro Gramm Feuchtwicht Leber anhand von Expressionsdaten für CYP1A (Shimada et al. 1994), CYP2C und CYP3A (vgl. 2.4.2 ff.)

CYP Isoenzym	K_m [μM]	V_{max} [pmol/min/ pmol CYP]	Cl_{D-702} [nl/min/ pmol CYP]	Cl_{D-702}^* [μl/g/min]
1A1	11,6 \pm 0,7	62,3 \pm 1,8	5,4	-/-
1A2	281,6 \pm 73,1	217,6 \pm 39,9	0,8	1,8
2C8	290,1 \pm 19,6	261,4 \pm 14,6	0,9	1,9
2C9	105,3 \pm 11,5	196,9 \pm 15,8	1,9	6,3
2C18	124,1 \pm 14,2	82,9 \pm 6,7	0,7	-/-
2C19	151,6 \pm 27,0	1080,7 \pm 148	7,1	2,5
3A4	28,7 \pm 4,5	142,5 \pm 9,9	5,0	18,6
3A5	66,0 \pm 26	43,7 \pm 9,4	0,7	0,3

Tabelle 20: Kinetik der Norverapamil Bildung aus Verapamil in der mikrosomalen Fraktion von mit humanen CYP-Isoenzymen stabil transfizierten Insektenzellen (SF9 Supersomes, Gentest). Angeben sind die Michaelis Konstante ($K_m \pm$ Standardabweichung), die Maximalgeschwindigkeit ($V_{max} \pm$ Standardabweichung) und die intrinsische Clearance ($Cl_{Norverapamil}$). *: Upscaling von Cl_{D-617} pro Gramm Feuchtwicht Leber anhand von Expressionsdaten für CYP1A (Shimada et al. 1994), CYP2C und CYP3A (vgl. 2.4.2 ff.)

CYP Isoenzym	K_m [μM]	V_{max} [pmol/min/ pmol CYP]	Cl_{Nor} [nl/min/ pmol CYP]	Cl_{Nor}^* [μl/g/min]
1A1	12,3 \pm 1,4	346,6 \pm 14,6	28,3	-/-
1A2	105,1 \pm 34,7	164,2 \pm 30,3	1,6	3,5
2C8	55,9 \pm 5,2	2222,6 \pm 145	39,8	85,7
2C9	108,7 \pm 39,8	311,1 \pm 64	2,9	9,6
2C18	104,9 \pm 36,4	282,6 \pm 76,9	2,7	-/-
2C19	297,4 \pm 77	1627,8 \pm 300	5,5	1,9
3A4	21,8 \pm 3,9	3317,9 \pm 357	152,3	565,1
3A5	6,3 \pm 0,4	301,6 \pm 7,6		20,1

2.3.1.2 Untersuchungen mit spezifischen Hemmstoffen

Um weiteren Aufschluß über die CYP-Isoformen, die an der Bildung von D-617 und D-703 aus Verapamil beteiligt sind, zu erhalten wurden Inkubationen mit den Hemmstoffen Taxol (CYP2C8 Hemmstoff (Rahman et al. 1994), Sulfaphenazol (CYP2C9 Hemmstoff) (Bourrie et al. 1996) und Ketoconazol (CYP3A- und CYP1A1 Hemmstoff) (Gibbs et al. 1999; Paine et al. 1999) durchgeführt. Dabei wurde Leberhomogenat mit 250 μM Verapamil zusammen mit zwei bzw. vier Konzentrationen der o.a. Hemmstoffen inkubiert. Das dazu verwendete Leberhomogenat (Leber N) enthielt 58,8 pmol CYP3A4, 2,9 pmol CYP3A5, 23,0 pmol CYP2C8, 29,0 pmol CYP2C19 und 1,9 pmol CYP2C19 pro mg Proteinhomogenat. Ketoconazol wurde 0,1- und 1 μM (6- bzw. 60-fache K_i), Sulfaphenazol 1-, 5-, 10- und 25 μM (3-, 15-, 30- bzw. 75-fache K_i) und Taxol 10- und 100 μM (3- bzw. 30-fache K_i) eingesetzt. Innerhalb dieser Konzentrationen sind Ketoconazol und Sulfaphenazol als spezifisch anzusehen (Baldwin et al. 1995; Bourrie et al. 1996; Eagling et al. 1998).

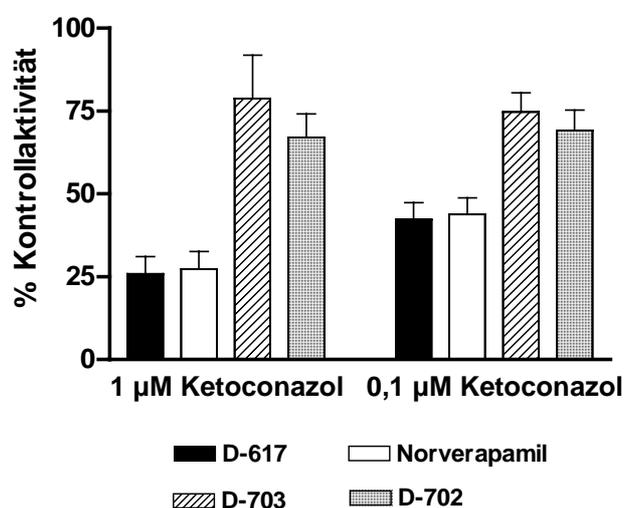


Abbildung 17: Effekt des CYP3A Hemmstoffs Ketoconazol auf die Bildungsraten von D-617, Norverapamil, D-703 und D-702.

Durch den CYP3A spezifischen Hemmstoff Ketoconazol wurde die Bildung D-617 ($28,5 \pm 5,3\%$ der Kontrollaktivität mit 1 μM Ketoconazol) und Norverapamil ($27,3 \pm 5,3\%$ der Kontrollaktivität mit 1 μM Ketoconazol) in Abhängigkeit von der Ketoconazolkonzentration gehemmt. Der Effekt auf die Verapamil-O-Demethylierung ist deutlich schwächer ausgeprägt ($78,7 \pm 13,2\%$ der D-703 Kontrollaktivität bzw. $67,0 \pm 7,2\%$ der D-702 Kontrollaktivität mit 1 μM Ketoconazol).

Da weder (Bourrie et al. 1996) noch (Baldwin et al. 1995) gezeigt haben, ob Sulfaphenazol neben der beschriebenen Hemmung von CYP2C9 weitere Isoenzyme der CYP2C Subfamilie hemmt, wurde der Effekt von Sulfaphenazol auf die Bildung von D-703 in Inkubationen mit rekombinatem CYP2C8, 2C9 und 2C19 untersucht (Abbildung 18).

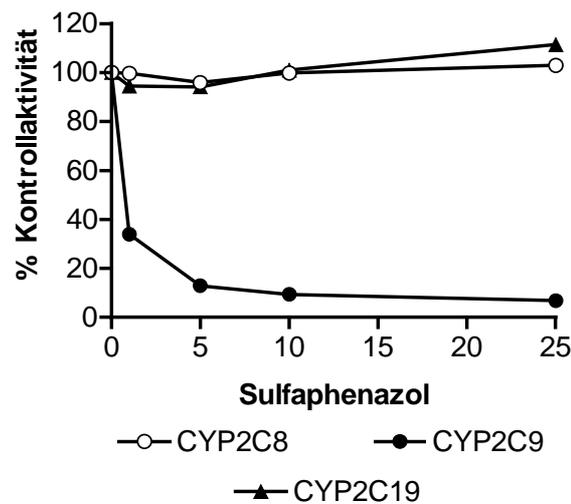


Abbildung 18: Hemmung der D-703 Bildung durch Sulfaphenazol in Inkubationen mit jeweils 25 pmol rekombinanten CYP2C8, 2C9 und 2C19.

In Übereinstimmung mit den Untersuchungen zum Verapamil-Metabolismus mit rekombinant exprimierten CYP-Isoenzymen (Tabelle 19-22), war nur eine geringe Hemmung der Verapamil-O-Demethylierung durch den CYP2C9 spezifischen Hemmstoff Sulfaphenazol ($91,6 \pm 8,7\%$ der D-703 Kontrollaktivität bzw. $86,0 \pm 0,8\%$ der D-702 Kontrollaktivität mit $25 \mu\text{M}$ Sulfaphenazol) nachweisbar.

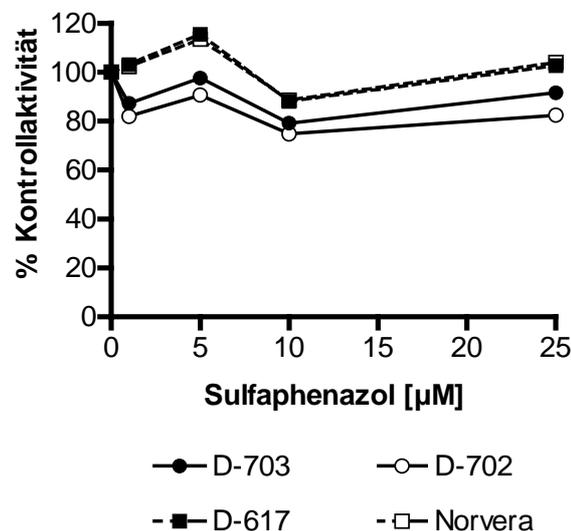


Abbildung 19: Effekt des CYP2C9 Hemmstoffs Sulfaphenazol auf die Bildungsraten von D-617, Norverapamil, D-703 und D-702.

In Versuchen mit rekombinant exprimierten CYPs machte CYP2C8 hingegen 12,1% der metabolischen Clearance von Verapamil aus. D-703 wurde überwiegend durch CYP2C8 gebildet. Hemmversuche mit Taxol in Leberhomogenat zeigten eine von der

Taxolkonzentration abhängige Reduktion der D-703 ($34,2 \pm 0,7\%$ der Kontrollaktivität mit $100 \mu\text{M}$ Taxol) und D-702 Bildung ($46,5 \pm 2,3\%$ der Kontrollaktivität mit $100 \mu\text{M}$ Taxol). In analogen Experimenten (Abbildung 20) mit Enterozytenhomogenat war dieser Effekt bei gleichen Taxol Konzentrationen deutlich schwächer ausgeprägt ($66,3 \pm 0,5\%$ D-703 Kontrollaktivität und $60,3 \pm 1,0\%$ D-702 Kontrollaktivität). Wie in 2.4.4.2 gezeigt, konnte in Enterozytenhomogenat kein CYP2C8 nachgewiesen werden. Folglich ist auch die Taxol vermittelte Inhibition der D-703 Bildung in Enterozytenhomogenat geringer ausgeprägt als in Leber.

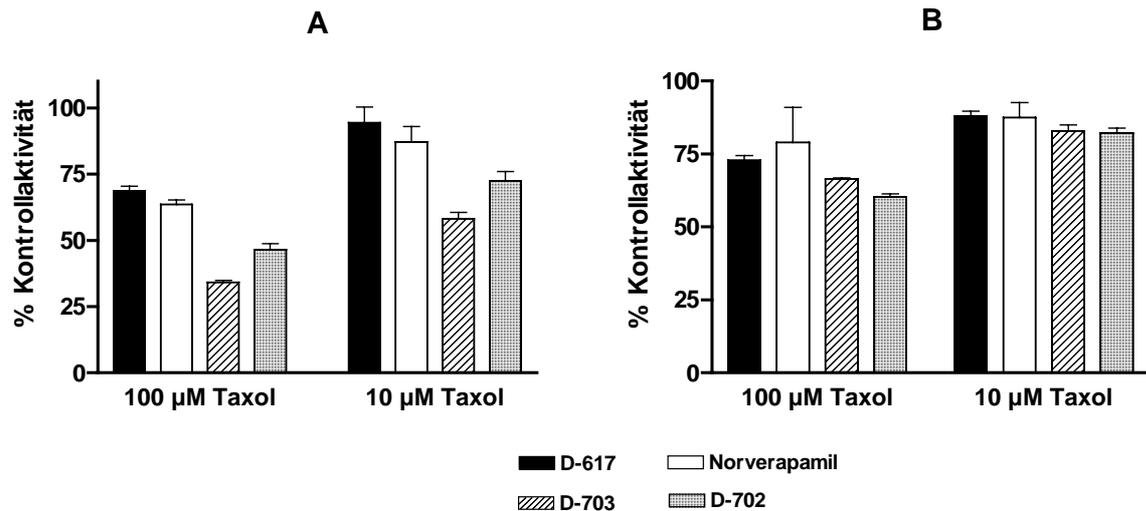


Abbildung 20: Effekt von Taxol auf die Bildungsrate von D-617, Norverapamil, D-703 und D-702 in Leber- (A) und Enterozytenhomogenat (B).

2.4 Verapamil Metabolismus in Enterozyten und Leber

2.4.1 Inkubationsbedingungen

Reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat (NADPH) wurde als Cosubstrat Cytochrom P450 vermittelter Oxidationen in einer Konzentration von $4,8 \text{ mM}$ eingesetzt, um Vergleichbarkeit mit bereits am Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institut gemessenen Enzymaktivitäten zu erhalten (Kroemer et al. 1992; Busse et al. 1995; Evert et al. 1997).

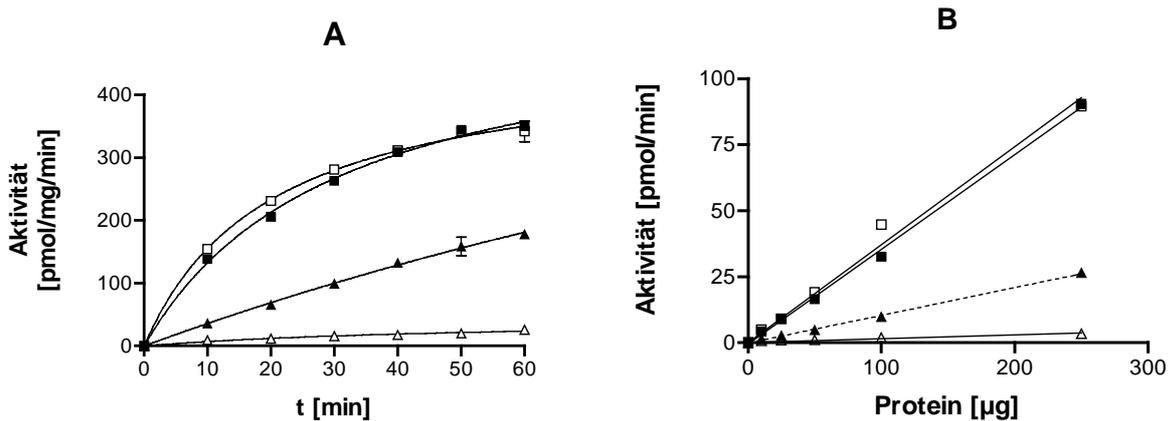


Abbildung 21: Zeit- (A) und Proteinabhängigkeit (B) der D-617 (■, □) und D-703-Bildung (▲, Δ) in Enterozyten- (□, Δ) und Leberhomogenat (■, ▲).

Die Bildung von D-617 und Norverapamil war über 10 Minuten, die von D-703 und D-702 über 60 Minuten linear. Bei einer Inkubationszeit von 10 Minuten waren alle untersuchten Bildungsraten mit eingesetzten 10-250 µg Protein Enterozyten- und Leberhomogenat linear (Abbildung 21). Die Inkubationen zur Bestimmung von K_m und V_{max} wurden demzufolge mit 100 µg Protein und einer Inkubationszeit von 10 Minuten in Enterozyten- und Leberhomogenat von 15 Patienten durchgeführt.

2.4.2 CYP3A4 Aktivität und Proteinexpression

Die Funktion von CYP3A4, gemessen als N-Desalkylierung von Verapamil zu D-617, und die Proteinexpression dieses Enzyms wurden in 15 Enterozyten- und Leberhomogenaten bestimmt. Enzymaktivitäten sind im folgenden dargestellt als: [Stoffmenge gebildeter Metabolit • Minute⁻¹ • mg Proteinhomogenat⁻¹]. Die gemessenen Proteinmengen werden angegeben als: [Stoffmenge • mg Proteinhomogenat⁻¹].

2.4.2.1 Verapamil N-Desalkylierung

D-617 wurde in Enterozytenhomogenaten mit einer 1,8-fach höheren Maximalgeschwindigkeit umgesetzt ($P < 0,05$). Dabei war die interindividuelle Variabilität in Enterozyten größer (VK: 80,3%) als in Leber (VK: 28,1%). Die intrinsische Clearance von D-617 (Cl_{D-617}) war in Enterozytenhomogenat um 29% höher als in den entsprechenden Leberhomogenaten ($P = 0,072$). Die Michaelis Konstante ist im Vergleich zur Leber um 26% Prozent erhöht ($P < 0,05$). Die Angleichung der gemessenen Aktivitäten an eine monophasische Michaelis-Menten-Enzymkinetik wurde in Enterozyten- mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit (χ^2 -Test) von $0,7 \pm 0,8\%$ und in Leberhomogenaten mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $1,3 \pm 3,2\%$ durchgeführt.

Tabelle 21: Individuelle Daten der Verapamil-N-Desalkylierung, CYP3A4- und CYP3A5 Expression in Enterozyten- und Leberhomogenaten von 15 Patienten (angegeben pro mg Proteinhomogenat). <LLOQ: CYP3A5-Proteingehalt lag unterhalb der unteren Bestimmungsgrenze von 0,25 pmol/mg. (MW \pm SD): Mittelwert \pm Standardabweichung

Patient	Enterozyten					Leber				
	$V_{max, D-617}$ [pmol/mg/min]	K_m [μ M]	$Cl_{int, D-617}$ [μ /mg/min]	CYP3A4 [pmol/mg]	CYP3A5 [pmol/mg]	$V_{max, D-617}$ [pmol/mg/min]	K_m [μ M]	$Cl_{int, D-617}$ [μ /mg/min]	CYP3A4 [pmol/mg]	CYP3A5 [pmol/mg]
A	120,1 \pm 7,3	31,5 \pm 4,1	3,8	70,2	< LLOQ	119,1 \pm 6,2	31,3 \pm 5,0	3,8	10,7	< LLOQ
B	81,0 \pm 7,0	40,0 \pm 7,2	2,0	19,2	< LLOQ	85,0 \pm 5,7	40,5 \pm 5,5	2,1	5,1	< LLOQ
C	234,9 \pm 3,7	41,5 \pm 1,3	5,7	94,2	0,3	56,0 \pm 2,9	29,5 \pm 3,5	1,9	2,4	< LLOQ
D	274,9 \pm 4,6	49,9 \pm 1,6	5,5	157,2	0,6	141,2 \pm 1,8	29,6 \pm 0,8	4,8	35,8	< LLOQ
E	142,8 \pm 6,1	37,2 \pm 3,3	3,8	69,0	< LLOQ	115,5 \pm 9,0	42,5 \pm 6,7	2,7	13,6	< LLOQ
F	155,2 \pm 4,8	42,3 \pm 2,6	3,7	96,5	0,3	111,4 \pm 8,4	28,3 \pm 4,9	3,9	25,3	< LLOQ
G	247,1 \pm 19	33,0 \pm 5,6	7,5	122,6	< LLOQ	181,6 \pm 4,8	29,5 \pm 1,7	6,2	32,3	< LLOQ
H	156,1 \pm 2,7	37,0 \pm 1,3	4,2	51,9	2,0	64,3 \pm 1,9	27,0 \pm 1,9	2,4	0,9	2,6
I	356,4 \pm 5,1	77,1 \pm 18	4,6	173,9	0,6	119,8 \pm 2,2	38,0 \pm 1,5	3,2	11,1	< LLOQ
K	106,9 \pm 15	72,2 \pm 16	1,5	37,3	< LLOQ	114,4 \pm 40	108,5 \pm 62	1,1	16,7	< LLOQ
L	103,8 \pm 4,8	47,8 \pm 4,3	2,2	21,6	< LLOQ	117,7 \pm 3,0	35,2 \pm 1,9	3,3	29	< LLOQ
M	128,9 \pm 4,1	40,4 \pm 2,6	3,2	41,2	< LLOQ	110,2 \pm 5,2	32,0 \pm 3,3	3,4	21,8	< LLOQ
N	755,7 \pm 59	62,9 \pm 9,0	12,0	128,0	0,6	132,4 \pm 4,5	34,9 \pm 2,5	3,8	58,8	2,9
O	189,5 \pm 2,9	34,4 \pm 1,1	5,5	35,2	< LLOQ	164,6 \pm 7,2	34,4 \pm 3,2	4,8	45,4	< LLOQ
P	106,4 \pm 5,8	30,0 \pm 3,0	3,5	22,6	0,3	112,0 \pm 5,6	27,3 \pm 2,8	4,1	45,8	< LLOQ
MW	210,6	45,1	4,6	80,1	1,4	116,3	37,9	3,4	23,6	3,2
\pmSD	\pm 169,1	\pm 14,6	\pm 2,1	\pm 49,9	\pm 1,2	\pm 32,6	\pm 20,1	\pm 1,3	\pm 17,4	\pm 1,7

Es bestand keine Korrelation zwischen den Maximalgeschwindigkeiten der Verapamil-N-Desalkylierung in Enterozyten und Leber.

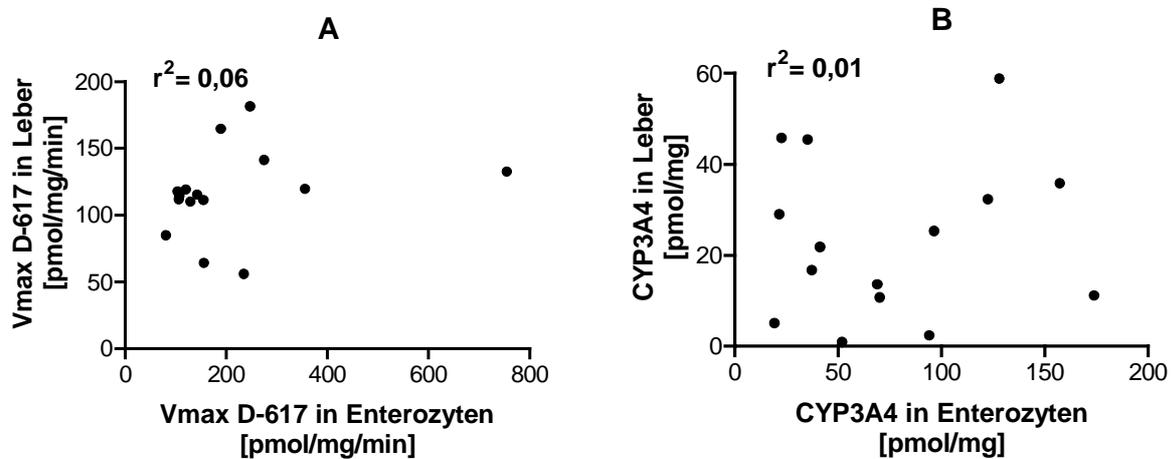


Abbildung 22: Korrelation zwischen $V_{\max D-617}$ (A) und dem CYP3A4 Proteingehalt (B) in Enterozyten- und Leberhomogenaten.

2.4.2.2 CYP3A4 Proteinexpression

In Enterozyten belief sich der CYP3A4 Proteingehalt $80,1 \pm 49,9$ pmol/mg. Die Einzelwerte schwankten um das 8,1-fache. In den Leberhomogenaten wurden $23,6 \pm 17,4$ pmol/mg CYP3A4 mit 24,5-fachen interindividuellen Unterschieden gemessen. Der CYP3A4 Proteingehalt in Enterozyten- war im Mittel um das 3,7-fache höher als in den entsprechenden Leberhomogenaten ($P < 0,005$). Die CYP3A4 Proteinexpression in beiden Organen war nicht koreguliert (Abbildung 22). Die individuellen Daten sind in Tabelle 21 aufgeführt.

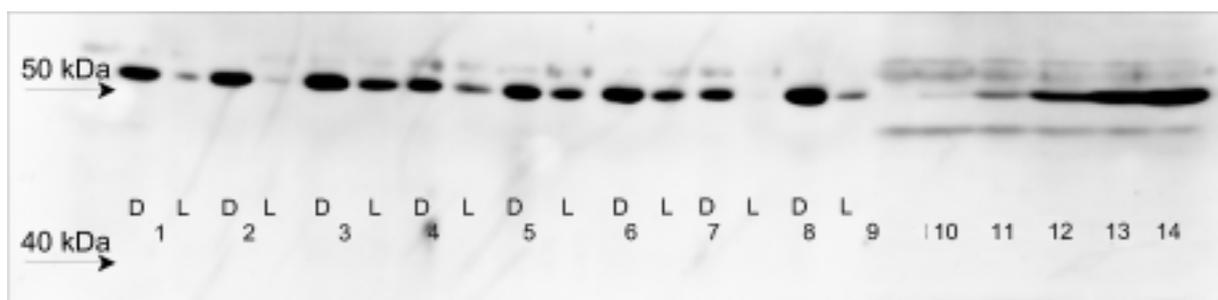


Abbildung 23: Immunoblot der CYP3A4 Expression in Enterozyten- (D) und Leberhomogenat (L). Im dargestellten Blot wurden jeweils 5 μ g Proteinhomogenat der Proben A (1), C (2), D (3), E (4), F (5), G (6), H (7) und I (8) aufgetragen. Spur (9) enthielt 500 fmol rekombinantes CYP3A5. als Negativkontrolle. Als Eichpunkte wurden 50, 100, 250, 500 und 1000 fmol rekombinantes CYP3A4 verwendet (10-14).

2.4.2.3 Korrelation zwischen D-617- und Norverapamil Aktivität und CYP3A4 Proteinexpression

Die maximale Bildungsrate von D617 ($V_{\max \text{ D-617}}$) korrelierte sowohl in Enterozyten- ($r^2=0,83$; $P<0,0001$; $n=15$) als auch in Leberhomogenaten ($r^2=0,46$; $P<0,01$; $n=15$) mit dem jeweiligen CYP3A4 Proteingehalt (Abbildung 24). Für den gesamten Datensatz ergab sich ein Korrelationskoeffizient von $r^2=0,80$ ($P<0,0001$; $n=30$). Des Weiteren bestand eine Korrelation zwischen dem CYP3A4 Proteingehalt und der maximalen Bildungsrate von Norverapamil in Enterozyten ($r^2=0,78$; $P<0,0001$; $n=15$) und Leber ($r^2=0,27$; $P<0,05$; $n=15$) als auch im gesamten Datensatz ($r^2=0,63$; $P<0,0001$; $n=30$). Die V_{\max} der D-703-, D-702-, 4'-OH-Diclofenac-, M3G- und M6G-Bildung korrelierten nicht mit der gemessenen CYP3A4 Proteinexpression. Die intrinsische Clearance von D-617 ($Cl_{\text{int D-617}}$) korrelierte sowohl in Enterozyten- ($r^2=0,39$; $P<0,05$; $n=15$) als auch in Leberhomogenaten ($r^2=0,40$; $P<0,05$; $n=15$) und in dem gesamten Datensatz ($r^2=0,35$; $P<0,001$; $n=30$) mit dem CYP3A4 Gehalt.

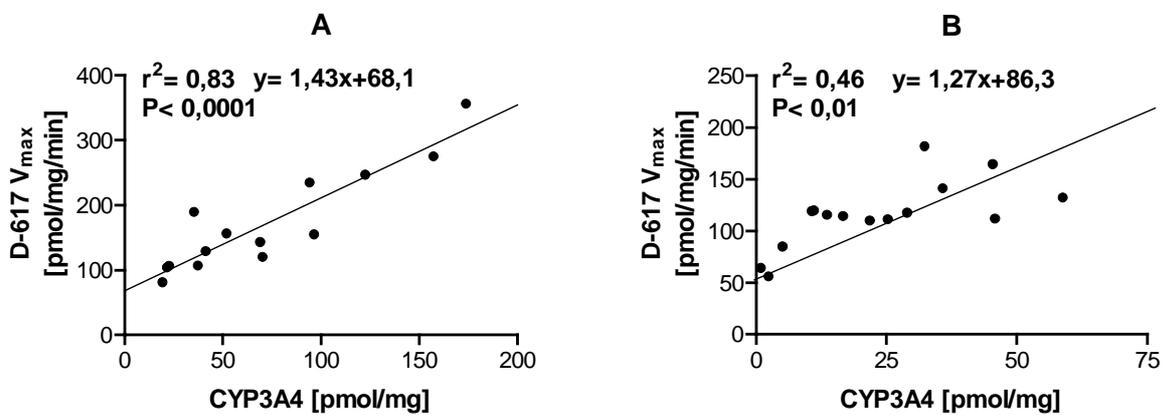


Abbildung 24: Korrelation zwischen der Maximalgeschwindigkeit der Verapamil-N-Desalkylierung und dem CYP3A4 Proteingehalt in Enterozyten- (A) und Leberhomogenaten (B). Das Enterozytenhomogenat von Patient N wurde als Ausreißer von der Korrelationsanalyse ausgeschlossen.

2.4.3 CYP3A5 Proteinexpression

Die Proteinexpression von CYP3A5 wurde in 15 Enterozyten und Leberhomogenaten bestimmt (Tabelle 21). In allen Proben konnte CYP3A5 nachgewiesen werden, allerdings lag die gemessene Menge in 8 Enterozyten- (53,3%) und in 13 Leberproben (86,6%) unterhalb der Bestimmungsgrenze von 250 fmol/mg Protein. In Enterozytenhomogenat wurden $1,4 \pm 1,2$ pmol/mg CYP3A5 gemessen. Die Einzelwerte schwankten um das 13,7-fache. Die Leberhomogenate enthielten $3,2 \pm 1,7$ pmol CYP3A5/mg mit 2,9-fachen interindividuellen Unterschieden. Ein Vergleich des CYP3A5 Proteingehalts in Darm und Leber und eine Korrelation zwischen der Proteinexpression in Darm und Leber konnten nicht getroffen werden, da die Zahl der Wertepaare ($n=2$) für die entsprechenden statistischen Tests zu gering war. Relativ zur CYP3A4 Proteinexpression waren in Enterozytenhomogenat im

Mittel lediglich 1,7% und in Leberhomogenat 12,9% CYP3A5 enthalten. Eine multiple lineare Korrelationsanalyse ergab, daß CYP3A5 sowohl in Enterozyten als auch in Leber keinen signifikanten Beitrag zur Verapamil-N-Desalkylierung liefert.

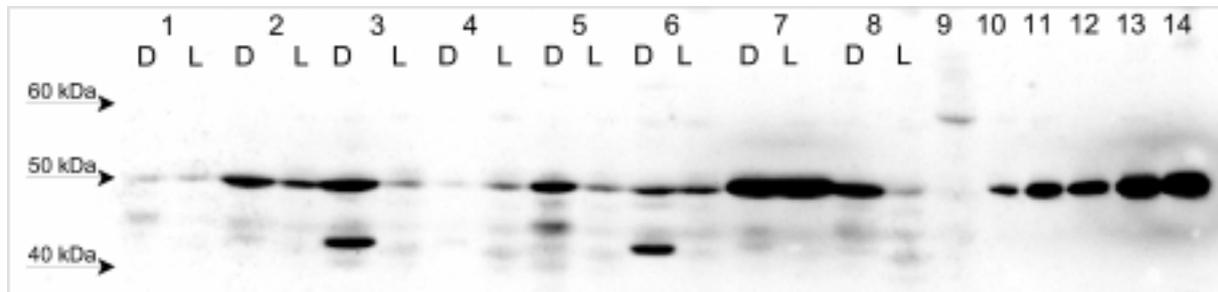


Abbildung 25: Immunoblot der CYP3A5 Expression in Enterozyten- (D) und Leberhomogenat (L). Im dargestellten Blot wurden jeweils 50 µg Proteinhomogenat der Proben A (1), C (2), D (3), E (4), F (5), G (6), H (7) und I (8) aufgetragen. Spur (9) enthielt 500 fmol rekombinantes CYP3A4, als Negativkontrolle. Als Eichpunkte wurden 12,5, 25, 50, 100 und 200 fmol rekombinantes CYP3A5 verwendet (10-14).

2.4.4 CYP2C8 Aktivität und Proteinexpression

2.4.4.1 Verapamil O-Demethylierung

Die intrinsische Clearance von D-703 war in Enterozytenhomogenat um das 6-fache niedriger als in den entsprechenden Leberhomogenaten ($P < 0,0001$). Die Michaelis Konstanten in Enterozyten- ($261,1 \pm 186,5$) und Leberhomogenat ($42,9 \pm 9,8$) wiesen signifikante Unterschiede auf ($P < 0,001$). Die maximalen Bildungsraten von D-703 unterschieden sich in beiden untersuchten Geweben nicht signifikant voneinander und wiesen, wie auch D-617, größere interindividuelle Schwankungen in Enterozyten (VK: 78,8%) als in Leber (VK: 16,1%) auf. Des weiteren bestand eine Korrelation zwischen den Maximalgeschwindigkeiten in beiden Geweben ($r^2 = 0,37$; $P < 0,005$). Eine Übersicht über die individuellen Daten gibt Tabelle 22. Die Angleichung der gemessenen Aktivitäten an eine monophasische Michaelis-Menten-Enzymkinetik wurde in Enterozyten- mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit (χ^2 -Test) von $2,2 \pm 1,8\%$ und in Leberhomogenaten von $1,8 \pm 0,9\%$ durchgeführt.

Tabelle 22: Individuelle Daten der Verapamil-O-Demethylierung und CYP2C8 Expression in Enterozyten und Leberhomogenaten von 15 Patienten (angegeben pro mg Proteinhomogenat). (n.b.): aufgrund zu geringer Enzymaktivität nicht bestimmbar. (-/-): nicht nachweisbar. (MW \pm SD): Mittelwert \pm Standardabweichung.

Patient	Enterozyten				Leber			
	$V_{\max D-703}$ [pmol/mg/min]	K_m [μ M]	$Cl_{\text{intD-703}}$ [μ /mg/min]	CYP2C8 [pmol/mg]	$V_{\max D-703}$ [pmol/mg/min]	K_m [μ M]	$Cl_{\text{intD-703}}$ [μ /mg/min]	CYP2C8 [pmol/mg]
A	12,1 \pm 2,3	191,7 \pm 60,4	0,1	-/-	46,5 \pm 4,4	29,5 \pm 8,7	1,6	27,1
B	42,8 \pm 18,5	378,6 \pm 192	0,1	-/-	51,5 \pm 5,9	37,0 \pm 7,9	1,4	14,4
C	26,8 \pm 1,3	149,3 \pm 12,3	0,2	-/-	38,7 \pm 2,8	41,3 \pm 5,5	0,9	7,3
D	21,6 \pm 1,1	154,3 \pm 13,3	0,1	-/-	37,9 \pm 4,1	31,6 \pm 6,6	1,2	16,0
E	21,8 \pm 1,7	285,2 \pm 30,5	0,1	-/-	48,7 \pm 4,1	40,7 \pm 6,4	1,2	2,9
F	27,1 \pm 4,9	184,9 \pm 52,1	0,1	-/-	49,2 \pm 3,8	34,2 \pm 5,2	1,4	15,1
G	24,7 \pm 7,6	188,2 \pm 89,9	0,1	-/-	37,3 \pm 4,0	53,1 \pm 9,8	0,7	8,7
H	19,1 \pm 2,5	159,2 \pm 34,4	0,1	-/-	40,4 \pm 4,4	34,7 \pm 7,2	1,2	6,2
I	27,0 \pm 6,4	141,2 \pm 50,3	0,2	-/-	45,6 \pm 5,4	52,6 \pm 10,9	0,9	18,9
K	51,3 \pm 24,3	224,4 \pm 143	0,2	-/-	54,1 \pm 5,8	53,0 \pm 11,0	1,0	15,1
L	64,3 \pm 23,3	859,4 \pm 36,5	0,1	-/-	45,9 \pm 4,3	64,5 \pm 10,1	0,7	5,7
M	23,0 \pm 2,5	306,2 \pm 46,2	0,1	-/-	44,9 \pm 3,5	44,0 \pm 6,2	1,0	4,8
N	124,0 \pm 28	280,4 \pm 80,8	0,4	-/-	64,7 \pm 6,2	39,7 \pm 7,0	1,6	25,5
O	25,2 \pm 5,4	152,5 \pm 53,9	0,2	-/-	58,1 \pm 4,9	37,6 \pm 6,0	1,5	23,0
P	n.b.	n.b.	n.b.	-/-	45,5 \pm 6,8	50,5 \pm 13,8	0,9	18,0
MW \pm SD	36,5 \pm 28,7	261,1 \pm 186,5	0,2 \pm 0,1	-/-	47,3 \pm 7,6	42,9 \pm 9,8	1,2 \pm 0,3	13,7 \pm 7,9

2.4.4.2 CYP2C8 Proteinexpression

In Leberhomogenat wurde ein CYP2C8 Proteingehalt von $13,9 \pm 7,9$ pmol/mg gemessen. Die individuellen Werte (Tabelle 22) schwankten um das 5,6-fache von 4,8 bis 27,1 pmol/mg. CYP2C8 wurde in keinem der 17 Enterozytenhomogenate nachgewiesen.

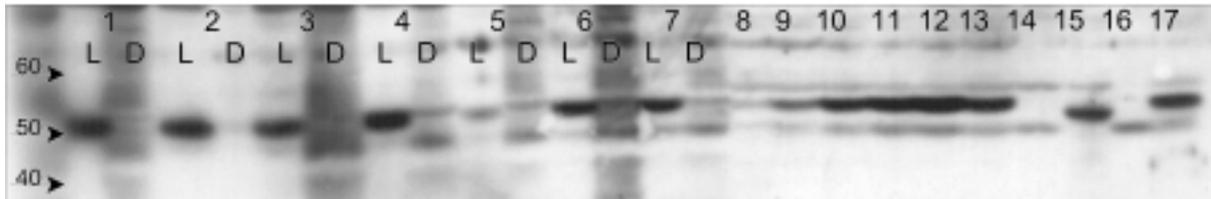


Abbildung 26: Immunoblot der CYP2C8 Expression in Enterozyten- (D) und Leberhomogenat (L). Im dargestellten Blot wurden jeweils 25 μ g Proteinhomogenat der Proben A (1), B (2), C (3), D (4), E (5), F (6) und G (7) aufgetragen. Als Eichpunkte wurden 100, 250, 500, 750 und 1000 fmol rekombinantes CYP2C8 verwendet (8-12). Die Spuren (13-16) enthielten jeweils 500 fmol rekombinantes CYP2C8, 2C9, 2C18 und 2C19, als Kontrollen.

2.4.4.3 CYP2C18 Proteinexpression

Weder in Enterozyten- noch in Leberhomogenaten konnte CYP2C18 Proteinexpression nachgewiesen werden.

2.4.4.4 Korrelation zwischen D-703 Aktivität und CYP2C8 Proteinexpression

Die maximale Bildungsrate ($V_{\max D-703}$) als auch die intrinsische Clearance von D703 ($Cl_{\text{int} D703}$) korrelierten mit dem jeweiligen CYP2C8 Proteingehalt in Leberhomogenaten ($r^2 = 0,37$; $P < 0,05$ bzw. $r^2 = 0,49$; $P < 0,01$; $n = 15$). Die pro pmol CYP2C8 gebildete Stoffmenge D-703, belief sich auf $5,7 \pm 5,8$ pmol D-703/min.

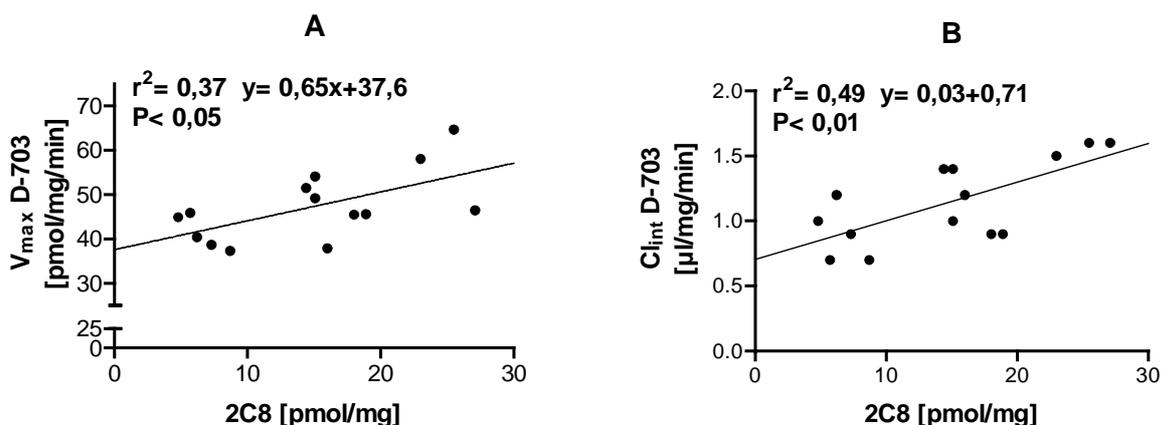


Abbildung 27: Korrelation zwischen der maximalen Bildungsrate (A) bzw. der intrinsischen Clearance (B) von D-703 mit dem CYP2C8 Proteingehalt in Leberhomogenaten von 15 Patienten.

2.4.5 Bildung von D-702 und Norverapamil in Enterozyten und Leber

D-702 wurde in Enterozytenhomogenaten mit einer 1,6-fach höheren Maximalgeschwindigkeit umgesetzt ($P < 0,05$). Die interindividuellen Schwankungen der D-702 Bildung waren in Enterozyten größer (VK: 45,7%) als in der Leber (VK: 13,1%). Keine Unterschiede bestanden in der intrinsischen Clearance von Verapamil zu D-702 in beiden Organen, da die Michaelis-Konstante der D-702-Bildung in Enterozyten größer als in der Leber war ($P < 0,001$). Die Angleichung der gemessenen Aktivitäten an eine monophasische Michaelis-Menten-Enzymkinetik wurde in Enterozyten mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit (χ^2 -Test) von $2,6 \pm 2,3\%$ und in Leberhomogenaten mit $1,9 \pm 0,8\%$ durchgeführt. Die individuellen Daten sind in Tabelle 23 aufgeführt.

Der Quotient der Maximalgeschwindigkeiten von D-703/D-702 war in Enterozytenhomogenaten $0,9 \pm 0,3$, in Leberhomogenat dagegen $1,7 \pm 0,3$.

Tabelle 23: Individuelle Daten der Verapamil-O-Demethylierung zu D-702 in Enterozyten und Leberhomogenaten von 15 Patienten. (n.b.): aufgrund zu geringer Enzymaktivität nicht bestimmbar. (MW \pm SD): Mittelwert \pm Standardabweichung.

Patient	Enterozyten			Leber		
	V_{\max} D-702 [pmol/mg/min]	K_m [μ M]	$Cl_{\text{intD-702}}$ [μ /mg/min]	V_{\max} D-702 [pmol/mg/min]	K_m [μ M]	$Cl_{\text{intD-702}}$ [μ /mg/min]
A	25,3 \pm 6,6	151,0 \pm 59,4	0,17	25,5 \pm 2,6	72,0 \pm 15,2	0,35
B	35,2 \pm 9,4	162,2 \pm 57,6	0,22	27,6 \pm 0,8	77,8 \pm 3,7	0,35
C	31,2 \pm 3,5	80,8 \pm 15,3	0,39	27,5 \pm 3,9	114,0 \pm 25,0	0,24
D	34,8 \pm 2,9	102,8 \pm 12,8	0,34	26,3 \pm 1,9	68,1 \pm 7,9	0,39
E	24,0 \pm 2,4	143,7 \pm 24,2	0,17	27,3 \pm 4,0	104,8 \pm 24,0	0,26
F	33,6 \pm 5,2	121,6 \pm 29,0	0,28	27,5 \pm 3,1	70,9 \pm 13,5	0,39
G	29,8 \pm 5,0	109,6 \pm 28,3	0,27	27,4 \pm 2,7	76,4 \pm 12,3	0,36
H	27,9 \pm 3,6	114,0 \pm 21,5	0,24	17,0 \pm 2,5	72,5 \pm 17,6	0,23
I	33,0 \pm 5,7	79,8 \pm 23,8	0,41	26,0 \pm 2,9	88,6 \pm 19,3	0,29
K	58,9 \pm 25,3	205,6 \pm 11,3	0,29	28,8 \pm 3,1	114,2 \pm 20,3	0,25
L	41,1 \pm 9,7	268,2 \pm 90,4	0,15	33,7 \pm 3,8	98,3 \pm 17,8	0,34
M	24,4 \pm 2,3	136,3 \pm 21,7	0,18	27,5 \pm 3,0	95,7 \pm 16,6	0,29
N	89,2 \pm 24,9	91,4 \pm 39,3	0,98	29,8 \pm 3,8	89,6 \pm 18,7	0,33
O	50,1 \pm 3,4	177,6 \pm 15,9	0,28	31,8 \pm 4,7	75,4 \pm 18,8	0,42
P	n.b.	n.b.	n.b.	26,5 \pm 4,3	102,8 \pm 26,3	0,26
MW \pm SD	38,5 \pm 17,6	138,9 \pm 52,3	0,31 \pm 0,21	27,3 \pm 3,6	88,0 \pm 16,1	0,32 \pm 0,06

Die überwiegend durch CYP3A4 katalysierte Verapamil-N-Demethylierung zu Norverapamil war in Enterozyten und Lebern vergleichbar mit der Bildung von D-617 (vgl. 2.4.2.1). Norverapamil wurde in Enterozytenhomogenaten mit einer 1,5-fach höheren Maximalgeschwindigkeit umgesetzt ($P > 0,05$). Die interindividuellen Schwankungen waren in Enterozyten größer (VK: 96,8%) als in der Leber (VK: 33,1%). In beiden Organen waren keine Unterschiede in der intrinsischen Clearance von Norverapamil ($Cl_{\text{int Norverapamil}}$) festzustellen. Die Michaelis-Konstante der Norverapamil-Bildung war in Enterozyten größer als in der Leber ($P < 0,05$). Die Angleichung der gemessenen Aktivitäten an eine

monophasische Michaelis-Menten-Enzymkinetik wurde in Enterozyten mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit (χ^2 -Test) von $0,7 \pm 1,0\%$ und in Leberhomogenaten mit $0,5 \pm 0,6\%$ durchgeführt. Die individuellen Daten sind in Tabelle 24 aufgeführt.

Tabelle 24: Individuelle Daten der Verapamil-N-Demethylierung in Enterozyten und Leberhomogenaten von 15 Patienten. (MW \pm SD): Mittelwert \pm Standardabweichung.

Patient	Enterozyten			Leber		
	V_{\max} Norvera [pmol/mg/min]	K_m [μ M]	Cl_{int} Norvera [μ /mg/min]	V_{\max} Norvera [pmol/mg/min]	K_m [μ M]	Cl_{int} Norvera [μ /mg/min]
A	160,3 \pm 12,3	31,5 \pm 5,2	5,1	204,0 \pm 6,7	26,4 \pm 2,9	7,7
B	109,5 \pm 4,9	34,1 \pm 3,3	3,2	148,4 \pm 7,0	36,9 \pm 3,6	4,0
C	352,5 \pm 8,5	35,9 \pm 1,8	9,8	102,3 \pm 2,1	26,2 \pm 1,2	3,9
D	386,1 \pm 12,7	42,4 \pm 2,7	9,1	220,9 \pm 7,4	26,5 \pm 2,0	8,3
E	207,5 \pm 8,3	29,2 \pm 2,6	7,1	184,8 \pm 14,0	36,9 \pm 5,8	5,0
F	209,5 \pm 11,0	32,8 \pm 3,6	6,4	175,4 \pm 8,7	24,0 \pm 2,8	7,3
G	361,2 \pm 18,5	24,5 \pm 2,9	14,8	284,5 \pm 4,6	23,9 \pm 0,9	16,1
H	240,2 \pm 12,7	34,0 \pm 3,8	7,1	118,5 \pm 2,4	19,9 \pm 1,0	5,9
I	587,6 \pm 128,	83,7 \pm 27,6	7,0	199,8 \pm 10,0	34,9 \pm 3,7	5,7
K	136,2 \pm 27,1	66,7 \pm 21,9	2,0	222,4 \pm 12,7	35,9 \pm 4,7	1,3
L	153,6 \pm 7,7	48,2 \pm 4,7	3,2	185,6 \pm 6,2	38,5 \pm 2,6	4,8
M	191,1 \pm 3,6	40,9 \pm 1,4	4,7	168,9 \pm 7,0	31,2 \pm 2,8	5,4
N	1034,9 \pm 46,	57,2 \pm 4,7	18,1	215,7 \pm 7,9	35,4 \pm 2,7	6,1
O	276,6 \pm 7,5	32,5 \pm 1,9	8,5	268,0 \pm 7,2	32,4 \pm 1,9	8,3
P	134,5 \pm 2,2	20,7 \pm 0,7	6,5	183,3 \pm 7,0	27,5 \pm 2,2	6,7
MW \pm SD	303 \pm 293	40,9 \pm 16,8	7,5 \pm 4,3	199 \pm 66	30,4 \pm 5,8	6,4 \pm 3,3

Wie in dargestellt, waren weder die Bildung von D-702 noch die Verapamil-N-Demethylierung in beiden Organen koreguliert (D-702: $r^2 = 0,18$; Norverapamil: $r^2 = 0,03$).

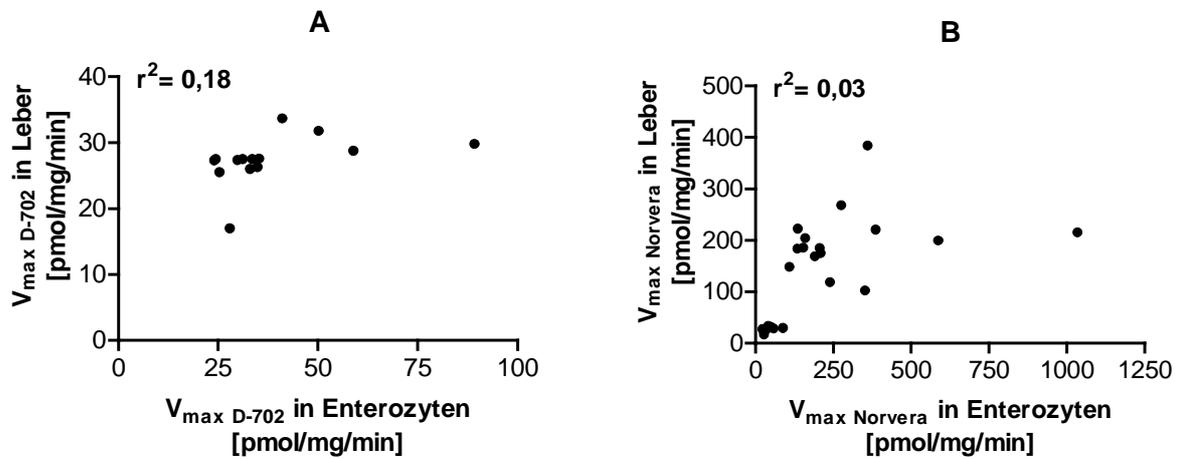


Abbildung 28: Korrelation zwischen V_{\max} D-702 (A) bzw. V_{\max} Norverapamil (B) in Enterozyten- und Leberhomogenaten.

2.4.6 Intrinsische Clearance von Verapamil in Enterozyten und Leber

Die intrinsische Clearance von Verapamil (Cl_{int}), d.h. die Summe der intrinsischen Metabolitenclearances (Cl_{D-617} , Cl_{D-702} , Cl_{D-703} und $Cl_{Norverapamil}$) war in Enterozytenhomogenaten ($12,5 \pm 7,1 \mu\text{l/mg/min}$) mit der in den entsprechenden Leberhomogenaten ($11,3 \pm 4,5 \mu\text{l/mg/min}$) vergleichbar.

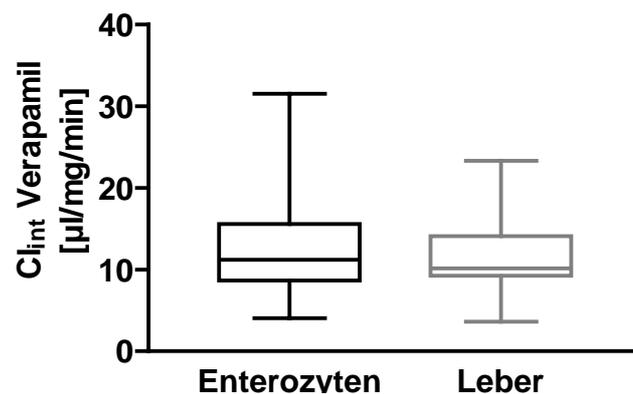


Abbildung 29: Box'n Whisker Plot der intrinsischen Clearance von Verapamil in 15 Enterozyten- und Leberhomogenaten. Die Box stellt die zweite und dritte Quartile mit dem Median in der Mitte dar.

2.5 Diclofenac Metabolismus in Enterozyten und Leber

Die Bildung von 4'-OH-Diclofenac war über 70 Minuten in 5-100 μg Enterozyten- und 5-50 μg Leberhomogenat linear. Die Inkubationen zur Bestimmung von K_m und V_{max} wurden daher mit 25 μg Protein und einer Inkubationszeit von 20 Minuten durchgeführt.

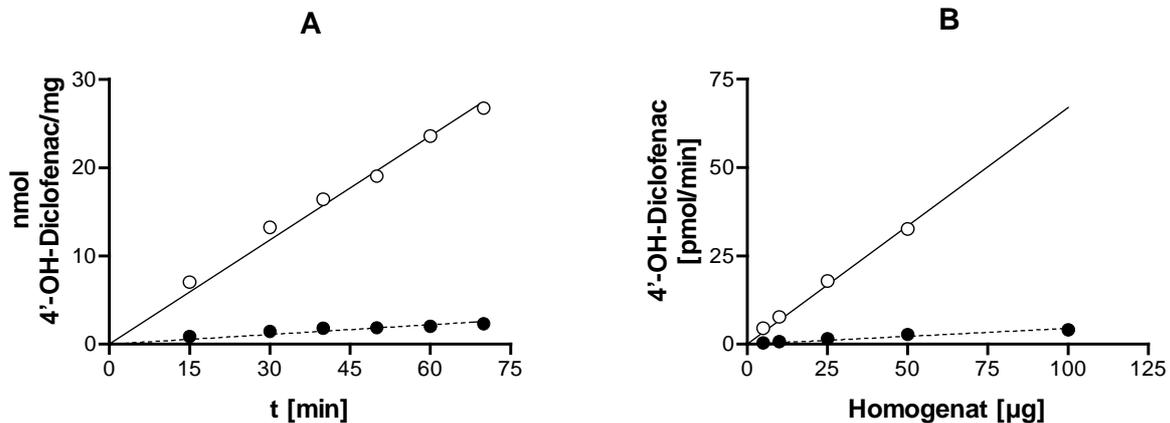


Abbildung 30: Zeit- (A) und Proteinabhängigkeit (B) der 4'-OH-Diclofenac Bildung in Enterozyten- (●) und Leberhomogenat (○).

2.5.1.1 Diclofenac-4-hydroxylierung

Die Diclofenac-4'-hydroxylierung wurde in Enterozyten und Leberhomogenat von 14 Patienten bestimmt (Tabelle 25). In allen Proben wurde Diclofenac zu 4'-OH-Diclofenac umgesetzt. Geringe Mengen 3'-OH-Diclofenac wurden sowohl in Inkubationen mit Enterozyten- als auch mit Leberhomogenat gebildet.

Die Maximalgeschwindigkeit (V_{max}) der Diclofenac-4-hydroxylierung war in Leber im Durchschnitt um das 3,8-fache höher als in den korrespondierenden Enterozyten ($P < 0,0005$), die intrinsischen Clearance (Cl_{int}) war 7,8-fach erhöht ($P < 0,0005$). In beiden Geweben war die Diclofenac-4-hydroxylierung nicht korreliert (Abbildung 32). Die Diclofenac-4-hydroxylierung entsprach in Enterozyten- und Leberhomogenaten einer monophasischen Michaelis-Menten-Kinetik, mit vergleichbaren Michaelis-Konstanten (Irrtumswahrscheinlichkeit der mathematischen Angleichung (χ^2 -Test) in Enterozytenhomogenaten: $4,2 \pm 2,8\%$; in Leberhomogenaten: $0,4 \pm 0,3\%$).

Tabelle 25: Individuelle Daten der Diclofenac-4-hydroxylierung und CYP2C9 Expression in Enterozyten- und Leberhomogenaten von 15 Patienten (angegeben pro mg Proteinhomogenat). (n.b.): aufgrund zu geringer Enzymaktivität nicht bestimmbar. (MW \pm SD): Mittelwert \pm Standardabweichung.

Patient	Enterozyten				Leber			
	$V_{\max}^{4\text{-OH-D}}$ [pmol/mg/min]	K_m [μ M]	$Cl_{\text{int}}^{4\text{-OH-D}}$ [μ /mg/min]	CYP2C9 [pmol/mg]	$V_{\max}^{4\text{-OH-D}}$ [pmol/mg/min]	K_m [μ M]	$Cl_{\text{int}}^{4\text{-OH-D}}$ [μ /mg/min]	CYP2C9 [pmol/mg]
A	341,6 \pm 85,6	4,73 \pm 2,10	72,2	3,4	880,1 \pm 49,8	2,46 \pm 0,28	357,7	25,5
C	204,4 \pm 33,2	6,52 \pm 1,79	31,4	2,1	1092,2 \pm 64,3	3,77 \pm 0,42	289,7	26,1
D	241,5 \pm 58,9	10,22 \pm 3,7	23,6	2,6	601,5 \pm 28,7	3,02 \pm 0,27	199,2	23,2
E	219,2 \pm 30,2	5,94 \pm 1,41	36,9	1,8	770,8 \pm 30,0	3,96 \pm 0,29	194,6	3,1
F	199,8 \pm 29,8	4,57 \pm 1,25	43,7	2,8	1150,4 \pm 25,8	3,91 \pm 0,16	294,2	30,1
G	300,4 \pm 24,6	4,24 \pm 0,64	71,5	2,8	1282,8 \pm 44,2	3,28 \pm 0,22	391,1	22,0
H	210,5 \pm 30,4	5,18 \pm 1,32	40,6	1,3	814,4 \pm 46,1	4,59 \pm 0,44	177,4	10,7
I	266,9 \pm 13,5	5,69 \pm 0,48	46,9	2,0	1050,3 \pm 29,9	3,86 \pm 0,20	272,1	23,0
L	251,3 \pm 35,0	5,84 \pm 1,39	43,0	2,8	1328,0 \pm 28,5	3,05 \pm 0,13	435,4	38,0
M	252,5 \pm 23,6	9,27 \pm 1,34	27,2	1,5	693,0 \pm 29,3	3,31 \pm 0,25	209,4	7,7
N	584,8 \pm 151	9,58 \pm 3,56	61,0	0,5	931,7 \pm 23,9	3,87 \pm 0,25	240,7	29,0
O	341,6 \pm 85,6	4,73 \pm 2,10	72,2	1,5	880,1 \pm 49,8	2,46 \pm 0,28	357,7	16,0
R	n.b.	n.b.	n.b.	0,8	250,9 \pm 5,8	2,38 \pm 0,12	105,4	12,7
S	149,2 \pm 22,7	9,17 \pm 2,2	16,3	6,4	874,0 \pm 19,4	2,62 \pm 0,12	333,2	24,5
MW \pm SD	274,1 \pm 108,6	6,6 \pm 2,2	68,0 \pm 92,0	2,3 \pm 1,4	900,0 \pm 281,7	3,3 \pm 0,7	275,6 \pm 93,2	21,0 \pm 10,0

2.5.1.2 CYP2C9 Proteinexpression

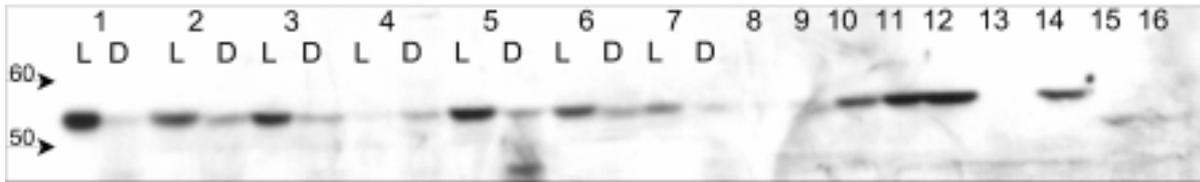


Abbildung 31: Immunoblot der CYP2C9 Expression in Enterozyten- (D) und Leberhomogenat (L). Im dargestellten Blot wurden jeweils 50 µg Proteinhomogenat der Proben A (1), C (2), D (3), E (4), F (5), G (6) und H (7) aufgetragen. Als Eichpunkte wurden 50, 100, 250, 500 und 1000 fmol rekombinantes CYP2C9 verwendet (8-12). Die Spuren 13-16 enthielten jeweils 500 fmol rekombinantes CYP2C8, 2C9, 2C18, und 2C19 als Kontrollen.

In Enterozytenhomogenat betrug der CYP2C9 Proteingehalt $2,3 \pm 1,4$ pmol/mg. Die Einzelwerte schwankten um das 12,8-fache. In den Leberhomogenaten war der CYP2C9 Proteingehalt mit $21,0 \pm 10,0$ pmol/mg um das 9-fache höher ($P < 0,0001$) als in den korrespondierenden Enterozyten. Der CYP2C9 Gehalt variierte dabei um das 12,3-fache. Eine Korrelation der CYP2C9 Proteinexpression in beiden Organen war nicht festzustellen (Abbildung 32).

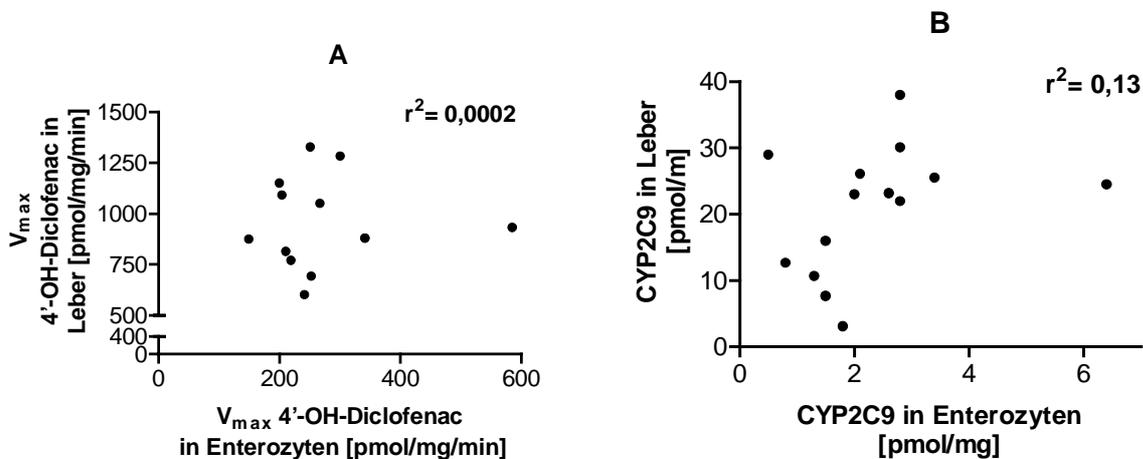


Abbildung 32: Korrelation zwischen der Maximalgeschwindigkeit der Diclofenac-4-hydroxylierung (A) bzw. dem CYP2C9 Proteingehalt (B) in Enterozyten- und Leberhomogenaten.

2.5.1.3 Korrelation zwischen 4'-OH-Diclofenac Aktivität und CYP2C9 Proteinexpression

Die Maximalgeschwindigkeit ($V_{\max 4\text{-OH-D}}$) als auch die intrinsische Clearance von 4'-OH-Diclofenac ($Cl_{\text{int } 4\text{-OH-D}}$) korrelierten mit dem jeweiligen CYP2C9 Proteingehalt in Leberhomogenaten ($r^2 = 0,39$; $P < 0,05$ bzw. $r^2 = 0,42$; $P < 0,05$ $n = 14$). Die Maximalgeschwindigkeit der Verapamil-O-Demethylierung zu D-703 ($V_{\max \text{ D-703}}$) korrelierte, wie auch alle anderen gemessenen maximalen Umsatzraten ($V_{\max \text{ D-617}}$, $V_{\max \text{ Norverapamil}}$, $V_{\max \text{ D-702}}$, $V_{\max \text{ M3G}}$, $V_{\max \text{ M6G}}$) nicht mit dem in Leber bestimmten CYP2C9 Gehalt ($r^2 = 0,03$). In den

Enterozytenhomogenaten waren sowohl zwischen V_{\max} 4'-OH-D als auch zwischen V_{\max} D-703 und dem CYP2C9 Proteingehalt keine Korrelationen vorhanden ($r = -0,52$ bzw. $r = -0,50$). Die Diclofenac-4-hydroxylierung pro pmol CYP2C9 wies in den Leber- ($60,0 \pm 58,4$ pmol 4'-OH-Diclofenac/min) und in Enterozytenhomogenaten ($138,0 \pm 76,5$ pmol 4'-OH-Diclofenac/min) signifikante Unterschiede auf ($P < 0,05$).

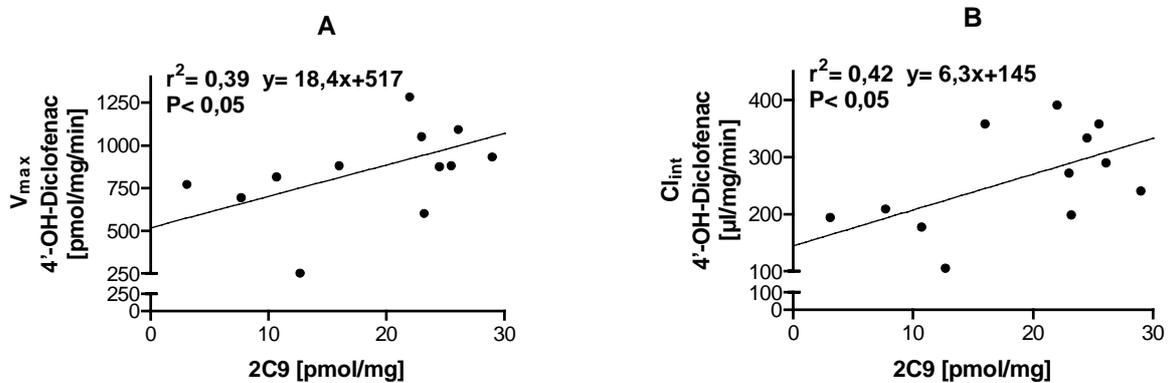


Abbildung 33: Korrelation zwischen der maximalen Bildungsrate (A) bzw. der intrinsischen Clearance (B) von 4'-OH-Diclofenac mit dem CYP2C9 Proteingehalt in Leberhomogenaten.

2.6 CYP2C19 Proteinexpression

Der CYP2C19 Proteingehalt war in Enterozyten im Mittel um 36% niedriger als in den entsprechenden Lebern, die Unterschiede waren jedoch nicht statistisch signifikant ($P > 0,05$). Die individuellen Daten sind in Tabelle 26 dargestellt. Die Einzelwerte schwankten in Enterozyten um das 10,6-fache und in Lebern um das 2,7-fache.

Tabelle 26: Individuelle Daten des CYP2C19 Proteingehalts in Enterozyten- und Leberhomogenaten von 14 Patienten (angegeben pro mg Proteinhomogenat). (MW \pm SD): Mittelwert \pm Standardabweichung. (n.b.): CYP2C19 Proteingehalt konnte nicht bestimmt werden, da zum Zeitpunkt der Messung die entsprechende Probe bereits verbraucht war.

Patient	Enterozyten CYP2C19 [pmol/mg]	Leber CYP2C19 [pmol/mg]
A	3,2	1,9
C	1,1	1,7
D	1,3	2,8
E	n.b.	1,4
F	0,7	2,0
G	0,9	1,5
H	0,7	3,4
I	3,1	2,1
K	0,5	0,9
L	0,3	1,8
M	2,4	2,0
N	n.b.	1,9
O	2,1	3,8
P	0,3	1,7
MW \pm SD	1,4 \pm 1,1	2,2 \pm 0,7

In Enterozyten belief sich der CYP2C19 Proteingehalt im Mittel auf 60,9% relativ zum CYP2C9 Proteingehalt. In Lebern machte der CYP2C19 Proteingehalt im Mittel lediglich 10,5% verglichen mit der CYP2C9 und 15,8% verglichen mit dem CYP2C8 Proteingehalt aus. Es bestand keine Korrelation zwischen dem CYP2C19 Proteingehalt in beiden Organen (Abbildung 34).

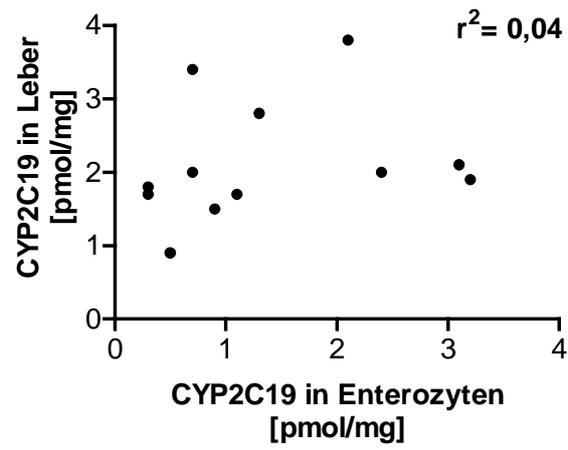


Abbildung 34: Korrelation zwischen dem CYP2C19 Proteingehalt in Erythrozyten und Leberhomogenaten.

2.7 Morphinglucuronidierung in Enterozyten und Leber

Die Morphinglucuronidierung wurde in Enterozyten- und Leberhomogenaten mit und ohne Aktivierung durch Alamethicin gemessen. Die individuellen Daten sind in Tabelle 27 und Tabelle 28 dargestellt.

Tabelle 27: Individuelle Daten der Morphin-3-glucuronidierung in Enterozyten und Leberhomogenaten von 15 Patienten mit und ohne Aktivierung durch Alamethicin (0,1mg/mg Homogenat) unter V_{\max} -Bedingungen (10 mM Morphin). Angegeben sind die Mittelwerte aus Doppelbestimmungen. (n.b.): Morphinglucuronidierung konnte nicht bestimmt werden, da zum Zeitpunkt der Messung die entsprechende Probe bereits verbraucht war. Mittelwert \pm Standardabweichung.

Patient	V_{\max} M3G in Enterozyten ohne Alamethicin [pmol/mg/min]	V_{\max} M3G in Enterozyten mit Alamethicin [pmol/mg/min]	V_{\max} M3G in Leber ohne Alamethicin [pmol/mg/min]	V_{\max} M3G in Leber mit Alamethicin [pmol/mg/min]
A	323,2	950,4	553,6	1075,8
B	n.b.	n.b.	417,1	906,3
C	615,5	747,5	796,5	782,2
D	502,7	743,6	288,1	1167,6
E	471,7	705,1	504,9	664,5
F	462,4	778,8	418,8	653,9
G	606,5	918,7	527,2	653,2
H	n.b.	n.b.	414,0	801,1
I	337,4	714,0	480,5	1140,0
K	n.b.	n.b.	949,1	1388,6
L	501,3	927,6	1179,1	969,5
M	530,7	908,9	722,4	1015,6
N	n.b.	n.b.	898,5	948,0
O	370,3	784,4	440,7	859,8
P	n.b.	n.b.	662,4	868,8
MW \pm SD	425,1 \pm 115,8	817,9 \pm 97,0	619,9 \pm 247,0	926,3 \pm 209,1

Tabelle 28: Individuelle Daten der Morphin-6-glucuronidierung in Enterozyten und Leberhomogenaten von 15 Patienten mit und ohne Aktivierung durch Alamethicin (0,1mg/mg Homogenat) unter V_{\max} -Bedingungen (10 mM Morphin). Angegeben sind die Mittelwerte aus Doppelbestimmungen. (n.b.): Morphinglucuronidierung konnte nicht bestimmt werden, da zum Zeitpunkt der Messung die entsprechende Probe bereits verbraucht war. (MW \pm SD): Mittelwert \pm Standardabweichung.

Patient	V_{\max} M6G in Enterozyten ohne Alamethicin [pmol/mg/min]	V_{\max} M6G in Enterozyten mit Alamethicin [pmol/mg/min]	V_{\max} M6G in Leber ohne Alamethicin [pmol/mg/min]	V_{\max} M6G in Leber mit Alamethicin [pmol/mg/min]
A	22,3	73,4	79,2	164,3
B	n.b.	n.b.	57,7	126,9
C	46,7	67,2	116,9	134,8
D	25,3	45,8	41,5	170,6
E	33,3	59,6	72,4	110,1
F	25,4	54,5	58,5	99,4
G	33,8	63,9	90,3	116,9
H	n.b.	n.b.	59,1	122,9
I	19,1	45,9	65,4	177,7
K	n.b.	n.b.	121,2	216,9
L	26,8	60,2	178,8	162,3
M	32,4	66,7	115,9	182,5
N	n.b.	n.b.	100,5	128,6
O	21,3	54,7	56,9	138,6
P	n.b.	n.b.	92,6	135,3
MW \pm SD	25,0 \pm 8,7	59,2 \pm 9,1	87,1 \pm 35,6	145,9 \pm 32,0

Das Ausmaß der Morphin-3-glucuronidierung in mit Alamethicin aktivierten Enterozyten- und Leberhomogenaten zeigte keine signifikanten Unterschiede ($P > 0,05$). Die Bildung von M6G in mit Alamethicin aktivierten Leberhomogenaten war, verglichen mit der Aktivität in den entsprechenden Enterozyten, um das 2,5-fache erhöht ($P < 0,0001$). Sowohl die Aktivierung der Morphin-3- als auch der Morphin-6-glucuronidierung durch Alamethicin, wies in Enterozyten- (M3G: 1,8-fach; M6G: 1,7-fach) verglichen mit Leberhomogenaten (M3G: 2,2-fach; M6G: 1,9-fach) keine signifikanten Unterschiede auf. Es wurden jedoch signifikante Unterschiede im Verhältnis der beiden Metabolite in beiden Organen sowohl ohne Aktivierung als auch mit Aktivierung durch Alamethicin gemessen ($P < 0,0001$). So

wurde in mit Alamethicin aktivierten Enterozyten das Verhältnis $V_{\max}\text{M3G}/V_{\max}\text{M6G}$ mit $14,0 \pm 1,6$ und in den Leberhomogenaten mit $6,4 \pm 0,5$ bestimmt.

Die interindividuelle Variabilität der Morphinglucuronidierung war im Gegensatz zu den durch Cytochrom P450 Enzyme katalysierten Oxidationen von Verapamil und Diclofenac deutlich geringer. Der Variationskoeffizient der Morphin-3-glucuronidierung war in Enterozyten und Leber 11,6% bzw. 22,6%, die Morphin-6-glucuronidierung variierte um 11,7% bzw. 21,9%. Weder die Morphin-3- noch die Morphin-6-glucuronidierung war in Enterozyten und Lebern korreliert (Abbildung 35).

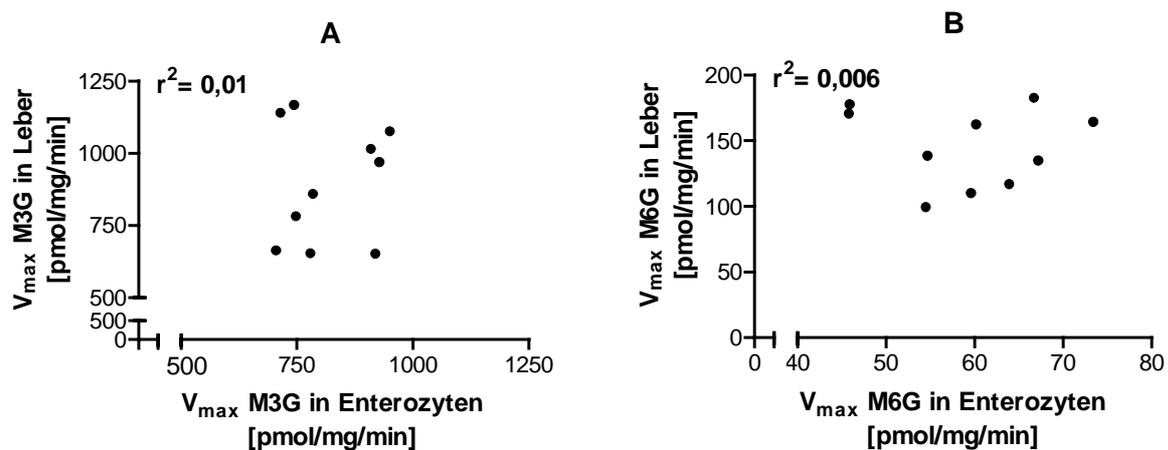


Abbildung 35: Korrelation zwischen V_{\max} M3G (A) bzw. V_{\max} M6G (B) in Enterozyten- und Leberhomogenaten.

2.7.1 Identifizierung und Untersuchungen von Hemmstoffen der Morphin-glucuronidierung

Gabapentin und Codein zeigten keine Hemmung der Morphinglucuronidierung (Abbildung 36).

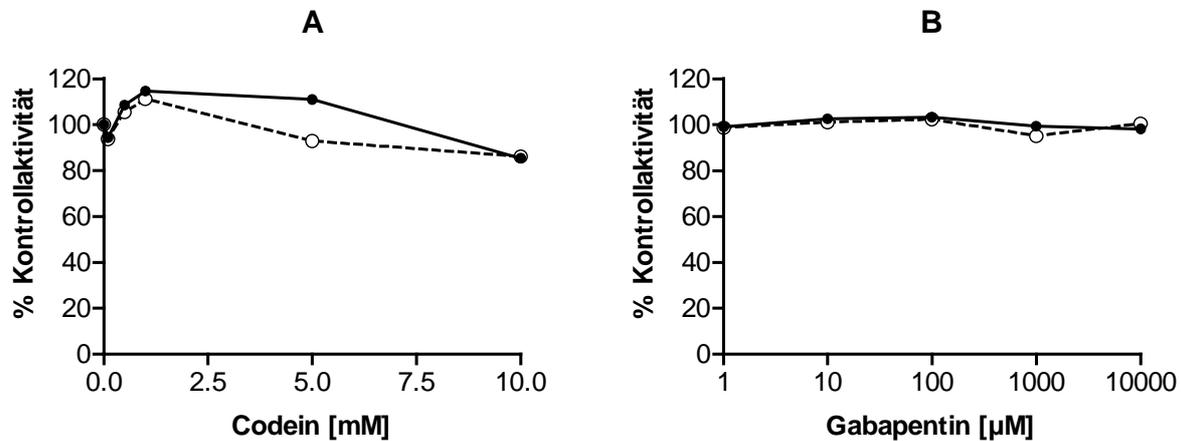


Abbildung 36: Effekte von Codein (A) und Gabapentin (B) auf die Morphin-3- (●) und Morphin-6-glucuronidierung (○) in Leberhomogenat bei einer Morphin Konzentration von 10 mM.

Diclofenac, Naringenin und Testosteron hemmten die Morphinglucuronidierung kompetitiv, für Dextromethorphan, 1-Naphthol und Propafenon ergab die Verwendung eines nicht-kompetitiven Modells die beste Angleichung an die gemessenen Daten. Testosteron, Propafenon und Diclofenac hemmten die Bildung von M3G und M6G mit gleicher Affinität. Für Naringenin und Dextromethorphan sind die K_i -Werte der M6G-Hemmung um den Faktor 2,7 bzw. 6,9 niedriger als die entsprechenden K_i -Werte der M3G-Hemmung. 1-Naphthol hemmte hingegen die Morphin-6-glucuronidierung stärker als die Morphin-3-glucuronidierung. Die K_i -Werte der einzelnen Substanzen sind in Tabelle 29 dargestellt.

Tabelle 29: Aufstellung über in Leberhomogenat ermittelte Inhibitorkonstanten (K_i) von Hemmstoffen der Morphinglucuronidierung.

Hemmstoff	K_i -Wert Hemmung M3G [μM]	K_i -Wert Hemmung M6G [μM]
Testosteron	262,8	278,6
Propafenon	190,9	201,0
1-Naphthol	62,5	23,9
Dextromethorphan	10,3	71,3
Diclofenac	18,7	17,7
R/S Naringenin	5,2	14,1

Die in Kapselform als Grapefruitkernextrakt verkauften getrockneten Fruchtwände von Pommeranzen (*Citrus aurantium*) hemmten fast vollständig die Morphinglucuronidierung. Im Konzentrationsbereich von 0,01-0,5 mg/ml Grapefruitkernextrakt-Auszug ist eine nahezu lineare Abnahme der M3G- bzw. M6G Aktivität zu beobachten (Abbildung 37). Eine Kapsel (50 mg Trockenextrakt) mit einem Glas Wasser (250 ml) eingenommen entspricht einer Konzentration von 0,2 mg/ml.

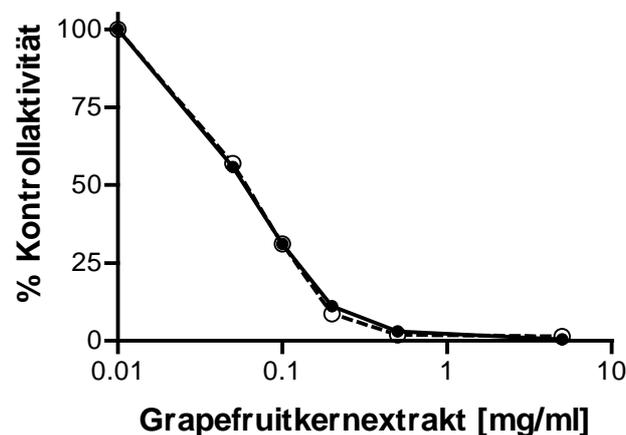


Abbildung 37: Hemmung der Morphin-3- (●) und Morphin-6-glucuronidierung (○) in Leberhomogenat durch Grapefruitkernextrakt bei Inkubationen mit 10 mM Morphin. Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf einen wässrigen Grapefruitkernextrakt-Auszug.

2.8 Expression des ABC-Transporters MDR1 P-Glykoprotein in Enterozyten und Leber

2.8.1 Untersuchungen zur Glycosylierung von P-Glykoprotein

In Proteinhomogenaten aus Zellen, die rekombinantes P-Glykoprotein exprimieren (L-MDR1), erkannte McAb F4 eine Bande bei 170-180 kDa. Bei der Western Blot Analyse von P-Glykoprotein wurden, abweichend vom Originalprotokoll, die in Lämmli-Puffer aufgenommenen Proben nicht erhitzt, da beim Aufkochen Banden von >300 kDa detektiert wurden, wie in Abbildung 38 dargestellt. Dieser Effekt ist vermutlich auf eine Agglomeration von P-Glykoprotein zurückzuführen (persönliche Mitteilung Dr. U. Brinkmann, Epidaurus AG).

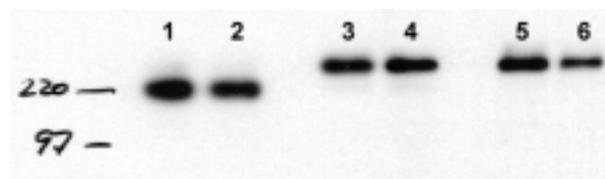


Abbildung 38: 50 µg L-MDR1 Zellhomogenat Kontrolle (1, 2). 50 µg L-MDR1 Zellhomogenat über 2 Minuten (3, 4) und 5 Minuten (5, 6) bei 95° C erhitzt.

In humanen Geweben wie Leber und Darm wurde eine zusätzliche Bande bei 100-120 kDa erkannt (Greiner et al. 1999). Zur Klärung der Frage ob es sich bei dieser Bande um ein durch Proteolyse oder Deglycosylierung entstandenes Abbauprodukt von P-Glykoprotein handelt, wurde ein Endo-N-Acetylglucosaminidase Verdau durchgeführt.

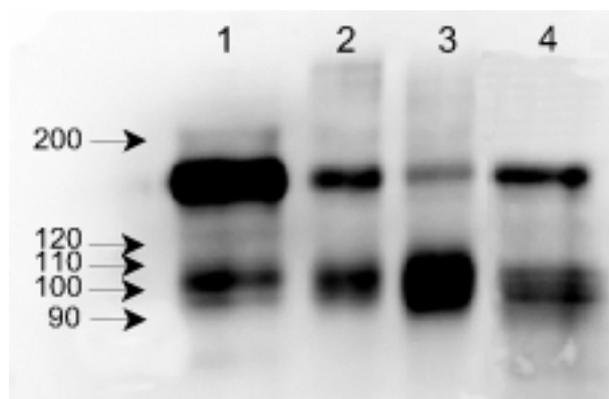


Abbildung 39: Endo F Verdau von P-Glykoprotein. 50 µg L-MDR1 Zellhomogenat wurden als unbehandelte Kontrolle aufgetragen (1). Verdau von 50 µg L-MDR1 Zellhomogenat mit 0,2 (2) und 0,5 (3) Einheiten Endo F. Weitere 50 µg Enterozytenhomogenat von Patient E wurden als Vergleich für die in humanen Proben auftretende 100-120 kDa Bande mitaufgetragen.

Die Deglycosylierung von L-MDR1 Zellhomogenat führte zum Auftreten einer, von der Menge an eingesetztem Enzym abhängigen Bande von 100-120 kDa. Der R_f -Wert dieser Bande war identisch mit dem in humanem Enterozytenhomogenat. Zu Vermeidung proteolytischen Abbaus waren in den mit Endo F inkubierten L-MDR1 Zellhomogenaten die Proteasehemmstoffen EDTA, Leupeptin, Pepstatin und PefaBloc zugesetzt.

2.8.2 Bestimmung der P-Glykoprotein Expression in Enterozyten- und Leberhomogenat

Da z. Zt. kein gereinigtes P-Glykoprotein zu Verfügung steht, wurden P-Glykoprotein Immunoblots mittels L-MDR1 Zellhomogenat standardisiert.

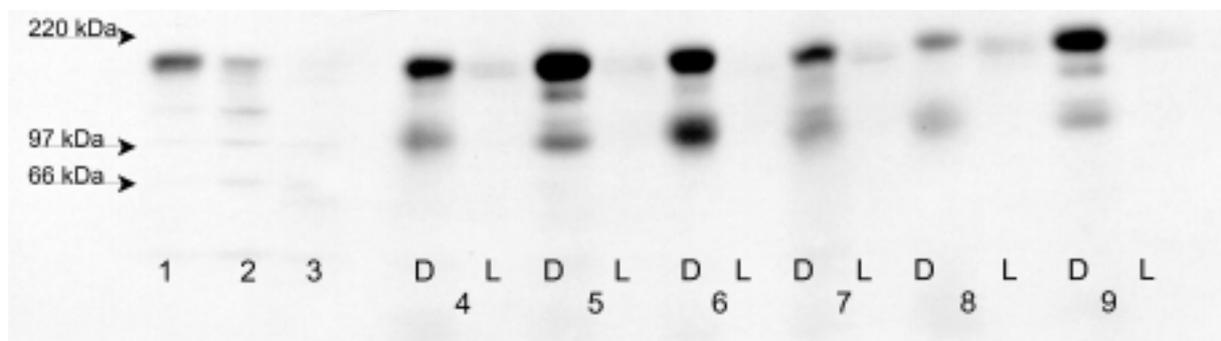


Abbildung 40: Immunoblot der P-Glykoprotein Expression in Enterozyten- und Leberhomogenat. Zur Standardisierung wurden 5 und 2 µg L-MDR1 Referenzzellhomogenat aufgetragen (1, 2). Als Negativkontrolle wurden 20 µg LLC-PK1 Zellhomogenat verwendet (3). Aufgetragen wurden 50 µg Enterozyten- (D) und Leberhomogenat (L) der Patienten G (4), F (5), E (6), D (7), C (8), A (9).

Die Expression von P-Glykoprotein wurde in 13 Enterozyten und Leberhomogenaten mit Röntgenfilm bestimmt (Patienten A, C, D, E, F, G, I, K, L, M, N, O, P). Das so gemessene P-Glykoprotein Signal schwankte in Enterozytenhomogenat um das 65-fache (40,1 bis 2658 ODs) Da die Signalstärke von P-Glykoprotein in Leberhomogenaten sehr schwach und ein lineares Ansprechen von Röntgenfilmen auf diese Signale nicht gewährleistet war, wurden die Messungen zu einem späteren Zeitpunkt mit einem Chemilumineszenz Imager (LAS-1000, Fuji) wiederholt. Aufgrund der sehr geringen Mengen Enterozytenhomogenat der Patienten K, N und P (vgl. 2.2.1), war kein Material mehr für diese Wiederholungsmessungen verfügbar. Das P-Glykoprotein Signal betrug in Enterozytenhomogenat $40,4 \pm 14,3 \text{ LAU} \times 10^6/\text{mg}$. Die Einzelwerte schwankten um das 4,0-fache. Die Leberhomogenate enthielten $6,3 \pm 2,5 \text{ LAU} \times 10^6/\text{mg}$ P-Glykoprotein mit einer interindividuellen Variabilität um den Faktor 4,4. Die P-Glykoprotein Expression in Enterozyten- war im Mittel um das 6,4-fache höher als in den entsprechenden Leberhomogenaten ($P < 0,0001$) und in beiden Geweben nicht koreguliert ($r^2 = 0,007$). Die individuellen Daten sind in Tabelle 30 aufgeführt.

Tabelle 30: Relativer P-Glykoprotein Gehalt in Enterozyten- und Leberhomogenaten von 17 Patienten, angegeben in Signalintensität pro mg Proteinhomogenat. (n.b.): P-Glykoprotein Proteingehalt konnte nicht bestimmt werden, da zum Zeitpunkt der Messung die entsprechende Probe bereits verbraucht war. (MW \pm SD): Mittelwert \pm Standardabweichung.

Patient	P-Glykoprotein in Enterozyten [LAU x 10 ⁶ /mg]	P-Glykoprotein in Leber [LAU x 10 ⁶ /mg]
A	42,4	8,1
B	n.b.	6,4
C	27,4	7,5
D	19,4	6,5
E	52,5	3,6
F	50,4	4,3
G	52,2	7,6
H	n.b.	4,0
I	41,4	6,6
K	n.b.	5,5
L	38,3	6,6
M	54,3	6,9
N	n.b.	2,3
O	58,2	3,5
P	n.b.	2,5
R	14,4	2,6
S	34,0	11,6
MW \pm SD	40,4 \pm 14,2	6,3 \pm 2,5

Geschlechtsspezifische Unterschiede der P-Glykoprotein Expression waren weder in Enterozyten (weiblich: 44813 \pm 12281 LAU/ μ g, n= 6; männlich 36016 \pm 15788 LAU/ μ g, n= 6) noch in Leber (weiblich: 5756 \pm 3313 LAU/ μ g, n= 8; männlich 5587 \pm 1620 LAU/ μ g, n= 9) vorhanden.

Wie in Abbildung 41 dargestellt bestand eine negative Korrelation von CYP3A4 und P-Glykoprotein in Enterozyten- und Leberhomogenaten.

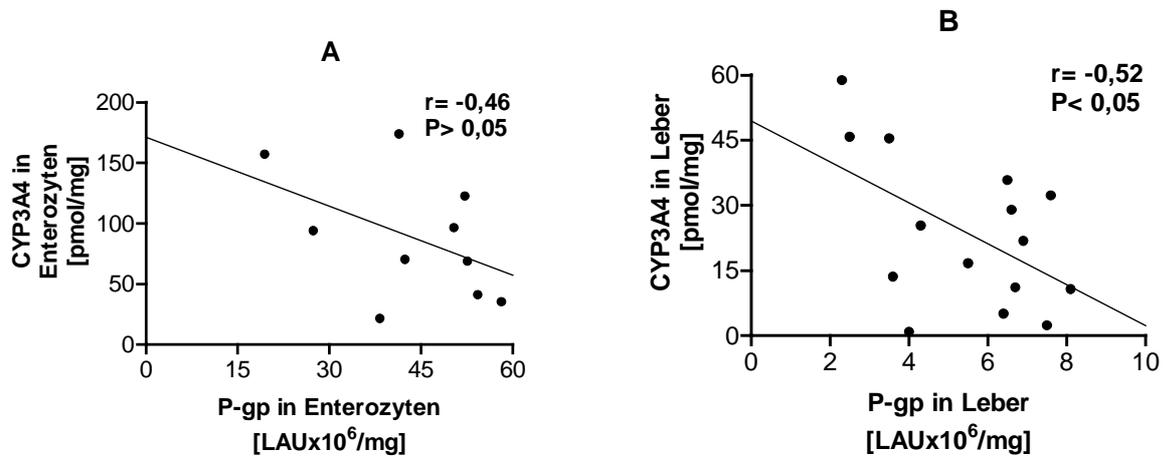


Abbildung 41: Korrelation zwischen dem CYP3A4- und P-Glykoprotein Proteingehalt in Enterozyten- (n= 10) (A) und Leberhomogenaten (n= 15) (B).

2.8.3 Untersuchungen zum gerichteten Transport von Verapamil und seiner Metabolite an Zellmonolayern

Das Ausmaß der Translokation von 5 μ M Verapamil, Norverapamil und D-703 durch Caco-2 Zellmonolayer war in beide Richtungen vergleichbar. Versuche mit L-MDR1 sowie in LLC-PK1 Zellmonolayern, die kein P-Glykoprotein enthalten und demnach als Negativkontrolle verwendet wurden, zeigten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede der Translokationsraten in beide Richtungen (Abbildung 42).

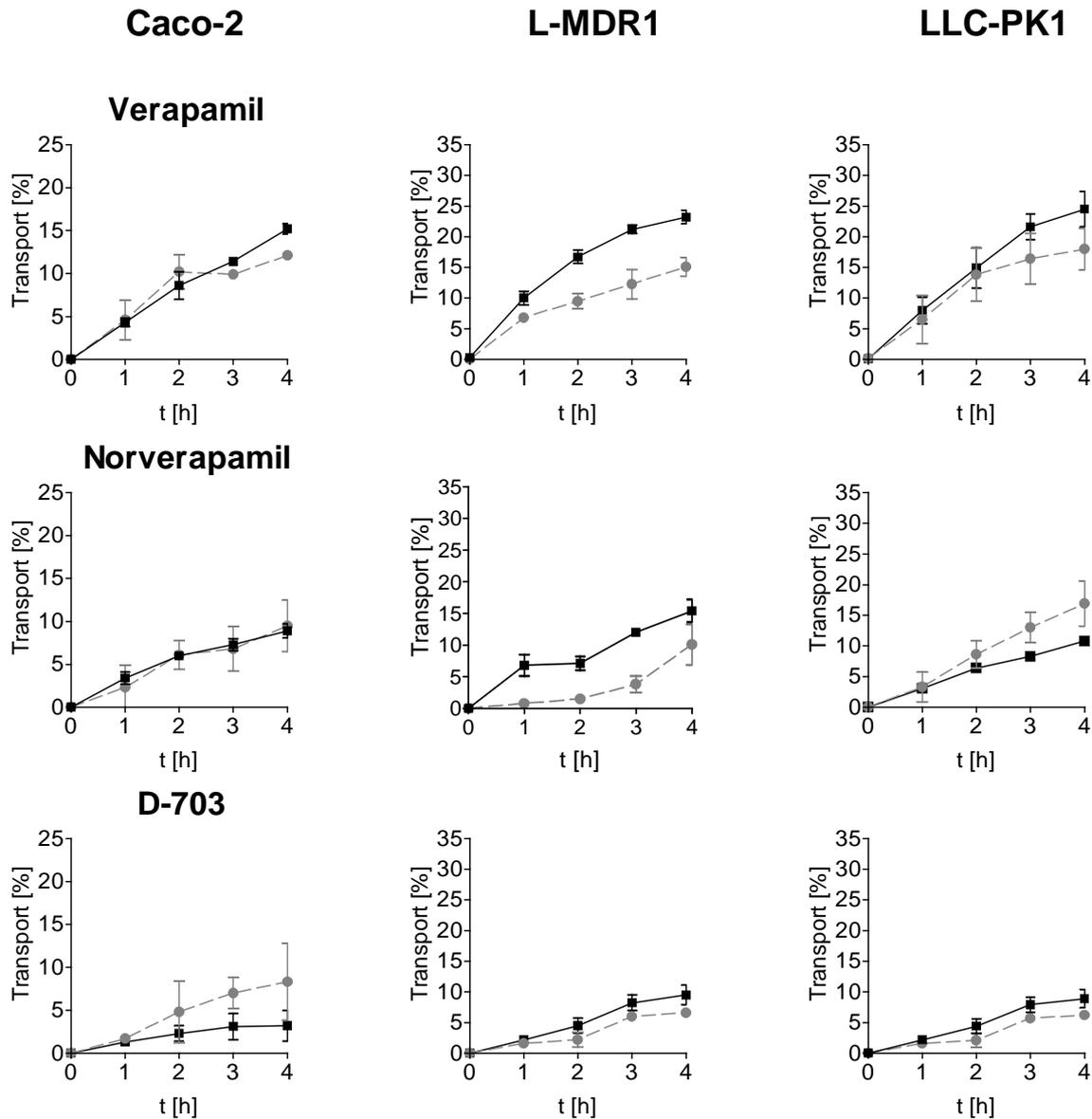


Abbildung 42: Translokationsraten von 5 µM Verapamil, Norverapamil und D-703 durch P-Glykoprotein überexprimierende L-MDR1-, humane Kolonkarzinom- (Caco-2) und LLC-PK1 Zellmonolayer. Dargestellt sind die Translokationsraten von basal-apikal (■) und apikal-basal (●).

In Konzentrationen von 0,5 µM eingesetzt, zeigten sich für Verapamil unterschiedliche Translokationsraten ($T_{b-a\ 4h}$: $25,0 \pm 2,0\%$; $T_{a-b\ 4h}$: $9,7 \pm 1,3\%$) in L-MDR1 Zellen, während dieser Unterschied in LLC-PK1 Zellen nicht zu beobachten war. Ebenso wurde für 0,5 µM Norverapamil in den P-Glykoprotein überexprimierenden L-MDR1 Zellen ein basal nach apikaler Transport gemessen ($T_{b-a\ 4h}$: $23,5 \pm 1,6\%$; $T_{a-b\ 4h}$: $3,9 \pm 0,4\%$, siehe Abbildung 43).

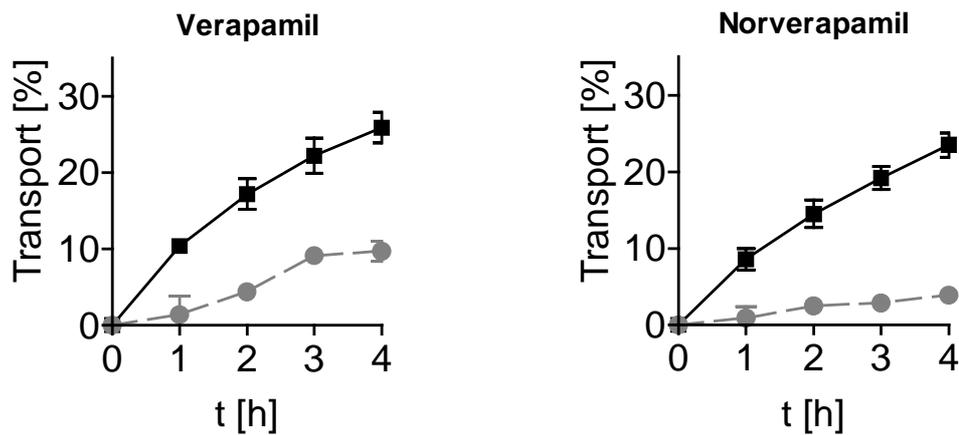


Abbildung 43: Translokationsraten von 0,5 μM Verapamil und Norverapamil durch P-Glykoprotein überexprimierende L-MDR1 Zellmonolayer. Dargestellt sind die Translokationsraten von basal-apikal (■) und apikal-basal (●).

Die Translokation von D-620 und D-617 durch Caco-2 und L-MDR1 Zellmonolayer war bereits in Konzentrationen von 5 μM signifikant größer, wenn die Substanzen basal appliziert und ihr Erscheinen apikal gemessen wurde. In Experimenten an LLC-PK1 Zellmonolayer waren diese Unterschiede nicht vorhanden (Abbildung 44). D-620 und D-617 unterliegen somit einem P-Glykoprotein abhängigem gerichteten Transport.

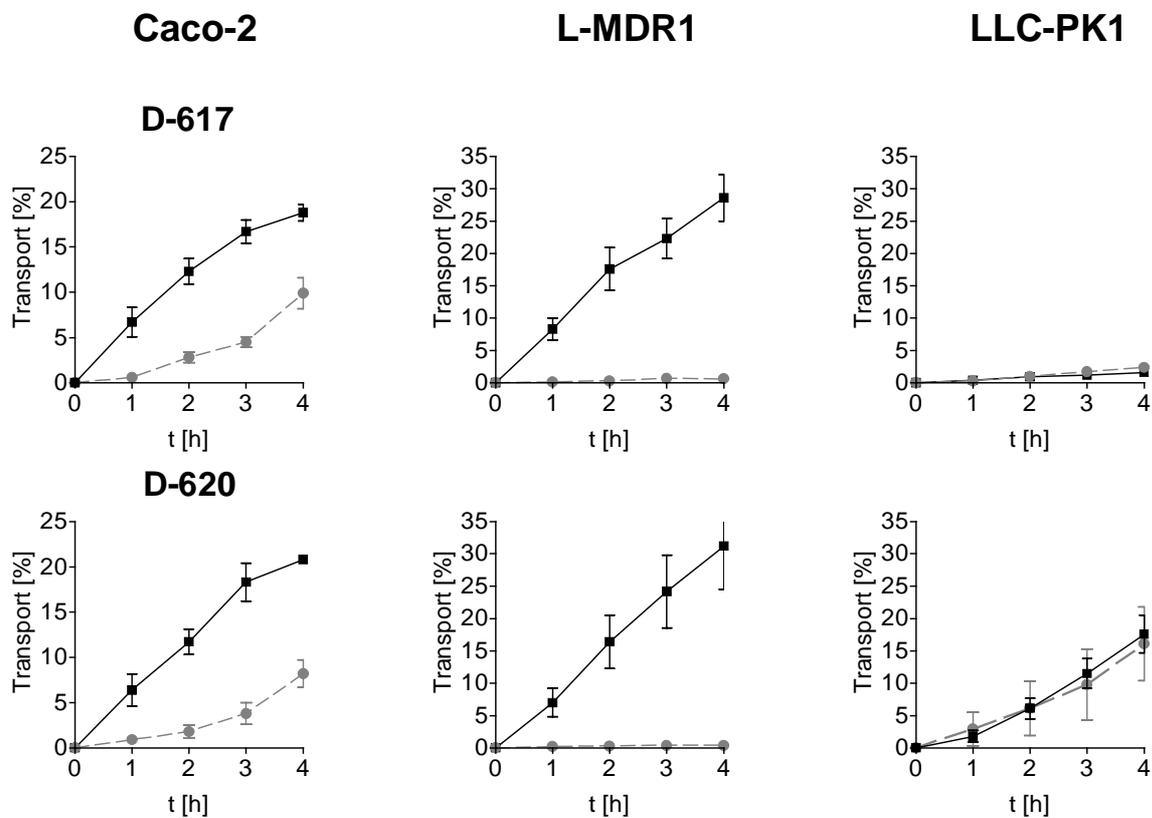


Abbildung 44: Translokationsraten von 5 μM D-617 und D-620 durch P-Glykoprotein überexprimierende L-MDR1-, humane Kolonkarzinom- (Caco-2) und LLC-PK1 Zellmonolayer. Dargestellt sind die Translokationsraten von basal-apikal (■) und apikal-basal (●).

3 Diskussion

3.1 Gewebesammlung/ Isolierung von Enterozyten

Ein direkter Vergleich der Proteinexpression verschiedener Cytochrom P450 Enzyme und von P-Glykoprotein zwischen Darm und Leber ist aufgrund der hohen interindividuellen Schwankungen dieser Enzyme in beiden Organen (Paine et al. 1997; Lown et al. 1997; Schuetz et al. 1995; Transon et al. 1996) nicht möglich, wenn die untersuchten Darm und Leberproben verschiedenen Individuen entstammen. Die dieser Arbeit zugrunde liegende Sammlung von Darm und Lebergewebe aus jeweils ein und demselben Patienten, ermöglichte erstmals eine gepaarte Analyse der Expression dieser Enzyme in beiden, am First-Pass Metabolismus beteiligten Organen, unter Ausschluß interindividueller Schwankungen. Bei der Sammlung und Aufarbeitung der Gewebe war die „warme Ischämiezeit“ so kurz wie möglich zu halten, um eine Verfälschung der Ergebnisse aufgrund von Proteolyse der untersuchten Enzyme oder Degradation der thermolabilen CYP3A Isoenzyme (Yamazaki et al. 1997) zu minimieren. Die „warme Ischämiezeit“ war im Mittel mit 50 Minuten deutlich niedriger als die von (Paine et al. 1997), für Organspendern entnommenen Därme, angegebenen 5 Stunden. Mit Ausnahme der Isolierung von Enterozyten war die Aufarbeitung von Darm und Leber in die entsprechenden Homogenate identisch. Folglich konnte ausgeschlossen werden, daß die in beiden Organen beobachtete differentielle Enzymexpression und -aktivität aus Unterschieden bei der Aufarbeitung der eingesetzten Enterozyten- und Leberhomogenate resultieren.

Im Gegensatz zur Leber, die mit Ausnahme von CYP3A4 eine über das gesamte Organ homogene Verteilung der Cytochrom P450 Expression aufweist (Ratanasavanh et al. 1991; Watkins et al. 1990), ist im Darm die Expression dieser Enzymfamilie auf die Enterozyten, die die einschichtige Epithelschicht dieses Organs bilden, beschränkt (Murray et al. 1988). Die Gesamtmenge CYP3A4, das Enzym welches fast die Hälfte aller heute gebräuchlichen Arzneistoffe metabolisiert, ist im Darm um den Faktor 20-30 niedriger als in der Leber (Back and Rogers 1987; de Waziers et al. 1990; Krishna and Klotz 1994). Für die CYP3A4 Substrate Midazolam (Thummel et al. 1996; Paine et al. 1996) und Verapamil (Fromm et al. 1996; von Richter et al. 2000) wurde jedoch gezeigt, daß das Ausmaß der intestinalen First-Pass Extraktion vergleichbar mit der hepatischen First-Pass Extraktion beider Substanzen ist. Ein Vergleich der Gesamtzytommengen beider Organe ist daher unzureichend, um den intestinalen First-Pass Metabolismus vorauszusagen. Folglich wurden in dieser Arbeit die Enterozyten als Ausgangsmaterial für den intestinalen Stoffwechsel zugrunde gelegt, da die intestinale Expression von CYPs, UGTs und P-Glykoprotein ausschließlich auf diesen Zelltyp beschränkt ist (Murray et al. 1988; Kolars et al. 1992; Peters and Jansen 1988; Cordon-Cardo et al. 1990; Thiebaut et al. 1987).

Zur schonenden und selektiven Isolierung von Enterozyten wurde die Vibrationsmethode nach (Hülsmann et al. 1973) mit den beschriebenen Modifikationen verwendet. Entsprechend den von (Fasco et al. 1993) und (Borm et al. 1983) gemachten Beobachtungen wurde dabei

das Villusepithel als zusammenhängende Schicht über die ganze Villuslänge abgetrennt. Bei der gewählten Vibrationsdauer von 5 Minuten wurden keine Epithelzellen der Lieberkühnschen Krypten abgelöst. Diese Beobachtung deckt sich mit Untersuchungen von (Koster et al. 1984), bei denen Zellmaterial aus Krypten erst nach 10-minütiger Vibration im Zellisolat auftrat. In keiner der analysierten morphologischen Kontrollen der mittels Vibrationsmethode isolierten Darmstücke wurden abgetrennte Villi festgestellt. Folglich erübrigte sich eine Standardisierung der Zellisolate auf ihren Enterozytengehalt..

Eine derartige Standardisierung würde das Vorhandensein eines Enterozytenmarkers voraussetzen, der keine interindividuellen Schwankungen aufweist. (Lown et al. 1994) verwendeten Villin, ein Protein, das am Aufbau der Bürstensaummembran beteiligt ist, zur Standardisierung des Enterozytengehalts von Duodenalbiopsien verschiedener Individuen. Allerdings wurde von Lown et al. lediglich gezeigt, daß der CYP3A4-Gehalt in Duodenalbiopsien eines Individuums mit dem Villin-Gehalt korreliert. Daten zur interindividuellen Variabilität des Villin-Gehalts in Enterozyten liegen nicht vor (persönliche Mitteilung Dr. J. Morrow, Yale University). Lown postuliert, daß der von Biopsie zu Biopsie unterschiedliche Enterozytengehalt auf der variablen Eindringtiefe der Biopsiezange beruht und das diese Unterschiede mit der Villinexpression korrelieren. Demnach müßten entsprechende Unterschiede bei mehrfacher Biopsieentnahme aus einem Individuum, wie beispielsweise bei Induktionsstudien, auftreten. Genau das war nicht der Fall wie von (Lown et al. 1997) selber gezeigt. Bei dieser Studie wurden aus einzelnen Individuen vor und nach Grapefruitsaftgabe Duodenalbiopsien entnommen. In Probanden, bei denen in der Kontrollbiopsie ein niedriger Villin-Gehalt festgestellt wurde, war der Villin-Gehalt auch in der nach Behandlung entnommenen Biopsie gering und umgekehrt (siehe Abb. 2 und 3 (Lown et al. 1997)). Die Verwendung von quantitativer Immunhistochemie (Fritz et al. 1992; Fritz et al. 1993) ermöglichte die Quantifizierung des Villingehalts in Duodenalbiopsien von 8 Probanden vor und nach Rifampizingabe direkt am Ort der Villin Expression, in der Bürstensaummembran (Greiner et al. 1999). Ein gepaarter t-Test ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen. Der Villin Gehalt in den Enterozyten vor und nach Rifampizinbehandlung wies vielmehr eine sehr gute Korrelation auf ($r= 0,96$; $P< 0,0001$). Die interindividuellen Schwankungen der Villinexpression betragen hingegen mehr als das 15-fache (0,043-0,65 ODs, unveröffentlichte Daten Drs. P. Fritz und B. Greiner). Somit ist Villin zur Standardisierung des Enterozytengehalts von Proben verschiedener Individuen ungeeignet.

Die Proteinausbeute relativ zum Feuchtgewicht des resektierten Darmgewebes war mit 0,34% wesentlich geringer als die von (Borm et al. 1983) für gesamten Rattendarm berichteten 2,4%. Eine Optimierung der Isolierungsmethode hinsichtlich der Proteinausbeute war in Ermangelung von ausreichenden Mengen humanem Darmgewebes nicht möglich.

3.2 Untersuchungen zur Cytochrom P450 Enzymspezifität des Verapamil Metabolismus

Zur Klärung der Frage, ob die Bildung von D-617 oder die von Norverapamil als eine prototypische, durch CYP3A4 katalysierte Reaktion angesehen werden kann, wurden Experimente mit rekombinant exprimierten CYP Isoenzymen durchgeführt. Rekombinant exprimierte CYPs bieten für Untersuchung zur Enzymspezifität den Vorteil, daß für jede CYP Isoform der Anteil an der intrinsische Clearance einer Substanz isoliert von anderen CYP Isoenzymen betrachtet werden kann. Allerdings handelt es sich um ein artifizielles System, in dem die Konkurrenz der einzelnen CYPs um Cytochrom P450 Reduktase bzw. Cytochrom b₅ (Tan et al. 1997) und ihre unterschiedliche Expression relativ zueinander nicht berücksichtigt werden. Dabei stellte sich heraus das von den untersuchten rekombinanten CYP Isoenzymen (CYP1A1, 1A2, 2C8, 2C9, 2C18, 2C19, 3A4, 3A5) CYP3A4 75,9% der Cl_{D-617} und 54,2% der $Cl_{Norverapamil}$ katalysiert. Der Anteil von CYP3A5 und CYP2C8 war für beide Metabolite gering. Diese Angaben sind für die in-vivo Situation oder für in-vitro Untersuchungen mit humanem Ausgangsmaterial nur relevant, wenn die relative Enzymmenge der einzelnen CYP Isoenzyme mit in die Berechnung einfließt. Da der Proteingehalt von CYP3A4 in Enterozyten und Leber im Vergleich zu CYP3A5 und CYP2C8 höher ist (vgl. 2.4.2.2, 2.4.3, 2.4.4.2), eignet sich die Verapamil-N-Desalkylierung demzufolge ebenso zur Messung von CYP3A4-Aktivität, wie die von (Nielsen et al. 1999) mithilfe von rekombinanten CYP Isoenzymen charakterisierte Chinidin-3-hydroxylierung oder die Midazolam-4-hydroxylierung (Kronbach et al. 1989).

Die mit dem CYP3A-Hemmstoff Ketoconazol durchgeführten Experimente zeigten in Übereinstimmung mit den o.a. Daten eine Hemmung der D-617- und Norverapamil-Bildung (74,2% Hemmung der D-617- vs. 72,7% Hemmung der Norverapamil-Aktivität bei 1 μ M Ketoconazol). Die Verwendung von Ketoconazol in Konzentrationen bis 1 μ M resultiert in einer spezifischen Hemmung von CYP3A (Baldwin et al. 1995; Newton et al. 1995). Die durch das CYP2C8 Substrat Taxol (Rahman et al. 1994) erzielte geringe Hemmung der D-617- und Norverapamil-Bildung war konform mit den in rekombinanten CYPs durchgeführten Untersuchungen. Aus den o.a. Daten wird in Übereinstimmung mit Ergebnissen von (Kroemer et al. 1993; Tracy et al. 1999) ersichtlich, daß die Bildung von D-617 und Norverapamil zu einem überwiegenden Anteil durch CYP3A4 katalysiert wird.

Die Korrelation zwischen dem CYP3A4 Proteingehalt und der Maximalgeschwindigkeit der D-617 Bildung war in Enterozytenhomogenaten ($r^2=0,83$; $P<0,0001$) besser als in den analysierten Leberhomogenaten ($r^2=0,46$; $P<0,01$). Eine mögliche Erklärung für dieses Ergebnis wäre, daß andere Enzyme, die differentiell in Leber und Darm exprimiert sind, an der Verapamil-N-Desalkylierung beteiligt sind.

Da zum Beitrag von Enzymen der CYP2C Familie am Verapamil Metabolismus z. T. widersprüchliche Angaben in der Literatur zu finden sind (Busse et al. 1995; Tracy et al. 1999) und der Beitrag von CYP2C19 nicht untersucht ist, wurden Experimente mit

rekombinant exprimierten CYP Isoenzymen durchgeführt. CYP2C8 war zu einem überwiegenden Anteil an der Cl_{D-703} beteiligt. Die O-Demethylierung von Verapamil zu D-703 war des weiteren zu einem geringen Anteil durch CYP3A4 und CYP2C19 katalysiert, jedoch wesentlich geringer als CYP2C8. Der Beitrag von CYP2C9 zur Cl_{D-703} und Cl_{D-702} war im rekombinanten System zu vernachlässigen. Da der CYP2C9 Proteingehalt in den untersuchten Leberhomogenaten lediglich um den Faktor 1,5 höher ist als der gemessene CYP2C8 Gehalt (vgl. 3.4) ist davon auszugehen, daß die im rekombinanten System ermittelten Beiträge von CYP2C8 und CYP2C9 am Verapamil Metabolismus auf den hepatischen Stoffwechsel von Verapamil in-vivo übertragbar sind.

Durch die Verwendung von rekombinanten Enzymen konnte gezeigt werden, daß Sulfaphenazol die durch CYP2C9 katalysierte Verapamil O-Demethylierung zu D-703 spezifisch hemmt. Andere CYP Isoenzyme werden nicht durch Sulfaphenazol gehemmt (Baldwin et al. 1995). Die Hemmung der Verapamil-O-Demethylierung war mit 10% sehr gering ausgeprägt. Vielmehr wurde jedoch eine Reduktion der D-703 Bildung auf 33,7% der Kontrollaktivität durch 100 μ M Taxol in Leberhomogenat festgestellt. Taxol wird in humanen Lebermikrosomen vorwiegend durch CYP2C8 metabolisiert und aufgrund seiner hohen Affinität zu diesem CYP Isoenzym als kompetitiver Hemmstoff eingesetzt (Rahman et al. 1994). Die Hemmung der D-703 Bildung durch Taxol in identischer Konzentration (100 μ M) war in Enterozytenhomogenat (Patient O) mit 66,3% der Kontrollaktivität deutlich geringer ausgeprägt. Diese Beobachtung deckt sich mit der nicht nachweisbaren CYP2C8 Protein- und der sehr geringen RNA-Expression in den untersuchten Darmgeweben (Läpple 2000).

In Übereinstimmung mit der durch Taxol beobachteten Hemmung der D-703 Bildung, wurden signifikante Korrelationen zwischen dem CYP2C8 Proteingehalt und $V_{max D-703}$ bzw. Cl_{D-703} in Leberhomogenaten gefunden ($r^2 = 0,37$; $P < 0,05$ bzw. $r^2 = 0,49$; $P < 0,01$). Es bestand hingegen keine Korrelation zwischen dem CYP2C9 Gehalt und der $V_{max D-703}$ in Leber ($r^2 = 0,03$) und Enterozytenhomogenaten ($r = -0,50$). Die um das 6-fach höhere Michaelis-Konstante der D-703 Bildung in Enterozyten im Vergleich zur Leber, ist durch die geringe CYP2C8-Proteinexpression in den untersuchten Enterozytenhomogenaten bedingt. Zusammengefaßt weisen diese Daten CYP2C8 einen bedeutenden Anteil an der Verapamil-O-Demethylierung zu D-703 zu. Ausgehend von diesen Daten, scheint CYP2C9 für diesen Abbauweg lediglich eine untergeordnete Rolle zu spielen. Die Bestimmung der D-703 Bildung wurde daher in Lebern als metabolischer Marker der CYP2C8 Aktivität verwendet. Der Anteil von CYP2C18 an der Bildung von D-703 kann als sehr gering angesehen werden, da CYP2C18 Protein weder in Enterozyten noch in Leber nachzuweisen war (vgl. 3.4). Der von (Busse et al. 1995) nachgewiesene Beitrag von CYP2C19 an der Verapamil-O-Demethylierung konnte mangels eines spezifischen Hemmstoffs oder eines inhibierenden Antikörpers, welche selektiv CYP2C19 hemmen, nicht weiter untersucht werden.

Die Verapamil-O-Demethylierung zu D-702 wurde im Gegensatz zur Bildung von D-703 durch CYP1A1 katalysiert, das ausschließlich extrahepatisch u.a. im Darm gebildet wird (Paine et al. 1999). Die CYP1A1 Expression im Vergleich zur CYP3A4 Expression ist im Darm jedoch gering (Zhang et al. 1999). Es existieren allerdings keine Angaben zu absoluten

CYP1A1 Proteinmengen, so daß der Anteil der durch CYP1A1 katalysierten D-702 Bildung im Darm schwer abzuschätzen bleibt. Den größten Anteil an der Oxidation von Verapamil zu D-702 hat jedoch CYP2C19 gefolgt von CYP3A4. Die Michaelis-Konstante der D-702 Bildung ist in Enterozyten mit der für rekombinantes CYP2C19 vergleichbar (138,9- vs. 151,6 μM). In Lebern war der K_m -Wert mit 88,0 μM deutlich niedriger als in Enterozyten. Der durch CYP2C19 katalysierte Anteil an der Bildung von D-702 ist in Enterozyten demnach vermutlich größer als in Leber, was auch durch den vergleichbaren Proteingehalt von CYP2C19 in Enterozyten und Lebern unterstrichen wird (vgl. 3.4).

3.3 Proteingehalt und Aktivität von CYP3A4 und CYP3A5 in Enterozyten und Lebern

Die Maximalgeschwindigkeit der Verapamil-N-Desalkylierung war in Enterozyten- im Mittel um das 1,8-fache höher als in den entsprechenden Leberhomogenaten. Diese Ergebnisse stehen in Widerspruch mit Veröffentlichungen von (de Waziers et al. 1990) und (Paine et al. 1997), die für die CYP3A4 vermittelte Pentoxyresorufin-O-desalkylierung, Erythromycin-demethylierung und Midazolam-1'-hydroxylierung in Dünndarmmikrosomen 105%, 60% bzw. 75% der in Lebermikrosomen gemessenen Aktivität fanden.

Die Unterschiede in der CYP3A4 Proteinexpression zwischen Enterozyten und Leber waren noch stärker ausgeprägt. So war der CYP3A4 Proteingehalt in Enterozyten- im Mittel um das 3,7-fache signifikant höher als in den entsprechenden Leberhomogenaten. Bei allen gesammelten Darmgewebeprobehandelt es sich ausschließlich um proximale Teile des Duodenums oder um Jejunum (Treitzsche Flexur). Paine et al. fanden eine Abnahme der CYP3A Proteinexpression in distalen Dünndarmabschnitten. Im Ileum lag die CYP3A Proteinexpression nur noch bei 54% des im Duodenum gemessenen CYP3A Gehalts. Die hohe CYP3A4 Proteinexpression in Enterozyten steht im Gegensatz zu von (Peters and Kremers 1989) (Paine et al. 1997) und (de Waziers et al. 1990) publizierten Ergebnissen, die in humanem Dünndarmgewebe nur 40%, 44% bzw. 50% des in Lebern gemessenen CYP3A4 Proteingehalts finden. Die in dieser Arbeit ermittelte CYP3A4 Proteinexpression in Enterozytenhomogenaten von im Mittel 80,1 pmol/mg übersteigt sogar die von Paine et al. (1997) in Lebermikrosomen gemessenen 69,7 pmol/mg. Alle drei o.a. Arbeiten beruhen auf Dünndarmgewebe, daß vom restlichen Darmgewebe ohne die von Grafström et al. (1979) beschriebene Kollagenasebehandlung abgeschabt wurde. Die bei Paine et al. (1997) angegebene Ausbeute isolierter Duodenalmukosa von durchschnittlich 23% bezogen auf das Feuchtgewicht des isolierten Duodenums ist umgerechnet auf die Proteingesamtausbeute um etwa das 10-fache höher als die in dieser Arbeit ermittelte Proteingesamtausbeute von 0,34%. Demnach ist zu vermuten, daß die mittels Abschabetechnik gewonnenen Zellsuspensionen einen hohen Anteil von Zellen abgetrennter Villi- und Submukosagewebe aufweisen, was einen geringeren CYP3A4-Gehalt und -Aktivität pro μg eingesetztem Protein zur Folge hat. Des weiteren beruhen die in den o.a. Arbeiten Vergleiche der CYP3A4 Proteinexpression in Darm und Leber auf Organen die von unterschiedlichen Spendern stammen. Die auf diese

Weise erhobenen Daten sind somit durch die hohen interindividuellen Schwankungen des intestinalen und hepatischen CYP3A4 Gehalts verfälscht.

Die interindividuellen Schwankungen der Verapamil-N-Desalkylierung waren in den untersuchten Enterozyten größer (VK: 80,3%) als in Lebern (VK: 28,1%). Die interindividuellen 8,1-fachen Unterschiede (VK: 62,3%) der CYP3A4 Proteinexpression in Enterozyten decken sich mit Untersuchungen von Lown et al. (1994; 1997) der über 11-fache Unterschiede berichtet. Die von (Paine et al. 1997) beschriebenen 30-fachen interindividuellen Unterschiede sind vermutlich aufgrund von Schwankungen des Enterozytengehalts durch die verwendete Isolierungsmethode als zu hoch anzusehen. Der hepatische CYP3A4 Proteingehalt wies in Übereinstimmung mit von mit Ergebnissen von (Paine et al. 1997) >50-fache interindividuelle Unterschiede mit einem VK von 73,7% auf. Überraschenderweise schlugen sich die Unterschiede im hepatischen CYP3A4 Gehalt nicht in einer entsprechenden Variabilität der Verapamil-N-Desalkylierung in den untersuchten Lebern nieder, was durch ein weiteres an der Bildung von D-617 beteiligte CYP Isoenzym erklärt werden könnte (vgl. 3.2).

Weder die Verapamil-N-Desalkylierung noch die CYP3A4 Proteinexpression korrelierten in beiden Organen miteinander, so daß von einer organspezifischen Regulation der CYP3A4 Proteinexpression auszugehen ist. Die Regulation von CYP3A4 ist weitgehend unbekannt. (Bertilsson et al. 1998) und (Goodwin et al. 1999) identifizierten den Pregnan-X Rezeptor (hPXR) als möglichen Faktor für die durch Rifampizin vermittelte Induktion von CYP3A4, der sowohl in Darm als auch in Leber exprimiert wird. Unterschiede in der Expression von hPXR in beiden Organen könnten daher ein Grund für die beobachtete organspezifische Regulation von CYP3A4 darstellen, vorausgesetzt daß hPXR neben anderen nukleären Hormonrezeptoren wie beispielsweise dem Glucocorticoid-Rezeptor (hGR) maßgeblich für die CYP3A4-Induktion verantwortlich ist. Schuetz et al. (1996) zeigten, daß Reserpin, Rifampizin, Phenobarbital und Verapamil neben einer Vielzahl von weiteren Substanzen in LS180 Zellen sowohl eine Induktion von CYP3A4 als auch P-Glykoprotein bewirkten. Da diese Substanzen entweder selber Substrate für P-Glykoprotein sind oder dessen Aktivität beeinflussen, postulierten Schuetz et al., daß der P-Glykoprotein-Gehalt einer Zelle das Ausmaß der Induktion von CYP3A4 durch Regulation der intrazellulären Konzentration des Induktors beeinflusst. So konnte gezeigt werden, daß in *mdr1a* (-/-) Knockout Mäusen die Induktion von CYP3A4 durch Rifampicin signifikant höher ist als in Wildtyp Mäusen (Schuetz et al. 1996). In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen wurde in den untersuchten Leberhomogenaten eine negative Korrelation zwischen der P-Glykoprotein und der CYP3A4 Proteinexpression gefunden ($r = -0,52$; $P < 0,05$; $n = 15$). In den Enterozyten war ein gleichartiger Trend zu beobachten, der jedoch nicht signifikant war.

Polymorphismen von CYP3A4, die eine Veränderung der Enzymfunktion zur Folge haben, können eine weitere Ursache für die hohe interindividuelle Variabilität der CYP3A4 Enzymaktivität sein. Durch Mutationsanalysen konnte gezeigt werden, daß die Aminosäure 119 im CYP3A4-Molekül eine bedeutende Rolle sowohl für die Substratspezifität als auch die Aktivität dieses Enzyms spielt (Roussel et al. 2000). Sata et al. (2000) identifizierten erst

kürzlich eine CYP3A4 Mutation die zu einem Serin/ Prolin Austausch in Position 222 führt, jedoch keine überzeugende Veränderungen in Substratspezifität und Aktivität gegenüber Wildtyp CYP3A4 zeigt und nur in 2,7% aller untersuchten Kaukasier auftrat. Andere CYP3A4 Polymorphismen sind z. Zt. nicht bekannt (Guengerich 1999). Das Vorhandensein einer Mutation mit einer gegenüber dem Wildtyp CYP3A4 veränderten Aktivität, in einer größeren Population, ist als unwahrscheinlich anzusehen, da eine Vielzahl von Untersuchungen zur CYP3A4 Aktivität stets bessere Korrelationen zwischen der Maximalgeschwindigkeit und dem CYP3A4 Proteingehalt beschreiben, als zwischen intrinsischer Clearance, der Größe welche den K_m -Wert miteinbezieht, und dem entsprechenden CYP3A4 Gehalt.

Bisher veröffentlichte Arbeiten zur CYP3A5 Proteinexpression stehen in Widerspruch zu Publikationen von (Kivistö et al. 1996; Jounaidi et al. 1996) die eine ubiquitäre CYP3A5 mRNA Expression in Leber und Dünndarm zeigten. In Dünndarm fanden (Lown et al. 1994) hingegen kein CYP3A5 Protein, (Paine et al. 1997) beobachteten lediglich in 20%, (McKinnon et al. 1995) in 22% und (Lown et al. 1997) in 60% aller untersuchten Dünndarmproben meßbare CYP3A5 Proteinexpression. In den von (Tateishi et al. 1999) und (Jounaidi et al. 1996) untersuchten Lebern war nur in 40% bzw. 74% aller Proben CYP3A5 Protein nachweisbar. Der Grund für diese Diskrepanz liegt vermutlich in der von (Paine et al. 1997) diskutierten Nachweisempfindlichkeit der verwendeten Detektionsmethoden. Um eine exakte Quantifizierung von CYP3A5 zu gewährleisten, wurde auf den Einsatz eines Antikörpers gegen CYP3A und die daraus resultierende Diskriminierung von CYP3A4 und CYP3A5 anhand ihrer Molekulargewichte aufgrund der zu erwartenden Unterschiede im Proteingehalt beider Isoenzyme und der begrenzten Trennschärfe der zwei Banden (vgl. (Gibbs et al. 1999) Abb. 1) verzichtet. Mit dem verwendeten spezifischen Antikörper gegen CYP3A5 wird in dieser Arbeit erstmals eine CYP3A5 Proteinexpression in allen untersuchten Leber- und Darmproben, in Übereinstimmung mit den Daten zur mRNA Expression (Kivistö et al. 1996; Jounaidi et al. 1996) gezeigt. Die Verwendung von POD-vermittelter Chemilumineszenz in Verbindung mit einem Chemilumineszenz Imager stellte sich demnach als überlegene Detektionsmethode heraus. Dies wird vor allem vor dem Hintergrund der CYP3A5 Proteinexpression deutlich, die in 47% der Enterozyten- und in 80% aller Leberhomogenate unterhalb der Bestimmungsgrenze von 250 fmol/mg lag. Die sehr geringe CYP3A5 Proteinexpression in diesen Proben lassen Raum für Mutationen die, wie von (Jounaidi et al. 1996) diskutiert, zu instabilem CYP3A5 führen. Der geringe Anteil an CYP3A5 von im Mittel 1,7% in Enterozyten im Vergleich zu CYP3A4, läßt vermuten, daß dieses Enzym für den intestinalen First-Pass Metabolismus eine untergeordnete Rolle spielt. Der Anteil von im Mittel 12,9% CYP3A5 relativ zum CYP3A4 Proteingehalt in Leber ist etwa um die Hälfte niedriger als von (Guengerich 1999) berichtet.

Eine multiple Regressionsanalyse ergab, daß CYP3A5 für die Verapamil-N-Desalkylierung keine Rolle zu spielen scheint. Der von (Tateishi et al. 1999) gemessene CYP3A5 Proteingehalt in Lebermikrosomen war mit $29,7 \pm 20,2$ pmol/mg deutlich höher als die in dieser Arbeit gemessenen $3,2 \pm 1,7$ pmol/mg Proteinhomogenat. Die von (Tateishi et al. 1999) angegebenen Daten sind allerdings als unzuverlässig anzusehen, da die Spezifität des

Antikörpers für CYP3A5 nicht gezeigt wurde und die Absolutmengen CYP3A5 nicht durch lineare Regression gegen eine Kalibrierungskurve berechnet, sondern durch den Vergleich gegen mitaufgetragene 10 pmol rekombinantes CYP3A5 ermittelt wurden.

3.4 Proteingehalt und Aktivität von CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18 und CYP2C19 in Enterozyten und Lebern

Die Analyse der CYP2C8 Proteinexpression ergab in Leberhomogenaten einen CYP2C8-Gehalt von $13,9 \pm 7,0$ pmol/mg, während in keinen der untersuchten Enterozytenhomogenate eine CYP2C8 Proteinexpression nachzuweisen war. Damit konnten die Ergebnisse von (Klose et al. 1999) reproduziert werden, die in Dünndarm ebenfalls keine CYP2C8 Proteinexpression nachweisen konnten. Die 5,6-fachen interindividuellen Schwankungen des CYP2C8 Gehalts in Leberhomogenaten waren deutlich niedriger als die von (Lasker et al. 1998) gefundene 150-fache Variabilität. Wie auch bei (Tateishi et al. 1999) waren die in dieser Arbeit angegebenen CYP2C8 Absolutmengen nicht durch lineare Regression gegen eine Kalibrierungskurve berechnet, sondern wurden durch den Vergleich gegen eine Referenzprobe ermittelt. (Lasker et al. 1998) fanden ebenfalls in Lebermikrosomen (n= 17) eine um den Faktor 8 höheren CYP2C9 Proteingehalt im Vergleich zum CYP2C8 Gehalt. In den in dieser Arbeit untersuchten 17 Leberhomogenaten war der CYP2C9- im Vergleich zum CYP2C8-Gehalt lediglich um den Faktor 1,5 höher.

Der starke Hintergrund der im Immunoblot aufgetragenen Darmhomogenate beruht vermutlich auf einer Kreuzreaktion des eingesetzten CYP2C8 Antikörpers mit Mucin. Spätere Immunhistochemische Untersuchungen mit diesem Antikörper zeigten, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Immunoblots, keine positive CYP2C8 Färbung in den Enterozyten. Die Becherzellen waren hingegen stark gefärbt und der Antikörper wies eine Kreuzreaktion mit aus Schweinedarm isolierten Mucin auf (persönliche Mitteilung Dr. P. Fritz, Robert Bosch Krankenhaus, Stuttgart).

Im Gegensatz zur CYP3A4-Proteinexpression war der CYP2C9-Gehalt in Enterozyten- im Mittel um das 9-fache niedriger als in den entsprechenden Leberhomogenaten. Die Unterschiede waren statistisch signifikant. Die intrinsische Clearance von Diclofenac war in Enterozyten 7,8-fach niedriger als in Leber. Die Maximalgeschwindigkeit der Diclofenac-4-hydroxylierung korrelierte mit der CYP2C9-Proteinexpression in Lebern ($r=0,64$). Der Korrelationskoeffizient war vergleichbar mit Ergebnissen von (Transon et al. 1996). Eine Korrelation der $V_{\max 4\text{-OH-D}}$ mit dem CYP2C9-Gehalt in Enterozyten war nicht vorhanden ($r= -0,37$). Dies legt die Vermutung nahe, daß die Diclofenac-4'-hydroxylierung, die in Lebern als Reaktion für CYP2C9-Aktivität verwendet wird (Transon et al. 1996; Bort et al. 1999), in Enterozyten durch eine andere CYP Isoform katalysiert wird. Diese Hypothese wird durch die signifikanten Unterschiede in der Bildung von 4-Hydroxy-Diclofenac pro pmol CYP2C9 in Enterozyten- und Leberhomogenaten unterstützt, die nicht auf eine differentielle Expression der Coenzyme Cytochrom P450 Reduktase oder Cytochrom b_5 in beiden Organen

zurückgeführt werden kann, da beide Coenzyme in Darm und Leber in gleichem Ausmaß und Verhältnis gebildet werden (Paine et al. 1997). Auffällig ist außerdem, dass die Korrelationsanalyse einen Y-Achsen Schnittpunkt von 638 pmol/mg/min verzeichnet (vgl. 2.5.1.3), was die Beteiligung eines weiteren CYP Isoenzym an der Diclofenac-4-hydroxylierung vermuten lässt. Diese Beobachtung deckt sich mit Daten von (Transon et al. 1996).

Eine Korrelation zwischen Enterozyten und Leber wurde weder für die Diclofenac-4'-Hydroxylierung noch die CYP2C9 Proteinexpression beobachtet. Damit ist, wie auch bei CYP3A4 gezeigt, eine unterschiedliche Regulation der CYP2C9 Proteinexpression in Darm und Leber zu vermuten.

Wie in 2.1.3.3 gezeigt, weist der verwendete CYP2C8 Antikörper eine starke Kreuzreaktion mit CYP2C18 auf, so daß CYP2C18 parallel zu CYP2C8 nachgewiesen werden kann, da sich beide Proteine aufgrund ihres unterschiedlichen Molekulargewichts trennen lassen (MW CYP2C8: 51,5 kDa; MW CYP2C18: 50 kDa). CYP2C18 Proteinexpression konnte weder in Leber noch in Enterozyten gemessen werden. Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit Daten von (Klose et al. 1999), die ebenfalls, trotz vorhandener CYP2C18 mRNA Expression, mit einem gegen CYP2C18 spezifischen Antikörper kein CYP2C18 Protein in beiden Organen nachweisen konnten. (Richardson et al. 1997) konnte mit einem anderen spezifischen CYP2C18 Antikörper ebenfalls keine meßbare CYP2C18 Proteinexpression in humanen Lebermikrosomen nachweisen. CYP2C18 Protein ist demnach entweder in Darm und Leber nicht vorhanden oder wird in beiden Geweben in einem so geringen Ausmaß gebildet, das unter der Nachweisgrenze der verwendeten Methoden liegt.

Im Gegensatz zu CYP2C8 und CYP2C9 wurden in Enterozyten im Mittel 60,9% des CYP2C19 Proteingehalts der entsprechenden Leberhomogenate gemessen, die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant. Die interindividuellen Schwankungen der CYP2C19 Proteinexpression waren in Enterozyten größer (VK: 78,6%) als in Leber (VK: 31,8%). Der CYP2C19 Proteingehalt korrelierte in beiden Organen nicht miteinander, so daß von einer organspezifischen Regulation der CYP2C19 Proteinexpression auszugehen ist.

Die Summe der CYP2C Isoenzyme (MW CYP2C8, 2C9, 2C19: 36,9 pmol/mg Proteinhomogenat) war in Leberhomogenaten höher als der CYP3A Gehalt (MW CYP3A4, 3A5 : 26,8 pmol/mg Proteinhomogenat). Diese Daten stehen somit im Widerspruch zu von (Shimada et al. 1994) publizierten Ergebnissen, die den CYP3A-Gehalt in Lebermikrosomen mit im Mittel 96 pmol/mg und den CYP2C-Gehalt mit im Mittel 60 pmol/mg angibt. Der von Shimada et al. angegebene CYP2C Gehalt gibt jedoch nur die Proteinexpression eines einzelnen CYP2C Isoenzym wieder, da nur eine CYP2C-Bande detektiert wird, die verschiedenen CYP2C Isoformen jedoch unter den angegebenen Versuchsbedingungen elektrophoretisch getrennt werden. Demnach hätten 3 Banden nachweisbar sein müssen. Des Weiteren finden sich im sowohl im Methodenteil als auch in den verwiesenen Arbeiten keine Angaben zur Quantifizierung der Proteinmengen, so daß diese Daten als unzuverlässig anzusehen sind. Der von (Lasker et al. 1998) angegebene CYP2C Gehalt in humanen

Lebermikrosomen beträgt im Mittel 117,8 pmol/mg und bestätigt den im Vergleich zur CYP3A-Proteinexpression in dieser Arbeit gemessenen höheren CYP2C Proteingehalt in Lebern.

Zusammenfassend bleibt festzustellen, daß aufgrund ihrer geringen oder nicht meßbaren Proteingehalts, weder CYP2C8, CYP2C9 noch CYP2C18 einen bedeutenden Beitrag zum intestinalen First-Pass Effekt von Arzneistoffen leisten. Der CYP2C19 Proteingehalt ist in Enterozyten jedoch vergleichbar mit dem in Leber. Ob demzufolge durch CYP2C19 verstoffwechelte Arzneistoffe wie Diazepam, Omeprazol, Propranolol, Imipramin oder Amitriptylin (Flockhart 1995) einem ausgeprägten intestinalen First-Pass Metabolismus unterliegen bleibt jedoch im Einzelfall nachzuweisen.

3.5 Verapamil Metabolismus in Enterozyten und Lebern

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten in-vitro Untersuchungen zum Verapamil-metabolismus in Enterozyten- und Leberhomogenaten sind, im Gegensatz zu bisher erhobenen Daten zum intestinalen Metabolismus von Midazolam (Paine et al. 1996; Paine et al. 1997), in Übereinstimmung mit dem in-vivo ermittelten Ausmaß des intestinalen First-Pass Effekt von Verapamil. Das Ausmaß des Verapamil-Metabolismus war in-vitro, mit einer intrinsichen Verapamil-Clearance in Enterozyten- ($12,5 \pm 7,1 \mu\text{l}/\text{mg}/\text{min}$) und in Leberhomogenaten ($11,3 \pm 4,5 \mu\text{l}/\text{mg}/\text{min}$) vergleichbar. Die mittels eines neu entwickelten Perfusionskatheters in-vivo ermittelte gastrointestinale Extraktion einer oral applizierten Verapamildosis betrug 47%, die hepatische Extraktion wurde mit 48% ermittelt (von Richter et al. 2000). Die interindividuellen Variabilität des prähepatischen Verapamil Stoffwechsels war sowohl in-vitro (VK Cl_{int} in Enterozytenhomogenaten: 56,8%) als auch in-vivo (VK der gastrointestinalen Extraktion: 34,0%) stärker ausgeprägt als die des hepatischen (VK Cl_{int} in Leberhomogenaten: 39,8%/ VK der hepatischen Extraktion: 9,4%). Diese Ergebnisse zeigen, daß der prähepatische Arzneimittelmetabolismus in der Mukosa des Dünndarms eine wichtige Rolle für das Ausmaß und die interindividuelle Variabilität der Bioverfügbarkeit von oral verabreichtem Verapamil spielt.

3.6 Untersuchungen zur Morphinglucuronidierung in Enterozyten und Lebern

Es konnten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Bildung von M3G in den mit Alamethicin aktivierten Enterozyten- und Leberhomogenaten festgestellt werden. Die Morphin-6-glucuronidierung war in Enterozyten dagegen signifikant um das 2,5-fache niedriger als in den entsprechenden Lebern. Das Verhältnis der M3G- zu M6G-Bildung war ohne und mit Aktivierung durch Alamethicin unterschiedlich, was auf eine Beteiligung von mehreren UGT Isoenzymen an der Morphinglucuronidierung, die unterschiedlich aktivierbar sind, schließen läßt. Diese Hypothese wird durch die signifikant unterschiedlichen Verhältnisse der M3G- zu M6G-Bildung in beiden Organen bestätigt. Die Ergebnisse sind

demnach in Übereinstimmung mit Untersuchungen, die Morphinglucuronidierung in rekombinant exprimierten UGT1A3, UGT1A8 und UGT2B7 nachweisen konnten (Green et al. 1998; Cheng et al. 1999; Coffman et al. 1997).

Interessanterweise hat das unterschiedliche Verhältnis der M3G- zu M6G-Bildung in Enterozyten und Lebern keine Auswirkungen auf die Plasmaspiegel in-vivo. (Faura et al. 1998 Abb. 5) stellten in einer Metaanalyse von 57 Studien fest, daß unabhängig von intravenöser oder oraler Morphingabe die Plasmaspiegel von M3G und M6G konstante Verhältnisse aufweisen. Dies legt die Schlußfolgerung nahe, daß neben der Morphinglucuronidierung Unterschiede in der Resorption und Verteilung beider Glucuronide im Körper, beispielsweise durch aktive Transportprozesse wie dem Konjugattransporter MRP2 (Konig et al. 1999), eine Rolle spielen müssen. Erste Hinweise auf ein Zusammenwirken von UGTs und MRP2 sind der Tatsache zu entnehmen, daß beide Proteine durch die Antioxidantien Quercetin und Butylhydrochinon induziert werden (Bock et al. 2000).

Im Gegensatz zu den Cytochrom P450 Enzymen wiesen die Morphinglucuronidierung sowohl in Leber als auch in Enterozyten äußerst geringe interindividuelle Unterschiede auf. Die Schwankungen waren dabei in Enterozyten- (VK: 11,6%) geringer ausgeprägt als in Leberhomogenaten (VK: 22,2%). Ein möglicher Grund wäre die Beteiligung am Abbau endogener Substrate, wie für UGT1A3, 1A8 und 2B7 gezeigt (Radomska-Pandya et al. 1999), die zum Erhalt der Homöostase zu einer gleichmäßigen Proteinexpression dieser Enzyme führt.

Im Zusammenhang mit den untersuchten Hemmstoffen der Morphinglucuronidierung möchte ich auf folgende Substanzen näher eingehen: Testosteron wird selber nicht durch UGT2B7 glucuronidiert. Testosteron hemmt kompetitiv sowohl die Morphin-3- als auch die Morphin-6-glucuronidierung mit vergleichbarer Affinität, so daß denkbar wäre, daß diese Hemmung die Konkurrenz um eine weitere Glucuronosyltransferase neben UGT2B7 beschreibt, die sowohl die Bildung von M3G als auch die Bildung von M6G katalysiert. Die Bildung von M6G ist jedoch bisher nur für UGT2B7 beschrieben (Coffman et al. 1997). Die zur Charakterisierung von rekombinanter UGT1A3 verwendete Methode zur Messung von M3G und M6G weist eine geringe Nachweisempfindlichkeit auf (Svensson et al. 1982; Green et al. 1998), so daß eine eventuell Bildung von M6G durch UGT1A3 möglicherweise übersehen wurde. Jedoch kann es sich bei der mit Testosteron beobachteten Hemmung der Morphin-6-glucuronidierung auch um eine unspezifische Hemmung von UGT2B7 durch Testosteron handeln. Eine weitere Erklärung für die Hemmung der M6G-Bildung durch Testosteron wäre das Vorhandensein von weiteren UGT Isoenzymen, welche die M6G Bildung katalysieren, wie beispielsweise die erst kürzlich klonierten und funktionell noch nicht beschriebene UGT2A1 (Jedlitschky et al. 1999). Ferner wäre denkbar, daß UGT2B7 funktionelle Dimere mit veränderten Substratspezifitäten ausbildet, die durch Testosteron hemmbar sind. Derartige Dimere wurden für UGT2B1 bereits im Zellkulturmodell nachgewiesen (Meech and Mackenzie 1997). Ob solche Dimere auch in humanen Geweben exprimiert werden, bleibt

hingegen offen. Eine klinisch relevante Interaktion zwischen Morphin und Testosteron ist aufgrund der kompetitiven Hemmung mit K_i -Werte von $> 100 \mu\text{M}$ unwahrscheinlich.

Wie Testosteron hemmte auch Propafenon sowohl die Morphin-3- als auch die Morphin-6-glucuronidierung mit vergleichbarer Affinität. Propafenon Steady-State Blutplasmaspiegel von $200\text{-}300 \mu\text{M}$ (Fromm et al. 1995) liegen im gleichen Konzentrationsbereich wie die gefundenen K_i -Werte. Eine Interaktion zwischen Morphin und Propafenon wäre daher in-vivo nicht auszuschließen.

Dextromethorphan zeigte von allen verwendeten Substanzen den ausgeprägtesten Unterschied in der Hemmung der Morphin-3- und Morphin-6-glucuronidierung. Die Hemmung der M3G-Bildung war für Dextromethorphan 7-fach stärker als die Hemmung der M6G-Bildung ausgeprägt, was in Übereinstimmung mit o.a. Ergebnissen ist, die für mehrere UGT Isoenzyme eine Beteiligung an der Morphinglucuronidierung nachweisen konnten.

Für diese Hypothese spricht auch die mit Naringenin gefundene Hemmung der Morphin-6-glucuronidierung, da Naringenin durch UGT1A3 und 1A8, jedoch nicht durch UGT 2B7 katalysiert wird. Naringenin zeigte eine sehr stark ausgeprägte kompetitive Hemmung der M3G- und M6G-Bildung mit K_i -Werten, die um über zwei Größenordnungen niedriger sind als der für die Morphinglucuronidierung beschriebene K_m -Werte (Miners et al. 1988). Beide K_i -Werte ($5,2$ und $14,1 \mu\text{M}$) lagen im Bereich des für in UGT1A3 ermittelten K_m -Werts von $36 \mu\text{M}$ (Green et al. 1998). Eine Interaktion mit Grapefruitsaft und Morphin ist in-vivo allerdings nicht zu erwarten, da Naringenin im Darm quantitativ glucuronidiert wird und im Plasma nach der Einnahme von 20 ml Grapefruitsaft nicht nachzuweisen ist (Fuhr and Kummert 1995). Eine Hemmung der Morphinglucuronidierung durch in Grapefruitsaft enthaltenes Naringenin wäre demnach auf den Darm beschränkt.

Der wäßrige Auszug der als Grapefruitkernextrakt bezeichneten getrockneten Fruchtwände von Pommeranzen hemmten die Morphinglucuronidierung fast vollständig. Es ist unwahrscheinlich, daß dieser Effekt ausschließlich auf Naringenin zurückzuführen ist, da Naringenin schlecht wasserlöslich ist und ein wäßriger Auszug für die Inhibitionsexperimente verwendet wurde. Ob andere in Grapefruitkernextrakt vorhandene Substanzen die Morphinglucuronidierung hemmen oder ob eine, wie für CYP3A4 durch 6',7'-Dihydroxybergamottin beschriebene Suizid-Inhibition besteht (He et al. 1998), bleibt zu untersuchen.

Die kompetitive Hemmung der Morphinglucuronidierung durch Diclofenac ist durch die Bildung von Diclofenac-Acylglucuroniden zu erklären (Kretz-Rommel and Boelsterli 1993). Die K_i -Werte für Diclofenac liegen nur minimal über den von (Degen et al. 1988) berichteten Plasma Peak-Werten von $10\text{-}12 \mu\text{M}$ nach Einzelgabe von 100 mg Diclofenac. Ausgehend von diesen Werten ist eine Interaktion zwischen Morphin und Diclofenac in-vivo zu erwarten. Entscheidend für eine durch eine kompetitive Inhibition hervorgerufenen Interaktion zwischen beiden Substanzen sind jedoch die Konzentrationen in der Leber, die häufig wesentlich höher als die im Blut gemessenen sind. Bei der Kombination von Diclofenac und

Morphin wurden bereits erhöhte analgetische Effekte festgestellt, die sich nicht allein durch den zusätzlichen analgetischen Effekt von Diclofenac erklären lassen (Rockemann et al. 1996; Montgomery et al. 1996).

Zusammenfassend werden im Dünndarm an der Morphin-3-Glucuronidierung beteiligte UDP-Glucuronosyltransferasen im gleichen Ausmaß wie in der Leber exprimiert. Die an der Morphin-6-Glucuronidierung beteiligte UGT2B7 scheint einer in beiden Organen differentiellen Expression zu unterliegen. Die Identifizierung der UGT Isoformen welche die Morphin-3-glucuronidierung in Enterozyten katalysieren, ist von Relevanz für den intestinalen Stoffwechsel von Substraten dieser UGT Isoformen, da für diese ein hoher intestinaler First-Pass Effekt resultieren könnte. Das Vorhandensein von Hemmstoffen mit vergleichbaren K_i -Werten wie bei Phase 1-Enzymen läßt klinisch relevante Interaktionen auch bei durch Glucuronidierung verstoffwechselten Arzneistoffen erwarten.

3.7 Expression des ABC-Transporters MDR1 P-Glykoprotein in Enterozyten und Leber: Konsequenzen für den intestinalen First-Pass Effekt von Verapamil

Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Daten sind der erste direkte Vergleich der P-Glykoprotein Expression in Enterozyten und Lebern. Die um das 6,4-fach höhere P-Glykoprotein Expression in Enterozyten im Vergleich zu den entsprechenden Lebern unterstreicht die Funktion des Darms als Barriere für Fremdstoffe. Die gemessene P-Glykoprotein Expression gibt die Verhältnisse im proximalen Teil (Duodenum/ Jejunum) des Dünndarms wieder. MDR1 mRNA Messungen von Fricker et al. (1996) lassen auf eine höhere P-Glykoprotein Expression in weiter distalen Darmabschnitten schließen, so daß die Resorption von P-Glykoprotein Substraten im distalen Ileum und im Kolon noch weiter herabgesetzt wäre. Von besonderer Bedeutung für die enterale Resorption von P-Glykoprotein Substraten ist die hohe Variabilität der P-Glykoprotein Expression in den Enterozyten, die mit einer erst kürzlich entdeckten SNP-Mutation in Exon 26 des MDR1 Gens korreliert (Hoffmeyer et al. 2000). Die gefundene Variabilität der intestinalen P-Glykoprotein Expression war deutlich größer als in einer von Lown et al. (1997) durchgeführten Untersuchung an Duodenalbiopsien von 25 Patienten, die einen 8-fachen Unterschied des intestinalen P-Glykoprotein Gehalts aufzeigte. Diese Unterschiede beruhen allerdings auf mit Villin standardisierten Werten für P-Glykoprotein, was zu einer Unterschätzung der tatsächlich vorhandenen Variabilität geführt haben könnte (vgl. 3.1)

Die P-Glykoprotein Expression in Enterozyten und Lebern war nicht koreguliert, was für eine organspezifische Regulation dieses Transporterproteins spricht. Die interindividuelle Variabilität war in Leber wesentlich geringer als in den Enterozyten und schwankte lediglich um den Faktor 4,4. Die Unterschiede stimmen mit von Schuetz et al. (1995) publizierten Ergebnissen überein, die über 6,1-fache interindividuelle Schwankungen des hepatischen P-Glykoprotein Gehalts (n= 10) berichten. Die von Schuetz festgestellten

geschlechtsspezifischen Unterschiede der P-Glykoprotein Expression konnten nicht reproduziert werden.

Bei der Analyse der P-Glykoprotein Expression in Enterozyten- und Leberhomogenaten war in allen Proben neben der P-Glykoprotein Hauptbande bei ~170 kDa eine weitere Bande bei ~100 kDa auszumachen. Einer ersten Hypothese, daß diese Bande durch Abbau nach der Gewebeentnahme aufgrund der warmen Ischämiezeit oder bei der Enterozytenisolierung entstanden ist, widersprachen Untersuchungen von Duodenalbiopsien, die mit konstanten warmen Ischämiezeiten von weniger als einer Minute asserviert wurden. Immunoblots dieser Duodenalbiopsien zeigten ebenfalls eine zweite Bande bei 100 kDa (Greiner et al. 1999). Das Verhältnis der Signalintensitäten der beiden Banden variierte auch in dieser Probeserie trotz konstanter Ischämie- und Aufarbeitungszeiten sehr stark (VK= 67,7%). Ein Abbau von P-Glykoprotein während der Probenasservierung und -Aufarbeitung erscheint somit als unwahrscheinlich als Ursache für das Auftreten der 100 kDa Bande.

P-Glykoprotein besteht aus je zwei Monomeren von je 610 Aminosäuren die durch eine Polypeptidkette von 60 Aminosäuren im Endoplasmatischen Retikulum zu einer teilweise glycosylierten 150 kDa Vorstufe verbunden werden (Chen et al. 1986). Durch N-Glycosylierung in Golgi Vesikeln entsteht ein Molekül von 170 kDa, das zur Zelloberfläche gelangt und dort in der Zellmembran die funktionellen Eigenschaften eines ATP-abhängigen Transporterproteins übernimmt. Durch Deglycosylierung mit Endo-β-N-Acetylglucosaminidase wird das Molekulargewicht von P-Glykoprotein wiederum auf 130-140 kDa reduziert. Diese deglycosylierte P-Glykoprotein Form ist zwar noch funktionell, zeichnet sich aber durch eine verringerte Proteinhalbwertszeit aus (Schinkel et al. 1993),(Ichikawa et al. 1991).

Wie von (Schinkel et al. 1993) gezeigt, ist das 170 kDa P-Glykoprotein an drei Positionen in der ersten extrazellulären Schleife N-glycosyliert. Endo-β-N-Acetylglucosaminidase F (Endo F) schneidet selektiv Glycopeptidstrukturen vom Typ $\text{Asn}(\text{GlcNAc})_2(\text{Man})_{3-6}$ die charakteristisch für P-Glykoprotein sind (Richert et al. 1988) Ein Verdau von Zellhomogenat einer mit humanem L-MDR1 transfizierten Schweinenierenzelllinie mit Endo F, erbrachte eine von der Menge an eingesetzter Glucosidase abhängige Abbaubande von 100 kDa, deren R_f -Wert identisch mit der in humanen Proben nachgewiesenen Bande war. Humanes P-Glykoprotein kann somit durch Verwendung von Endo F in eine Bande von 100 kDa überführt werden, deren Größe identisch mit der in humanen Geweben auftretenden Bande ist. Dieses Ergebnis steht in Widerspruch zu Ergebnissen von (Schinkel et al. 1993) und (Ichikawa et al. 1991), die nach Endo F Behandlung von humanen Melanomzellen und verschiedenen humanen Geweben das Auftreten einer Bande bei 130-140 kDa beobachten. Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz wäre der von Schinkel- und Ichikawa et al. verwendete Antikörper C-219, der eine Vielzahl von Kreuzreaktionen mit anderen, ebenfalls glykosylierten ABC-Transportern aufweist (Okochi et al. 1997).

Ob Endo F am Abbau von P-Glykoprotein in Enterozyten beteiligt ist, kann demnach nicht mit Bestimmtheit gesagt werden. Das humane Enzym wurde erstmals von (Overdijk et al.

1981) in Niere, Leber und Gehirn nachgewiesen. Daten über die Expression von Endo F in humanen Enterozyten liegen nicht vor. Im Unterschied zu anderen Hexosaminidasen ist Endo F im Cytosol lokalisiert (Lisman et al. 1985) was seine Teilnahme am normalen Glycoprotein Katabolismus sehr unwahrscheinlich erscheinen läßt (Conzelmann and Sandhoff 1987). Weitere Untersuchungen zur Natur dieser 100 kDa Bande sind notwendig, vor allem für Studien in denen die P-Glykoprotein Expression der -Aktivität gegenübergestellt werden soll.

In polarisierten Epithelzellen wie den Enterozyten des Darms oder dem proximalen Tubulusepithel der Niere sind CYP3A4 und P-Glykoprotein kolokalisiert. Einige CYP3A4 Substrate wie Terfenadin; Erythromycin und Lovastatin sind zugleich Substrate für P-Glykoprotein, andere wie Nifedipin oder Midazolam jedoch nicht (Kim et al. 1999). Mit Ausnahme von Debrisoquin existiert eine derartige Substratüberlappung nicht für prototypische Substrate anderer CYP Isoenzyme (Koffein, Tolbutamid, S-Mephenytoin, Chloroxazon) (Kim et al. 1999), was auf ein Zusammenwirken speziell zwischen CYP3A4 und P-Glykoprotein schließen läßt.

Die durchgeführten Untersuchungen an L-MDR1 und LLC-PK1 Zellmonolayern zeigten bei einer Konzentration von 5 μM einen P-Glykoprotein abhängigen Transport von basal nach apikal der beiden Phase I Metabolite D-620 und D-617, der ebenfalls in der humanen P-Glykoprotein exprimierenden Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 zu beobachten war. Weder Verapamil, Norverapamil noch D-703 unterlagen bei dieser Konzentration einem P-Glykoprotein abhängigen Transport. Bei niedrigeren Konzentrationen (0,5 μM) war jedoch auch für diese Substanzen ein Transport in L-MDR1 und Caco-2 Zellen zu beobachten (Pauli-Magnus et al. 2000).

Inhibitionsexperimente in Caco-2 Zellen identifizierten Verapamil, Norverapamil und D-703 als starke Inhibitoren des P-Glykoprotein vermittelten Digoxin Transports mit IC_{50} Werten von 1.1, 0,3 und 1.6 μM . Eine derartige Hemmung konnte für D-620 und D-617 nicht beobachtet werden (Pauli-Magnus et al. 2000).

Aus den vorliegenden Daten sind folgende Schlußfolgerungen zu ziehen: Sowohl der durch CYP3A4 vermittelte oxidative Metabolismus als auch der P-Glykoprotein abhängige Transport von Verapamil stellen einen Bestandteil des komplexen zellulären Detoxifikationsmechanismus dar. Wie bereits von Watkins (1997) postuliert, könnte das Zusammenspiel von P-Glykoprotein und CYP3A4 darin bestehen, daß die durch CYP3A4 gebildeten Metabolite aus der Zelle entfernt werden, um damit einer möglichen Produkthemmung oder einer kompetitiven Hemmung durch Sekundärmetabolismus vorzubeugen. Eine derartige Hemmung besteht tatsächlich für D-620 und D-617, die mit Verapamil im Verhältnis 1:5 inkubiert eine Hemmung gegenüber der Kontrollaktivität von 19,8% bzw. 25,1% bewirken. Um diese Effekte mit in-vitro Experimenten genauer zu untersuchen, ist es allerdings unerlässlich Klarheit über das intrazelluläre Verhältnis der Konzentrationen von Metaboliten und Substrat zu erlangen. Die genaue Analyse eines derartigen Zusammenspiels kann in Zellen die sowohl CYP3A4 als auch P-Glykoprotein

enthalten durchgeführt werden, indem die Mengen der gemessenen Metabolite auf den CYP3A4 Gehalt standardisiert werden.

Des Weiteren ist denkbar, daß P-Glykoprotein als „Diffusionsbremse“ wirkt, indem es CYP3A4 Substrate aus der Zelle entfernt und somit einer Sättigung von CYP3A4 vorbeugt. Dieser Effekt müßte um so stärker für Substrate mit einer hohen Affinität zu CYP3A4 ausgeprägt sein. Untersuchungen mit Indinavir (K_m in Lebermikrosomen $1,3 \mu\text{M}$ (Chiba et al. 1997) und Cyclosporin (K_m in Lebermikrosomen $5,7 \mu\text{M}$ (Mangold et al. 1994) in Caco-2 Zellen stützen diese Hypothese, da beide Substanzen bei apikaler Zugabe in einem größeren Ausmaß durch CYP3A4 metabolisiert werden als bei basaler Applikation (Hochman et al. 2000).

Für Verapamil wird dieser Sachverhalt komplexer, da es sowohl aktiv durch P-Glykoprotein transportiert aber P-Glykoprotein auch konzentrationsabhängig inhibiert. Der Einfluß von P-Glykoprotein auf die Resorption und den intestinalen First-Pass Metabolismus von Verapamil ist somit entscheidend von den intraluminalen Konzentrationen abhängig, da das beschriebene Zusammenspiel von P-Glykoprotein und CYP3A4 erst dann auftritt wenn Verapamil in Konzentrationen unterhalb seiner IC_{50} von $1,6 \mu\text{M}$ vorliegt (Döppenschmitt et al. 1999; Pauli-Magnus et al. 2000). Retardiert appliziertes Verapamil müßte demnach eine geringe Bioverfügbarkeit gegenüber schnell freisetzendem Verapamil aufweisen, da ein langsames Anfluten geringere intraluminale Konzentrationen und somit einen gesteigerten intestinalen First-Pass Metabolismus zur Folge hat. Der Sinn der beobachteten Inhibition von P-Glykoprotein durch das CYP3A4-Substrat Verapamil bleibt spekulativ. Berücksichtigt man die Abnahme von CYP3A4 in distalen Bereichen des Dünndarms (Paine et al. 1997) wird jedoch der Vorteil einer Hemmung von P-Glykoprotein durch hohe Substratkonzentrationen für das intestinale Detoxifikationssystem deutlich. Gelangt Verapamil in hohen Konzentrationen in den Dünndarm, bewirkt eine Hemmung von P-Glykoprotein, daß Verapamil in verstärktem Maße mit dem in proximalen Dünndarmabschnitten hohen CYP3A4-Gehalt in Kontakt kommt und eine entsprechend große Menge metabolisiert wird. Wäre P-Glykoprotein nicht durch Verapamil beeinflusst, würde die Substanz in proximalen Dünndarmabschnitten durch P-Glykoprotein aus den Enterozyten transportiert werden ohne vorher in Kontakt mit den am Endoplasmatischen Retikulum exprimierten CYP3A4 getreten zu sein. Die Folge wäre ein geringerer Stoffwechsel in distalen Dünndarmabschnitten der aus der geringeren CYP3A4 Proteinexpression im distalen Jejunum und Ileum resultiert.

Die Verapamil Metabolite Norverapamil und D-703 sind ebenfalls in der Lage die P-Glykoprotein Funktion zu inhibieren und können somit Arzneimittelinteraktionen hervorrufen.

4 Zusammenfassung

Das Ausmaß der Wirkung eines Arzneimittels hängt von der Konzentration am Zielorgan ab. Zu niedrige Konzentrationen des Wirkstoffs führen zum Verlust der therapeutischen Wirkung, zu hohe Arzneimittelkonzentrationen rufen dagegen häufig toxische Wirkungen hervor. Ein wichtiges Problem der Arzneimitteltherapie ist es, daß bei der Gabe einer identischen Dosis an eine Patientenpopulation die Wirkstoffkonzentrationen eine erhebliche Schwankungsbreite aufweisen und folglich mit einer großen Variabilität der Arzneimittelwirkungen verbunden sind. Dieses Problem stellt sich insbesondere bei am häufigsten verwendeten Darreichungsform, der oralen Arzneimittelgabe. Für eine Vielzahl von Arzneimitteln wie z.B. dem Calciumantagonisten Verapamil, dem Immunsuppressivum Cyclosporin, dem Analgetikum Morphin oder dem HIV1 Proteaseinhibitor Ritonavir ist die Bioverfügbarkeit nach oraler Gabe gering und weist große interindividuelle Schwankungen auf. Für die therapeutische Anwendung von Arzneistoffen stellt dies im Hinblick auf die zu wählende Dosierung ein großes Problem dar, so daß in der Entwicklung von Arzneistoffen eine unvollständige und sehr variable Bioverfügbarkeit nicht selten der Grund ist, die Entwicklung eines Arzneistoffes einzustellen. Es ist daher notwendig Faktoren zu identifizieren, die für derartige interindividuelle Unterschiede in der Pharmakokinetik und Wirkung von Arzneimitteln verantwortlich sind.

Bisher war man davon ausgegangen, daß die Leber das für die präsystemische Elimination von oral applizierten Arzneimitteln entscheidende Organ ist. Daher werden in der präklinischen Phase der Arzneimittelentwicklung verschiedene in-vitro Verfahren verwendet, die das Ausmaß des humanen First-Pass Metabolismus vorhersagen. In jüngster Zeit gibt es jedoch Hinweise darauf, daß auch die Darmwand in erheblichem Umfang zum First-Pass Metabolismus und damit zur unvollständigen und variablen Bioverfügbarkeit von Arzneimitteln beitragen kann. Aus diesem Grunde werden in-vitro Verfahren, die nur die hepatische Funktion erfassen, kein vollständiges Bild der in-vivo Situation geben.

In der vorliegenden Arbeit wurde mittels biochemischer, molekular- und zellbiologischer Techniken der Arzneimittelstoffwechsel in der Darmmukosa und der Arzneimitteltransport durch P-Glykoprotein als Mechanismen der oben beschriebenen Variabilität untersucht.

Ein Vergleich von arzneimittelabbauenden Enzymen und P-Glykoprotein in Darmmukosa und Leber ist aufgrund der starken interindividuellen Schwankungen nur möglich, wenn diese Enzyme in Darm- und Leber eines einzelnen Patienten bestimmt werden. Daher wurde jeweils Darm- und Lebergewebe von 17 Patienten untersucht. Im Gegensatz zur Leber, in der arzneimittelmetabolisierende Enzyme und P-Glykoprotein in fast allen Hepatozyten gebildet werden, ist im Darm die Expression dieser Enzyme auf die Enterozyten, welche die einschichtige Epithelschicht dieses Organs bilden, beschränkt. Aus diesem Grund wurden diese Enterozyten unter Erhalt der Enzymaktivität aus Darmgewebe isoliert.

Die Proteinexpression der maßgeblich am Phase I Stoffwechsel beteiligten Enzyme der Cytochrom P450 2C- und 3A-Subfamilien wurde vergleichend in Enterozyten- und Leberhomogenaten bestimmt. Des Weiteren wurde die Metabolisierung von CYP2C8-, CYP2C9- und CYP3A4-Substraten (Verapamil, Diclofenac) in diesen Proben verglichen. Im Gegensatz zu Veröffentlichungen anderer Arbeitsgruppen, ergab die Messung der CYP3A4-Aktivität durch Bestimmung der Verapamil-N-Desalkylierung in Enterozyten eine im Mittel 1,8-fach höhere V_{\max} als in den entsprechenden Leberproben. Die interindividuellen Schwankungen der CYP3A4-Aktivität war in den Enterozyten erheblich größer als in der Leber (Variationskoeffizient 80% bzw. 28%). Die mittels Western Blot bestimmte CYP3A4-Proteinexpression ergab einen in den Enterozyten im Mittel 3,7-fach höheren Proteingehalt als in der Leber. Die interindividuelle Variabilität der CYP3A4-Proteinexpression war in Lebern allerdings größer als in den Enterozyten. Intraindividuell korrelierten CYP3A4-Proteinexpression und –Aktivität zwischen Enterozyten und Lebern nicht. Dieser Befund spricht für eine unterschiedliche Regulation von CYP3A4 in Darm und Leber. CYP3A5-Proteinexpression wurde in allen untersuchten Enterozyten- und Leberproben nachgewiesen. Im Vergleich zur CYP3A4 Proteingehalt belief sich der CYP3A5-Proteingehalt in Enterozyten im Mittel nur auf 2% und in Leber auf 13%.

Die maximalen Bildungsrate der Verapamil-O-Demethylierung zu D-703, an der CYP2C8 in der Leber beteiligt ist, unterschieden sich in beiden Geweben nicht signifikant voneinander und wiesen größere interindividuelle Schwankungen in Enterozyten als in der Leber auf (Variationskoeffizient: 80% bzw. 16%). Die intrinsische Clearance von D-703 war jedoch in Enterozyten im Mittel um das 6-fache niedriger als in den entsprechenden Lebern, da die Michaelis Konstante in Enterozyten signifikant höher als in Lebern war (K_m 261 μ M bzw. 43 μ M). Dieser Unterschied deutet daraufhin, daß die Verapamil-O-Demethylierung in Enterozyten von einem anderen CYP-Isoenzym als CYP2C8 katalysiert wird. Übereinstimmend mit diesem Befund konnte in keiner der untersuchten Enterozytenproben CYP2C8 Proteinexpression nachgewiesen werden. Die Messung der CYP2C9-Aktivität durch Bestimmung der Diclofenac-4-Hydroxylierung ergab für die Enterozyten eine im Mittel 3,8-fach niedrigere V_{\max} als für die entsprechenden Lebern. Ebenso war die Proteinexpression von CYP2C9 in Lebern im Mittel 9-fach höher als in den Enterozyten. Die interindividuellen Unterschiede der CYP2C9 Proteinexpression waren in beiden Geweben vergleichbar. CYP2C18 Proteinexpression wurde in keiner der untersuchten Enterozyten- und Leberproben nachgewiesen. Der CYP2C19 Proteingehalt war in Enterozyten und Lebern vergleichbar. Die interindividuellen Schwankungen der CYP2C19 Proteinexpression war in Enterozyten größer als in den Leberproben (Variationskoeffizient: 78% bzw. 32%). Keine der gemessenen CYP2C-Aktivitäten und –Proteinexpression korrelierte intraindividuell zwischen Darm und Lebern. Die Hypothese einer Ko-Regulation der untersuchten arzneimittelmetabolisierenden Enzyme in Darm und Leber konnte demzufolge nicht bestätigt werden. Vielmehr ist von einer unterschiedlichen Regulation der CYP2C Isoenzyme in beiden Organen auszugehen.

Die Glucuronidierung von Morphin zu Morphin-3- (M3G) und Morphin-6-glucuronid (M6G) durch Konjugation mit UDP-Glucuronosylsäure wird durch UDP-Glucuronosyltransferasen (UGTs) der UGT1A und UGT2B Subfamilie katalysiert. Die Funktion dieser Phase II-

Enzyme ist im Darm im Vergleich zur Leber kaum untersucht. Ein Vergleich der Morphin-3-Glucuronidierung in Enterozyten und Leber zeigte keine signifikanten Unterschiede der maximalen Bildungsrate (V_{\max}). Die V_{\max} von Morphin-6-Glucuronidierung war in Leber, verglichen mit der Aktivität in den entsprechenden Enterozyten, um das 2,5-fache höher. Die interindividuelle Variabilität der Morphinglucuronidierung war im Gegensatz zu den durch Cytochrom P450 Enzyme katalysierten Oxidationen von Verapamil und Diclofenac in beiden Organen deutlich geringer (Variationskoeffizient < 23%). Weder die Morphin-3- noch die Morphin-6-Glucuronidierung korrelierten in Enterozyten und Lebern. Es ist davon auszugehen, daß dieser Befund die differentielle Expression der an der Morphinglucuronidierung beteiligten UGT Isoenzyme in Darm und Leber widerspiegelt, da zudem das Verhältnis $V_{\max}M3G/V_{\max}M6G$ in Enterozyten und Leber signifikante Unterschiede aufwies (14,0 bzw. 6,4) und mindestens 3 UDP-Glucuronosyltransferasen die Morphinglucuronidierung katalysieren (UGT1A3, UGT1A8, UGT2B7) von denen UGT1A8 extrahepatisch exprimiert wird. Die Identifizierung von Hemmstoffen der Morphinglucuronidierung ergab für Propafenon, Naringenin und Diclofenac K_i -Werte die in gleicher Höhe mit bereits in Patientenstudien gemessenen Blutspiegeln liegen (Propafenon: 200 μ M; Naringenin: 5 μ M; Diclofenac: 20 μ M), so daß klinisch relevante Interaktionen auch bei durch Glucuronidierung verstoffwechselten Arzneistoffen möglich sind.

Es wird zunehmend deutlich, daß neben dem Arzneimittelstoffwechsel auch Transporterproteine wie z.B. der im Rahmen der Multidrug Resistenz (MDR) von Tumoren entdeckte Effluxtransporter P-Glykoprotein die Arzneimittel elimination beeinflussen können. P-Glykoprotein ist in der apikalen Zellmembran bei Organen mit Ausscheidungsfunktion (Leber, Niere, Darmmukosa) und in der Blut-Hirn-Schranke exprimiert. Dadurch kann es aktiv Arzneimittel aus den Hepatozyten in die Galle und aus den Enterozyten direkt in das Darmlumen transportieren. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß P-Glykoprotein in den Enterozyten im Mittel 6,4-fach höher exprimiert wird als in der Leber. Die interindividuellen Schwankungen der P-Glykoprotein-Expression waren in den Enterozyten ebenfalls höher als in der Lebern. Ebenso wie im Fall der untersuchten Cytochrom P450 Enzyme und der UDP-Glucuronosyltransferasen, korrelierte die P-Glykoprotein-Expression intraindividuell zwischen Dünndarm und Lebern nicht. Es wurde zudem mittels polarisierter P-Glykoprotein exprimierender Zelllinien gezeigt, daß neben Arzneimitteln auch Arzneimittelmetabolite P-Glykoproteinsubstrate sein können, wie z.B. die Verapamilmetabolite D-617 und D-620.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, daß Leber und Darm ein unterschiedliches Expressionsprofil für Enzyme des Phase I und Phase II Arzneimittelstoffwechsels aufweisen und ihre Proteinexpression in beiden Organen nicht koreguliert ist. Diese differentielle Expression hat zur Folge, daß der intestinale Anteil am First-Pass Effekt für ein gegebenes Arzneimittel davon abhängt für welche Enzyme es Substrat ist und ob es einem durch P-Glykoprotein vermittelten Transport unterliegt. Für CYP3A4 und P-Glykoproteinsubstrate kann aus den vorliegenden Ergebnissen somit ein erheblicher intestinaler First-Pass Metabolismus vorhergesagt werden, da diese Enzyme in den Enterozyten des Darms erheblich stärker exprimiert werden als in der Leber.

5 Material und Methoden

5.1 Chemikalien, Antikörper, Enzyme, Zelllinien

<i>American Type Culture Collection, Manassas USA</i>	Caco-2 Zellen
<i>BioRad, München</i>	Acrylamid/Bis 37,5:1 Lösung Kaleidoscope Protein-Molekulargewichtsmarker
<i>Dianova, Hamburg</i>	Anti-Rabbit IgG, F(ab') ₂ Fragmente Peroxidase (POD) konjugiert 200 U/ml
<i>Gentest, Frankfurt a.M.</i>	rekombinantes CYP2C8, 2C9*1, 2C19, 3A4 gewonnen aus transfizierten humanen Lymphoblast-Zelllinien (AHH-1 TK+/-) rekombinantes CYP1A1, 1A2, 2A6, 2B6, 2D6, 2C8, 2C9*1, 2C9*2, 2C9*3, 2C18, 2C19, 3A4, 3A4+b5, 3A5 gewonnen aus transfizierten Sf9-Zelllinien Kaninchen Antiserum gegen humanes CYP3A4 Kanninchen Antiserum gegen humanes CYP3A5
<i>Gibco BRL, Karlsruhe</i>	10 kDa Protein-Molekulargewichtsmarker DMEM Gentamycin Opti-MEM L-Glutamin Medium 199 nicht essentielle Aminosäuren Penizillin Streptomycin TEMED
<i>Gödecke, Freiburg</i>	Gabapentin
<i>Invitrogen, San Diego USA</i>	TN5B1-4 Zellen
<i>Knoll, Ludwigshafen</i>	R/S Propafenon Verapamil und Metabolite D-620, D-617, D-702, D-703, Norverapamil, [2H ₃]Norverapamil, D-832
<i>Lipomed, Arlesheim Schweiz</i>	[² H ₃]Morphin-3-glucuronid [² H ₃]Morphin-6-glucuronid
<i>Merck, Darmstadt</i>	Acetonitril Ammoniumacetat Ammoniumpersulfat Ethanol (abs) Essigsäure

	Kaliumhydrogenphosphat Kaliumdihydrogenphosphat Magnesiumchlorid Methanol Natriumchlorid Natriumhydroxid 2-Propanol
<i>NEN Life Science, Köln</i>	[³ H]Digoxin (19 Ci/mmol) [³ H]Inulin (3,3 mCi/mg)
<i>Novartis, Basel Schweiz</i>	3'-Hydroxy-diclofenac 4'-Hydroxy-diclofenac 5'-Hydroxy-diclofenac
<i>Pharma Dessau, Dessau</i>	Hyalase "Dessau", 1500 I.E./ml
<i>Pharmakapsel GmbH, Murr</i>	Grapefruitkernextrakt
<i>Pierce, St. Augustin</i>	SuperSignal Dura Chemolumineszenz Substrat
<i>Research Biochemicals, Deisenhofen</i>	Dextromethorphan-HBr Dextrorphan-tartrat
<i>Research Diagnostics, Flanders USA</i>	Rabbit Anti-Human CYP2C8 IgG Rabbit Anti-Human CYP2C9 IgG Rabbit Anti-Human CYP2C19 gegen CYP2C8 und CYP2C9 immunoaffinitätsgereinigtes IgG
<i>Roche Diagnostics, Mannheim</i>	Anti-Mouse IgG, F(ab') ₂ Fragmente Peroxidase (POD) konjugiert 200 U/ml Endoglycosidase F 50 U/ml
<i>Roth, Karlsruhe</i>	Coomassie Roti-Blue Pefa Bloc SC Rinderserumalbumin (BSA) Tris-Base Triton X-100
<i>Sigma, Deisenhofen</i>	Anti-P-Glykoprotein (MDR), monoklonaler Anti- körper F4 (Maus IgG1) Bichinonsäure Bromphenolblau Codein Diclofenac-Natrium Glycerol Ketoconazol Kupfer(II)-sulfat Leupeptin 2-Mercaptoethanol Morphin-HCl Morphin-3-glucuronid Morphin-6-glucuronid NADPH

Naltrexon
 1-Naphthol
 (+/-) Naringenin
 Natrium-Dodecylsulfat
 Natrium-EDTA
 Leupeptin
 Pepstatin
 Ponceau S
 Sulfaphenazol
 Taxol
 Testosteron
 Tris-HCl
 UDPGA
 Vincristin

Zinsser Analytic, Frankfurt a.M.

Aqua Safe 300 Plus Szintillationsflüssigkeit

5.2 Lösungen, Puffer, Nährmedien

5.2.1 Puffer und Lösungen für SDS-Page und Western Blot

<i>Ammoniumpersulfat 10% (v/v)</i>	Ammoniumpersulfat dest. H ₂ O	1g ad 10 ml
<i>Auftragepuffer für SDS-Page (5-fach)</i>	SDS Tris-HCl, pH 6,8 Glycerol* 2-Mercaptoethanol Bromphenolblau Lagerung bei Raumtemperatur	10% (w/v) 0,5 M, 50% (v/v) 25% (v/v) 0,5% (w/v)
<i>Chemolumineszenz-Lösung (Pierce)</i>	SuperSignal Dura Kit Luminol/Enhancer Peroxid-Lösung	7 ml 7 ml
<i>Coomassie Färbelösung</i>	Coomassie Roti Blue 2-Propanol dest. H ₂ O	20% (v/v) 20% (v/v) 60% (v/v)
<i>Coomassie Entfärbelösung</i>	Eisessig 2-Propanol dest. H ₂ O	10% (v/v) 10% (v/v) 80% (v/v)
<i>Ponceaulösung</i>	Ponceau S Eisessig in dest. H ₂ O	0,1% (w/v) 0,5% (v/v)

* Der Glycerol-Gehalt wurde gegenüber dem ursprünglichen Protokoll von Lämmler et al. verringert um die Viskosität herabzusetzen und so ein genaueres und reproduzierbareres Pipettieren zu ermöglichen.

<i>SDS-Page Elektrophoresepuffer (10-fach)</i> (Laemmli 1970)	Tris-Base Glycin SDS Lagerung bei Raumtemperatur	250 mM 1,9 M 1%
<i>Transferpuffer (Proteine < 100 kDa)</i>	Tris Glycin Methanol	25 mM 192 mM 20% (v/v)
<i>Transferpuffer (Proteine > 100 kDa)</i>	Tris Glycin Methanol	48 mM 39 mM 20% (v/v)
<i>Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8</i>	Tris-Base dest. H ₂ O pH mit HCl konz. Einstellen; Lagerung bei 4° C	54,45 g ad 300 ml
<i>Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8</i>	Tris-Base dest. H ₂ O pH mit HCl konz. Einstellen; Lagerung bei 4° C	6 g ad 100 ml
<i>Waschpuffer TBS (10-fach)</i>	Tris NaCl pH 7,4	10 mM 150 mM
<i>Waschpuffer TBST (10-fach)</i>	Tris NaCl Tween 20 pH 7,4	10 mM 150 mM 0,1% (v/v)

5.2.2 Puffer und Lösungen für die Isolierung von Enterozyten und Gewebeaufarbeitung

<i>Isotonische Darmspüllösung</i>	K ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄ NaCl Hyaluronidase He begast, pH 7,4 Lagerung bei -20° C	34 mM 9 mM 90 mM 2 I.E./ml
<i>Enterozytenisolierungspuffer</i>	NaCl Tris-Base NaEDTA Pefa Bloc SC He begast, pH 7,4	90 mM 10 mM 1 mM 1 mM

<i>Proteinlagerungspuffer</i>	Tris-Base	100 mM
	NaEDTA	1 mM
	Pefa Bloc SC	1 mM
	Leupeptin	1 µg/ml
	Pepstatin	1 µg/ml
	He begast; pH 7,4; Lagerung bei -20° C	

5.2.3 Puffer und Lösungen für Proteinanalytik

<i>Smith Reagenz</i>	Kupfer-(II)-sulfat in Bichinonsäure	2% (v/v)
----------------------	--	----------

5.3 Nährmedien

<i>Kulturmedium für L-MDR1 und LLC-PK1 Zellen</i>	Medium 199 supplementiert mit:	
	Penizillin	50 U/ml
	Streptomycin	50 µg/ml
	Vincristin (nur L-MDR1)	640 nM
	Fötale Kälberserum	10% (v/v)

<i>Kulturmedium für Caco-2 Zellen</i>	DMEM supplementiert mit:	
	HEPES	25 mM
	L-Glutamin	2 mM
	Nicht essentielle AS	1% (v/v)
	Penizillin	100 U/ml
	Streptomycin	100 µg/ml
	Fötale Kälberserum	10% (v/v)

<i>Kulturmedium für TN5B1-4 Zellen</i>	TNMFH supplementiert mit:	
	Gentamycin	100 µg/ml
	Fötale Kälberserum	10% (v/v)

Die L-MDR1 und LLC-PK1 Zelllinien wurden mir großzügigerweise von Herrn Prof. Dr. A. Schinkel (Nederlands Kanker Center, Amsterdam, Niederlande) zur Verfügung gestellt.

5.4 Geräte und Hilfsmittel

Gerät	Bezeichnung
<i>Brutschrank</i>	BBK6220, Hereaus
<i>Chemolumineszenz CCD Kamera</i>	LAS-1000, Fuji
<i>Densitometer</i>	EIScript 400, Hirschmann
<i>Elektroblotter</i>	TransBlot Cell, Biorad
<i>Elektrophorese</i>	PowerPack 1000 und 300, BioRad
<i>Elektrophoresekammer</i>	Protean Iixi, BioRad
<i>Film</i>	Hyperfilm ECL (18x24 cm), Amersham Pharmacia
<i>Filterpapier</i>	GB03, Schleicher&Schuell
<i>Geltrockner</i>	GelDryer 583, BioRad
<i>Heizblock</i>	MultiTemp III, Pierce
<i>Homogenisatoren</i>	Potter Elvehjem (Glas/ Teflon), 2 ml, zylindrisch, Schütt Labortechnik
<i>HPLC</i>	HP1100 (Entgaser, binäre Pumpe, Autosampler, Säulenofen mit Säulenschaltventil, UV-Detektor), Agilent Technologies
<i>HPLC-Säulen</i>	Luna C8 (150x2 mm, 5 µm), Phenomenex LiChrospher RP C18 endcapped (3x125 mm, 5 µm), Bischoff
<i>HPLC-Vorsäulen</i>	Eclipse XDB-C8 (2,1x12,5 mm, 5 µM), Agilent Technologies LiChrospher RP C18 endcapped (20x3,0 mm), Bischoff
<i>Massenspektrometer</i>	HP1100 (1 Quadropol Massenspektrometer mit LC-Kopplung und ESI, Agilent Technologies)
<i>Mikrotiterplatten</i>	96er unsteril, Greiner
<i>Mikrotiterplattenlesegerät</i>	Multilabel Counter 1420, Victor
<i>Ohmmeter</i>	Millicell-ERS, Millipore
<i>pH-Meter</i>	420A, Orion
<i>Photometer</i>	GeneQuant, Amersham Pharmacia
<i>Pipetten</i>	Eppendorf Reference
<i>PVDF-Membran</i>	Roche Diagnostics
<i>Reagenzglasschüttler</i>	Minishaker MS2, IKA
<i>Röntgenkassetten</i>	18x24 cm, Suprema
<i>Schwingmühle</i>	Mikro-Dismembrator U, Braun Biotech
<i>Software</i>	Aida 2.1, Raytest ChemStation 4.06, Agilent Technologies Excel 97 SR-2, Microsoft Grafit 4.06, Erithacus Software GraphPad InStat 3.01, GraphPad Software GraphPad Prism 3.0, GraphPad Software
<i>Szintillationszähler</i>	LS1800, Beckman Coulter
<i>Transwell Membraneinsätze und Platten</i>	12-fach Transwell Membraneinsätze (Porengröße 0,4 µM), Costar
<i>Ultraschall Desintegrator</i>	Sonoplus HD 200 mit Spitze MS 72 (Ø 2mm), Bandelin
<i>Universalschüttelapparat</i>	Typ 3014, GFL
<i>Vibrationsschüttler</i>	Vibramax 100, Heidolph

<i>Waage</i>	HK 60, Mettler
<i>Wasserbad</i>	Multi Temp III, Amersham Pharmacia
<i>Zellzahlgerät</i>	Casy TT, Schärfe Systems
<i>Zentrifugen</i>	Labofuge 300, Hereaus Sepatech
	Biofuge 22R, Hereaus Sepatech
	Optima Max-E Ultrazentrifuge, Beckman Coulter

5.5 Gewebebank

Um einen intraindividuellen Vergleich von arzneimittelmetabolisierenden Enzymen und Arzneimitteltransportern in Darm und Leber unter Ausschluß interindividueller Schwankungen durchzuführen, war die Sammlung von Darm- und Lebergewebe eines einzelnen Patienten, grundlegende Voraussetzung für die vorliegende Arbeit. Zu diesem Zweck wurden Patienten, die sich im Robert-Bosch-Krankenhaus einer Operation unterzogen, bei der Dünndarmgewebe entfernt wurde (Pankresektomie nach Whipple oder Gastrektomie), eingehend über Ziel, Ablauf und Risiken der Gewebeentnahme einschließlich der zusätzlichen, therapeutisch nicht indizierten Leberkeilbiopsie mündlich und in schriftlicher Form aufgeklärt. Bei Einwilligung der Patienten wurden diese in die Studie eingeschlossen. Das dazu erforderliche Ethikvotum wurde von den Ethikkommissionen des Robert-Bosch-Krankenhauses und der Ärztekammer des Landes Baden-Württemberg erteilt. Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen oder Lebererkrankungen (Leberzirrhose, Hepatitis A, B, C) wurde von der Studie ausgeschlossen.

Im Zeitraum vom 4.08.97 bis 8.06.99 wurden 17 (weiblich n= 8, männlich n= 9) Patienten in die Gewebesammlung eingeschlossen. Angaben zu den Patientendaten sind in Tabelle 31 aufgeführt.

Tabelle 31: Daten der in die Gewebesammlung aufgenommenen Patienten.

Pat. Nr.	Alter/ Geschlecht	Erkrankung	Zigaretten pro Tag/ Diabetes	Resektions- abstand - Pylorus [cm]	Medikation	Präoperative Medikation
A	51 ♀	Pankreatitis (alkoholind.)	20 Typ I	30	Insulin ASS	Ranitidin Flunitrazepam
B	81 ♂	Ulcus	-/- Typ II	50	Glibenclamid Acarbose Furosemid Nifedipin Enalapril	Oxazepam
C	59 ♀	Pankreas- Karzinom	-/- -/-	5	Terfenadin	Dimetinden Metronidazol Ofloxacin
D	78 ♂	Pankreas- Pseudozyste (alkoholind.)	40 -/-	30	Omeprazol Metoprolol Nifedipin	Keine Angaben
E	54 ♀	Papillen- Karzinom	-/- -/-		Nifedipin Enalapril Amitriptylin	Flunitrazepam
F	78 ♂	Pankreas- Karzinom	-/- -/-	30	Ranitidin Metoclopramid Amlodipin Nifedipin Enoxazin	Acetyl-Digoxin
G	74 ♂	Pankreas- Karzinom	-/- -/-	40	Metoprolol Oxazepam ASS	Isosorbitdinitrat Nifedipin Omeprazol
H	62 ♂	Magen- Karzinom	-- -/-		Isosorbitdinitrat Furosemid Fosinopril Digitoxin	Gentamicin Amoxicillin

I	64 ♂	Adeno- Karzinom	10-20 -/-	45	Cyanocobalamin	Flunitrazepam Gentamicin Ampicillin
K	63 ♂	Magen- Karzinom	-/- Typ II	15	Glibenclamid	Flunitrazepam Ranitidin
L	37 ♂	Pankreatitis (alkoholind.)	50 Typ II	30	Glibenclamid Insulin	Flunitrazepam Ranitidin Piperacillin Vit K1
M	67 ♀	Pankreas- Karzinom	20 Typ I	30	Amlodipin Paracetamol ASS	Butylscopolamin Ceftriaxon Metronidazol Midazolam
N	59 ♀	Magen- Karzinom	-/- -/-	15	Omeprazol Estradiol Norethisteron Midazolam	Butylscopolamin Flunitrazepam Ceftriaxon
O	73 ♀	Magen- Karzinom	-/- -/-	15	Hydrochloro- thiazid Triamteren Johanniskraut	Vancomycin Gentamycin L-Thyroxin Furosemid Flunitrazepam
P	60 ♀	Magen- Karzinom	-/- -/-	15	Metoclopramid	Vancomycin Gentamycin Flunitrazepam
R	64 ♂	Pankreas- Karzinom	-/- -/-	30	ASS Brennseleextr. Moslidomin Metoprolol Pravastatin	Flucloxacillin Flunitrazepam Ranitidin
S	74 ♀	Duodenal- Karzinom	-/- -/-			

Präoperativ (4-16 Stunden) wurden 10 ml Blut in einer EDTA Monovette zur weiteren Gewinnung von genomischer DNA und RNA entnommen (Läpple et al., 2000). Die sog. "warme Ischämiezeit", d.h. die Zeit in der das zu resektierende Darmgewebe einer verminderten Durchblutung durch das Abklemmen von versorgenden Blutgefäßen ausgesetzt ist, betrug zwischen 30- und 90 Minuten bei Pankresektomien nach Whipple. Bei Gastrektomien verkürzte sich diese Zeit auf 15 Minuten. Nach erfolgter Resektion wurden Darmgewebe und Leberbiopsien auf Eis gelagert und pathologisch befundet. Das vom Pathologen freigegebene Darmgewebe wurde durch einen Längsschnitt eröffnet und vorsichtig mit isotonischer Darm-Spüllösung gewaschen. Nach der Entfernung von Gewebestücken zur Isolierung von RNA (Läpple et al., 2000) und Einbettung in Paraffinblöcke für weitergehende immunhistochemische Untersuchungen, wurden das verbleibende Darm- und Lebergewebe in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80°C gelagert. Die kalte Ischämiezeit, d.h. die Zeit zwischen Resektion und Schockgefrieren konnte unter 10 Minuten gehalten werden.

5.5.1 Isolierung von Enterozyten

Da die zu untersuchenden Cytochrom P450 Isoenzyme, die Glucuronyltransferasen und der Arzneimitteltransporter P-Glykoprotein ausschließlich in der Epithelzellschicht des Darms, den Enterozyten exprimiert werden, mußte diese Zellschicht möglichst selektiv und unter Bewahrung der funktionellen Eigenschaften dieser Enzyme vom restlichen Darmgewebe isoliert werden. Zu diesem Zweck wurde die von (Hülsmann et al. 1973) entwickelte Isolierungsmethode, die sich durch eine höhere Ausbeute und Reproduzierbarkeit gegenüber der herkömmlichen Abschabetechnik auszeichnet (Borm et al. 1983), mit einigen Modifikationen angewendet. Daten zur Funktion von Cytochrom P450 Enzymen der mit dieser Methode isolierten Enterozyten liegen für Rattendarm als Ausgangsmaterial vor (Fasco et al. 1993). Das tiefgefrorene Darmgewebe wurde im Kühlraum (4°C Raumtemperatur) bis auf -10°C erwärmt und dann in ein Becherglas mit 20°C warmer isotonischer Darmspüllösung gegeben und bis auf 4°C aufgetaut. Die angegebenen Temperaturen wurden mittels eines elektronischen Meßfühlers überprüft. Das Darmgewebe wurde dann in ein Kunststoffgefäß gegeben, dessen Boden zuvor mit einem halbelastischem Kunststoffbelag verklebt worden war. Mithilfe von Stecknadeln wurde das Darmgewebe mit der luminalen Seite nach oben am Boden befestigt und mit 100-150 ml Enterozyten-Isolierungspuffer (4°C) übergossen. Das Gefäß wurde dann auf einem Vibrationsschüttler (Vibramax 100, Heidolph) befestigt und mit Frischhaltefolie abgedeckt. Die Isolierung erfolgte bei 2000 U/min bei einer festen Amplitude von 1,5 mm über 5 Minuten. Die erhaltene Zellsuspension wurde dann in 50 ml Falcon-Gefäße gegeben, das verbleibende Darmgewebe zweimal mit je 50 ml Enterozyten-Isolierungspuffer gespült. Zellsuspension und Spüllösung wurden bei 400 g und 4°C 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets vereinigt. Das vereinigte Pellet wurde in 25 ml Protein-Lagerungspuffer gewaschen und erneut bei 400 g und 4°C 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen.

5.5.2 Aufarbeitung der Leberbiopsien

Die tiefgefrorenen Leberbiopsien wurden mittels einer Kugelmühle aufgearbeitet. Dazu wurden die Leberbiopsie, die Stahlkugel und die Teflontrommel der Kugelmühle in flüssigem Stickstoff vorgekühlt. Anschließend wurden die Leberbiopsien bei 2500 U/min über 2 Minuten pulverisiert, in ein 15 ml Falcon-Gefäß überführt und gewogen.

5.5.3 Proteinpräparation aus Enterozyten und Lebergewebe

Aus dem Magen und dem Pankreas gelangen diverse Proteasen in das Darmlumen, durch die die untersuchten arzneimittelmetabolisierenden Enzyme und Transporter hätten abgebaut werden können. Daher wurden in Tabelle 32 aufgeführte Proteaseinhibitoren bei der Proteinpräparation und -Lagerung zugesetzt, um einem derartigen Abbau vorzubeugen.

Tabelle 32: Aufstellung über in humaner Darmflüssigkeit und in Leber vorhandener Proteasen und entsprechender Inhibitoren

Protease	Organ	Inhibitor
Carboxypeptidase A	Pankreas	EDTA
Carboxypeptidase B	Pankreas	EDTA
Cathepsin B	Leber	Leupeptin
Cathepsin D	Leber	Pepstatin A
Chymotrypsin	Pankreas	PefaBloc
Kallikrein	Pankreas	Leupeptin
Pepsin	Magen	Pepstatin A
Trypsin	Pankreas	PefaBloc, Leupeptin

Isolierte Enterozyten und pulverisierte Leber wurden in Proteinlagerungspuffer (1 ml/50 mg) resuspendiert und in einem 2 ml Potter Elvehjem Homogenisator (Glas/ Teflon) 2 Minuten bei 1000 U/min homogenisiert. Im Anschluß wurden die Homogenate für 30 Sekunden mit

Ultraschall von 12 W behandelt (Bandelin Sonoplus HD 200), aliquotiert und bei -80°C gelagert. Auf die Herstellung einer mikrosomalen Fraktion wurde verzichtet, da aufgrund der geringen zu Verfügung stehenden Menge an Enterozytenhomogenat (vgl. 2.2.1) und einem Cytochrom P450 Verlust von 70% bei der Präparation von Mikrosomen (Joly et al. 1975) keine ausreichenden Mengen Protein aus Enterozyten zur Verfügung gestanden hätte.

5.6 Proteinanalytische Methoden

5.6.1 Quantifizierung des Proteingehalts

Die Bestimmung des Proteingehalts einer Probe erfolgte in allen Fällen nach der Methode von (Smith et al. 1985) mittels Bichinonsäure/ Kupfer-II-sulfat in Mikrotiterplatten. Dazu wurden ein $10\ \mu\text{l}$ Aliquot der entsprechenden Proteinhomogenate 1:5 bis 1:30 mit H_2O dest. verdünnt. $10\ \mu\text{l}$ dieser Verdünnung wurden jeweils doppelt in 96er Mikrotiterplatten aufgetragen, mit $200\ \mu\text{l}$ Smith Reagenz versetzt (Bichinonsäure mit 2% (v/v) Kupfer-II-sulfat) und 1 Minute auf einem Universalschüttler gemischt. Nach einstündiger Inkubation in einem Trockenschrank bei 37°C wurde die Absorption bei $570\ \text{nm}$ mithilfe eines Mikrotiterplattenlesegeräts (Multilabel Counter 1420, Victor) gemessen. Bei jeder Meßreihe wurden eine Eichkurve (200, 400, 600, 800, $1000\ \mu\text{g/ml}$ BSA) und Qualitätskontrollen (200 und $800\ \mu\text{g/ml}$ BSA) in Doppelbestimmung mitgeführt.

Die Quantifizierung erfolgte mittels linearer Regressionsanalyse gegen die Eichkurve. Die Messung wurde als valide angesehen wenn die beiden mitgeführten Qualitätskontrollen eine Richtigkeit von $\pm 10\%$ Abweichung aufwiesen. Die Präzision der Messung, berechnet als die relative Standardabweichung der einzelnen Meßwerte, mußte $< 10\%$ sein. Zur Auswertung wurden zwei Verdünnungen herangezogen, deren Meßwerte innerhalb des linearen Bereichs der Methode ($200\text{-}1000\ \mu\text{g/ml}$ BSA entsprechen $0,2\text{-}0,7\ \text{A}$) lagen. Der Proteingehalt der Proben wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Proteingehalt [mg/ml]} = \text{Mittelwert der Meßwerte} \times \text{Verdünnungsfaktor} / 1000$$

5.6.2 Vorbereitung der Proteinhomogenate zur elektrophoretischen Trennung

Zur Quantifizierung von CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18, CYP2C19, CYP3A4, CYP3A5 und zur Bestimmung von P-Glykoprotein in Enterozyten- und Leberhomogenaten wurden Stammlösungen der entsprechenden Homogenate in Auftragepuffer für die SDS-Gelelektrophorese hergestellt.

Zur Messung der verschiedenen Cytochrom P450 Isoenzyme wurden $250\ \mu\text{g}$ der entsprechenden Homogenate mit $1/5$ Volumen Auftragepuffer für die SDS-Gelelektrophorese (5-fach) versetzt, mit H_2O bidest. auf eine Konzentration von $1\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$ Proteinhomogenat

eingestellt und mit einem Universalschüttler gemischt. Anschließend wurde 5 Minuten in einem Heizblock (MultiTemp III, Pierce) bei 95° C denaturiert und danach auf einem Universalschüttler gemischt. Die Stammlösungen wurden dann bis zum weiteren Gebrauch bei -20° C gelagert.

Zur Bestimmung von P-Glykoprotein wurden 125 µg der entsprechenden Homogenate mit 1/5 Volumen Auftragepuffer für die SDS-Gelelektrophorese (5-fach) und 1/10 Volumen Proteinlagerungspuffer (10-fach) versetzt. Anschließend wurde mit H₂O bidest. auf eine Konzentration von 1 µg/µl eingestellt und die Lösung durch mehrfaches Aufziehen durch eine 7G Kanüle, bis zum Erhalt einer niedrig viskosen Lösung, geschert. Da P-Glykoprotein durch Aufkochen bei 95° agglomeriert, mußte an dieser Stelle eine derartige Behandlung entfallen. Die Stammlösungen wurden gevortext, sofort wieder in flüssigen Stickstoff gegeben und bis zum weiteren Gebrauch bei -80° C gelagert, um weiteren proteolytischem und glykolytischem Abbau vorzubeugen.

5.6.3 Herstellung von Eichlösungen aus rekombinanten Enzymen

Um Cytochrom P450 Isoenzyme mittels Immunoblotanalyse zu quantifizieren, war es nötig entsprechende Eichlösungen herzustellen und parallel zu den Enterozyten- und Leberhomogenaten auf jedem Gel mitaufzutragen. Als geeignete Standards wurden mikrosomale Fraktionen von mit CYP2C8, 2C9, 2C19, 3A4 und 3A5 transfizierten humanen Lymphoblasten (Gentest, Frankfurt a.M.) verwendet. Die Schwierigkeit bei der Cytochrom P450 Quantifizierung derartiger Standards mittels CO-Differenzspektrum besteht darin, daß mit dieser Methode vorhandenes Apoprotein nicht miterfaßt wird (Joly et al. 1975). Derartiges Apoprotein wird in der Immunoblotanalyse hingegen detektiert. Somit ist darauf zu achten, daß die eingesetzten Cytochrom P450 Standards einen möglichst geringen Anteil von Apoprotein aufweisen. Die eingesetzten Standards enthalten einen Apoprotein Anteil von <10% (persönliche Mitteilung von Dr. E. Code, Gentest).

Zur Herstellung der höchsten Eichlösung (1000 fmol/25µl CYP2C8, CYP2C9, CYP3A4; 500 fmol/25 µl CYP2C19; 200 fmol/25µl CYP3A5) wurde die rekombinanten Enzyme zusammen mit 1/5 Volumen Auftragepuffer für die SDS-Gelelektrophorese (5-fach) versetzt, mit TN5 Zellhomogenat auf eine Proteinkonzentration von 0,5 µg/µl eingestellt und mit H₂O bidest. auf ein Endvolumen von 500 µl eingestellt. TN5 Zellhomogenat diente als Trägerprotein, da ein linearer Proteintransfer aus SDS-Polyacrylamidgelen nur bis 5 µg Protein/Spur zu beobachten war (vgl. 2.1.3.1), und um Adsorption an Glas und Kunststoffgefäßen vorzubeugen. Die Eichlösungen niedrigerer Konzentration wurden aus der jeweils höher konzentrierten durch Verdünnung mit Auftragepuffer für die SDS-Gelelektrophorese, der mit 0,5 µg/µl TN5 Zellhomogenat versetzt war, hergestellt. Folgende Eichlösungen wurden verwendet:

CYP2C8 (Gentest Microsomes M112r, Ch. Nr.: 26)
CYP2C9*1 (Gentest Microsomes M118r, Ch. Nr.: 27)
CYP3A4 (Gentest Microsomes M107r, Ch. Nr.: 73)

Eichlösung 1: 1000 fmol/25 μ l
Eichlösung 2: 500 fmol/25 μ l
Eichlösung 3: 250 fmol/25 μ l
Eichlösung 4: 125 fmol/25 μ l
Eichlösung 5: 62,5 fmol/25 μ l

CYP2C19 (Gentest Microsomes M119a, Ch. Nr.: 24)

Eichlösung 1: 500 fmol/25 μ l
Eichlösung 2: 250 fmol/25 μ l
Eichlösung 3: 100 fmol/25 μ l
Eichlösung 4: 50 fmol/25 μ l
Eichlösung 5: 25 fmol/25 μ l

CYP3A5 (Gentest Supersomes P235, Ch. Nr.: 7)

Eichlösung 1: 200 fmol/25 μ l
Eichlösung 2: 100 fmol/25 μ l
Eichlösung 3: 50 fmol/25 μ l
Eichlösung 4: 25 fmol/25 μ l
Eichlösung 5: 12,5 fmol/25 μ l

Die weitere Aufarbeitung der Eichlösungen erfolgte wie in 5.6.2 beschrieben. In Ermangelung von aufgereinigtem P-Glykoprotein wurde L-MDR1 Zellhomogenat zur Normierung und als Positivkontrolle für P-Glykoprotein Immunoblots verwendet. Bei L-MDR1 Zellen handelt es sich um die mit humanem MDR-1 transfizierte Zelllinie LLC-PK1 (Schinkel et al. 1995) (Schweinenierenzelllinie). Zur Normierung der Blot zu Blot Variabilitäten wurden 2 und 10 μ g L-MDR1 Zellhomogenat mit 0,5 μ g/ μ l TN5 Zellhomogenat enthaltendem Auftragepuffer für die SDS-Gelelektrophorese ad 25 μ l versetzt und auf jedem Gel mitaufgetragen.

5.6.4 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Bei der SDS-Gelelektrophorese werden Proteine in Gegenwart eines Überschusses von Natriumdodecylsulfat (SDS) nach Denaturierung elektrophoretisch aufgetrennt. SDS lagert sich in konstantem Gewichtsverhältnis an die Proteine an und kompensiert Aminosäuren mit positiver Ladung, so daß alle Proteine nach Anlegen von elektrischem Strom zur Anode

wandern. Die Proteine verlieren dabei Ihre Tertiär- und Sekundärstrukturen und können so in einem Gel geeigneter Porosität entsprechend ihres Molekulargewichts aufgetrennt werden. Enterozyten- und Leber-Proteinhomogenate wurden nach der Methode von Lämmli (Laemmli 1970) elektrophoretisch aufgetrennt. Für Cytochrom P450 Isoenzyme erfolgte die Trennung in 10%igen Polyacrylamidgelen von 1,5 mm Dicke, für P-Glykoprotein in 12% Polyacrylamidgelen von 1,0 mm Dicke. Trenn- (10x16 cm) und Sammelgele (6x16 cm, 25 Spuren) wurden nach folgenden Vorschriften hergestellt:

Tabelle 33: Herstellung von SDS-Polyacrylamidgelen

Chemikalien		Trenngel 12%, 1,0 mm	Trenngel 10%, 1,5 mm	Sammelgel 4%
Acrylamid 30%:BIS (37,5:1)	ml	10,8	10	2,7
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	ml	7,5	7,5	-/-
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	ml	-/-	-/-	5,0
SDS 10% (v/v)	ml	0,3	0,3	0,2
TEMED	µl	30	30	20
H ₂ O bidest	ml	12	12	12
Ammoniumpersulfat 10%	µl	300	300	200

Die Proben wurden mittels Pipettenspitzen (Cytochrom P450 Isoenzyme) oder einer Hamiltonspritze (P-Glykoprotein) zusammen mit einem Molekulargewichtsmarker aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte über Nacht (1,5 h bei 150 V anschließend 12 h bei 35 V) in einer vertikalen Elektrophoresekammer (TransBlot Cell Iixi, BioRad, München).

5.6.5 Proteinquantifizierung mittels Immunoblotanalyse

Der Transfer der Proteine aus DS-Polyacrylamidgelen auf Polyvinylidendifluoridmembranen (PVDF), die eine höhere Proteinbindungskapazität und mechanische Stabilität als Nitrocellulosemembranen aufweisen (BioRad 1997), wurde in Anlehnung an die Methode von Towbin durchgeführt (Towbin et al. 1979). Das die aufgetrennten Proteine enthaltende SDS-Polyacrylamidgel wurde 15 Minuten in Transferpuffer äquilibriert. Der Transfer der

Proteine auf PVDF-Membran erfolgte in einer Tankblot Apparatur (TankBlot Cell, BioRad), die einer Halbtrockenblot Apparatur hinsichtlich Reproduzierbarkeit überlegen ist. Cytochrom P450 Isoenzyme (MW: 48-56 kDa) wurden mittels Transferpuffer für Proteine < 100 kDa 2 h bei einer konstanten Spannung von 100 V transferiert. Der Transfer von P-Glykoprotein (MW: 170 kDa) wurde 20 h bei einer Leistung von 5 W und Transferpuffer für Proteine > 100 kDa durchgeführt.

Die Validierung des Transfers erfolgte durch Kontrolle der im Gel verbleibenden Restmenge Protein mittels Coomassie-Färbung des Gels. Dazu wurden die transferierten Gele 4 h in Coomassie Färbelösung geschwenkt. Nach Inkubation der gefärbten Gele in Coomassie-Entfärbelösung bei Raumtemperatur, wurden diese in einem Gel Trockner (GelDryer 583, BioRad) 90 Minuten bei 90° C getrocknet und anschließend mit einem Scanner (HP DeskScanII, Hewlett Packard) digitalisiert. Der lineare Transfer verschiedener Proteinmengen auf die PVDF Membran wurde durch das Anfärben der Membran nach abgeschlossenem Transfer mit Ponceau-S untersucht. Die PVDF-Membranen wurden dazu sofort noch dem Transfer 5 Minuten in Ponceau-S Färbelösung gegeben. Nach Abgiessen der Ponceau-S Färbelösung wurden die Membranen dann zweimal mit 50 ml H₂O bidest. gewaschen und die angefärbte Membran anschließend mit einem Scanner digitalisiert.

Die mit Protein beladenen PVDF-Membranen wurden dann zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen 60 Minuten in Blockpuffer unter leichtem Schütteln (20x/min) inkubiert. Zur Bindung der Antikörper wurden die Membranen dann 60 Minuten in mindestens 15 ml der entsprechenden Antikörperlösungen unter leichtem Schütteln (20x/min) inkubiert. Nach Entfernung der Antikörperlösungen wurde einmal kurz und zweimal je 10 Minuten mit 100 ml Waschpuffer (TBS/ 0,1% Tween) unter leichtem Schütteln (20x/min) gewaschen. Daraufhin folgte die Inkubation mit Meerrettichperoxidase (POD) konjugiertem Sekundärantikörper für 30 Minuten. Durch anschließendes Waschen zweimal je 5 Minuten und zweimal je 10 Minuten mit 100 ml Waschpuffer (TBS/ 0,1% Tween) unter starkem Schütteln (60x/min) wurde überschüssiger Sekundärantikörper entfernt. Die Inkubationsbedingungen waren im einzelnen:

CYP2C8 Aufgetragene Probenmenge: 25 µg Homogenat
Blockpuffer: 5% (w/v) Magermilchpulver in TBS/ 0,1 % Tween 20
Primärantikörper-Lösung: Anti-human CYP2C8 (Reserch Diagnostic, Katalog Nr. RDI-CYP2C8abr, Ch. RaPh/B#5 Nr.): 1:200 in Blockpuffer
Sekundärantikörper-Lösung: Anti-Rabbit IgG-POD, Fab Fragmente (Dianova, Katalog Nr. 111-035-006, Ch. Nr. 41299): 1:5000 (40 mU/ml) in Blockpuffer

- CYP2C9** Aufgetragene Probenmenge: 25 µg Homogenat
Blockpuffer: 5% (w/v) Magermilchpulver in TBS/ 0,1 % Tween 20
Primärantikörper-Lösung: Anti-human CYP2C9 (Research Diagnostic, Katalog Nr. RDI-CYP2C9abr, Ch. Nr. RaJ/B#3-7:) 1:200 in Blockpuffer
Sekundärantikörper-Lösung: Anti-Rabbit IgG-POD, Fab Fragmente (Dianova, Katalog Nr. 111-035-006, Ch. Nr. 41299:) 1:5000 (40 mU/ml) in Blockpuffer
- CYP2C19** Aufgetragene Probenmenge: 50 µg Homogenat
Blockpuffer: 5% (w/v) Magermilchpulver in TBS/ 0,1 % Tween 20
Primärantikörper-Lösung: Anti-human CYP2C19 (Research Diagnostic, Katalog Nr. RDI-CYP2C19Mabr, Ch. Nr. RaJ/Mono#2:) 1:400 in 1% (v/v) Magermilchpulver in 0,1 % TBST
Sekundärantikörper-Lösung: Anti-Rabbit IgG-POD, Fab Fragmente (Dianova, Katalog Nr. 111-035-006, Ch. Nr. 41299:) 1:5000 (40 mU/ml) in Blockpuffer
- CYP3A4** Aufgetragene Probenmenge: 5 µg Homogenat
Blockpuffer: 5% (w/v) Magermilchpulver in TBS/ 0,1 % Tween 20
Primärantikörper-Lösung: Anti-human CYP3A4 (Gentest WB-3A4 Katalog Nr. A234, Ch. Nr. 1:) 1:500 in Blockpuffer
Sekundärantikörper-Lösung: Anti-Rabbit IgG-POD, Fab Fragmente (Dianova, Katalog Nr. 111-035-006) 1:50.000 (4 mU/ml) in Blockpuffer
- CYP3A5** Aufgetragene Probenmenge: 50 µg Homogenat
Blockpuffer: 5% (w/v) Magermilchpulver in TBS/ 0,1 % Tween 20
Primärantikörper-Lösung: Anti-human CYP3A4 (Gentest WB-3A5 Katalog Nr. A235 Ch. Nr. 1:) 1:1000 in 1% (v/v) Magermilchpulver in 0,1 % TBST
Sekundärantikörper-Lösung: Anti-Rabbit IgG-POD, Fab Fragmente (Dianova, Katalog Nr. 111-035-006) 1:50.000 (4 mU/ml) in Blockpuffer
- P-gp** Aufgetragene Probenmenge: 20 µg Homogenat
Blockpuffer: 5% (w/v) Magermilchpulver in TBS/ 0,1 % Tween 20
Primärantikörper-Lösung: Anti P-Glykoprotein Clone F4 (Sigma Immunochemicals, Katalog Nr. P7965) 1:4000 in Blockpuffer
Sekundärantikörper-Lösung: Anti-Mouse IgG-POD, Fab Fragmente (Roche Diagnostics, Katalog Nr. 1500686) 1:4800 (25 mU/ml) in Blockpuffer

Alle Inkubationen wurden bei Raumtemperatur vorgenommen. Die Detektion der entsprechenden Antigene erfolgte durch 5-minütige Inkubation der Membranen in 15 ml Supersignal Dura (Pierce Substrat:Starter 1:1) in Dunkelheit. Die Membranen wurden dann mithilfe von Zellstoff von überschüssiger Chemolumineszenz-Lösung befreit und in Frischhaltefolie gewickelt. Die Detektion des durch die Chemolumineszenz ausgesandten Lichts von 425 nm erfolgte für CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19 und P-Glykoprotein mit Röntgenfilmen (ECL Hyperfilm, Amersham Pharmacia), die im Anschluß in einem

Densitometer (ELScript 400, Hirschmann) eingelesen wurden. CYP3A4, CYP3A5 und P-Glykoprotein wurden mit einer hochempfindlichen Digitalkamera (LAS-1000, Fuji) mit Flat-Frame Korrektur, Abzug des Dunkelbilds und ohne Binning gemessen. Nach erfolgter Messung wurden die Membranen 30 Minuten in Abwaschpuffer bei 50° C inkubiert, anschließend in TBS/ 0,1% Tween 20 gewaschen und zur Lagerung getrocknet.

Die Auswertung der Messungen erfolgte durch zweidimensionale Erfassung der Signalbanden mit der Software AIDA 2.1 (Raytest, Straubenhard). Je nach Form der Signalbanden wurden rechteckige oder elliptische Meßfelder um diese gelegt, kopiert und oberhalb der Banden in den Hintergrund positioniert. Als Messwert wurde die Differenz aus Signal- und Hintergrundfeld verwendet.

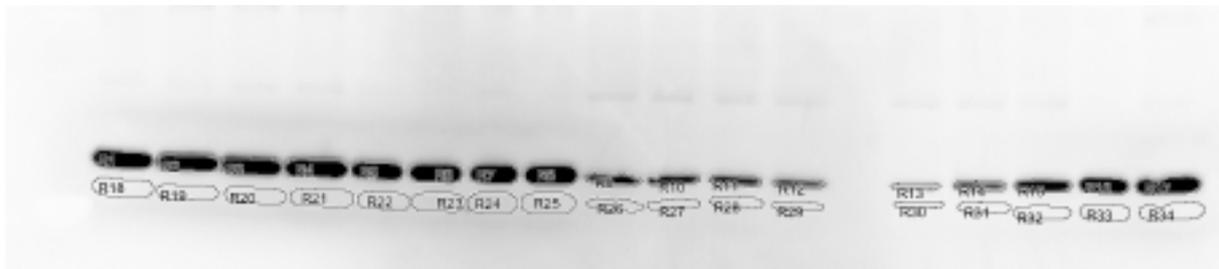


Abbildung 45: Auswertung eines Immunoblots durch zweidimensionale Meßfelder für das Signal und den entsprechenden Hintergrund.

Zur absoluten Quantifizierung der Cytochrom P450 Isoformen wurden auf jedem Immunoblot 5 Eichspuren entsprechender rekombinanter Standards (vgl. 5.6.3) mitgeführt. Die Quantifizierung erfolgte mittels linearer Regressionsanalyse gegen diese Eichkurve.

5.6.6 Deglycosylierung von P-Glykoprotein mit Endo- β -N-acetyl-glucosaminidase

In L-MDR1 Zellen rekombinant exprimiertes P-Glykoprotein wurde mit Endo- β -N-acetylglucosaminidase F deglycosyliert. Dazu wurden 50 μ g Proteinhomogenat in 100 μ l Deglycosylierungspuffer (100 mM Natriumacetat pH 5,0, 1 mM EDTA, 1 mM Pefabloc, Leupeptin 1 μ g/ml, Pepstatin, 1 μ g/ml, β -Mercaptoethanol 1% (v/v), Endo- β -N-acetylglucosaminidase F (0,1, 0,2, 0,5 U) 60 Minuten bei 37° C inkubiert und mit 11 μ l Auftragepuffer für SDS-Page abgestoppt.

5.7 Analytische Methoden

5.7.1 Bestimmung der Verapamil Metabolite D-620, D-617, D-702, D-703 und Norverapamil aus Inkubationslösungen und Zellkulturmedium

Die Messung der Verapamil Metabolite D-620, D-617, D-702, D-703 und Norverapamil aus Inkubationslösungen und Zellkulturmedium, erfolgte analog einer neu entwickelten Methode für die Bestimmung dieser Metabolite in Blutplasma und Darmperfusionslösung.

5.7.1.1 Reinsubstanzen

Alle Reinsubstanzen wurden von der Knoll AG, Ludwigshafen zur Verfügung gestellt.

[¹ H]Norverapamil-HCl	MW: 477,1
[² H ₃]Norverapamil-Oxalat (Interner Standard)	MW: 530,6
D-702 HCl	MW: 477,1
D-703 HCl	MW: 477,1
D-617 HCl	MW: 326,9
D-620 HCl	MW: 312,9
D-832 HCl (Interner Standard)	MW: 356,9

5.7.1.2 Lösungen

- Mobile Phase A: 5 mM Ammoniumacetat:
770 mg Ammoniumacetat werden in 2 l H₂O bidest. gelöst, durch einen Membranfilter von 0,45 µm Porengröße (Schleicher&Schuell, Einbeck) gefiltert und mit Eisessig auf pH 4,2 eingestellt.
- Mobile Phase B: Acetonitril (ACN)
- Stammlösungen: Auf einer Analysenwaage abgewogenes D-620 HCl, D-617 HCl, D-702 HCl, D-703 HCl, Norverapamil-HCl und die Internen Standards wurden in 2-Propanol 10 Minuten im Ultraschallbad in einer Konzentration von 1 mg/ml gelöst und vor Licht geschützt bei 4° C gelagert.
- Arbeitslösungen: Die Arbeitslösungen wurden aus den Stammlösungen mit H₂O bidest./ 1% (v/v) Isoamylalkohol verdünnt und bei -20° C gelagert.

5.7.1.3 Probenaufbereitung

Zu den mit Ethanol abs. versetzten Inkubationslösungen (vgl. 5.7.5.2) wurden 25 µl Interner Standard Lösung (2 nM D-832, [²H₃]Norverapamil) gegeben und auf einem Universalschüttler gemischt. Die Lösung wurde dann zur Abtrennung von denaturiertem Protein 10 Minuten bei 10000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde dann mit einer Pasteur Pipette in ein konisches Extraktionsglas überführt und unter Stickstoff-Begasung bei 37° C bis zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde in 150 µl 5mM Ammoniumacetat

/Acetonitril (70:30) wiederaufgenommen. 20 µl (Verapamil Konzentrationen <100 µM) bzw. 5µl (Verapamil-Konzentrationen >100 µM) wurden in das HPLC-System injiziert.

Die bei den Untersuchungen zum gerichteten Transport von Verapamil und seiner Metabolite entnommenen Proben (50 µl serumfreies Medium Opti-MEM, vgl. 2.8.3) wurden mit 25 µl Interner Standard Lösung (2 nM D-832, [²H₃]Norverapamil) und 5mM Ammoniumacetat /Acetonitril (70:30) ad 150 µl versetzt und auf einem Universalschüttler gemischt. 40 µl wurden direkt ohne Extraktion in das HPLC-System injiziert.

5.7.1.4 HPLC-Bedingungen

Gerät:	HP1100 mit Entgaser, Binärer Pumpe, Säulenschaltung, Autosampler, UV-Detektor, Agilent Technologies, Waldbronn	
UV-Detektor:	254 nm	
Detektor:	HP1100 einfach Quadropol Massenspektrometer mit LC-Kopplung und Electronic Spray (ESI) Ionisation, Agilent Technologies, Waldbronn	
Säule:	LUNA C8, 150x2 mm I.D., 5 µm Partikelgröße; (Phenomenex, Aschaffenburg)	
Vorsäule:	Eclipse XDB-C8, 2,1x12,5 mm, 5 µm Partikelgröße, (Agilent Technologies, Waldbronn)	
Säulentemperatur:	40° C	
Säulenschaltung:	0 min	Abfall
	2 min	über Säule
	15 min	Abfall
Gradient:	0 min	70% Mobile Phase A/30% Mobile Phase B 0,5 ml/min
	8 min	70% Mobile Phase A/30% Mobile Phase B 0,5 ml/min
	8,5 min	80% Mobile Phase A/20% Mobile Phase B 0,5 ml/min
	11 min	80% Mobile Phase A/20% Mobile Phase B 0,5 ml/min
	12,5 min	50% Mobile Phase A/50% Mobile Phase B 0,75 ml/min
	14,4 min	50% Mobile Phase A/50% Mobile Phase B 0,75 ml/min
	14,5 min	70% Mobile Phase A/30% Mobile Phase B 0,5 ml/min
	Äquilibrationszeit: 4 Minuten	

5.7.1.5 MSD-Bedingungen

Ionisation:	Electronic Spray Ionisation (ESI), positiv
Gas Temperatur:	350° C
Sprühdruck:	50 psig
N ₂ Volumenstrom:	11 l/min
Kapillarspannung:	3500 V

Messmodus:	Single Ion Monitoring Mode (SIM)	
	0 min	Fragmentor 80 V
		Gain: 1
		m/z 277,2 D-620
		m/z 291,2 D-617
		m/z 321,2 D-832, Interner Standard
	7 min	Fragmentor: 120 V
		Gain: 1
		m/z 441,6 D-703, D-702, Norverapamil
		m/z 444,3 [² H ₃]Norverapamil, Interner Standard

5.7.1.6 Quantifizierung

Die Quantifizierung erfolgte mittels linearer Regressionsanalyse mit Wichtung (1/x) des Peakflächenverhältnisses Interner Standard/Analyt. Zur internen Standardisierung der N-Desalkylmetabolite D-620 und D-617 wurde der Gallopamil Metabolit D-832 herangezogen. [²H₃]Norverapamil wurde zur Standardisierung von D-703, D-702 und Norverapamil benutzt. Die Berechnung erfolgte mithilfe der Software HP Chem Station 4.06. Alle angegebenen Werte sind Absolutmengen der freien Basen in pmol/ 250µl Inkubationsvolumen.

5.7.2 Bestimmung von 4'-OH-Diclofenac aus Inkubationslösungen

Die Messung von 4'-OH-Diclofenac aus Inkubationslösungen, erfolgte mit einer neu entwickelten LC-MS Methode.

5.7.2.1 Reinsubstanzen

Alle Diclofenac-Reinsubstanzen wurden von der Novartis AG, Basel zur Verfügung gestellt. Diflunisal wurde von Sigma, Deisenhofen bezogen.

3'-OH-Diclofenac		MW: 311,1
4'-OH-Diclofenac		MW: 311,1
5-OH-Diclofenac		MW: 311,1
Diflunisal	(Interner Standard)	MW: 250,2

5.7.2.2 Lösungen

Mobile Phase A: 5 mM Ammoniumacetat:
770 mg Ammoniumacetat werden in 2 l H₂O bidest. gelöst, durch einen Membranfilter von 0,45 µm Porengröße (Schleicher&Schuell, Einbeck) gefiltert und mit Eisessig auf pH 4,2 eingestellt.

Mobile Phase B: Acetonitril (ACN)

- Stammlösungen:** Auf einer Analysenwaage abgewogenes 3'-OH-Dicofenac, 4'-OH-Dicofenac, 5'-OH-Dicofenac und der Interne Standard wurden in Ethanol abs. 10 Minuten im Ultraschallbad in einer Konzentration von 1 mg/ml gelöst und vor Licht geschützt bei -20° C gelagert.
- Arbeitslösungen:** Die Arbeitslösungen wurden aus den Stammlösungen mit H₂O bidest./ 1% (v/v) Isoamylalkohol/ 1% Eisessig verdünnt und bei -20° C gelagert.

5.7.2.3 Probenaufbereitung

Zu den mit Ethanol abs. versetzten Inkubationslösungen (vgl. 5.7.5.6) wurden 25 µl Interner Standard (2 nM Diflunisal) gegeben und auf einem Universalschüttler gemischt. Die Lösung wurde dann zur Abtrennung von denaturiertem Protein 10 Minuten bei 10000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Pasteur Pipette in ein konisches Extraktionsglas überführt und unter Stickstoff-Begasung bei 37° C bis zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde in 150 µl 5mM Ammoniumacetat /Acetonitril (70:30) wiederaufgenommen. 40 µl wurden in das HPLC-System injiziert.

5.7.2.4 HPLC-Bedingungen

- Gerät:** HP1100 mit Entgaser, Binärer Pumpe, Säulenschaltung, Autosampler, UV-Detektor, Agilent Technologies, Waldbronn
- UV-Detektor:** 280 nm
- Detektor:** HP1100 einfach Quadropol Massenspektrometer mit LC-Kopplung und Electronic Spray (ESI) Ionisation, Agilent Technologies, Waldbronn
- Säule:** LUNA C8, 150x2 mm I.D., 5 µm Partikelgröße, (Phenomenex, Aschaffenburg)
- Vorsäule:** Eclipse XDB-C8, 2,1x12,5 mm, 5 µm Partikelgröße, (Agilent Technologies, Waldbronn)
- Säulentemperatur:** 45° C
- Säulenschaltung:**
- | | |
|-------|------------|
| 0 min | Abfall |
| 2 min | über Säule |
| 7 min | Abfall |
- Gradient:**
- | | | |
|---------|---------------------------------------|------------|
| 0 min | 70% Mobile Phase A/30% Mobile Phase B | 0,5 ml/min |
| 5 min | 70% Mobile Phase A/30% Mobile Phase B | 0,6 ml/min |
| 9 min | 40% Mobile Phase A/60% Mobile Phase B | 0,6 ml/min |
| 9,1 min | 70% Mobile Phase A/30% Mobile Phase B | 0,5 ml/min |
- Äquilibrationszeit: 2 Minuten

5.7.2.5 MSD-Bedingungen

- Ionisation:** Electronic Spray Ionisation (ESI), negativ
- Gas Temperatur:** 350° C
- Sprühdruck:** 50 psig

N ₂ Volumenstrom:	10 l/min	
Kapillarspannung:	3500 V	
Messmodus:	Single Ion Monitoring Mode (SIM)	
	Fragmentor: 50 V	
	Gain: 1	
	m/z 310,0	3'-OH-Diclofenac
		4'-OH-Diclofenac
		5-OH-Diclofenac
	m/z 249,0	Diflunisal, Interner Standard

5.7.2.6 Quantifizierung

Die Quantifizierung erfolgte mittels linearer Regressionsanalyse mit Wichtung (1/x) des Peakflächenverhältnisses Interner Standard/Analyt. Die Berechnung erfolgte mithilfe der Software HP Chem Station 4.06. Alle angegebenen Werte sind Absolutmengen der freien Basen in pmol/ 250µl Inkubationsvolumen.

5.7.3 Bestimmung von Morphin-3- und Morphin-6-glucuronid aus Inkubationslösungen

Die Messung von Morphin-3- und Morphin-6-glucuronid aus Inkubationslösungen, erfolgte analog einer von (Schänzle et al. 1999) entwickelten Methode für die Bestimmung dieser Morphin-Konjugate in Blutplasma und Cerebrospinalflüssigkeit.

5.7.3.1 Reinsubstanzen

Alle Reinsubstanzen wurden von Lipomed, Arlesheim, Schweiz und von Sigma, Deisenhofen bezogen.

Morphin-3-glucuronid	MW: 461,5
Morphin-6-glucuronid x 2H ₂ O	MW: 497,5
[² H ₃]Morphin-3-glucuronid x H ₂ O	MW: 464,5
[² H ₃]Morphin-6-glucuronid x CF ₃ COOH x H ₂ O	MW: 464,5

5.7.3.2 Lösungen

Mobile Phase A: H₂O/ 1% (v/v) Eisessig:
20 ml Eisessig werden in 1.998 l H₂O bidest. gegeben und durch einen Membranfilter von 0,45 µm Porengröße (Schleicher&Schuell, Einbeck) gefiltert.

Mobile Phase B: Acetonitril/ 1% (v/v) Eisessig:
10 ml Eisessig werden in 990 ml Acetonitril gegeben und durch einen Membranfilter von 0,45 µm Porengröße (Schleicher&Schuell, Einbeck) gefiltert.

- Stammlösungen: Auf einer Analysenwaage abgewogenes Morphin-3-, Morphin-6-glucuronid und die Internen Standards [²H₃]Morphin-3- und [²H₃]Morphin-6-glucuronid wurden in H₂O bidest. in einer Konzentration von 1 mg/ml gelöst und vor Licht geschützt bei -20° C gelagert.
- Arbeitslösungen: Die Arbeitslösungen wurden aus den Stammlösungen mit H₂O bidest. verdünnt und bei -20° C gelagert.

5.7.3.3 Probenaufbereitung

Zu den mit Ethanol abs. versetzten Inkubationslösungen (vgl. 5.7.5.7) wurden 25 µl Interner Standard (20 nM [²H₃]Morphin-3-glucuronid, 4 nM [²H₃]Morphin-6-glucuronid) gegeben und auf einem Universalschüttler gemischt. Die Lösung wurde dann zur Abtrennung von denaturiertem Protein 10 Minuten bei 10000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Pasteur Pipette in ein konisches Extraktionsglas überführt und unter Stickstoff-Begasung bei 37° C bis zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde in 150 µl H₂O bidest./Acetonitril/Eisessig (94:5:1) wiederaufgenommen. 80 µl (Morphin Konzentrationen <50 µM), 40 µl (Morphin Konzentrationen <5 mM) bzw. 4 µl (Morphin-Konzentrationen >5 mM) wurden in das HPLC-System injiziert.

5.7.3.4 HPLC-Bedingungen

Gerät:	HP1100 mit Entgaser, Binärer Pumpe, Säulenschaltung, Autosampler, UV-Detektor, Agilent Technologies, Waldbronn		
UV-Detektor:	254 nm		
Detektor:	HP1100 einfach Quadropol Massenspektrometer mit LC-Kopplung und Electronic Spray (ESI) Ionisation, Agilent Technologies, Waldbronn		
Säule:	LiChrospher RP C18 endcapped, 3x125 mm, 5 µm Partikelgröße, (Bischoff, Leonberg)		
Vorsäule:	LiChrospher RP C18 endcapped, 20x3,0 mm, (Bischoff, Leonberg)		
Säulentemperatur:	30° C		
Säulenschaltung:	0 min	Abfall	
	2 min	über Säule	
	6 min	Abfall	
Gradient:	0 min	93% Mobile Phase A/7% Mobile Phase B	0,5 ml/min
	6 min	95% Mobile Phase A/5% Mobile Phase B	0,5 ml/min
	7 min	30% Mobile Phase A/70% Mobile Phase B	0,75 ml/min
	8 min	30% Mobile Phase A/70% Mobile Phase B	0,75 ml/min
	9 min	93% Mobile Phase A/7% Mobile Phase B	0,5 ml/min
	Äquilibrierungszeit: 4 Minuten		

5.7.3.5 MSD-Bedingungen

Ionisation:	Electronic Spray Ionisation (ESI), positiv
Gas Temperatur:	350° C

Sprühdruk:	50 psig	
N ₂ Volumenstrom:	12 l/min	
Kapillarspannung:	3500 V	
Messmodus:	Single Ion Monitoring Mode (SIM)	
	Fragmentor: 120 V	
	Gain: 2	
	m/z 462,0	Morphin-3- und Morphin-6-glucuronid
	m/z 465,0	[² H ₃]Morphin-3- und [² H ₃]Morphin-6-glucuronid

5.7.3.6 Quantifizierung

Die Quantifizierung erfolgte mittels linearer Regressionsanalyse mit Wichtung (1/x) des Peakflächenverhältnisses Interner Standard/Analyt. Die interne Standardisierung wurde mit den entsprechenden dreifach deuterierten Standards durchgeführt. Die Berechnung erfolgte mithilfe der Software HP Chem Station 4.06. Alle angegebenen Werte sind Absolutmengen der freien Glucuronide in pmol/ 250µl Inkubationsvolumen.

5.7.4 Validierung analytischer Methoden

Da Enzymaktivitäten in Stoffmenge Metabolit pro Menge Enzym und Zeit angegeben werden, wurden bei den o.a. analytischen Verfahren anstelle von Konzentrationen die gebildete Stoffmenge Metabolit pro Inkubation bestimmt. Bei jeder Inkubationsserie wurden Kontrolllösungen aus gesondert hergestellten Stammlösungen mit drei unterschiedlichen Mengen Analyt mitgeführt. Die Kontrolllösungen wurden analog 5.7.5.2, 5.7.5.2 und 5.7.5.6 allerdings ohne Cofaktor hergestellt und nicht inkubiert. Als untere Quantifizierungsgrenze (Lower Limit of Quantification, LLOQ) wurde die Menge Analyt betrachtet, bei der die Abweichungen von Richtigkeit und Präzision der Intra- und Inter-Assay-Variabilität < 20% waren. Als Nachweisgrenze der Methode (Limit of Detection, LOD) wurde die Menge Analyt angegeben, deren Signal-Rausch-Verhältnis bei 3:1 lag.

Auf Stabilitätsuntersuchungen wurde verzichtet, da Daten zur Stabilität der Stammlösungen bereits vorlagen (Schänzle et al. 1999) oder vom Hersteller mitgeliefert wurden. Des weiteren wurden die aufgearbeiteten Proben maximal vier Tage bei -20° C gelagert bevor die Messungen durchgeführt wurden. Innerhalb dieses Zeitintervalls sind die Lösungen bei den gewählten pH-Bedingungen stabil (persönliche Mitteilung von Dr. U. Hofmann, Dr. Margarete Fischer-Bosch Institut)

5.7.5 Inkubationen, Enzymkinetik

5.7.5.1 Lösungen

- Verapamil:** Zur Herstellung einer 5mM Verapamil Stöcklösung wurden 23,07 mg Verapamil HCl (MW: 491,1) der Charge 53788 in 9,395 ml H₂O bidest. gelöst. Weitere Verapamil Lösungen von 2500 µM, 1000 µM, 500 µM, 250 µM, 100 µM, 50 µM, 25 µM und 10 µM wurden durch eine schrittweise Verdünnung der jeweils höher konzentrierten Lösung mit H₂O bidest. hergestellt.
- Diclofenac:** Zur Herstellung einer 5 mM Diclofenac Stöcklösung wurden 5,6 mg Diclofenac Na (MW: 318,1) der Charge 84H0594 in 17,604 ml H₂O bidest. gelöst. Weitere Diclofenac Lösungen von 500 µM, 100 µM, 50 µM, 25 µM, 10 µM und 5 µM wurden durch eine schrittweise Verdünnung der jeweils höher konzentrierten Lösung mit H₂O bidest. hergestellt.
- Morphin:** Eine 200 mM Morphin Stöcklösung wurde durch Lösen von 136,7 mg Morphin HCl (MW: 375,8) der Charge in 1,818 ml H₂O bidest. und Erwärmen auf 37° C hergestellt. Aus dieser Stammlösung wurden weitere Morphin Lösungen von 100 mM, 50 mM, 50 µM, 30 mM, 20 mM, 15 mM, 10 mM, 8 mM und 6 mM wurden durch eine schrittweise Verdünnung der jeweils höher konzentrierten Lösung mit H₂O bidest. hergestellt. Eine zweite Stammlösung von 1 mM Morphin (4,4 mg gelöst in 11,706 mg H₂O bidest.) diente zur analogen Herstellung weiter Morphin Lösungen mit einer Konzentration von 500 µM, 125 µM, 100 µM, 75 µM, 50 µM, 25 µM, 10 µM und 5 µM.
- NADPH:** Reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat (NADPH) wurde als Stammlösung in einer Konzentration von 48 mM hergestellt. Dazu wurden 1420 mg (MW: 833,4) in 35,5 ml H₂O bidest. gelöst und in 250 µl Aliquots bei -20° C gelagert.
- UDPGA:** Uridin-5'-diphosphoglucuronosylsäure (UDPGA) wurde als Stammlösung in einer Konzentration von 100 mM hergestellt. Dazu wurden 432,4 mg UDPGA Na₃ (MW: 646,2) in 6,69 ml H₂O bidest. gelöst und in 250 µl Aliquots bei -20° C gelagert.
- Alamethicin:** Zur Herstellung einer Alamethicin Stammlösung von 50µg/µl, wurden 10 mg Alamethicin in 200µl Ethanol abs. gelöst. Alle Lösungen wurden bei 4° C gelagert.

- Codein: Eine 100 mM Stammlösung Codein wurde durch Lösen von 7,94 mg Codein (MW: 299,4) in H₂O bidest. hergestellt. Weitere Verdünnungen waren: 50 mM, 10 mM, 5 mM und 1 mM.
- D-620: Zur Herstellung einer 100 µM D-620 Stammlösung, wurden 15,6 ml einer 1 mg/ml Lösung D-620 HCl ad 500 µl H₂O bidest. gelöst. Weitere Verdünnungen waren: 50 µM, 5 µM und 1 µM.
- Dextromethorphan: Eine 10 mM Stammlösung Dextromethorphan wurde durch Lösen von 12,97 mg Dextromethorphan HBr (MW: 352,3) in 3,68 ml H₂O bidest. hergestellt. Weitere Verdünnungen waren: 5 mM, 1 mM 0,5 mM, 50 µM und 5 µM.
- Dextrorphan: Zur Herstellung einer 10 mM Dextrorphan Stammlösung, wurden 9,81 mg Dextrorphan tartrat (MW: 407,5) in 2,41 ml H₂O bidest. gelöst. Weitere Verdünnungen waren: 5 mM, 1 mM 0,5 mM, 50 µM und 5 µM.
- Gabapentin: Zur Herstellung einer 100 mM Gabapentin Stammlösung, wurden 2,44 mg Gabapentin (MW: 171,24) in 142 µl H₂O bidest. gelöst. Weitere Verdünnungen waren: 10 mM, 1 mM, 100 µM und 10 µM.
- Ketoconazol: Eine 100 µM Stammlösung Ketoconazol wurde durch Lösen von 1,16 mg Ketoconazol (MW: 531) in Methanol hergestellt. Weitere Verdünnung: 10 µM.
- KH₂PO₄: 0,5 M: 1,7 g KH₂PO₄ (MW: 136,1) wurden in 25 ml H₂O bidest. gelöst und mit 19,55 ml 0,5 M NaOH (MW: 40,0) versetzt. Mittels H₃PO₄ wird pH 7,4 eingestellt. 500 µl Aliquots wurden bei 4° C gelagert.
- Magnesiumchlorid: 300 mM: 609,9 mg MgCl₂ (MW: 203,3) wurden in 10 ml H₂O bidest. gelöst. 50 mM: 101,7 mg MgCl₂ wurden in 10 ml H₂O bidest. gelöst. 33 mM: 167,7 mg MgCl₂ wurden in 25 ml H₂O bidest. gelöst. 500 µl Aliquots wurden bei 4° C gelagert.
- Naringenin: Eine 50 mM Stammlösung Naringenin wurde durch Lösen von 2,19 mg ± Naringenin (MW: 272,3) in Ethanol abs. hergestellt. Weitere Verdünnungen waren: 12,5 mM, 5 mM, 2,5 mM, 1,25 mM, 0,5 mM und 50 µM.
- Naphthol: Zur Herstellung einer 50 mM Naphthol Stammlösung, wurden 4,04 mg 1-Naphthol (MW: 144,17) in 560 µl Ethanol abs. gelöst. Weitere Verdünnungen waren: 50 mM, 25 mM, 10 mM, 5 mM und 1 mM.

- Norverapamil: Zur Herstellung einer 100 μM Norverapamil Stammlösung, wurden 23,9 ml einer 1 mg/ml Lösung Norverapamil HCl ad 500 μl H_2O bidest. gelöst. Weitere Verdünnungen waren: 50 μM , 5 μM und 1 μM .
- Propafenon: Eine 10 mM Stammlösung Propafenon wurde durch Lösen von 7,15 mg R/S Propafenon (MW: 378,0) in 1,89 ml H_2O bidest. hergestellt. Weitere Verdünnungen waren: 5 mM, 1 mM, 0,5 mM, 0,1 mM, und 10 μM .
- Sulfaphenazol: Eine 500 μM Stammlösung Sulfaphenazol wurde durch Lösen von 4,76 mg Sulfaphenazol (MW: 314,4) in DMSO hergestellt. Weitere Verdünnung: 100 μM .
- Taxol: Eine 7 mM Stammlösung Ketoconazol wurde durch Lösen von 6 mg Taxol (MW: 853,9) in H_2O bidest. hergestellt. Weitere Verdünnungen: 1 mM und 0,1 mM.
- Testosteron: Zur Herstellung einer 50 mM Testosteron Stammlösung, wurden 4,17 mg 1-Testosteronacetat (MW: 330,5) in 252 μl Ethanol abs. gelöst. Weitere Verdünnungen waren: 10 mM, 2,5 mM, 1 mM, 0,5 mM und 0,1 mM.
- Tris
1 M: 3,02 g Tris-Base (MW: 121,1) wurden in 25 ml H_2O bidest. gelöst.
0,5 M: 1,51 g Tris wurden in 25 ml H_2O bidest. gelöst. 500 μl Aliquots wurden bei 4° C gelagert

Alle in H_2O bidest. gelösten Substanzen sind 10-fach konzentriert hergestellt. Die Verdünnung erfolgt, indem 1/10 des Inkubationsvolumens verwendet werden. Alle in organischen Lösungsmitteln gelösten Substanzen sind 100-fach konzentriert, um den Anteil organischen Lösungsmittel < 1% zu halten, da sonst Lösungsmittelleffekte zu erwarten sind (Busby et al. 1999; Palamanda et al. 2000; Coller et al. 1999).

5.7.5.2 Verapamil Inkubationen

Zur Messung der CYP2C8 und CYP3A4 Enzymaktivität wurden die enzymkinetischen Parameter K_m und V_{max} der Bildung von D-617, D-702, D-703 und Norverapamil aus Verapamil in Enterozyten- und Leberhomogenaten bestimmt.

In auf Eis stehenden 2 ml Eppendorf-Gefäßen wurde Verapamil verschiedener Konzentrationen mit Inkubationslösung (50 mM Kaliumhydrogenphosphatpuffer, pH 7,4, 30 mM $MgCl_2$, 100 μg Protein) ad 225 μl aufgefüllt. Nach 2 minütiger Vorinkubation bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 25 μl 48 mM NADPH gestartet. Nach Ablauf der Inkubationszeit von 10 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 1,7 ml eisgekühltem Ethanol abs. abgestoppt, und die Inkubationsgefäße auf Eis gelagert. Verapamil wurde dabei in sechs verschiedenen Konzentrationen (500, 250, 100, 50, 25, 5 μM) eingesetzt.

5.7.5.3 Verapamil Inkubationen mit spezifischen Inhibitoren

Kompetitive Inhibitoren:

In auf Eis stehenden 2 ml Eppendorf-Gefäßen wurden Sulfaphenazol (1 und 5 μM), Ketoconazol (0,1 und 1 μM) und Taxol (10 und 100 μM) mit Inkubationslösung (250 μM Verapamil, 50 mM Trispuffer, pH 7,4, 30 mM $MgCl_2$, 100 μg Protein aus Leberhomogenat) ad 225 μl aufgefüllt. Nach 2 minütiger Vorinkubation bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 25 μl 48 mM NADPH gestartet. Nach Ablauf der Inkubationszeit von 10 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 1,7 ml eisgekühltem Ethanol abs. abgestoppt, und die Inkubationsgefäße auf Eis gelagert.

5.7.5.4 Verapamil Inkubationen mit in SF9-Zellen rekombinant exprimierten Cytochrom P450 Enzymen

Der Beitrag der einzelnen am Metabolismus von Verapamil beteiligten CYP P450 Isoenzyme zur gesamten intrinsischen Clearance (CL_{int}) wurde durch Bestimmung ihrer enzymkinetischen Parameter K_m und V_{max} ermittelt. Für diese Versuche wurden mikrosomale Fraktionen von SF9-Zellen, die mit cDNAs der jeweiligen Cytochrom P450 Isoformen und NADPH-Reduktase transfiziert worden sind, verwendet.

In auf Eis stehenden 2 ml Eppendorf-Gefäßen wurde Verapamil verschiedener Konzentrationen mit Inkubationslösung (50 mM Trispuffer, pH 7,4, 30 mM $MgCl_2$, 25 pmol Cytochrom P450 Isoenzym) ad 225 μl aufgefüllt. Nach 2 minütiger Vorinkubation bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 25 μl 48 mM NADPH gestartet. Die Inkubationszeiten wurden in Anlehnung an Angaben aus den Datenblättern (Gentest, Frankfurt a.M.) gewählt: 10 Minuten für CYP3A4, CYP3A4+b5 und 15 Minuten für CYP1A1, CYP1A2, CYP2C8, CYP2C9*1, CYP2C18, CYP2C19. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 1,7 ml eisgekühltem Ethanol abs. abgestoppt und die Inkubationsgefäße auf Eis gelagert. Verapamil wurde dabei in sieben verschiedenen Konzentrationen (250, 100, 50, 25, 10, 2,5, 1 μM) eingesetzt.

5.7.5.5 Upscaling der mit rekombinant exprimierten Cytochrom P450 Enzymen ermittelten intrinsischen Clearance

Die mit rekombinant exprimierten CYP Isoenzymen ermittelte intrinsische Clearance von D-617, D-703, D-702 und Norverapamil [nl/ pmol Enzym/ min] wurde mithilfe der hepatischen CYP1A (Shimada et al. 1994), CYP2C und CYP3A-Proteingehalte (2.4.2 ff.) auf die intrinsische Clearance pro Gramm Feuchtgewicht Leber extrapoliert. Dabei wurde zugrunde gelegt, daß aus einem Gramm Leber 157,2 mg Proteinhomogenat (vgl. 2.2) bzw. 52,5 mg mikrosomales Protein (Iwatsubo et al. 1997) gewonnen werden.

5.7.5.6 Diclofenac Inkubationen

Zur Messung der CYP2C9 Enzymaktivität wurden die enzymkinetischen Parameter K_m und V_{max} der Bildung von 4'-OH-Diclofenac aus Diclofenac in Enterozyten- und Leberhomogenaten bestimmt.

In auf Eis stehenden 2 ml Eppendorf-Gefäßen wurde Diclofenac verschiedener Konzentrationen mit Inkubationslösung (50 mM Trispuffer, pH 7,4, 3,3 mM $MgCl_2$, 25 µg Protein) ad 225 µl aufgefüllt. Nach 2 minütiger Vorinkubation bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 25 µl 48 mM NADPH gestartet. Nach Ablauf der Inkubationszeit von 20 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 1,7 ml eisgekühltem Ethanol abs. abgestoppt, und die Inkubationsgefäße auf Eis gelagert. Diclofenac wurde dabei in sechs verschiedenen Konzentrationen (100, 50, 10, 5, 2,5, 1, 0,5 µM) eingesetzt.

5.7.5.7 Morphin Inkubationen

Die Messung der Morphin-3- und Morphin-6-glucuronidierung in Enterozyten und Leberhomogenat wurde mit einer Morphinkonzentration von 20 mM durchgeführt. Dazu wurden in auf Eis stehenden 2 ml Eppendorf-Gefäßen 225 µl Inkubationspuffer (20 mM Morphin, 100 mM Trispuffer, pH 7,4, 5 mM $MgCl_2$, AlamethicinStammlösung 0,1 mg/ 1 mg Protein, 50 µg Protein) gegeben. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 25 µl 100 mM UDPGA gestartet. Nach Ablauf der Inkubationszeit von 60 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 1,7 ml eisgekühltem Ethanol abs. abgestoppt, und die Inkubationsgefäße auf Eis gelagert. Alle Inkubationen wurden als Doppelbestimmung durchgeführt.

5.7.5.8 Morphin Inkubationen mit Inhibitoren

Der Einfluß von Codein, Dextromethorphan, Dextroprophan, Diclofenac, Gabapentin, Naltrexon, Naphthol, Naringenin, Propafenon und Testosteron auf die Morphin-3- und Morphin-6-glucuronidierung wurde bei einer Morphin Konzentrationen von 10 mM untersucht. Da keine Informationen über die Art einer möglichen Inhibition verfügbar waren, wurden genannte Substanzen wie kompetitive Inhibitoren behandelt. Dazu wurden in auf Eis stehenden 2 ml Eppendorf-Gefäßen die o.a. Substanzen in verschiedenen Konzentrationen mit Inkubationslösung (10 mM Morphin, 100 mM Trispuffer, pH 7,4, 5 mM $MgCl_2$, 50 µg Protein aus Leberhomogenat) ad 225 µl aufgefüllt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 25 µl 100 mM UDPGA gestartet. Nach Ablauf der Inkubationszeit von 60 Minuten wurde die

Reaktion durch Zugabe von 1,7 ml eisgekühltem Ethanol abs. abgestoppt, und die Inkubationsgefäße auf Eis gelagert. Alle Inkubationen wurden doppelt durchgeführt.

Für Naringenin, Diclofenac und Dextromethorphan wurden K_i Werte bestimmt. Dazu wurden wie o.a. Inhibitionsexperimente bei vier verschiedenen Morphinkonzentrationen (1 mM, 500 μ M, 100 μ M, 10 μ M) durchgeführt. Naringenin, Diclofenac und Dextromethorphan wurden dabei 500, 50, 5 und 0.5 μ M eingesetzt.

Zu jeder Inkubationsreihe wurden Inkubationslösung ohne Protein und Substrat zur Überprüfung von Verunreinigungen mit Substrat und Metaboliten mitgeführt. Zusätzlich wurden Inkubationen mit denaturiertem Protein (Schweineenterozytenhomogenat) und ohne Protein durchgeführt um eine nicht enzymvermittelte Metabolitenbildung zu korrigieren.

5.7.5.9 Einfluß von Proteaseinhibitoren und Hyaluronidase auf Enzymaktivitäten

Eine mögliche Beeinflussung der Verapamil-, Diclofenac-Oxidation und der Morph-3/6-glucuronidierung durch im Proteinlagerungspuffer enthaltene Proteasehemmer, und bei der Enterozytenisolierung eingesetzte Hyaluronidase, wurde analog 5.7.5.3 und 5.7.5.8 durchgeführt. Ein Gemisch humaner Lebermikrosomen (Kieler Lebern KL8, KL12, KL24 1:1:2) in 100 mM Tris-Puffer, pH 7,4 wurden unter V_{max} Bedingungen mit 1 mM Pefa-Bloc, 1 mM EDTA, 1 μ g/ml Pepstatin, 1 μ g/ml Leupeptin, 2 I.E. Hyaluronidase und einem Gemisch aller Proteaseinhibitoren ohne Hyaluronidase in o.a. Konzentrationen inkubiert. Als Kontrollen wurden Lebermikrosomen ohne Proteaseinhibitoren und in 1% (v/v) Methanol inkubiert. Die Kontrollinkubationen in Methanol waren nötig, um Lösungsmittelleffekte für in Methanol gelöstes Pepstatin auszugleichen. Alle Inkubationen wurden doppelt durchgeführt und die Abweichung in % vom jeweiligen Kontrollwert berechnet. Die Inkubationsbedingungen waren wie folgt:

Verapamil (250 μ M):	50 μ g Lebermikrosomen, 5 Minuten Vorinkubation, 5 Minuten Inkubationsdauer
Diclofenac (100 μ M):	10 μ g Lebermikrosomen, 10 Minuten Vorinkubation, 10 Minuten Inkubationsdauer
Morphin (10 mM):	Alamethicin (0,1 mg/mg Protein) 20 μ g Lebermikrosomen, 15 Minuten Vorinkubation, 15 Minuten Inkubationsdauer

5.7.5.10 Berechnungen

Die Michaelis Konstante (K_m) und die maximale Umsatzgeschwindigkeit (V_{max}) von D-617, D-702, D-703, Norverapamil und 4'-OH-Diclofenac wurden mithilfe der Gleichung einer monophasischen Michaelis-Menten Kinetik berechnet. v ist in dieser Gleichung die Bildungsrate und $[S]$ die Substratkonzentration. Die Michaelis Konstante stellt die Dissoziationskonstante des Enzym-Substrat Komplexes.

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

Die intrinsische Clearance eines Enzyms (Cl_{int}) ergibt sich aus K_m und V_{\max} nach folgender Gleichung:

$$Cl_{\text{int}} = \frac{V_{\max}}{K_m}$$

Die Inhibitorkonstanten (K_i) von Dextromethorphan, Diclofenac, 1-Naphthol, Naringenin, Propafenon und Testosteron wurden nach folgenden Modellen berechnet:

- Kompetitive Inhibition:

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S]}$$

Wobei [I] für die Inhibitorkonzentration und K_i für die Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor Komplexes (Inhibitorkonstante) steht.

- Nichtkompetitive Inhibition:

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \cdot (K_m + [S])}$$

Die mathematische Angleichungen der ungewichteten, untransformierten Bildungsraten [pmol/mg Protein/min] wurden mit zwei Programmen (Excel 7.0, Microsoft, München und Grafit 4.06, Erithacus Software, Middlesex, Großbritannien) berechnet. Die verschiedenen mathematischen Angleichungen wurden graphisch und über die Summe der gewichteten ($1/x$) Fehlerquadrate (Excel) oder mittels Chi²-Test (Grafit) bewertet.

5.8 Untersuchungen zum gerichteten Transport von Verapamil und seiner Metabolite an Zellmonolayern

5.8.1 Kultivierung von Caco-2, L-MDR1 und LLC-PK1 Zelllinien

Bei -80°C in Einfriermedium (Kulturmedium 40%, DMSO 20%, FCS 40%) gelagerte Zellen wurden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und in eine 50 cm^2 Zellkulturflasche mit dem entsprechenden Kulturmedium (vgl. 5.2) überführt. Zum „Anwachsen“ der Zellen wurden die Kulturmedien mit zusätzlichen 10-20% FCS supplementiert und bei 37°C , 99% rel. Luftfeuchte und 5% CO_2 im Brutschrank kultiviert. Nach dem Anwachsen der Zellen wurden diese passagiert und in 150 cm^2 Zellkulturflaschen überführt und dort weiter kultiviert. Die Zellen wurden alle drei Tage passagiert. Alle Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Zellzahlen wurden mit einem Zählgerät (Casy1 TT, Schärfe Systems) bestimmt.

5.8.2 Messung von gerichtetem Transport an Zellmonolayern

Von Caco-2 (4×10^5 Zellen/ml), L-MDR1 und LLC-PK1 (8×10^5 Zellen/ml) Zellensuspensionen wurden jeweils 1 ml in Transwell-Clear Platten ($0,4\ \mu\text{M}$ Porengröße, 12 mm Durchmesser/ Well, 12 Wells/ Platte; Costar, Bodenheim) auf die obere Seite des Filters ausgesät und in jedes Well eingesetzt. In den unteren Teil der Transwell Platten wurden 1,5 ml/Well des entsprechenden Kulturmediums gegeben und sieben Tage bei 37°C , 99% rel. Luftfeuchte und 5% CO_2 im Brutschrank kultiviert. Die auf den Filtern ausgesäten Zellen wachsen zu Zellmonolayern heran, die eine Kompartimentierung der Wells in ein apikales (oberes) und ein basales (unteres) Kompartiment bewirken. Die Zellen wurden alle drei Tage mit frischem Zellkulturmedium versorgt. Dabei wurden apikal $500\ \mu\text{l}$ der entsprechenden Zellsuspension und basal 1,5 ml des jeweiligen Kulturmediums ersetzt. Am achten Tag wurde die Konfluenz der Zellen lichtmikroskopisch überprüft, das Kulturmedium abgesaugt und die entstandenen Zellmonolayer mit Opti-MEM ($100\ \mu\text{l}$ apikal, $1000\ \mu\text{l}$ basal; Gibco BRL, Karlsruhe) gewaschen. Die Dichtigkeit der Zellmonolayer wurde durch Messung des elektrischen Widerstandes (Millicell-ERS, Millipore, Eschborn) überprüft. Die Zellmonolayer wurden als dicht angesehen wenn:

$$R_{\text{Monolayer}} - R_{\text{Blankfilter}} > 200\ \Omega$$

Die Integrität der Zellmonolayer wurde des weiteren durch die Messung der transepithelialen Durchlässigkeit von ^3H -Inulin, nach apikaler Applikation in je zwei Wells/Platte überprüft. Die Zellmonolayer wurden als dicht angesehen, wenn weniger als 5% der apikal applizierten radiaktiven Inulin-Dosis nach 4 Stunden im basalen Kompartiment wiedergefunden wurden.

Für Transportexperimente wurden D-620, D-617, D-703 (5 μM in Opti-MEM), Norverapamil und Verapamil (0,5 und 5 μM in Opti-MEM) gelöst. Zur Untersuchung der apikal nach basalen Permeabilität wurden in das apikale Kompartiment 800 μl dieser Lösungen gegeben während basal 800 μl Opti-MEM appliziert wurden. Nach 1, 2, 3 und 4 Stunden wurden 50 μl Aliquots aus dem basalen Kompartiment entnommen und durch die gleiche Menge Opti-MEM ersetzt. In diesen Proben wurden die Mengen Substanz prozentual zur apikal aufgegebenen Menge bestimmt (vgl. 5.7.1.3). Für jede Substanz wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt. Zur Untersuchung des basal nach apikalen Permeabilität wurden die Experimente in umgekehrter Ausrichtung durchgeführt.

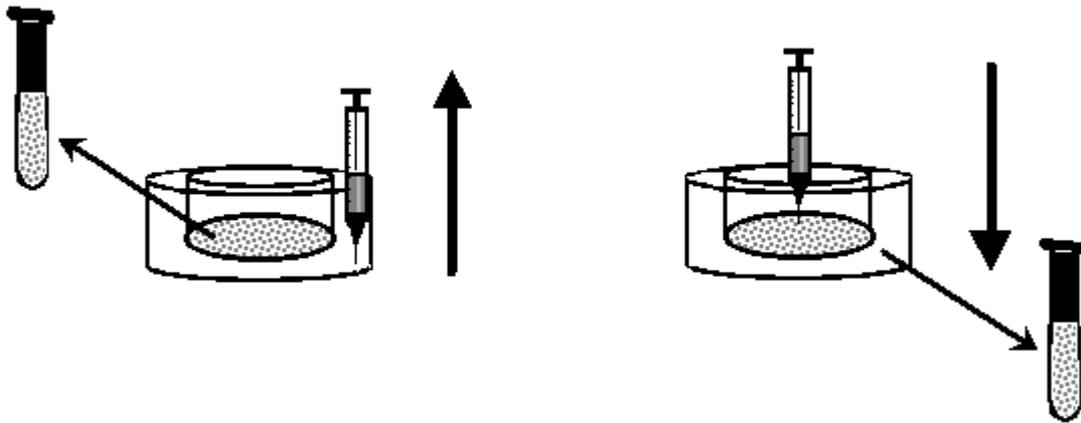


Abbildung 46: Durchführung der Transportexperimente. (A) Transport von basalen ins apikale Kompartiment: basale Applikation von 5 μM D-620, D-617, D-703, Norverapamil und Verapamil – apikale Probenentnahme (50 μl) nach 1,2,3,4 Stunden. (B): Transport vom apikalen ins basale Kompartiment: apikale Applikation o.a. Substanzen – basale Probenentnahme (50 μl) nach 1,2,3,4 Stunden.

Als Referenzsubstanz für durch P-Glykoprotein vermittelten Transport wurde ^3H markiertes Digoxin (5 μM) apikal und basal auf jeder Platte mitgeführt (Fromm et al. 1999).

5.9 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit GraphPadInStat (Version 3.0, GraphPad Software, San Diego, USA).

Zur Beschreibung von Stichproben wurde der arithmetische Mittelwert \pm Standardabweichung (MW \pm STABW) und/oder die relative Standardabweichung berechnet. Die relative Standardabweichung wurde als Variationskoeffizient [VK = (STABW/MW * 100%)] angegeben.

Die Prüfung einer Stichprobe ($n > 12$) auf Normalverteilung erfolgte nach Kolmogorov und Smirnov. Die Datensätze wurden als normalverteilt angesehen, wenn der P-Wert nach Dallal und Wilkinson $> 0,1$ war (10%-Niveau). Mit diesem Vortest wurde entschieden, ob bei

weiterführenden statistischen Betrachtungen parameterfreie oder parametrische Verfahren eingesetzt wurden. Bei den analysierten Daten aus Enterozyten und Lebern handelt es sich um zwei voneinander abhängige Stichproben, da Enterozyten und Lebern vom gleichen Patienten stammen. Dementsprechend wurden Mittelwertvergleiche für diese Daten mit dem gepaarten t-Test (Student) oder dem Wilcoxon-Test durchgeführt. Mittelwerte wurden als signifikant unterschiedlich bezeichnet, wenn die Nullhypothese mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% abgelehnt wurde ($P < 0.05$).

Zur Beschreibung von Zusammenhängen zwischen zwei Größen wurde die Korrelations-/Regressionsanalyse nach Pearson eingesetzt. Als Masszahl für die Stärke und Richtung einer linearen Beziehung wurde der Korrelationskoeffizient r^2 angegeben. Die Regressionsgleichungen wurden in der allgemeinen Form $y = mx + b$ berechnet (m entspricht dem Anstieg der Geraden, b ist der Schnittpunkt der Geraden mit der y-Achse).

6 Abkürzungsverzeichnis

ABC-Transporter	ATP-binding cassette Transporter
ACN	Acetonitril
BSA	Rinderserumalbumin
Cl _{int}	intrinsische Clearance
Cl _{met}	Metabolische Clearance
Cl _{D-617}	Clearance von Verapamil zu D-617
Cl _{Norverapamil}	Clearance von Verapamil zu Norverapamil
Cl _{D-703}	Clearance von Verapamil zu D-703
Cl _{D-702}	Clearance von Verapamil zu D-702
Cl _{4'-OH-D}	Clearance von Diclofenac zu 4'-OH-Diclofenac
CYP	Cytochrom P450
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESI	Elektronensprühionisation (electronic spray ionization)
HEPES	Hydroxyethylpiperazinethanolsulfonsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
K _m	Michaelis-Konstante
LC-MS	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit gekoppelter massenselektiver Detektion
LAU	(Light Abundance Unit: Maßeinheit für mittels Chemilumineszenzimager ausgewertete Proteinsignale)
KL	Kieler Leber
M3G	Morphin-3-glucuronid
M6G	Morphin-6-glucuronid
MDR1	Multidrug Resistance Gen 1
MSD	Massenselektiver Detektor
MW	Mittelwert
NADPH	reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat
OD	Optische Dichte (Meßeinheit für mittels Röntgenfilm ausgewerteten Proteinsignale)
PAA	Polyacrylamid
P-gp	P-Glykoprotein, das Genprodukt von MDR1
POD	Meerettich Peroxidase
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonucleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
SNP	Single nucleotide polymorphism
TE	Tris/ EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
Tween	Polyoxyethylen-Sorbitanfettsäureester 20
UDP	Uridin-5'-diphosphat
UDPGA	Uridin-5'-diphosphoglucuronosylsäure
UGT	UDP-Glucuronosyltransferase
V _{max}	Maximalgeschwindigkeit einer enzymatischen Reaktion

7 Literaturverzeichnis

- Ameer B und Weintraub RA. Drug interactions with grapefruit juice. **Clin Pharmacokinet**; 33/2 (1997): 103-21.
- Ausubel F, Brent R, Kingston R, Moore D, Seidman J, Smith J und Struhl K, Current protocols in molecular biology. In: C. VB (Ed.), Analysis of Proteins, Vol. 2, John Wiley & Sons, Inc., New York, (1998).
- Back DJ und Rogers SM. Review: first-pass metabolism by the gastrointestinal mucosa. **Aliment Pharmacol Ther**; 1/5 (1987): 339-57.
- Baldwin SJ, Bloomer JC, Smith GJ, Ayrton AD, Clarke SE und Chenery RJ. Ketoconazole and sulphaphenazole as the respective selective inhibitors of P4503A and 2C9. **Xenobiotica**; 25/3 (1995): 261-70.
- Benet LZ, Izumi T, Zhang Y, Silverman JA und Wacher VJ. Intestinal MDR transport proteins and P-450 enzymes as barriers to oral drug delivery [In Process Citation]. **J Controlled Release**; 62/1-2 (1999): 25-31.
- Bertilsson G, Heidrich J, Svensson K, Asman M, Jendeberg L, Sydow-Backman M, Ohlsson R, Postlind H, Blomquist P und Berkenstam A. Identification of a human nuclear receptor defines a new signaling pathway for CYP3A induction. **Proc Natl Acad Sci U S A**; 95/21 (1998): 12208-13.
- BioRad, Increase recovery of blotted proteins with PVDF membrane, Vol. 1998, BioRad Laboratories, 1997.
- Bock KW, Eckle T, Ouzzine M und Fournel-Gigleux S. Coordinate induction by antioxidants of UDP-glucuronosyltransferase UGT1A6 and the apical conjugate export pump MRP2 (multidrug resistance protein 2) in Caco-2 cells. **Biochem Pharmacol**; 59/5 (2000): 467-70.
- Bodenham A, Quinn K und Park GR. Extrahepatic morphine metabolism in man during the anhepatic phase of orthotopic liver transplantation. **Br J Anaesth**; 63/4 (1989): 380-4.
- Borm PJ, Koster AS, Frankhuijzen-Sierevogel A und Noordhoek J. Comparison of two cell isolation procedures to study in vitro intestinal wall biotransformation in control and 3-methyl-cholanthrene pretreated rats. **Cell Biochem Funct**; 1/3 (1983): 161-7.

- Bort R, Mace K, Boobis A, Gomez-Lechon MJ, Pfeifer A und Castell J. Hepatic metabolism of diclofenac: role of human CYP in the minor oxidative pathways. **Biochem Pharmacol**; 58/5 (1999): 787-96.
- Bourrie M, Meunier V, Berger Y und Fabre G. Cytochrome P450 isoform inhibitors as a tool for the investigation of metabolic reactions catalyzed by human liver microsomes. **J Pharmacol Exp Ther**; 277/1 (1996): 321-32.
- Buchthal J, Grund KE, Buchmann A, Schrenk D, Beaune P und Bock KW. Induction of cytochrome P4501A by smoking or omeprazole in comparison with UDP-glucuronosyltransferase in biopsies of human duodenal mucosa. **Eur J Clin Pharmacol**; 47/5 (1995): 431-5.
- Busby WF, Jr., Ackermann JM und Crespi CL. Effect of methanol, ethanol, dimethyl sulfoxide, and acetonitrile on in vitro activities of cDNA-expressed human cytochromes P-450. **Drug Metab Dispos**; 27/2 (1999): 246-9.
- Busse D, Cosme J, Beaune P, Kroemer HK und Eichelbaum M. Cytochromes of the P450 2C subfamily are the major enzymes involved in the O-demethylation of verapamil in humans. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**; 353/1 (1995): 116-21.
- Chen CJ, Chin JE, Ueda K, Clark DP, Pastan I, Gottesman MM und Roninson IB. Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. **Cell**; 47/3 (1986): 381-9.
- Cheng Z, Radominska-Pandya A und Tephly TR. Studies on the substrate specificity of human intestinal UDP-glucuronosyltransferases 1A8 and 1A10. **Drug Metab Dispos**; 27/10 (1999): 1165-70.
- Chiba M, Hensleigh M und Lin JH. Hepatic and intestinal metabolism of indinavir, an HIV protease inhibitor, in rat and human microsomes. Major role of CYP3A. **Biochem Pharmacol**; 53/8 (1997): 1187-95.
- Chu TM, Kawinski E und Lin TH. Characterization of a new monoclonal antibody F4 detecting cell surface epitope and P-glycoprotein in drug-resistant human tumor cell lines [published erratum appears in *Hybridoma* 1993 Dec;12(6):771]. **Hybridoma**; 12/4 (1993): 417-29.
- Coffman BL, King CD, Rios GR und Tephly TR. The glucuronidation of opioids, other xenobiotics, and androgens by human UGT2B7Y(268) and UGT2B7H(268). **Drug Metab Dispos**; 26/1 (1998): 73-7.
- Coffman BL, Rios GR, King CD und Tephly TR. Human UGT2B7 catalyzes morphine glucuronidation. **Drug Metab Dispos**; 25/1 (1997): 1-4.

- Coller JK, Somogyi AA und Bochner F. Flunitrazepam oxidative metabolism in human liver microsomes: involvement of CYP2C19 and CYP3A4. **Xenobiotica**; 29/10 (1999): 973-86.
- Conzelmann E und Sandhoff K. Glycolipid and glycoprotein degradation. **Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol**; 60 (1987): 89-216.
- Cordon-Cardo C, O'Brien JP, Boccia J, Casals D, Bertino JR und Melamed MR. Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human normal and tumor tissues. **J Histochem Cytochem**; 38/9 (1990): 1277-87.
- de Waziers I, Cugnenc PH, Yang CS, Leroux JP und Beaune PH. Cytochrome P 450 isoenzymes, epoxide hydrolase and glutathione transferases in rat and human hepatic and extrahepatic tissues. **J Pharmacol Exp Ther**; 253/1 (1990): 387-94.
- Degen PH, Dieterle W, Schneider W, Theobald W und Sinterhauf U. Pharmacokinetics of diclofenac and five metabolites after single doses in healthy volunteers and after repeated doses in patients. **Xenobiotica**; 18/12 (1988): 1449-55.
- Döppenschmitt S, Langguth P, REGARDH CG, Andersson TB, Hilgendorf C und Spahn-Langguth H. Characterization of binding properties to human P-glycoprotein: development of a [3H]verapamil radioligand-binding assay. **J Pharmacol Exp Ther**; 288/1 (1999): 348-57.
- Eagling VA, Tjia JF und Back DJ. Differential selectivity of cytochrome P450 inhibitors against probe substrates in human and rat liver microsomes. **Br J Clin Pharmacol**; 45/2 (1998): 107-14.
- Easterling KW und Holtzman SG. Comparison of the discriminative and antinociceptive effects of morphine and its glucuronide metabolites after central or systemic administration in the rat. **Psychopharmacology (Berl)**; 140/1 (1998): 91-7.
- Eichelbaum M, Somogyi A, von Unruh GE und Dengler HJ. Simultaneous determination of the intravenous and oral pharmacokinetic parameters of D,L-verapamil using stable isotope-labelled verapamil. **Eur J Clin Pharmacol**; 19/2 (1981): 133-7.
- Evert B, Eichelbaum M, Haubruck H und Zanger UM. Functional properties of CYP2D6 1 (wild-type) and CYP2D6 7 (His324Pro) expressed by recombinant baculovirus in insect cells. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**; 355/3 (1997): 309-18.
- Fasco MJ, Silkworth JB, Dunbar DA und Kaminsky LS. Rat small intestinal cytochromes P450 probed by warfarin metabolism. **Mol Pharmacol**; 43/2 (1993): 226-33.

- Faura CC, Collins SL, Moore RA und McQuay HJ. Systematic review of factors affecting the ratios of morphine and its major metabolites. **Pain**; 74/1 (1998): 43-53.
- Fisher MB, Campanale K, Ackermann BL, VandenBranden M und Wrighton SA. In Vitro Glucuronidation Using Human Liver Microsomes and The Pore-Forming Peptide Alamethicin. **Drug Metab Dispos**; 28/5 (2000): 560-566.
- Flockhart DA. Drug interactions and the cytochrome P450 system. The role of cytochrome P450 2C19. **Clin Pharmacokinet**; 29/Suppl 1 (1995): 45-52.
- Fontana RJ, Lown KS, Paine MF, Fortlage L, Santella RM, Felton JS, Knize MG, Greenberg A und Watkins PB. Effects of a chargrilled meat diet on expression of CYP3A, CYP1A, and P-glycoprotein levels in healthy volunteers. **Gastroenterology**; 117/1 (1999): 89-98.
- Fricker G, Drewe J, Huwylar J, Gutmann H und Beglinger C. Relevance of p-glycoprotein for the enteral absorption of cyclosporin A: in vitro-in vivo correlation. **Br J Pharmacol**; 118/7 (1996): 1841-7.
- Fritz P, Behrle E, Beaune P, Eichelbaum M und Kroemer HK. Differential expression of drug metabolizing enzymes in primary and secondary liver neoplasm: immunohistochemical characterization of cytochrome P4503A and glutathione-S-transferase. **Histochemistry**; 99/6 (1993): 443-51.
- Fritz P, Tuzcek HV, Offinger B, Schwarzmann P, Schieszl S, Wu X, Kleine B, Blodorn J und Multhaupt H. Immunohistochemical quantification of steroid receptors and other prognosis factors in human breast cancer patients. **Prog Histochem Cytochem**; 26/1-4 (1992): 146-58.
- Fromm MF, Botsch S, Heinkele G, Evers J und Kroemer HK. Influence of renal function on the steady-state pharmacokinetics of the antiarrhythmic propafenone and its phase I and phase II metabolites. **Eur J Clin Pharmacol**; 48/3-4 (1995): 279-83.
- Fromm MF, Busse D, Kroemer HK und Eichelbaum M. Differential induction of prehepatic and hepatic metabolism of verapamil by rifampin. **Hepatology**; 24/4 (1996): 796-801.
- Fromm MF, Dilger K, Busse D, Kroemer HK, Eichelbaum M und Klotz U. Gut wall metabolism of verapamil in older people: effects of rifampicin-mediated enzyme induction. **Br J Clin Pharmacol**; 45/3 (1998): 247-55.
- Fromm MF, Kim RB, Stein CM, Wilkinson GR und Roden DM. Inhibition of P-glycoprotein-mediated drug transport: A unifying mechanism to explain the interaction between digoxin and quinidine [see comments]. **Circulation**; 99/4 (1999): 552-7.

- Fuhr U und Kummert AL. The fate of naringin in humans: a key to grapefruit juice-drug interactions? **Clin Pharmacol Ther**; 58/4 (1995): 365-73.
- Gan LS, Moseley MA, Khosla B, Augustijns PF, Bradshaw TP, Hendren RW und Thakker DR. CYP3A-like cytochrome P450-mediated metabolism and polarized efflux of cyclosporin A in Caco-2 cells. **Drug Metab Dispos**; 24/3 (1996): 344-9.
- Gibbs MA, Thummel KE, Shen DD und Kunze KL. Inhibition of cytochrome P-450 3A (CYP3A) in human intestinal and liver microsomes: comparison of K_i values and impact of CYP3A5 expression. **Drug Metab Dispos**; 27/2 (1999): 180-7.
- Gong QL, Hedner T, Hedner J, Bjorkman R und Nordberg G. Antinociceptive and ventilatory effects of the morphine metabolites: morphine-6-glucuronide and morphine-3-glucuronide. **Eur J Pharmacol**; 193/1 (1991): 47-56.
- Goodwin B, Hodgson E und Liddle C. The orphan human pregnane X receptor mediates the transcriptional activation of CYP3A4 by rifampicin through a distal enhancer module. **Mol Pharmacol**; 56/6 (1999): 1329-39.
- Grafström R, Moldeus P, Andersson B und Orrenius S. Xenobiotic metabolism by isolated rat small intestinal cells. **Med Biol**; 57/5 (1979): 287-93.
- Gramatté T und Oertel R. Intestinal secretion of intravenous talinolol is inhibited by luminal R- verapamil. **Clin Pharmacol Ther**; 66/3 (1999): 239-45.
- Gramatté T, Oertel R, Terhaag B und Kirch W. Direct demonstration of small intestinal secretion and site-dependent absorption of the beta-blocker talinolol in humans. **Clin Pharmacol Ther**; 59/5 (1996): 541-9.
- Green MD, King CD, Mojarrabi B, Mackenzie PI und Tephly TR. Glucuronidation of amines and other xenobiotics catalyzed by expressed human UDP-glucuronosyltransferase 1A3. **Drug Metab Dispos**; 26/6 (1998): 507-12.
- Greiner B, Eichelbaum M, Fritz P, Kreichgauer HP, von Richter O, Zundler J und Kroemer HK. The role of intestinal P-glycoprotein in the interaction of digoxin and rifampin. **J Clin Invest**; 104/2 (1999): 147-53.
- Guengerich FP. Role of cytochrome P450 enzymes in drug-drug interactions. **Adv Pharmacol**; 43 (1997): 7-35.
- Guengerich FP. Cytochrome P-450 3A4: regulation and role in drug metabolism. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**; 39 (1999): 1-17.

- Gutmann H, Fricker G, Torok M, Michael S, Beglinger C und Drewe J. Evidence for different ABC-transporters in Caco-2 cells modulating drug uptake. **Pharm Res**; 16/3 (1999): 402-7.
- Halliday AJ, Bartlett SE, Colditz P und Smith MT. Brain region-specific studies of the excitatory behavioral effects of morphine-3-glucuronide. **Life Sci**; 65/2 (1999): 225-36.
- Hartiala K. Metabolism of hormones, drugs and other substances by the gut. **Physiol Rev**; 53/2 (1973): 496-534.
- He K, Iyer KR, Hayes RN, Sinz MW, Woolf TF und Hollenberg PF. Inactivation of cytochrome P450 3A4 by bergamottin, a component of grapefruit juice. **Chem Res Toxicol**; 11/4 (1998): 252-9.
- Hebert MF, Roberts JP, Prueksaritanont T und Benet LZ. Bioavailability of cyclosporine with concomitant rifampin administration is markedly less than predicted by hepatic enzyme induction. **Clin Pharmacol Ther**; 52/5 (1992): 453-7.
- Herter CA und Wakeman AJ. The action of hepatic, renal and other cells on phenol and indol, under normal and pathological conditions. **J Exp Med**; 4 (1899): 307-26.
- Hirohashi T, Suzuki H, Chu XY, Tamai I, Tsuji A und Sugiyama Y. Function and expression of multidrug resistance-associated protein family in human colon adenocarcinoma cells (Caco-2). **J Pharmacol Exp Ther**; 292/1 (2000): 265-70.
- Hochman JH, Chiba M, Nishime J, Yamazaki M und Lin JH. Influence of P-glycoprotein on the transport and metabolism of indinavir in Caco-2 cells expressing cytochrome P-450 3A4. **J Pharmacol Exp Ther**; 292/1 (2000): 310-8.
- Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmoller J, Johne A, Cascorbi I, Gerloff T, Roots I, Eichelbaum M und Brinkmann U. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. **Proc Natl Acad Sci U S A**; 97/7 (2000): 3473-8.
- Hülsmann WC, van den Berg JWO und de Jonge HR. Isolation of intestinal mucosal cells. **Methods Enzymol.**; 32 (1973): 665-673.
- Ichikawa M, Yoshimura A, Furukawa T, Sumizawa T, Nakazima Y und Akiyama S. Glycosylation of P-glycoprotein in a multidrug-resistant KB cell line, and in the human tissues. **Biochim Biophys Acta**; 1073/2 (1991): 309-15.

- Iwatsubo T, Hirota N, Ooie T, Suzuki H, Shimada N, Chiba K, Ishizaki T, Green CE, Tyson CA und Sugiyama Y. Prediction of in vivo drug metabolism in the human liver from in vitro metabolism data. **Pharmacol Ther**; 73/2 (1997): 147-71.
- Jedlitschky G, Cassidy AJ, Sales M, Pratt N und Burchell B. Cloning and characterization of a novel human olfactory UDP- glucuronosyltransferase. **Biochem J**; 340/Pt 3 (1999): 837-43.
- Joly JG, Doyon C und Peasant Y. Cytochrome P-450 measurement in rat liver homogenate and microsomes. Its use for correction of microsomal losses incurred by differential centrifugation. **Drug Metab Dispos**; 3/6 (1975): 577-86.
- Jounaidi Y, Hyraille V, Gervot L und Maurel P. Detection of CYP3A5 allelic variant: a candidate for the polymorphic expression of the protein? **Biochem Biophys Res Commun**; 221/2 (1996): 466-70.
- Kaminsky LS und Fasco MJ. Small intestinal cytochromes P450. **Crit Rev Toxicol**; 21/6 (1991): 407-22.
- Kim RB, Fromm MF, Wandel C, Leake B, Wood AJ, Roden DM und Wilkinson GR. The drug transporter P-glycoprotein limits oral absorption and brain entry of HIV-1 protease inhibitors. **J Clin Invest**; 101/2 (1998): 289-94.
- Kim RB, Wandel C, Leake B, Cvetkovic M, Fromm MF, Dempsey PJ, Roden MM, Belas F, Chaudhary AK, Roden DM, Wood AJ und Wilkinson GR. Interrelationship between substrates and inhibitors of human CYP3A and P-glycoprotein. **Pharm Res**; 16/3 (1999): 408-14.
- Kirkwood LC, Nation RL und Somogyi AA. Glucuronidation of dihydrocodeine by human liver microsomes and the effect of inhibitors. **Clin Exp Pharmacol Physiol**; 25/3-4 (1998): 266-70.
- Kivistö KT, Bookjans G, Fromm MF, Griese EU, Munzel P und Kroemer HK. Expression of CYP3A4, CYP3A5 and CYP3A7 in human duodenal tissue. **Br J Clin Pharmacol**; 42/3 (1996): 387-9.
- Klose TS, Blaisdell JA und Goldstein JA. Gene structure of CYP2C8 and extrahepatic distribution of the human CYP2Cs. **J Biochem Mol Toxicol**; 13/6 (1999): 289-95.
- Kolars JC, Lown KS, Schmiedlin-Ren P, Ghosh M, Fang C, Wrighton SA, Merion RM und Watkins PB. CYP3A gene expression in human gut epithelium. **Pharmacogenetics**; 4/5 (1994): 247-59.

- Kolars JC, Schmiedlin-Ren P, Schuetz JD, Fang C und Watkins PB. Identification of rifampin-inducible P450III_{A4} (CYP3A₄) in human small bowel enterocytes. **J Clin Invest**; 90/5 (1992): 1871-8.
- König J, Nies AT, Cui Y, Leier I und Keppler D. Conjugate export pumps of the multidrug resistance protein (MRP) family: localization, substrate specificity, and MRP2-mediated drug resistance. **Biochim Biophys Acta**; 1461/2 (1999): 377-94.
- Koster AS, Borm PJ, Dohmen MR und Noordhoek J. Localization of biotransformational enzymes along the crypt-villus axis of the rat intestine. Evaluation of two cell isolation procedures. **Cell Biochem Funct**; 2/2 (1984): 95-101.
- Kretz-Rommel A und Boelsterli UA. Diclofenac covalent protein binding is dependent on acyl glucuronide formation and is inversely related to P450-mediated acute cell injury in cultured rat hepatocytes. **Toxicol Appl Pharmacol**; 120/1 (1993): 155-61.
- Krishna DR und Klotz U. Extrahepatic metabolism of drugs in humans. **Clin Pharmacokinet**; 26/2 (1994): 144-60.
- Kroemer HK, Echizen H, Heidemann H und Eichelbaum M. Predictability of the in vivo metabolism of verapamil from in vitro data: contribution of individual metabolic pathways and stereoselective aspects. **J Pharmacol Exp Ther**; 260/3 (1992): 1052-7.
- Kroemer HK, Gautier JC, Beaune P, Henderson C, Wolf CR und Eichelbaum M. Identification of P450 enzymes involved in metabolism of verapamil in humans. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**; 348/3 (1993): 332-7.
- Kronbach T, Mathys D, Umeno M, Gonzalez FJ und Meyer UA. Oxidation of midazolam and triazolam by human liver cytochrome P450III_{A4}. **Mol Pharmacol**; 36/1 (1989): 89-96.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**; 227/259 (1970): 680-5.
- Landsdorp D, Vree TB, Janssen TJ und Guelen PJ. Pharmacokinetics of rectal diclofenac and its hydroxy metabolites in man. **Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol**; 28/7 (1990): 298-302.
- Läpple F, Charakterisierung der Expression und Induzierbarkeit von arzneimittel-metabolisierenden Enzymen der CYP2C-Subfamilie in humanen Geweben, Fakultät für Chemie, Universität Stuttgart, Stuttgart, (2000), pp. 131.

- Lasker JM, Wester MR, Aramsombatdee E und Raucy JL. Characterization of CYP2C19 and CYP2C9 from human liver: respective roles in microsomal tolbutamide, S-mephenytoin, and omeprazole hydroxylations. **Arch Biochem Biophys**; 353/1 (1998): 16-28.
- Lisman JJ, van der Wal CJ und Overdijk B. Endo-N-acetyl-beta-D-glucosaminidase activity in rat liver. Studies on substrate specificity, enzyme inhibition, subcellular localization and partial purification. **Biochem J**; 229/2 (1985): 379-85.
- Little JM, Lehman PA, Nowell S, Samokyszyn V und Radomska A. Glucuronidation of all-trans-retinoic acid and 5,6-epoxy-all-trans-retinoic acid. Activation of rat liver microsomal UDP-glucuronosyltransferase activity by alamethicin. **Drug Metab Dispos**; 25/1 (1997): 5-11.
- Lottspeich F und Zorbas H. Proteinbestimmungen, Bioanalytik, Verlag Spektrum der Wissenschaften, Stuttgart, 1998, pp. 36-45.
- Lown KS, Bailey DG, Fontana RJ, Janardan SK, Adair CH, Fortlage LA, Brown MB, Guo W und Watkins PB. Grapefruit juice increases felodipine oral availability in humans by decreasing intestinal CYP3A protein expression [see comments]. **J Clin Invest**; 99/10 (1997): 2545-53.
- Lown KS, Kolars JC, Thummel KE, Barnett JL, Kunze KL, Wrighton SA und Watkins PB. Interpatient heterogeneity in expression of CYP3A4 and CYP3A5 in small bowel. Lack of prediction by the erythromycin breath test [published erratum appears in Drug Metab Dispos 1995 Mar;23(3):following table of contents]. **Drug Metab Dispos**; 22/6 (1994): 947-55.
- Lown KS, Mayo RR, Leichtman AB, Hsiao HL, Turgeon DK, Schmiedlin-Ren P, Brown MB, Guo W, Rossi SJ, Benet LZ und Watkins PB. Role of intestinal P-glycoprotein (mdr1) in interpatient variation in the oral bioavailability of cyclosporine. **Clin Pharmacol Ther**; 62/3 (1997): 248-60.
- Mangold JB, Schran HF, Yatscoff RW, Weitzel WF und Leichtman AB. Biotransformation of cyclosporin G in comparison to cyclosporine [published erratum appears in Transplant Proc 1994 Dec;26(6):3741]. **Transplant Proc**; 26/5 (1994): 3013-6.
- Markwardt F, Drawert J und Walsmann P. Synthetic low molecular weight inhibitors of serum kallikrein. **Biochem Pharmacol**; 23/16 (1974): 2247-56.
- McDonald C, Trier JS und Everett B. Cell proliferation and migration in the stomach, duodenum and rectum of man. **Gastroenterology**; 46 (1964): 405-417.

- McKinnon RA, Burgess WM, Hall PM, Roberts-Thomson SJ, Gonzalez FJ und McManus ME. Characterisation of CYP3A gene subfamily expression in human gastrointestinal tissues. **Gut**; 36/2 (1995): 259-67.
- Meech R und Mackenzie PI. Structure and function of uridine diphosphate glucuronosyltransferases. **Clin Exp Pharmacol Physiol**; 24/12 (1997): 907-15.
- Meech R und Mackenzie PI. UDP-glucuronosyltransferase, the role of the amino terminus in dimerization. **J Biol Chem**; 272/43 (1997): 26913-7.
- Mikus G, Eichelbaum M, Fischer C, Gumulka S, Klotz U und Kroemer HK. Interaction of verapamil and cimetidine: stereochemical aspects of drug metabolism, drug disposition and drug action. **J Pharmacol Exp Ther**; 253/3 (1990): 1042-8.
- Miners JO, Lillywhite KJ und Birkett DJ. In vitro evidence for the involvement of at least two forms of human liver UDP-glucuronosyltransferase in morphine 3-glucuronidation. **Biochem Pharmacol**; 37/14 (1988): 2839-45.
- Montgomery JE, Sutherland CJ, Kestin IG und Sneyd JR. Morphine consumption in patients receiving rectal paracetamol and diclofenac alone and in combination. **Br J Anaesth**; 77/4 (1996): 445-7.
- Murray GI, Barnes TS, Sewell HF, Ewen SW, Melvin WT und Burke MD. The immunocytochemical localisation and distribution of cytochrome P- 450 in normal human hepatic and extrahepatic tissues with a monoclonal antibody to human cytochrome P-450. **Br J Clin Pharmacol**; 25/4 (1988): 465-75.
- Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyereisen R, Waxman DJ, Waterman MR, Gotoh O, Coon MJ, Estabrook RW, Gunsalus IC und Nebert DW. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. **Pharmacogenetics**; 6/1 (1996): 1-42.
- Newton DJ, Wang RW und Lu AY. Cytochrome P450 inhibitors. Evaluation of specificities in the in vitro metabolism of therapeutic agents by human liver microsomes. **Drug Metab Dispos**; 23/1 (1995): 154-8.
- Nielsen TL, Rasmussen BB, Flinois JP, Beaune P und Brosen K. In vitro metabolism of quinidine: the (3S)-3-hydroxylation of quinidine is a specific marker reaction for cytochrome P-4503A4 activity in human liver microsomes. **J Pharmacol Exp Ther**; 289/1 (1999): 31-7.
- Okochi E, Iwahashi T und Tsuruo T. Monoclonal antibodies specific for P-glycoprotein. **Leukemia**; 11/7 (1997): 1119-23.

- Overdijk B, van der Kroef WM, Lisman JJ, Pierce RJ, Montreuil J und Spik G. Demonstration and partial characterization of endo-N-acetyl-beta-D- glucosaminidase in human tissues. **FEBS Lett**; 128/2 (1981): 364-6.
- Paine MF, Khalighi M, Fisher JM, Shen DD, Kunze KL, Marsh CL, Perkins JD und Thummel KE. Characterization of interintestinal and intrainestinal variations in human CYP3A-dependent metabolism. **J Pharmacol Exp Ther**; 283/3 (1997): 1552-62.
- Paine MF, Schmiedlin-Ren P und Watkins PB. Cytochrome P-450 1A1 expression in human small bowel: interindividual variation and inhibition by ketoconazole. **Drug Metab Dispos**; 27/3 (1999): 360-4.
- Paine MF, Shen DD, Kunze KL, Perkins JD, Marsh CL, McVicar JP, Barr DM, Gillies BS und Thummel KE. First-pass metabolism of midazolam by the human intestine. **Clin Pharmacol Ther**; 60/1 (1996): 14-24.
- Palamanda J, Feng WW, Lin CC und Nomeir AA. Stimulation of tolbutamide hydroxylation by acetone and acetonitrile in human liver microsomes and in a cytochrome P-450 2C9-reconstituted system [In Process Citation]. **Drug Metab Dispos**; 28/1 (2000): 38-43.
- Pauli-Magnus C, von Richter O, Burk O, Ziegler A, Mettang T, Eichelbaum M und Fromm MF. Characterization of the Major Metabolites of Verapamil as Substrates and Inhibitors of P-glycoprotein. **J Pharmacol Exp Ther**; 293/2 (2000): 376-382.
- Peters WH und Jansen PL. Immunocharacterization of UDP-glucuronyltransferase isoenzymes in human liver, intestine and kidney. **Biochem Pharmacol**; 37/3 (1988): 564-7.
- Peters WH und Kremers PG. Cytochromes P-450 in the intestinal mucosa of man. **Biochem Pharmacol**; 38/9 (1989): 1535-8.
- Prueksaritanont T, Dwyer LM und Cribb AE. (+)-bufuralol 1'-hydroxylation activity in human and rhesus monkey intestine and liver. **Biochem Pharmacol**; 50/9 (1995): 1521-5.
- Radomska-Pandya A, Czernik PJ, Little JM, Battaglia E und Mackenzie PI. Structural and functional studies of UDP-glucuronosyltransferases. **Drug Metab Rev**; 31/4 (1999): 817-99.
- Radomska-Pandya A, Little JM, Pandya JT, Tephly TR, King CD, Barone GW und Raufman JP. UDP-glucuronosyltransferases in human intestinal mucosa. **Biochim Biophys Acta**; 1394/2-3 (1998): 199-208.

- Rahman A, Korzekwa KR, Grogan J, Gonzalez FJ und Harris JW. Selective biotransformation of taxol to 6 alpha-hydroxytaxol by human cytochrome P450 2C8. **Cancer Res**; 54/21 (1994): 5543-6.
- Ratanasavanh D, Beaune P, Morel F, Flinois JP, Guengerich FP und Guillouzo A. Intralobular distribution and quantitation of cytochrome P-450 enzymes in human liver as a function of age. **Hepatology**; 13/6 (1991): 1142-51.
- Richardson TH, Griffin KJ, Jung F, Raucy JL und Johnson EF. Targeted antipeptide antibodies to cytochrome P450 2C18 based on epitope mapping of an inhibitory monoclonal antibody to P450 2C51. **Arch Biochem Biophys**; 338/2 (1997): 157-64.
- Richert ND, Aldwin L, Nitecki D, Gottesman MM und Pastan I. Stability and covalent modification of P-glycoprotein in multidrug-resistant KB cells. **Biochemistry**; 27/20 (1988): 7607-13.
- Rockemann MG, Seeling W, Bischof C, Borstinghaus D, Steffen P und Georgieff M. Prophylactic use of epidural mepivacaine/morphine, systemic diclofenac, and metamizole reduces postoperative morphine consumption after major abdominal surgery. **Anesthesiology**; 84/5 (1996): 1027-34.
- Roussel F, Khan KK und Halpert JR. The importance of SRS-1 residues in catalytic specificity of human cytochrome P450 3A4 [In Process Citation]. **Arch Biochem Biophys**; 374/2 (2000): 269-78.
- Sata F, Sapone A, Elizondo G, Stocker P, Miller VP, Zheng W, Raunio H, Crespi CL und Gonzalez FJ. CYP3A4 allelic variants with amino acid substitutions in exons 7 and 12: evidence for an allelic variant with altered catalytic activity. **Clin Pharmacol Ther**; 67/1 (2000): 48-56.
- Schänzle G, Li S, Mikus G und Hofmann U. Rapid, highly sensitive method for the determination of morphine and its metabolites in body fluids by liquid chromatography-mass spectrometry. **J Chromatogr B Biomed Sci Appl**; 721/1 (1999): 55-65.
- Schinkel AH, Kemp S, Dolle M, Rudenko G und Wagenaar E. N-glycosylation and deletion mutants of the human MDR1 P-glycoprotein. **J Biol Chem**; 268/10 (1993): 7474-81.
- Schinkel AH, Roelofs EM und Borst P. Characterization of the human MDR3 P-glycoprotein and its recognition by P-glycoprotein-specific monoclonal antibodies. **Cancer Res**; 51/10 (1991): 2628-35.

- Schinkel AH, Wagenaar E, van Deemter L, Mol CA und Borst P. Absence of the mdr1a P-Glycoprotein in mice affects tissue distribution and pharmacokinetics of dexamethasone, digoxin, and cyclosporin A. **J Clin Invest**; 96/4 (1995): 1698-705.
- Schmitz G, Lepper H und Estler CJ. High-performance liquid chromatographic method for the routine determination of diclofenac and its hydroxy and methoxy metabolites from in vitro systems. **J Chromatogr**; 620/1 (1993): 158-63.
- Schomerus M, Spiegelhalder B, Stieren B und Eichelbaum M. Physiological disposition of verapamil in man. **Cardiovasc Res**; 10/5 (1976): 605-12.
- Schuetz EG, Beck WT und Schuetz JD. Modulators and substrates of P-glycoprotein and cytochrome P4503A coordinately up-regulate these proteins in human colon carcinoma cells. **Mol Pharmacol**; 49/2 (1996): 311-8.
- Schuetz EG, Furuya KN und Schuetz JD. Interindividual variation in expression of P-glycoprotein in normal human liver and secondary hepatic neoplasms. **J Pharmacol Exp Ther**; 275/2 (1995): 1011-8.
- Schuetz EG, Schinkel AH, Relling MV und Schuetz JD. P-glycoprotein: a major determinant of rifampicin-inducible expression of cytochrome P4503A in mice and humans. **Proc Natl Acad Sci U S A**; 93/9 (1996): 4001-5.
- Schwarz UI, Gramatte T, Krappweis J, Berndt A, Oertel R, von Richter O und Kirch W. Unexpected effect of verapamil on oral bioavailability of the beta- blocker talinolol in humans. **Clin Pharmacol Ther**; 65/3 (1999): 283-90.
- Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y und Guengerich FP. Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. **J Pharmacol Exp Ther**; 270/1 (1994): 414-23.
- Shimomura K, Kamata O, Ueki S, Ida S und Oguri K. Analgesic effect of morphine glucuronides. **Tohoku J Exp Med**; 105/1 (1971): 45-52.
- Shimoyama M, Shimoyama N, Inturrisi CE und Elliott KJ. Gabapentin enhances the antinociceptive effects of spinal morphine in the rat tail-flick test. **Pain**; 72/3 (1997): 375-82.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ und Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid [published erratum appears in Anal Biochem 1987 May 15;163(1):279]. **Anal Biochem**; 150/1 (1985): 76-85.

- Strassburg CP, Kneip S, Topp J, Obermayer-Straub P, Barut A, Tukey RH und Manns MP. Polymorphic gene expression and interindividual variation of UDP-glucuronosyltransferase activity in human small intestine. **J Biol Chem** (2000).
- Strassburg CP, Nguyen N, Manns MP und Tukey RH. UDP-glucuronosyltransferase activity in human liver and colon. **Gastroenterology**; 116/1 (1999): 149-60.
- Svensson JO, Rane A, Sawe J und Sjoqvist F. Determination of morphine, morphine-3-glucuronide and (tentatively) morphine-6-glucuronide in plasma and urine using ion-pair high- performance liquid chromatography. **J Chromatogr**; 230/2 (1982): 427-32.
- Tan Y, Patten CJ, Smith T und Yang CS. Competitive interactions between cytochromes P450 2A6 and 2E1 for NADPH- cytochrome P450 oxidoreductase in the microsomal membranes produced by a baculovirus expression system. **Arch Biochem Biophys**; 342/1 (1997): 82-91.
- Tateishi S, Arima S und Futami K. Assessment of blood flow in the small intestine by laser Doppler flowmetry: comparison of healthy small intestine and small intestine in Crohn's disease. **J Gastroenterol**; 32/4 (1997): 457-63.
- Tateishi T, Watanabe M, Moriya H, Yamaguchi S, Sato T und Kobayashi S. No ethnic difference between Caucasian and Japanese hepatic samples in the expression frequency of CYP3A5 and CYP3A7 proteins. **Biochem Pharmacol**; 57/8 (1999): 935-9.
- Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I und Willingham MC. Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P- glycoprotein in normal human tissues. **Proc Natl Acad Sci USA**; 84/21 (1987): 7735-8.
- Thummel KE, O'Shea D, Paine MF, Shen DD, Kunze KL, Perkins JD und Wilkinson GR. Oral first-pass elimination of midazolam involves both gastrointestinal and hepatic CYP3A-mediated metabolism. **Clin Pharmacol Ther**; 59/5 (1996): 491-502.
- Thummel KE, Shen DD, Podoll TD, Kunze KL, Trager WF, Bacchi CE, Marsh CL, McVicar JP, Barr DM, Perkins JD und et al. Use of midazolam as a human cytochrome P450 3A probe: II. Characterization of inter- and intraindividual hepatic CYP3A variability after liver transplantation. **J Pharmacol Exp Ther**; 271/1 (1994): 557-66.
- Towbin H, Staehelin T und Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc Natl Acad Sci U S A**; 76/9 (1979): 4350-4.

- Tracy TS, Korzekwa KR, Gonzalez FJ und Wainer IW. Cytochrome P450 isoforms involved in metabolism of the enantiomers of verapamil and norverapamil. **Br J Clin Pharmacol**; 47/5 (1999): 545-52.
- Transon C, Lecoecur S, Leemann T, Beaune P und Dayer P. Interindividual variability in catalytic activity and immunoreactivity of three major human liver cytochrome P450 isozymes. **Eur J Clin Pharmacol**; 51/1 (1996): 79-85.
- Van Beers EH, Rings EH, Taminiou JA, Heymans HS, Einerhand AW, Dekker J und Buller HA. Regulation of lactase and sucrase-isomaltase gene expression in the duodenum during childhood. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**; 27/1 (1998): 37-46.
- von Richter O, Greiner BM, Fromm MF, Fraser R, Omari T, Dent J, Somogyi AA und Eichelbaum M. Absorption, Intestinal First-Pass Metabolism and Elimination of Verapamil in Humans determined with a New Multilumen Perfusion Catheter. **Manuskript in Vorbereitung (2000)**.
- Watkins PB. Drug metabolism by cytochromes P450 in the liver and small bowel. **Gastroenterol Clin North Am**; 21/3 (1992): 511-26.
- Watkins PB. The barrier function of CYP3A4 and P-glycoprotein in the small bowel. **Adv Drug Deliv Rev**; 27 (1997): 161-170.
- Watkins PB, Murray SA, Thomas PE und Wrighton SA. Distribution of cytochromes P-450, cytochrome b5, and NADPH-cytochrome P-450 reductase in an entire human liver. **Biochem Pharmacol**; 39/3 (1990): 471-6.
- Watkins PB, Wrighton SA, Schuetz EG, Molowa DT und Guzelian PS. Identification of glucocorticoid-inducible cytochromes P-450 in the intestinal mucosa of rats and man. **J Clin Invest**; 80/4 (1987): 1029-36.
- West AB, Isaac CA, Carboni JM, Morrow JS, Mooseker MS und Barwick KW. Localization of villin, a cytoskeletal protein specific to microvilli, in human ileum and colon and in colonic neoplasms. **Gastroenterology**; 94/2 (1988): 343-52.
- Wester MR, Lasker JM, Johnson EF und Raucy JL. CYP2C19 participates in tolbutamide hydroxylation by human liver microsomes. **Drug Metab Dispos**; 28/3 (2000): 354-9.
- Wynne HA, Cope LH, Mutch E, Rawlins MD, Woodhouse KW und James OF. The effect of age upon liver volume and apparent liver blood flow in healthy man. **Hepatology**; 9/2 (1989): 297-301.

- Yamazaki H, Inoue K, Turvy CG, Guengerich FP und Shimada T. Effects of freezing, thawing, and storage of human liver samples on the microsomal contents and activities of cytochrome P450 enzymes. **Drug Metab Dispos**; 25/2 (1997): 168-74.
- Zhang QY, Dunbar D, Ostrowska A, Zeisloft S, Yang J und Kaminsky LS. Characterization of human small intestinal cytochromes P-450. **Drug Metab Dispos**; 27/7 (1999): 804-9.
- Zhu BT, Taneja N, Loder DP, Balentine DA und Conney AH. Effects of tea polyphenols and flavonoids on liver microsomal glucuronidation of estradiol and estrone. **J Steroid Biochem Mol Biol**; 64/3-4 (1998): 207-15.

8 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: (1) Intestinale Sekretion von Arzneistoffen und Metaboliten durch MDR1 P-Glykoprotein.
- Abbildung 2: Strukturformeln von Verapamil und Metaboliten
- Abbildung 3: Massenspektrometrisches Chromatogramm einer mit 1 pmol D-620, D-617, D-703, D-702, Norverapamil und 50 pmol D-832, [²H₃]Norverapamil versetzten Kontrolllösung.
- Abbildung 4: Strukturformeln von Diclofenac und Metaboliten.
- Abbildung 5: Chromatographische Trennung von Diflunisal: (4,2 Min), 3'-Hydroxydiclofenac: (4,7Min), 4'-Hydroxydiclofenac: (5,4 Min), 5-Hydroxydiclofenac: (5,7 Min) und Diclofenac: (7,9 Min).
- Abbildung 6: Massenspektrometrisches Chromatogramm einer mit 5 pmol 4'-OH-Diclofenac und 50 pmol Diflunisal versetzten Kontrolllösung.
- Abbildung 7: Strukturformeln von Morphin und Glucuronosylsäure-Konjugaten.
- Abbildung 8: Massenspektrometrisches Chromatogramm einer mit 250 pmol M3G, 50 pmol M6G und 500 pmol bzw. 100 pmol der internen Standards [²H₃]M3G/ [²H₃]M6G versetzten Kontrolllösung.
- Abbildung 9: Coomassie Färbung von Polyacrylamidgelen (10%; 1,5 mm Dicke) nach 1- (A), 2- (B) und 3-stündigem (C) Transfer.
- Abbildung 10: Ponceau Färbung von PVDF-Membranen nach Transfer mit 0,1% SDS (A) und ohne (B) von 5, 10, 25, 50 und 100 µg TN5 Zellhomogenat aus Polyacrylamidgelen (10%; 1,5 mm Dicke).
- Abbildung 11: Spezifität des Anti-CYP2C8 IgGs.
- Abbildung 12: Spezifität des Anti-CYP2C9 IgGs.
- Abbildung 13: Spezifität des Anti-CYP2C19 IgGs.
- Abbildung 14: Spezifität des Anti-CYP3A4 IgGs.
- Abbildung 15: Spezifität des Anti-CYP3A5 IgGs.
- Abbildung 16: (A) Hämatoxyllin/Eosin gefärbter Schnitt durch Darmmukosa.
- Abbildung 17: Effekt des CYP3A Hemmstoffs Ketoconazol auf die Bildungsraten von D-617, Norverapamil, D-703 und D-702.
- Abbildung 18: Hemmung der D-703 Bildung durch Sulfaphenazol in Inkubationen mit jeweils 25 pmol rekombinantem CYP2C8, 2C9 und 2C19.
- Abbildung 19: Effekt des CYP2C9 Hemmstoffs Sulfaphenazol auf die Bildungsraten von D-617, Norverapamil, D-703 und D-702.
- Abbildung 20: Effekt von Taxol auf die Bildungsraten von D-617, Norverapamil, D-703 und D-702 in Leber- (A) und Enterozytenhomogenat (B).
- Abbildung 21: Zeit- (A) und Proteinabhängigkeit (B) der D-617 und D-703-Bildung in Enterozyten- und Leberhomogenat.
- Abbildung 22: Korrelation zwischen V_{\max} D-617 (A) und dem CYP3A4 Proteingehalt (B) in Enterozyten- und Leberhomogenaten.
- Abbildung 23: Immunoblot der CYP3A4 Expression in Enterozyten- (D) und Leberhomogenat (L).
- Abbildung 24: Korrelation zwischen der Maximalgeschwindigkeit der Verapamil-N-Desalkylierung und dem CYP3A4 Proteingehalt in Enterozyten- (A) und Leberhomogenaten (B).
- Abbildung 25: Immunoblot der CYP3A5 Expression in Enterozyten- (D) und Leberhomogenat (L).

- Abbildung 26: Immunoblot der CYP2C8 Expression in Enterozyten- (D) und Leberhomogenat (L).
- Abbildung 27: Korrelation zwischen der maximalen Bildungsrate (A) bzw. der intrinsischen Clearance (B) von D-703 mit dem CYP2C8 Proteingehalt in Leberhomogenaten von 15 Patienten.
- Abbildung 28: Korrelation zwischen V_{\max} D-702 (A) bzw. V_{\max} Norverapamil (B) in Enterozyten- und Leberhomogenaten.
- Abbildung 29: Box'n Whisker Plot der intrinsischen Clearance von Verapamil in 15 Enterozyten- und Leberhomogenaten. Die Box stellt die zweite und dritte Quartile mit dem Median in der Mitte dar.
- Abbildung 30: Zeit- (A) und Proteinabhängigkeit (B) der 4'-OH-Diclofenac Bildung in Enterozyten- und Leberhomogenat.
- Abbildung 31: Immunoblot der CYP2C9 Expression in Enterozyten- (D) und Leberhomogenat (L).
- Abbildung 32: Korrelation zwischen der Maximalgeschwindigkeit der Diclofenac-4-hydroxylierung (A) bzw. dem CYP2C9 Proteingehalt (B) in Enterozyten- und Leberhomogenaten.
- Abbildung 33: Korrelation zwischen der maximalen Bildungsrate (A) bzw. der intrinsischen Clearance (B) von 4'-OH-Diclofenac mit dem CYP2C9 Proteingehalt in Leberhomogenaten.
- Abbildung 34: Korrelation zwischen dem CYP2C19 Proteingehalt in Enterozyten und Leberhomogenaten.
- Abbildung 35: Korrelation zwischen V_{\max} M3G (A) bzw. V_{\max} M6G (B) in Enterozyten- und Leberhomogenaten.
- Abbildung 36: Effekte von Codein (A) und Gabapentin (B) auf die Morphin-3- und Morphin-6-glucuronidierung in Leberhomogenat bei einer Morphin Konzentration von 10 mM.
- Abbildung 37: Hemmung der Morphin-3- und Morphin-6-glucuronidierung in Leberhomogenat durch Grapefruitkernextrakt bei Inkubationen mit 10 mM Morphin.
- Abbildung 38: 50 μ g L-MDR1 Zellhomogenat Kontrolle (1, 2). 50 μ g L-MDR1 Zellhomogenat über 2 Minuten (3, 4) und 5 Minuten (5, 6) bei 95° C erhitzt.
- Abbildung 39: Endo F Verdau von P-Glykoprotein.
- Abbildung 40: Immunoblot der P-Glykoprotein Expression in Enterozyten- und Leberhomogenat.
- Abbildung 41: Korrelation zwischen dem CYP3A4- und P-Glykoprotein Proteingehalt in Enterozyten- (n= 10) (A) und Leberhomogenaten (n= 15) (B).
- Abbildung 42: Translokationsraten von 5 μ M Verapamil, Norverapamil und D-703 durch P-Glykoprotein überexprimierende L-MDR1-, humane Kolonkarzinom- (Caco-2) und LLC-PK1 Zellmonolayer.
- Abbildung 43: Translokationsraten von 0,5 μ M Verapamil und Norverapamil durch P-Glykoprotein überexprimierende L-MDR1 Zellmonolayer.
- Abbildung 44: Translokationsraten von 5 μ M D-617 und D-620 durch P-Glykoprotein überexprimierende L-MDR1-, humane Kolonkarzinom- (Caco-2) und LLC-PK1 Zellmonolayer.
- Abbildung 45: Auswertung eines Immunoblots durch zweidimensionale Meßfelder für das Signal und den entsprechenden Hintergrund.
- Abbildung 46: Durchführung der Transportexperimente.

9 Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1: Intra-Assay Variabilität der Proteinbestimmung nach Smith.
- Tabelle 2: Inter-Assay Variabilität der Proteinbestimmung nach Smith.
- Tabelle 3: Einfluß von Proteinlagerungspuffer auf die Proteinbestimmung nach Smith.
- Tabelle 4: Intra-Assay Variabilität zur Bestimmung von D-620, D-617, D-702, D-703 und Norverapamil aus Inkubationslösungen.
- Tabelle 5: Inter-Assay Variabilität zur Bestimmung von D-620, D-617, D-702, D-703 und Norverapamil aus Inkubationslösungen
- Tabelle 6: Intra-Assay Variabilität der 4'-OH-Diclofenac Bestimmung in Inkubationslösungen.
- Tabelle 7: Inter-Assay Variabilität der 4'-OH-Diclofenac Bestimmung in Inkubationslösungen.
- Tabelle 8: Intra-Assay Variabilität der M3G und M6G Bestimmung in Inkubationslösungen
- Tabelle 9: Inter-Assay Variabilität der M3G und M6G Bestimmung in Inkubationslösungen
- Tabelle 10: Einfluß von Proteasehemmstoffen und Hyaluronidase auf den. Verapamil- (250 µM), Diclofenac- (100 µM) und Morphin-(5 mM) Metabolismus.
- Tabelle 11: Intra-Assay Variabilität der CYP2C8 Bestimmung mittels Immunoblot.
- Tabelle 12: Intra-Assay Variabilität der CYP2C9 Bestimmung mittels Immunoblot.
- Tabelle 13: Intra-Assay Variabilität der CYP2C19 Bestimmung mittels Immunoblot.
- Tabelle 14: Intra-Assay Variabilität der CYP3A4 Bestimmung mittels Immunoblot.
- Tabelle 15: Intra-Assay Variabilität der CYP3A5 Bestimmung mittels Immunoblot.
- Tabelle 16: Aus Enterozyten und Lebern isolierte Gesamtmenge Protein sowie die daraus resultierende Ausbeute an Gesamtprotein bezogen auf das Feuchtgewicht des jeweiligen Gewebes.
- Tabelle 17: Kinetik der D-617 Bildung aus Verapamil in der mikrosomalen Fraktion von mit humanen CYP-Isoenzymen stabil transfizierten Insektenzellen.
- Tabelle 18: Kinetik der D-703 Bildung aus Verapamil in der mikrosomalen Fraktion von mit humanen CYP-Isoenzymen stabil transfizierten Insektenzellen.
- Tabelle 19: Kinetik der D-702 Bildung aus Verapamil in der mikrosomalen Fraktion von mit humanen CYP-Isoenzymen stabil transfizierten Insektenzellen.
- Tabelle 20: Kinetik der Norverapamil Bildung aus Verapamil in der mikrosomalen Fraktion von mit humanen CYP-Isoenzymen stabil transfizierten Insektenzellen.
- Tabelle 21: Individuelle Daten der Verapamil-N-Desalkylierung, CYP3A4- und CYP3A5 Expression in Enterozyten- und Leberhomogenaten von 15 Patienten.
- Tabelle 22: Individuelle Daten der Verapamil-O-Demethylierung und CYP2C8 Expression in Enterozyten und Leberhomogenaten von 15 Patienten.
- Tabelle 23: Individuelle Daten der Verapamil-O-Demethylierung zu D-702 in Enterozyten und Leberhomogenaten von 15 Patienten.
- Tabelle 24: Individuelle Daten der Verapamil-N-Demethylierung in Enterozyten und Leberhomogenaten von 15 Patienten.
- Tabelle 25: Individuelle Daten der Diclofenac-4-hydroxylierung und CYP2C9 Expression in Enterozyten- und Leberhomogenaten von 15 Patienten.
- Tabelle 26: Individuelle Daten des CYP2C19 Proteingehalts in Enterozyten- und Leberhomogenaten von 14.
- Tabelle 27: Individuelle Daten der Morphin-3-glucuronidierung in Enterozyten und Leberhomogenaten von 15 Patienten.

Tabelle 28: Individuelle Daten der Morphin-6-glucuronidierung in Enterozyten und Leberhomogenaten von 15 Patienten mit und ohne Aktivierung durch Alamethicin.

Tabelle 29: Aufstellung über in Leberhomogenat ermittelte Inhibitorkonstanten (K_i) von Hemmstoffen der Morphinglucuronidierung.

Tabelle 30: Relativer P-Glykoprotein Gehalt in Enterozyten- und Leberhomogenaten von 17 Patienten.

Tabelle 31: Daten der in die Gewebesammlung aufgenommenen Patienten.

Tabelle 32: Aufstellung über in humaner Darmflüssigkeit und in Leber vorhandener Proteasen und entsprechender Inhibitoren

Tabelle 33: Herstellung von SDS-Polyacrylamidgelen

10 Liste der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren Professoren und Dozenten:

K. W. Bock, Tübingen
A. Braun, Mainz
G. Dannhardt, Mainz
M. Eichelbaum, Stuttgart
B. Epe, Mainz
U. Klotz, Stuttgart
F. Moll, Mainz
P. Münzel, Tübingen
E. Mutschler, Frankfurt
H. K. Kroemer, Greifswald

11 Lebenslauf

<i>Geburtsdatum</i>	24. Juli 1970	
<i>Geburtsort</i>	Goslar, als Sohn von Friedrich-Carl von Richter und Birgit von Richter geb. Heer	
<i>Schulausbildung</i>	Grundschule Osterode am Harz	08/76 – 07/80
	Gymnasium Hamburg Rissen	08/80 – 06/82
	Franziskus Gymnasium Lingen/ Ems	08/82 – 06/86
	Bischöfliches Willigis Gymnasium Mainz; Abitur	08/86 – 05/89
<i>Wehrdienst</i>	NATO Airborne Early Warning Force Geilenkirchen	06/89 – 08/90
<i>Berufsausbildung</i>	Studium der Chemie Johannes Gutenberg Universität Mainz	10/90 – 04/91
	Studium der Pharmazie Johannes Gutenberg Universität Mainz und Université de Bourgogne Dijon, Frankreich	04/91 – 10/96
	Approbation als Apotheker	01/97
	Doktorand am Dr. Margarete Fischer-Bosch- Institut für Klinische Pharmakologie	02/97 – 04/00