

Aus dem Institut für Pharmakologie, Pharmazie und Toxikologie
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

REGULATION DES REDUCED FOLATE CARRIER (RFC1)
IN HPCT-1E3-RATTEN-HEPATOCYTOMA-ZELLEN
DURCH CYTOCHROM P450-INDUKTOREN VOM PHENOBARBITAL-TYP

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von

Sandra Halwachs
aus Hannover

Leipzig, 2006

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Professor Dr. Karsten Fehlhaber

Betreuer: Professor Dr. Walther Honscha
Institut für Pharmakologie, Pharmazie und Toxikologie
Direktor: Professor Dr. Fritz Rupert Ungemach
Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig

Gutachter: Professor Dr. Walther Honscha
Institut für Pharmakologie, Pharmazie und Toxikologie
Direktor: Professor Dr. Fritz Rupert Ungemach
Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig

Professor Dr. Gotthold Gäbel
Veterinär-Physiologisches Institut
Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig

Professor Dr. Gerhard Burckhardt
Zentrum Physiologie und Pathophysiologie
Abteilung Vegetative Physiologie und Pathophysiologie
Georg-August-Universität Göttingen

Tag der Verteidigung: 04. Juli 2006

MEINEN ELTERN

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG.....	1
2	LITERATURÜBERSICHT.....	4
2.1	Methotrexat.....	4
2.1.1	Wirkungsweise und Einsatz in Human- und Veterinärmedizin.....	4
2.1.2	Pharmakokinetik.....	6
2.1.3	Chemoresistenz gegenüber Methotrexat.....	8
2.1.3.1	Transport-assoziierte Chemoresistenz.....	8
2.1.3.2	Metabolische Chemoresistenz.....	9
2.1.3.3	Arzneimittelinteraktionen.....	10
2.1.3.3.1	Überblick.....	10
2.1.3.3.2	Cytochrom P450-Induktoren und Methotrexat.....	10
2.2	Reduced Folate Carrier/Reduced folate carrier (RFC/Rfc; SLC19A1/Slc19a1)	11
2.2.1	Struktur und Homologie der RFC-/Rfc-Transporter bei verschiedenen Spezies und deren Gewebeverteilung.....	11
2.2.2	Regulationselemente in der Promotorregion des hepatozellulären RFC/Rfc.....	13
2.2.3	Charakterisierung der Transportaktivität in Leber und Niere.....	14
2.2.3.1	Physiologische Funktion von RFC/Rfc.....	14
2.2.3.2	Transport von Methotrexat.....	15
2.3	Regulation von Arzneistoffwechselwegen.....	16
2.3.1	Das Cytochrom P450 System.....	16
2.3.1.1	Transkriptionelle Regulation der Cytochrom P450-Enzyme durch Induktoren vom PB-Typ und TCPOBOP.....	17
2.3.2	Regulation von hepatozellulären Transportproteinen.....	23
2.3.2.1	Regulation über Kernrezeptoren am Beispiel von OATP und MRP.....	23
2.3.2.2	Proteinkinase A- und C-vermittelte posttranslationale Regulation.....	25
2.4	Das HPCT-1E3-Zellkulturmodell.....	27

3	MATERIAL UND METHODEN.....	29
3.1	Chemikalien und Pufferlösungen.....	29
3.1.1	Chemikalien.....	29
3.1.2	Pufferlösungen.....	30
3.2	Materialien und Reagenzien.....	31
3.3	Zellkulturbedarf.....	34
3.3.1	Einmalartikel.....	34
3.3.2	Kulturmedien und Zusätze.....	34
3.4	Geräte.....	34
3.5	Zellbiologische Methoden.....	35
3.5.1	Kultur der HPCT-1E3-Zellen.....	35
3.5.2	WST-1 Toxizitätsstudien an HPCT-1E3-Zellen.....	36
3.5.3	Regulationsstudien mit HPCT-1E3-Zellen.....	37
3.5.3.1	Inkubation der HPCT-1E3-Zellen mit Cytochrom P450-Induktoren vom PB-Typ und TCPOBOP.....	37
3.5.3.2	Inkubation der HPCT-1E3 mit Modulatoren der Phosphorylierung.....	38
3.6	Proteinbiochemische Methoden.....	39
3.6.1	Bestimmung der Gesamtproteinmenge mittels BCA-Assay.....	39
3.6.2	Bestimmung der Gesamtproteinmenge nach der Methode von Lowry.....	40
3.6.3	Quantifizierung des Rfc1 Proteins in HPCT-1E3-Zellen.....	40
3.7	Molekularbiologische Methoden.....	41
3.7.1	RNA-Isolierung aus HPCT-1E3-Zellen.....	41
3.7.2	Quantifizierung der Rfc1 mRNA durch real time RT-PCR.....	43
3.7.2.1	Durchführung der cDNA Synthese.....	43
3.7.2.2	Nachweis der Spezifität der Rfc1 Primer und Proben.....	43
3.7.2.3	Durchführung der real time PCR.....	44
3.7.2.4	Auswertung der real time PCR.....	45
3.8	Transportstudien.....	46
3.8.1	Bestimmung der funktionellen Aktivität des Rfc1 in HPCT-1E3-Zellen.....	46
3.8.1.1	Messung des intrazellulären Gehalts an fluoreszenzmarkiertem Methotrexat mittels Fluoreszenzspektrophotometrie.....	46
3.8.1.2	Messung der Aufnahme von ³ [H]-Methotrexat über 20 min.....	46
3.9	Statistische Auswertung.....	48

4	ERGEBNISSE.....	50
4.1	WST-1 Toxizitätsstudien an HPCT-1E3-Zellen.....	50
4.1.1	Toxizität von Phenobarbital, Carbamazepin und Diazepam.....	50
4.1.2	Toxizität von Chlorpromazin und Haloperidol.....	51
4.1.3	Toxizität von Clotrimazol und Amphotericin B.....	52
4.1.4	Toxizität von TCPOBOP.....	53
4.2	Beeinflussung der Rfc1-vermittelten Aufnahme von fluoreszenzmarkiertem Methotrexat in HPCT-1E3-Zellen durch Induktoren vom PB-Typ.....	54
4.2.1	Phenobarbital in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer.....	55
4.2.2	Phenobarbital, Carbamazepin und Diazepam.....	56
4.2.3	Chlorpromazin und Haloperidol.....	58
4.2.4	Clotrimazol und Amphotericin B.....	59
4.2.5	TCPOBOP.....	61
4.3	Zeitabhängige Beeinflussung der Rfc1-vermittelten Aufnahme von ³ [H]-Methotrexat in HPCT-1E3-Zellen durch Induktoren vom PB-Typ.....	62
4.3.1	Phenobarbital, Carbamazepin und Diazepam.....	63
4.3.2	Chlorpromazin.....	66
4.3.3	Clotrimazol.....	67
4.3.4	TCPOBOP.....	69
4.4	Quantifizierung der Rfc1 mRNA in HPCT-1E3-Zellen.....	70
4.4.1	Nachweis der Spezifität der Rfc1 Primer und Proben.....	70
4.4.2	Einfluss von Phenobarbital und TCPOBOP auf die Rfc1-Genexpression in HPCT-1E3-Zellen.....	71
4.5	Einfluss von Phenobarbital, TCPOBOP und Diazepam auf die Rfc1-Proteinmenge in HPCT-1E-Zellen.....	73
4.6	Regulation der funktionellen Aktivität des Rfc1 in HPCT-1E3-Zellen.....	74
4.6.1	Modulatoren der Phosphorylierung.....	74
4.6.1.1	PMA und/oder Okadainsäure.....	75
4.6.1.2	PMA und BIM.....	76
4.6.1.3	cAMP und H-89.....	76
4.6.2	Beteiligung der Proteinkinase C an der Regulation der Rfc1-vermittelten Aufnahme von ³ [H]-Methotrexat durch Cytochrom P450-Induktoren.....	79
4.6.2.1	Vorbehandlung mit Phenobarbital und BIM.....	79

4.6.2.2	Vorbehandlung mit TCPOBOP und BIM.....	79
5	DISKUSSION.....	83
5.1	Transport von Methotrexat in HPCT-1E3-Zellen.....	83
5.2	Beeinflussung der Rfc1-vermittelten FMTX- bzw. ³ [H]-MTX-Aufnahme in HPCT-1E3-Zellen durch Induktoren vom PB-Typ und TCPOBOP.....	90
5.3	Mechanismus der Regulation der Rfc1-Aktivität in HPCT-1E3-Zellen durch Cytochrom P450-Induktoren vom PB-Typ und TCPOBOP.....	96
5.3.1	Regulation der Rfc1-Genexpression.....	96
5.3.2	Regulation der Rfc1-Proteinmenge.....	98
5.3.3	Regulation der Rfc1-Aktivität in HPCT-1E3-Zellen durch Modulatoren der Phosphorylierung.....	99
5.3.4	Beteiligung der PKC an der Regulation der Rfc1-Aktivität in HPCT-1E3-Zellen durch Cytochrom P450-Induktoren vom PB-Typ und TCPOBOP.....	102
5.4	Ausblick.....	103
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	107
7	SUMMARY.....	109
8	LITERATURVERZEICHNIS.....	111
9	ANHANG.....	138
10	DANKSAGUNG.....	149

TABELLENVERZEICHNIS

- Tab. 1: Import- und Efflux-Transporter für Methotrexat bei Mensch und Ratte.
- Tab. 2: Versuchsprotokoll zur Inkubation der HPCT-1E3-Zellen mit Modulatoren der Phosphorylierung.
- Tab. 3: Real time PCR Primer und Proben: Sequenzen und zu erwartende Produktgrößen.
- Tab. 4: Statistische Signifikanz der Beeinflussung der Rfc1-vermittelten ³[H]-Methotrexat-Aufnahme durch Cytochrom P450-Induktoren vom PB-Typ.
- Tab. 5: Beeinflussung der natriumabhängigen, Rfc1-vermittelten bzw. der natriumunabhängigen ³[H]-Methotrexat-Aufnahmerate (V_{influx}) durch Cytochrom P450-Induktoren vom PB-Typ bzw. Modulatoren der Phosphorylierung.

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Abb. 1: Strukturformel der 2-[4-[(2,4-diaminopteridin-6-yl)methyl-methyl-amino]-benzoyl]aminopentandicarbonsäure (MTX).
- Abb. 2: Modell der hepatozellulären Rfc1 Proteinstruktur der Ratte.
- Abb. 3: Schematische Darstellung der Rezeptor-vermittelten transkriptionellen Regulation fremdstoffmetabolisierender Enzyme der Cytochrom P450-Superfamilie, von Phase II-Enzymen und Transportproteinen bei Mensch, Ratte und Maus.
- Abb. 4: Hypothetischer Mechanismus der PB-vermittelten Regulation der hepatozellulären Expression von Cytochrom P450 2B Genen bei Mensch, Ratte und Maus.
- Abb. 5: Schematische Darstellung der PB-vermittelten transkriptionellen Regulation von Cytochrom P450_{BM-3} (CYP102) in *Bacillus megaterium*.
- Abb. 6: Schematische Darstellung der Quantifizierung des Rfc1 Proteins in HPCT-1E3-Zellen.
- Abb. 7: Toxizität von Phenobarbital, Carbamazepin und Diazepam in HPCT-1E3-Zellen.
- Abb. 8: Toxizität von Chlorpromazin und Haloperidol in HPCT-1E3-Zellen.
- Abb. 9: Toxizität von Clotrimazol und Amphotericin B in HPCT-1E3-Zellen.
- Abb. 10: Toxizität von TCPOBOP in HPCT-1E3-Zellen.
- Abb. 11: Einfluss von Phenobarbital auf die Rfc1-vermittelte FMTX-Aufnahme in HPCT-1E3-Zellen in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer.
- Abb. 12: Einfluss von Phenobarbital, Carbamazepin und Diazepam auf die Rfc1-vermittelte Aufnahme von FMTX.
- Abb. 13: Einfluss von Chlorpromazin und Haloperidol auf die Rfc1-vermittelte Aufnahme von FMTX.
- Abb. 14: Einfluss von Clotrimazol und Amphotericin B auf die Rfc1-vermittelte Aufnahme von FMTX.
- Abb. 15: Einfluss des direkten CAR-Agonisten TCPOBOP auf die Rfc1-vermittelte FMTX-Aufnahme.
- Abb. 16: Beeinflussung der ³[H]-MTX-Aufnahme in HPCT-1E3-Zellen durch Phenobarbital und Carbamazepin.

- Abb. 17: $^3\text{[H]}$ -MTX-Aufnahme in HPCT-1E3-Zellen nach Vorbehandlung mit Diazepam.
- Abb. 18: Beeinflussung der $^3\text{[H]}$ -MTX-Aufnahme in HPCT-1E3-Zellen durch Chlorpromazin.
- Abb. 19: Beeinflussung der $^3\text{[H]}$ -MTX-Aufnahme in HPCT-1E3-Zellen durch Clotrimazol.
- Abb. 20: Beeinflussung der $^3\text{[H]}$ -MTX-Aufnahme in HPCT-1E3-Zellen durch den CAR-Agonisten TCPOBOP.
- Abb. 21: Nachweis der Spezifität der Rfc1 Primer.
- Abb. 22: Einfluss von Phenobarbital und dem direkten CAR-Agonisten TCPOBOP auf die Rfc1-Genexpression in HPCT-1E3-Zellen.
- Abb. 23: Einfluss von Phenobarbital, TCPOBOP und Diazepam auf die Rfc1-Proteinmenge in HPCT-1E3-Zellen.
- Abb. 24: Beeinflussung der Rfc1-vermittelten $^3\text{[H]}$ -MTX-Aufnahme in HPCT-1E3-Zellen durch den PKC-Induktor PMA und/oder den Phosphatase 1/2A-Inhibitor Okadainsäure (OA) bzw. PMA und/oder den PKC-Inhibitor Bisindolylmaleimid (BIM).
- Abb. 25: Beeinflussung der Rfc1-vermittelten $^3\text{[H]}$ -MTX-Aufnahme in HPCT-1E3-Zellen durch PKA-Modulatoren.
- Abb. 26: Beteiligung der Proteinkinase C an der Regulation der Rfc1-vermittelten Aufnahme von $^3\text{[H]}$ -MTX in HPCT-1E3-Zellen durch Cytochrom P450-Induktoren.

ABKÜRZUNGEN

AA	Androstanol
Abb.	Abbildung
ABC	ATP binding cassette
AE	Androstenol
abh.	abhängig
AhR	Aryhydrocarbonrezeptor
AhR/ARNT	Aryhydrocarbon/Aryhydrocarbon receptor nuclear translocator
AK	Antikörper
ALL	Akute Lymphatische Leukämie
AML	Akute Myeloische Leukämie
AMP	Adenosinmonophosphat
AP1	Aktivatorprotein 1
AP2	Aktivatorprotein 2
ARNT	Aryhydrocarbon receptor nuclear translocator
AS	Aminosäuren
Aqua dest.	destilliertes Wasser
BCA	Bicinchoninsäure
BCRP	breast cancer resistance protein
BHQ	Black Hole Quencher
kBq	Kilobecquerel
bidest	bidestillatus
BIM	Bisindolylmaleimid
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bspw.	beispielsweise
bZIP	leucine-rich dimerization domain
bzw.	beziehungsweise
DB- cAMP	Dibutyryl-3',5'cyclo-Adenosinmonophosphat
ca.	circa
Caco-2-Zellen	humane Colonkarzinomzellen
CAR	Constitutive androstane receptor
cDNA	komplementäre DNA
C/EBP	CCAAT/enhancer binding protein
Ci	Curie
CLL	Chronische Lymphatische Leukämie
CO ₂	Kohlendioxid
Co-reg	Ko-Regulatoren
COS-Zellen	immortale Zellen abgeleitet aus der Niere vom Affen
cpm	Zähler pro Minute

CPZ	Clorpromazin
cMOAT	multispecific organic anion transporter
C _T	Treshhold Cycle
CTZ	Clotrimazol
CYP450	Cytochrom P450
d	Tag
DAG	1,2-Diacylglycerol
DEHP	Di(2-ethylhexyl)phthalat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
d.h.	das heisst
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DIDS	4,4'-Diisothiocyantostilben-2,2'-disulfonat
DMEM	Dulbecco modified Eagle's medium
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
dpm	Zerfall pro Minute
ED	effektive Dosis
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Endkonz.	Endkonzentration
ER	Östrogenrezeptor
ERM-Familie	Ezrin-, Radixin-, Moesin-Familie
EtOH	Ethanol
6-FAM	6-Carboxyfluorescein
FCS	fötales Kälberserum
FMTX	fluoreszenzmarkiertes Methotrexat
FOLR	Folatrezeptor
FPGS	Folylpolyglutamatsynthetase
FS	Fettsäuren
FXR	Farnesoid X receptor
g	Schwerebeschleunigung
GAT1	γ-Aminobutytrattransporter
GGH	γ-Glutamylhydrolase
GITC	Guanidinisothiocyanat
GR	Glukokortikoidrezeptor
GRE	Glucocorticoid response element
GST	Gluthation-S-Transferase
h	Stunde
³ [H]	Tritium
HAK	Halogenierte aromatische Kohlenwasserstoffe

HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonsäure
HepG2	Humane Hepatomzellen
HNFB3A	Hepatocyte nuclear factor B3A
H ₂ O	Wasser
HPCT	Hepatocytoma
HRP	Meerrettichperoxidase
IC	Hemmkonzentration
IEC-6-cells	Darmepithelzellen der Ratte
i.d.R.	in der Regel
i.v.	intravenös
kDA	kiloDalton
KN-62/-93	Ca ⁺⁺ /calmodulin-abhängiger Kinase-Inhibitor-62/-93
KPP	Kalium-Phosphat-Puffer
LLC-PK1	immortalisierte Schweinenierenzelllinie
LSC	Flüssigkeitsszintillationszähler
LXR	Liver X receptor
max.	maximal
3-MC	3-Methycholanthren
MDCK	Madin Darby canine kidney Zellen
MDR	Multidrug resistance
mEH	mikrosomale Epoxidhydrolase
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mind.	mindestens
min	Minuten
MK 571	(3)-3-[[[3-[2-(7-chloro-2-quinolinyl)ethenyl]phenyl][[3-(dimethylamino)-3-oxopropyl]thio]methyl]thio]-propansäure
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MRP	Multidrug resistance-associated protein
MTX-1	Methotrexate carrier-1
Mtx	Methotrexat
MW	Mittelwert
Na ⁺	Natriumionen
Na-abh.	natriumabhängig
NADC-1	Na ⁺ /Dicarboxylat-Kotransporter-1
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Hydrophosphat
NaPi-II	Na/P _i -Kotransporter-2
Na-unabh.	natriumunabhängig
NF1	Kernfaktor1
NF-κB	Kernfaktor-κB

ng	Nanogramm
NHE1	Natrium-Protonen-Austauscher
NR	Kernrezeptor
n.s.	nicht signifikant
OA	Okadainsäure
OAT	Organic anion transporter
OATP	Organic anion transporting polypeptide
OH	Hydroxy
P	Phosphor
p.a.	pro analysis
PAK	Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PB	Phenobarbital
PBREM	Phenobarbital responsive enhancer module
PBRE-NR	Phenobarbital responsive enhancer-nuclear receptor
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCN	Pregnenolon-16 α -Carbonitril
PE	Positive Element
PFA	Paraformaldehyd
P-gp	P-glycoprotein
pH	potentia Hydrogenii
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-myrestat-13-acetat
pmol	Picomol
PP 1/2A	Proteinphosphatase 1/2A
PPAR	Peroxisome proliferator activated receptor
p.o.	per os
PXR	Pregnane X receptor
RE	Response element
Rfc1	reduced folate carrier1
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
RT-PCR	Reverse Transkriptions-Polymerasekettenreaktion
RXR	Retinoid X receptor
s.	siehe
s	Sekunde
S	Svedberg
SA	spezifische Aktivität
SD	Standardabweichung
SD Ratten	Sprague-Dawley Ratten
SDS	Natriumdodecylsulfat

SEM	Standardabweichung des Mittelwertes
SHP	Short heterodimer partner
Slc	Solute carrier
SNP	Einzelnukleoidpolymorphismus
sog.	so genannt
Sp1	Simian virus 40 Promoterfaktor1
SRC-1	Steroid Ko-Aktivator-1
Sult2a1	zytosolische Sulfotransferase2a1
t	Zeit
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris-Borat-EDTA
TCDD	2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin
TCPOBOP	1,4-Bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzen
TexRed	Texas Red
TMB	Tetramethylbenzidin
Transportprot.	Transportproteine
U	Einheit
u.a.	unter anderem
UGT	UDP-Glukoronosyltransferase
V_{influx}	Geschwindigkeit des MTX-Influx
XRE	Xenobiotic response element
β	Beta
β ME	β -Merkaptoethanol
μ g	Mikrogramm

1 EINLEITUNG

Arzneimittelinteraktionen spielen im Rahmen der heute in der Klinik üblichen polytherapeutischen Regime eine immer größere Rolle. Diese führen entweder zu einer Steigerung der therapeutischen Wirkung oder verstärken umgekehrt unerwünschte toxische Effekte des Pharmakons bzw. haben eine Reduktion der Therapieeffizienz zur Folge (PATSALOS et al. 2002). Von wichtiger klinischer Bedeutung ist u.a. die Interaktion des Chemotherapeutikums Methotrexat (MTX) mit Antiepileptika, welche zur Gruppe der sog. „Cytochrom P450-Induktoren vom PB-Typ“ gehören (VECHT et al. 2003a; s. 2.3.1.1). Methotrexat (MTX, Amethopterin) wird seit vielen Jahren in der Human- sowie in der Veterinärmedizin zur Behandlung neoplastischer und nicht neoplastischer Erkrankungen wie dem malignen Lymphom oder osteogenen Sarkomen bzw. der rheumatoiden Arthritis eingesetzt (COTTER u. PARKER 1978, LINK u. HIRSCHBERGER 1999, GROMNICA-IHLE 2002, KINOSHITA 2003, ZELCER et al. 2005). Der Wirkmechanismus des Folsäureantagonisten beruht aufgrund der großen strukturellen Ähnlichkeit zur Folsäure auf der kompetitiven Hemmung des Enzyms Dihydrofolatreduktase (DHFR) und damit der Inhibition der Synthese von Nukleinsäure-Vorstufen (STACHER u. LUTZ 1996, JOSTING et al. 1998). Die Ko-Therapie von Zytostatika wie MTX und Antiepiletika ist in der Klinik vielfach indiziert, da Epilepsie eine häufige Komplikation bei Krebspatienten darstellt (VECHT et al. 2003b). Krampfanfälle treten bspw. bei 20-70% der Patienten mit primären und sekundären Hirntumoren (VILLEMURE u. DETRIBOLET 1996, VECHT 1998, MANGANO et al. 2002) sowie bei ca. 10-20% der ALL-Patienten auf (RELLING et al. 2000). RELLING et al. (2000) bzw. RIVA et al. (2000) zeigten, dass die Vorbehandlung mit den PB-artigen Induktoren Phenobarbital (PB), Carbamazepin und Phenytoin zu deutlich verminderten intrazellulären MTX-Wirkspiegeln führte. Dies hatte eine Reduktion der Chemotherapieeffizienz und damit eine maßgebliche Verschlechterung der Patientenprognose zur Folge.

In niedriger Konzentration wird Methotrexat durch sättigbare und energieabhängige Transportproteine in die Zelle aufgenommen bzw. ausgeschieden. Die MTX-Aufnahme wird vornehmlich über den Reduced Folate Carrier/Reduced folate carrier (RFC/Rfc; SLC19A1/Slc19a1) vermittelt, welcher bei neutralem pH-Wert bis zu 90% natriumabhängig ist (DIXON et al. 1994, WILLIAMS et al. 1994, MOSCOW et al. 1995, HONSCHA et al. 2000, KNEUER et al. 2004). Das Transportprotein wird nahezu ubiquitär exprimiert und ist in Geweben des Gastrointestinaltraktes sowie des Plexus choroideus apikal bzw. in Niere und Leber basolateral lokalisiert (WANG et al. 2001, WHETSTINE et al. 2002a, HINKEN 2005).

Der hepatozelluläre Rfc1 der Ratte, ein 58 kDA großes Protein, weist auf Proteinebene zwei mögliche Phosphorylierungsstellen und im Promotorbereich des Gens u.a. ein durch Induktoren vom PB-Typ regulierbares Genelement auf, welches bisher insbesondere bei fremdstoffmetabolisierenden Enzymen der Cytochrom P450 Familie nachgewiesen werden konnte (LIANG et al. 1995, HONSCHA et al. 2000).

Cytochrom P450 Enzyme sind im Rahmen der sog. „Phase I-Reaktion“ im Zusammenspiel mit Phase II-Enzymen in den Metabolismus verschiedenster Arzneimittel und Xenobiotika involviert und stehen im engen Zusammenhang mit membranständigen Transportproteinen, welche die Elimination der Metaboliten vermitteln. Deren koordinierte Regulation gewährleistet die gerichtete Aufnahme in die Zelle, den Metabolismus und die nachfolgende Exkretion der jeweiligen Substanz und stellt somit einen wichtigen zellulären Schutzmechanismus gegenüber toxischen Nebenwirkungen von Fremdstoffen dar (RUSHMORE u. KONG 2002).

Grundsätzlich wird die Pharmakokinetik verschiedenster Arzneimittel und Xenobiotika, welche carrier-vermittelt in Zellen transportiert werden, über direkte Interaktionen am Transportprotein oder durch die Regulation der Transporteraktivität beeinflusst. Letztere kann auf Ebene der Transkription durch Regulation der Genexpression oder durch Phosphorylierung und/oder Internalisierung des Transportproteins im Rahmen einer posttranslationalen Regulation erfolgen. Diese Regulationsmechanismen finden in Abstimmung mit der Phase I- und II-Enzymregulation statt und können im Falle von Arzneimittelwechselwirkungen wie bspw. zwischen Methotrexat und „Induktoren vom PB-Typ“ zu verminderten Arzneistoffwirkspegeln führen und auf diese Weise die Effizienz einer Pharmakotherapie erheblich mindern.

Anhand einer Reihe von Studien zur transkriptionellen Regulation von Arzneistoffwechselwegen konnte in diesem Zusammenhang übereinstimmend gezeigt werden, dass fremdstoffmetabolisierende Enzyme und ebenso Transportproteine durch Kernrezeptoren wie dem „Constitutive Androstane Receptor (CAR)“ reguliert werden (XU et al. 2005). Der CAR-Rezeptor vermittelt die Phenobarbital-bedingte Regulation der hepatozellulären Cytochrom P450 2B-Genexpression beim Menschen, der Ratte und der Maus durch die Bindung an das sog. „Phenobarbital-responsive enhancer module (PBREM)“ innerhalb der distalen Promotorregion des Cytochrom P450 2B Gens (SUEYOSHI u. NEGISHI 2001). Phenobarbital stellt hierbei den Prototyp einer großen Gruppe von strukturell unterschiedlichen Substanzen wie dem Antiepileptikum Carbamazepin, dem Antimykotikum Clotrimazol oder dem Zytostatikum Cyclophosphamid dar, welche die

transkriptionelle Regulation der Genexpression von Phase I und II-Enzymen sowie Transportproteinen bedingen (SUEYOSHI u. NEGISHI 2001, XU et al. 2005). So konnte bspw. die Induktion der hepatozellulären MRP2/Mrp2-Genexpression (cMOAT, ABCC2/Abcc2) nach Vorbehandlung mit spezifischen CAR-Induktoren wie PB nachgewiesen werden (KAST et al. 2002, STAUDINGER et al. 2003). Das in der kanalikulären Hepatozytenmembran lokalisierte Transportprotein vermittelt die Elimination zahlreicher endogener und exogener organischer Anionen wie Methotrexat (BORST et al. 2000).

Neben der Regulation der Genexpression spielt im Rahmen des carrier-vermittelten Arzneimitteltransports ebenso die schnelle und kurzfristige posttranslationale Regulation von Transportproteinen eine wichtige Rolle, welche u.a. durch die Proteinkinase C (PKC) oder die Proteinkinase A (PKA) vermittelt wird. Anhand zahlreicher *in vivo*- sowie *in vitro*-Studien wurde bspw. die PKC- bzw. die PKA-vermittelte posttranslationale Regulation von Transportproteinen wie z.B. von OAT1 (YOU et al. 2000, WOLFF et al. 2003) durch direkte Phosphorylierung des Proteins (VAUGHAN et al. 1997, CONRADT u. STOFFEL 1997, LEDERER et al. 2003) oder durch Veränderung der Transportproteindichte in der Plasmamembran (HIRSCH et al. 1996, RAMAMOORTHY et al. 1998, ROELOFSEN et al. 1998) nachgewiesen.

Aufgrund der hier diskutierten zunehmenden Bedeutung von Arzneimittelinteraktionen im Rahmen einer MTX-Chemotherapie und der koordinierten Regulation von fremdstoffmetabolisierenden Enzymen und Transportproteinen durch Kernrezeptoren soll innerhalb dieser Arbeit die Regulation des Transportproteins Rfc1 durch Induktoren vom PB-Typ und dem CAR-Agonisten 1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzen (TCPOBOP) systematisch in einem der *in vivo*-Situation nahestehenden *in vitro*-Zellkulturmodell (HALWACHS et al. 2005; s. 2.4 und Anhang) untersucht werden. Von besonderem Interesse ist hierbei eine mögliche Beteiligung der postulierten Genregulationselemente bzw. des Kernrezeptors CAR.

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 Methotrexat

2.1.1 Wirkungsweise und Einsatz in Human- und Veterinärmedizin

Das Chemotherapeutikum Methotrexat (MTX, Amethopterin, 2-[4-[(2,4-diaminopteridin-6-yl)methyl-methyl-amino]benzoyl]aminopentandicarbonsäure, s. Abb. 1) gehört zur Gruppe der sog. „Antimetabolite“. Der Wirkmechanismus des Folsäureantagonisten beruht aufgrund der großen strukturellen Ähnlichkeit zur Folsäure insbesondere auf der kompetitiven Hemmung des Enzyms Dihydrofolatreduktase (DHFR). Nachfolgend wird die Bildung von 5-Methyltetrahydrofolat und anderen reduzierten Folaten, die als Kofaktoren für die Purin- und Pyrimidinsynthese dienen, inhibiert (KAMEN 1997, JOSTING et al. 1998). Diese Synthesehemmung von Nukleinsäure-Vorstufen zeichnet MTX als S-Phasen-spezifisches Zytostatikum aus (STACHER u. LUTZ 1996). In Folge der Anreicherung von Dihydrofolat und dem Mangel an 5-Methyltetrahydrofolat, dem Substrat der Thymidylatsynthetase, kommt es weiterhin zu einer Hemmung der enzymvermittelten Thymidin-Synthese.

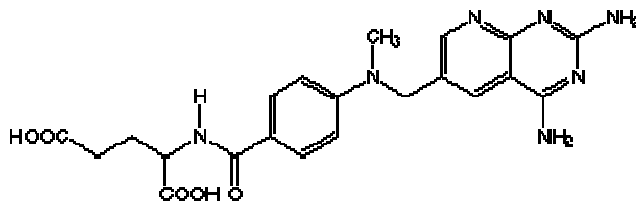


Abb. 1: Strukturformel der 2-[4-[(2,4-diaminopteridin-6-yl)methyl-methyl-amino]benzoyl]aminopentandicarbonsäure (MTX).

In der Humanmedizin wurde MTX erstmalig 1949 eingeführt. Der Folsäureantagonist wird meist in Kombination mit anderen Zytostatika, im Rahmen einer mittelhoch dosierten MTX-Therapie (100-1000 mg/m² i.v.) bei gastrointestinalen Tumoren, Non-Hodgkin-Lymphomen (JOSTING et al. 1998) und akuten Leukämien (KINOSHITA et al. 2003) bzw. im Rahmen einer Hochdosis (HD)-MTX-Therapie (8-12 g/m² i.v.) bei osteogenen Sarkomen (JOSTING et al. 1998, ZELCER et al. 2005) sowie Tumoren im Kopf- Nacken- und Brustbereich

(BARNAJEE et al. 2002), eingesetzt. Weiterhin findet Methotrexat in niedriger Dosierung (5-25 mg/Woche p.o.) in der Rheumatologie und Immunologie zur Behandlung der rheumatoiden Arthritis, dem Reiter-Syndrom oder der Psoriasis vulgaris Anwendung (JOSTING et al. 1998, GROMNICA-IHLE 2002, PRODANOWICH et al. 2005). Toxische Nebenwirkungen des Chemotherapeutikums manifestieren sich aufgrund der hohen Zellproliferationsrate vor allem in Schleimhautepithelien und hämatopoetischen Zellen des Knochenmarks in Form einer Stomatitis sowie Übelkeit und Diarrhoe bzw. einer ausgeprägten Myelosuppression. Ferner sind Leberschäden in Form von Hepatitiden und Fibrosen, neurologische Störungen und renale Dysfunktion beschrieben worden (JOSTING et al. 1998).

Die Therapie neoplastischer Erkrankungen hat auch in der Veterinärmedizin in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen. Tumorerkrankungen stellen eine zentrale Todesursache bei Hund und Katze dar (BRONSON 1982), wobei die Prävalenz kontinuierlich ansteigt (DORN 1976). Die Gründe hierfür liegen u.a. in der gestiegenen Lebenserwartung der Tiere (WITHROW 1996). Die wachsende Bedeutung von Haustieren in der Gesellschaft und damit die finanzielle Bereitschaft und der Wunsch vieler Tierbesitzer zur Behandlung neoplastischer Erkrankungen geht mit dieser Entwicklung einher (DARBES et al. 1999). Im Gegensatz zur chirurgischen und radiotherapeutischen Behandlung von Tumoren werden Zytostatika in der Veterinärmedizin nicht mit dem Ziel der Heilung des Patienten, sondern im Rahmen der sog. „palliativen Chemotherapie“ zur Verbesserung der Lebensqualität ohne Lebensverlängerung, eingesetzt (KESSLER 1999). Methotrexat wird hierbei überwiegend in Kombinationsprotokollen mit anderen Chemotherapeutika zur Behandlung von Lymphomen und lymphatischen Leukämien (MACEWEN et al. 1981, BORTNOWSKI u. ROSENTHAL 1991, LINK u. HIRSCHBERGER 1999, TESKE 1999), dem Osteosarkom (COTTER u. PARKER 1978), myeloproliferativen Syndromen sowie dem Sertoli-Zelltumor (OGILVIE u. MOORE 1995) und dem Sticker-Sarkom (BROWN et al. 1980) angewendet. Bei Hunden und Katzen sind als Nebenwirkungen schwere Myelosuppression, akute renale Tubulusnekrose, Hepatotoxizität, gastrointestinale Toxizität in Form von Vomitus und Diarrhoe sowie Haarausfall beschrieben worden (OGILVIE 1996, HIRSCHBERGER et al. 2000, RUSLANDER 1999). Die gebräuchliche Dosierung ist aufgrund dieser Nebenwirkungen niedriger als in der Humanmedizin und beträgt $2,5 \text{ mg/m}^2$ p.o. tgl. bzw. $0,6-0,8 \text{ mg/m}^2$ i.v. alle drei Wochen (RUSLANDER 1999).

2.1.2 Pharmakokinetik

Im Rahmen der HD-MTX-Therapie beim Menschen ($8-12 \text{ g/m}^2$ über 6 h) liegen die Serumspiegel 24 h nach Beginn der Therapie unter $3 \mu\text{M}$, nach 48 h unter $0,3 \mu\text{M}$ und nach 72 h unter $0,1 \mu\text{M}$, wobei die Elimination biphasisch erfolgt (HEINEMANN et al. 2001).

In niedriger Konzentration wird das zweifach negativ geladene Methotrexat durch sättigbare und energieabhängige Transportproteine in die Zelle aufgenommen bzw. ausgeschieden (JOSTING et al. 1998, s. Tab. 1). Die MTX-Aufnahme wird durch Vertreter der Organischen Anionen Transportierenden Polypeptide (OATP, SLC21), der Organischen Anionen Transporter (OAT, SLC22) und des Reduced Folate Carrier (RFC1, SLC19A1) vermittelt. Die Elimination des Chemotherapeutikums erfolgt durch Vertreter der Multidrug Resistance-Associated Proteine (MRP, ABCC) der ATP-binding cassette (Abc)-Superfamilie. Bei hohen extrazellulären Konzentrationen, wie sie im Rahmen einer HD-MTX-Therapie entstehen, passiert der Folsäureantagonist zusätzlich über passive Diffusionsmechanismen die Zellmembran (HILL et al. 1979, BERGER et al. 1996).

Die Elimination von Methotrexat erfolgt bei Applikation konventioneller Dosen von $20-500 \text{ mg/m}^2$ bis zu 90% durch glomeruläre Filtration und tubuläre Sekretion über die Niere, wobei das Pharmakon größtenteils in unveränderter Form im Urin vorliegt (KAMEN 1997, JOSTING et al. 1998). Ferner unterliegt MTX zu ca. 10% der hepatobiliären Elimination. Der Anteil der nicht-renalen Ausscheidung nimmt mit steigender Plasmakonzentration zu und erreicht im Rahmen einer HD-MTX-Therapie maximal 50% (LUI 1985, KAMEN 1997). Insgesamt konnten drei MTX-Metabolite identifiziert werden. Über die hepatozelluläre Aldehydoxidase wird MTX zu dem vielfach schwächer wirksamen 7-Hydroxy-MTX abgebaut, welches eine 6fach schlechtere Wasserlöslichkeit als MTX aufweist. In der Folge kommt es im Rahmen der Primärharnbildung zur Präzipitation des Metaboliten. Bei Patienten mit akuten Nierenversagen liegt 7-OH-MTX in den Nierentubuli bspw. bis zu 70% in kristalliner Form vor und trägt somit entscheidend zur MTX-Nephrotoxizität bei (BERTINO 1981, JOSTING et al. 1998). Ferner wird das Zytostatikum intrazellulär durch die Folylpolylglutamatsynthetase (FPGS) zu dem aktiven Metaboliten MTX-Polyglutamat metabolisiert. Der Metabolit weist ebenfalls eine hohe Affinität zur DHFR, aber eine geringere Dissoziationskonstante als MTX auf. Darüber hinaus erfolgt die intrazelluläre Retention der MTX-Polyglutamate aufgrund deren hohen Molekulargewichts. Dies trägt entscheidend zur Selektivität der Antifolatwirkung bei (POSER et al. 1981, FABRE et al. 1984, CHABNER et al. 1985). Die Bildung des inaktiven Metaboliten 4-amino-4-deoxy-N10-

Tab. 1: Import- und Efflux-Transporter für Methotrexat bei Mensch und Ratte.

Protein	Gensymbol	Spezies	Gewebelokalisation	Membranlokalisierung	Referenz	
Import						
Oat1	Slc22a6 §	Ratte	Niere	} basolateral	SEKINE et al. 1997	
Oat2	Slc22a7	Ratte	Leber		SIMONSON et al. 1994, SEKINE et al. 1998,	
Oat3/ OAT3	Slc22a8/ SLC22A8	Ratte Mensch	Leber/ Niere		KOJIMA et al. 2002	
OATP4C1	SLCO4C1	Mensch	Niere		MIKKAICHI et al. 2004	
OATP1B1	SLCO1B1	Mensch	Leber		} HAGENBUCH u. MEYER 2004	
OATP1B3	SLCO1B3	Mensch	Leber			
Rfc1/ RFC1	Slc19a1/ SLC19A1	Ratte Mensch	Leber/ Niere		HONSCHA et al. 2000, KNEUER et al. 2004	
Efflux						
Oat2	Slc22a7	Ratte	Niere		} apikal	KOJIMA et al. 2002
OAT4	SLC22A11	Mensch	Niere			TAKEDA et al. 2002
Oatp1a3	Slco1a3	Ratte	Niere	SAITO et al. 1996		
Mrp1-3/ MRP1-3	Abcc1-3/ ABCC1-3	Ratte Mensch	Niere	} KRUH u. BELINSKY 2003		
MRP4	ABCC4	Mensch	Niere			
Mrp1 u. 3/ MRP1 u. 3	Abcc1 u. 3/ ABCC1 u. 3	Ratte Mensch	Leber	} basolateral		

§ = Alle in Großbuchstaben aufgeführten Symbole bezeichnen humane Gene bzw. Genprodukte, während diese von Nagern gemäß der vereinbarten Nomenklatur für Transportproteine mit Kleinbuchstaben gekennzeichnet werden (HEDIGER et al. 2004).

methylpteroylsäure (DAMPA) durch Darmbakterien spielt dagegen quantitativ nur eine untergeordnete Rolle (DONEHOWER et al. 1979).

2.1.3 Chemoresistenz gegenüber Methotrexat

Der limitierende Faktor jeder Chemotherapie neoplastischer Erkrankungen stellt die Entstehung einer Resistenz der Tumorzelle gegenüber dem Chemotherapeutikum dar. In der Klinik wird grundsätzlich zwischen der intrinsischen und einer erworbenen Tumorzellresistenz unterschieden. Die intrinsische Resistenz beschreibt eine immanente Eigenschaft der Tumorzellen, welche nicht durch eine Zytostatika-Exposition bedingt ist. Dagegen entwickelt sich die sog. „erworbene Resistenz“ erst nach Exposition der Tumorzellen mit dem Chemotherapeutikum (BANERJEE et al. 2002). In den letzten Jahren konnte eine Reihe von Resistenzmechanismen von Tumorzellen gegenüber dem Antifolat MTX aufgedeckt werden, welche die zelluläre MTX-Aufnahme, den Metabolismus sowie den Export des Folsäureantagonisten betreffen.

2.1.3.1 Transport-assoziierte Chemoresistenz

Der verminderte Transport des Chemotherapeutikums stellt im Rahmen der erworbenen Chemoresistenz gegenüber Methotrexat einen zentralen Resistenzmechanismus zahlreicher Tumorzellen dar (BANERJEE et al. 2002).

In niedrigen Dosierungen erfolgt die MTX-Aufnahme in erster Linie RFC-/Rfc-vermittelt durch einen aktiven Transportmechanismus (GOLDMAN u. MATHERLY 1986, s. 2.2.3.2). Durch Studien an immortalen Zelllinien sowie Tumorzellen von ALL-Patienten oder osteogenen Sarkomen konnte die Entstehung einer Resistenz nach Gabe von MTX aufgrund einer verminderten RFC-vermittelten Transportaktivität beobachtet werden (TRIPPETT et al. 1992, FLINTOFF et al. 2004). Weiterhin konnten GORLICK et al. (1997) sowie GUO et al. (1999) zeigen, dass dieser Aktivitätsverlust in Zusammenhang mit einer verminderten RFC-Transkriptionsrate steht. Zudem führen Punktmutationen im Rfc-Gen zur Entstehung eines inaktiven Proteins sowie einer veränderten Proteinstabilität, zellulären Lokalisation und Substratspezifität (ZHAO et al. 1998, 1999; SADLISH et al. 2000). ZHAO et al. (1998) beschrieben bspw. das Auftreten einer Rfc-Genmutation, welche die Substitution der

Aminosäure Serin durch Asparagin an Position 46 zur Folge hatte. Dies führte, bedingt durch eine veränderte Mobilität des Transportproteins, zu einem eingeschränkten Rfc-vermittelten MTX-Transport in einer Rfc-transfizierten immortalen Zelllinie.

Neben einer verminderten Aufnahme ist eine verstärkte zelluläre Ausscheidung des Chemotherapeutikums ein weiterer Mechanismus der Chemoresistenz zahlreicher Tumorzellen. Die Effluxcarrier MRP1-4/Mrp1-4 vermitteln die Elimination von organischen Anionen wie z.B. MTX, wobei viele Tumorgewebe eine erhöhte Expressionsrate dieser Transportproteine aufweisen (CHEN et al. 2002, MATHERLY u. GOLDMAN 2003). HOOIJBERG et al. (1999) konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass MRP-transfizierte Tumorzellen eine erhöhte Resistenz gegenüber MTX aufwiesen. Ferner konnte mittels *in vitro*-Studien die Beteiligung des Exportcarriers BCRP an der Ausbildung einer MTX-Resistenz nachgewiesen werden (VOLK et al. 2002, KAGER et al. 2005).

2.1.3.2 Metabolische Chemoresistenz

Die Selektivität der Antifolatwirkung ist in hohem Maße abhängig von der Bildung und intrazellulären Akkumulation von MTX-Polyglutamaten, die durch die Expression und die Aktivität der Enzyme FPGS (FABRE et al. 1984, KAMEN 1997; s. 2.1.2) und GGH, welche für den Abbau der MTX-Polyglutamate verantwortlich ist (GALIVAN et al. 1997), reguliert wird. So konnte in einer Reihe von Studien an ALL-Tumorzellen gezeigt werden, dass diese im Vergleich zu benignen Zellen signifikant weniger MTX-Polyglutamate anreichern (LIN et al. 1991, GOKER et al. 1993, BARREDO et al. 1994, SYNOLD et al. 1994, KAGER et al. 2005). Diese reduzierte Akkumulation ist entweder bedingt durch eine verminderte Expression und Aktivität der FPGS (LENZ et al. 1994) oder einer erhöhten GGH-Aktivität (RHEE et al. 1993).

Weiterhin wurden eine verminderte Affinität von MTX für das Enzym DHFR durch Punktmutationen im DHFR-Gen sowie eine gesteigerte DHFR-Genexpression bzw. Proteinmenge bei gleichzeitigem Anstieg der DHFR-Aktivität als weitere Mechanismen einer erworbenen MTX-Chemoresistenz beschrieben (GOKER et al. 1995, SPENCER et al. 1996, BANERJEE et al. 2002).

2.1.3.3 Arzneimittelinteraktionen

2.1.3.3.1 Überblick

Im Rahmen der heute üblichen polytherapeutischen Regime spielen Arzneimittelinteraktionen in der Klinik eine immer größere Rolle und stellen neben der Entstehung von Tumorzellresistenzen den limitierenden Faktor einer erfolgreichen Chemotherapie dar (VECHT et al. 2003a). Prinzipiell werden Arzneimittelinteraktionen in pharmakokinetische und pharmakodynamische Wechselwirkungen unterteilt. Eine pharmakokinetische Interaktion liegt vor, wenn ein Pharmakon Absorption, Verteilung, Metabolismus oder Elimination eines zweiten Arzneimittels beeinflusst. Dies resultiert in einer veränderten Plasmakonzentration und somit in einer veränderten Wirksamkeit des zweiten Arzneimittels oder dessen Metaboliten. Dagegen ist die pharmakodynamische Arzneimittelinteraktion durch den ähnlichen oder entgegengesetzten pharmakologischen Mechanismus zweier Substanzen gekennzeichnet. Diese Interaktion findet auf zellulärer Ebene statt und resultiert nicht in einer Änderung der Arzneimittelplasmaspiegel (PATSALOS et al. 2002). Sowohl pharmakokinetische als auch pharmakodynamische Arzneimittelwechselwirkungen führen entweder zu einer Steigerung der therapeutischen Wirkung oder verstärken umgekehrt unerwünschte toxische Effekte des Pharmakons bzw. haben eine Reduktion der Therapieeffizienz zur Folge (KAPETANOVIC et al. 1981, BINNIE et al. 1986, BAKER et al. 1992).

2.1.3.3.2 Cytochrom P450-Induktoren und Methotrexat

In einer Reihe von klinischen Studien sind pharmakokinetische Arzneimittelinteraktionen zwischen Cytochrom P450-Induktoren und Methotrexat beschrieben worden (s. Übersichtsarbeit von VECHT et al. 2003a). Der Metabolismus der meisten Medikamente wird durch ein oder mehrere Enzyme der Cytochrom P450 Familien 1, 2 und 3 vermittelt (WRIGHTON u. STEVENS 1992, s. 2.3.1). Die Aktivität dieser Isoenzyme kann durch Xenobiotika entweder induziert oder gehemmt werden. Wie in 2.1.2 beschrieben kommt es im Rahmen einer MTX-Hochdosistherapie zur intrazellulären Akkumulation von MTX-Metaboliten. RELLING et al. (2000) und RIVA et al. (2000) konnten anhand klinischer Studien eine verminderte intrazelluläre Anreicherung von Methotrexat nach Gabe der Cytochrom P450-Induktoren Phenobarbital, Carbamazepin und Phenytoin nachweisen.

Weiterhin lieferte eine *in vitro*-Studie den Hinweis auf eine Reduktion der RFC-vermittelten MTX-Transportaktivität nach Vorbehandlung mit Carbamazepin, welche zu einer verminderten Sensitivität der Tumorzellen gegenüber dem Zytostatikum führte (TOFFOLI et al. 2000). In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen konnten HONSCHA et al. (2000) mittels einer *in vivo*-Studie an Ratten zeigen, dass die Vorbehandlung der Tiere mit dem Cytochrom P450-Induktor Phenobarbital eine signifikant reduzierte hepatozelluläre MTX-Akkumulation zur Folge hatte und vermuteten, dass diese durch eine verminderte Rfc1-Aktivität bedingt wäre.

2.2 Reduced Folate Carrier/Reduced folate carrier (RFC/Rfc; SLC19A1/Slc19a1)

2.2.1 Struktur und Homologie der RFC-/Rfc-Transporter bei verschiedenen Spezies und deren Gewebeverteilung

Der Reduced Folate Carrier/Reduced folate carrier gehört gemäß der vereinbarten Nomenklatur für Transportproteine (HEDIGER et al. 2004) zur Familie 19 der sog. "Solute Carrier" (SLC/Slc), Unterfamilie A und stellt das Mitglied 1 dar (GANAPATHY et al. 2004). Die beiden weiteren Mitglieder 2 und 3 repräsentieren Transporter für Thiamin. Die Vertreter der SLC/Slc19-Familie weisen hinsichtlich ihrer Aminosäurestruktur eine Übereinstimmung von 55-70% auf (GANAPATHY et al. 2004). In den letzten Jahren konnte aus humanem Tumormaterial sowie immortalen Zelllinien der RFC/Rfc des Menschen (MOSCOW et al. 1995, WONG et al. 1995, WILLIAMS u. FLINTOFF 1995), der Ratte (HONSCHA et al. 2000, KNEUER et al. 2004), der Maus (DIXON et al. 1994) und des Hamsters (WILLIAMS et al. 1994) isoliert werden. In diesem Zusammenhang bezeichnen alle in Großbuchstaben aufgeführten Symbole das humane RFC-Gen bzw. -Genprodukt, während diese von Nagern gemäß der vereinbarten Nomenklatur für Transportproteine (HEDIGER et al. 2004) mit Kleinbuchstaben gekennzeichnet werden. Zunächst wurde der Rfc1 der Ratte aufgrund seiner vom humanen RFC differierenden funktionellen Eigenschaften als MTX-1 bezeichnet (HONSCHA et al. 2000). In der Zwischenzeit konnten jedoch KNEUER und HONSCHA (2004) anhand vergleichender funktioneller Studien den Nachweis für die Orthologie des MTX-1 mit dem humanen RFC erbringen.

Die Lokalisation des SLC19A1-/Slc19a1-Gens von Mensch, Ratte, Maus und Hamster wurde jeweils auf Chromosom 21q22.2 (MOSCOW et al. 1995), 20p12 (Rat Genome Database

[RGD] 3695), 10 (ROY et al. 1998) bzw. 1q2-3 (CHAN et al. 1995) nachgewiesen. Das humane (WILLIAMS u. FLINTOFF 1998, ZHANG et al. 1998) und murine (TOLNER et al. 1997) sowie das SLC19A1-/Slc19a1-Gen der Ratte (KNEUER et al. 2005a) und des Hamsters (MURRAY et al. 1996) besitzt jeweils einen offenen Leserahmen mit 5 kodierenden und einer unterschiedlichen Anzahl nicht kodierender Exons. Durch die Nutzung alternativer Exons entstehen ferner, im Rahmen des sog. „alternativen Splicings“, im RFC/Rfc-Gen von Mensch (WILLIAMS u. FLINTOFF 1998), Ratte (HONSCHA et al. 2000, KNEUER et al. 2005a), Maus (TOLNER et al. 1999) und Hamster (MURRAY et al. 1996) verschiedene mRNA-Varianten.

Die vorhergesagte Proteinstruktur des RFC/Rfc besteht bei allen untersuchten Spezies übereinstimmend aus 12 transmembranären Domänen (TMD) mit einer großen intrazellulären Schlaufe zwischen TMD 6 und 7 sowie einem im Zytoplasma lokalisiertem C- und N-Terminus (FERGUSON u. FLINTOFF 1999, MATHERLY u. GOLDMAN 2003, KNEUER u. HONSCHA 2004). SHARINA et al. (2002) und SADLISH et al. (2002) zeigten, dass der C-Terminus insbesondere für die Proteinstabilität und die korrekte Membranlokalisation verantwortlich ist. Weiterhin kommt der großen zytoplasmatischen Schlaufe eine wichtige strukturelle Bedeutung zu (LIU et al. 2003). Die unglykosylierte Form des Rfc1 der Ratte besitzt ein vorhergesagtes Molekulargewicht von 58 kDa, bestehend aus 512 Aminosäuren. Ferner wurden auf Proteinebene zwei Phosphorylierungsstellen im Bereich des C-Terminus und der intrazellulären Schlaufe zwischen TMD 6 und 7 sowie eine Glykosylierungsstelle in der ersten extrazellulären Schlaufe zwischen TMD 1 und 2 vorhergesagt (HONSCHA et al. 2000; s. Abb. 2). Das SLC19A1-/Slc19a1-Gen von Mensch, Maus und Hamster codiert jeweils für ein Protein mit einem vorhergesagten Molekulargewicht von 65 (MOSCOW et al. 1995), 58 (DIXON et al. 1994) bzw. 59 kDa (WILLIAMS et al. 1994). FERGUSON und FLINTOFF (1999), KNEUER et al. (2004) sowie WONG et al. (1998) konnten darüber hinaus den Nachweis einer glykosylierten Form des humanen RFC sowie des Rfc von Ratte und Hamster erbringen. Diese posttranslationalen Modifikationen scheinen jedoch keine Auswirkungen auf die Funktion zu haben (MATHERLY u. GOLDMAN 2003). Zusammenfassend konnten KNEUER und HONSCHA (2004) aufzeigen, dass die Aminosäurestruktur des Rfc der Nager zu 66-67% mit der des humanen RFC übereinstimmt bzw. dass die Übereinstimmung innerhalb der Nagergruppe bei 80-90% liegt. Dies lässt auf eine engere phylogenetische Verwandtschaft der Rfc von Ratte, Maus und Hamster untereinander im Vergleich zum humanen RFC schließen.

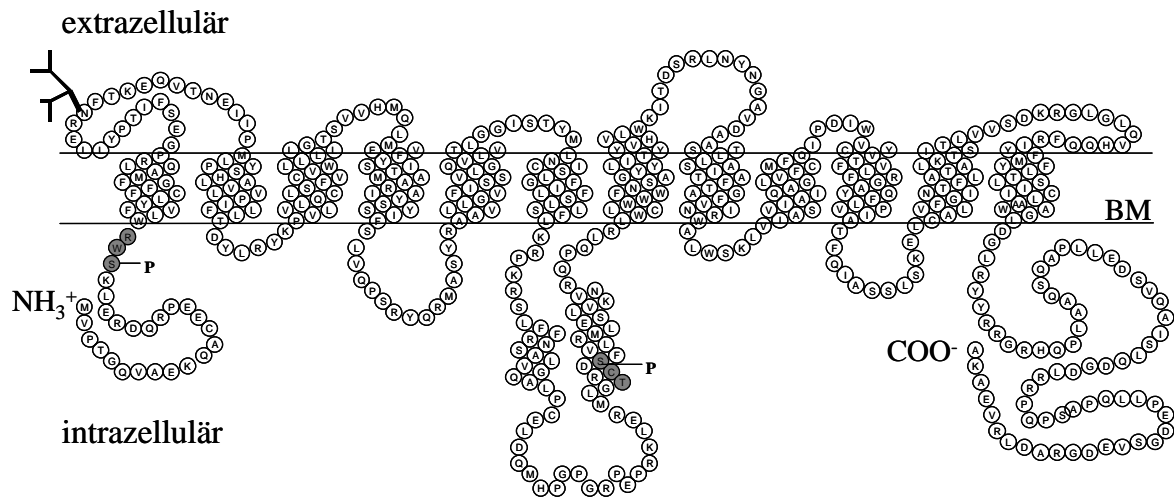


Abb. 2: Modell der heptozellulären Rfc1 Proteinstruktur der Ratte.

BM: Basalmembran

Der RFC/Rfc von Mensch, Maus und Ratte wird in benignem Gewebe nahezu ubiquitär exprimiert und konnte ebenso in einer Reihe von Tumorzellen nachgewiesen werden (WANG et al. 2001, WHETSTINE et al. 2002a, HINKEN 2005). Gewebe mit absorptiver Funktion wie Niere, Darm oder Plazenta weisen eine hohe Rfc-Expressionsrate auf, während diese in Skelett- und Herzmuskelgewebe sehr gering bzw. nicht nachweisbar ist (GANAPATHY et al. 2004, HINKEN 2005). Die subzelluläre RFC-/Rfc-Lokalisation ist je nach Gewebe und dessen Funktion unterschiedlich. In Geweben des Gastrointestinaltraktes sowie des Plexus choroideus ist der RFC/Rfc apikal und in Niere und Leber basolateral lokalisiert (WANG et al. 2001, MATHERLY u. GOLDMAN 2003, KNEUER et al. 2004, 2005b).

2.2.2 Regulationselemente in der Promotorregion des heptozellulären RFC/Rfc

Die Promotorregion des RFC/Rfc bei Mensch, Ratte, Maus und Hamster weist im Gegensatz zu den codierenden Gensequenzen ein geringes Maß an Übereinstimmung auf (MATHERLY u. GOLDMAN 2003). Der humane RFC besitzt 7 mögliche Promotorsequenzen, wobei jedoch eine Promotoraktivität bislang nur für die 5'-untranslatierte Region proximal von Exon A, B und C nachgewiesen werden konnte (ZHANG et al. 1998, WHETSTINE u. MATHERLY 2001, WHETSTINE et al. 2002a). WHETSTINE und MATHERLY (2001) konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass die Promotoren A und B des humanen RFC

durch Transkriptionsfaktoren der Sp-Familie und der bZip-Superfamilie reguliert werden, wobei die Faktoren Sp1 und AP2 für die Aktivierung des Promotors A (WHETSTINE et al. 2002b) bzw. Methylierungs- und Acetylierungsprozesse für die Aktivierung des Promotors B entscheidende Bedeutung haben (WORM et al. 2001). Zusammenfassend hoben MATHERLY und GOLDMAN (2003) die wichtige Rolle der verschiedenen Transkriptionsfaktoren in der gewebespezifischen RFC-/Rfc-Expression hervor.

Der hepatozellulär exprimierte Rfc1 der Ratte weist im Promotorbereich Bindungsmotive für den AhR/ArNT-Rezeptorkomplex und eine sog. „Barbie Box“ (s. 2.3.1.1), ein durch Induktoren vom Phenobarbital-Typ regulierbares Element, auf (HONSCHA et al. 2000). Diese Genregulationselemente sind bislang insbesondere bei fremdstoffmetabolisierenden Enzymen der Cytochrom P450 Familie bekannt (SWANSON u. BRADFIELD 1993, LIANG et al. 1995). Weiterhin konnten HONSCHA et al. (2000) im Promotorbereich des Rfc1 der Ratte eine Konsensussequenz für den hepatozytenspezifischen Transkriptionsfaktor HNFB3A sowie ein entsprechendes Bindungsmotiv für den Transkriptionsfaktor C/EBP, die sog. „CAAT-Enhancer“-Gensequenz, nachweisen. Durch Abgleich der Gensequenz des humanen und des murinen RFC/Rfc mit der Gensequenz für Bindungsstellen möglicher Transkriptionsfaktoren, konnten durch den Autor für diese ebenfalls entsprechende Sequenzen für den AhR/ArNT-Rezeptorkomplex sowie für die Transkriptionsfaktoren C/EBP und HNFB ermittelt werden. Die „Barbie Box“-Sequenz konnte dagegen bei diesen beiden Spezies nicht nachgewiesen werden. Die Gensequenz des Rfc von Ratte und Maus sowie des humanen RFC umfasste ferner eine Reihe von Bindungsstellen für den GR, ER und Transkriptionsfaktoren der Sp- und AP-Familie.

2.2.3 Charakterisierung der Transportaktivität in Leber und Niere

2.2.3.1 Physiologische Funktion von RFC/Rfc

Der Reduced Folate Carrier/Reduced folate carrier stellt ein aktives Transportsystem für reduzierte Folate wie N⁵-Methyltetrahydrofolat und N⁵-Formyltetrahydrofolat dar, welches sich durch eine hohe Substrataffinität ($K_m \sim 1-10 \mu\text{M}$) und eine geringe Transportkapazität auszeichnet. Die Affinität des Transporters gegenüber Folat ist dagegen deutlich niedriger ($K_m \sim 200-400 \mu\text{M}$; GOLDMAN et al. 1968, SIROTNAK 1985, WESTERHOF et al. 1995, ZHAO et al. 1998, SIERRA u. GOLDMAN 1999, HONSCHA u. PETZINGER 1999). So

konnten ZHAO et al. (2001) zeigen, dass der Folat-Transport vornehmlich FOLR-vermittelt erfolgt und der RFC/Rfc eine untergeordnete Rolle spielt. RFC/Rfc-Substrate liegen bei physiologischem pH charakteristischerweise als Anionen vor (GANAPATHY et al. 2004). Deren aktiver RFC/Rfc-vermittelter Transport ist nicht direkt an die Hydrolyse von ATP gekoppelt, sondern an die Aufrechterhaltung eines transmembranären pH-Gradienten gebunden (HORNE 1990). In diesem Zusammenhang ist der Symport von Protonen in die Zelle oder Antiport von OH⁻ denkbar (BRZEZINSKA et al. 2000, GANAPATHY et al. 2004). Ferner konnten YANG et al. (1984) zeigen, dass der RFC-vermittelte Transport beim Menschen durch die Anwesenheit extrazellulär lokalisierter Phosphate, Folate und Sulfate stimuliert wird. In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen beschreibt ZHAO et al. (2002) Thiaminphosphat, nicht jedoch Thiamin als ein Substrat des humanen RFC. Zusammenfassend besitzt der Reduced Folate Carrier wichtige physiologische Bedeutung für die Biosynthese von Nukleotiden (Purin und Thymidin) sowie Aminosäuren und auf diese Weise für Zellwachstum und Differenzierung (BRZEZINSKA et al. 2000). Reduzierte Folate gewährleisten bspw. die Bereitstellung von Methyl-Gruppen für die Synthese von Methionin aus Homocystein. Eine Homocysteinämie, möglicherweise bedingt durch eine herabgesetzte RFC-/Rfc-Transportaktivität durch einen Polymorphismus im RFC-/Rfc-Gen, führt zu einer erhöhten Inzidenz für kardiovaskuläre Erkrankungen und Schädigungen des Neuralrohres während der Embryogenese (De MARCO et al. 2003, GANAPATHY et al. 2004).

2.2.3.2 Transport von Methotrexat

Der Reduced Folate Carrier/Reduced folate carrier vermittelt den Transport des Chemotherapeutikums Methotrexat (s. 2.1.2) in gesunde Zellen und zahlreiche Tumorzellen unterschiedlicher Genese (GOLDMAN et al. 1968, SIROTNAK et al. 1968, FREISHEIM et al. 1989, HONSCHA u. PETZINGER 1999). Das Transportprotein besitzt auf diese Weise, neben der physiologischen Bedeutung im Rahmen des Folatmetabolismus, ebenfalls eine wichtige Rolle in der Therapie zahlreicher neoplastischer und nicht neoplastischer Erkrankungen (s. 2.1.1 und 2.1.3). Der RFC/Rfc stellt ein energie- und temperaturabhängiges MTX-Transportsystem mit hoher Substrataffinität ($K_m \sim 1-5 \mu\text{M}$) und geringer Kapazität ($V_{\max} \sim 2-40 \text{ pmol/min/mg Protein}$) dar (GOLDMAN et al. 1968, WESTERHOF et al. 1995, SIERRA u. GOLDMAN 1999, HONSCHA u. PETZINGER 1999, WONG et al. 1999, CAI u. HORNE 2003, FLINTOFF et al. 2004). KNEUER et al. (2004) konnten darüber hinaus

zeigen, dass die RFC-/Rfc-vermittelte MTX-Aufnahme bei Mensch und Ratte pH-abhängig erfolgt, wobei die Aufnahme des Folatantagonisten bei pH 5,5 etwa dreimal höher ist als bei physiologischem pH. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit früheren Studien zur pH-Abhängigkeit der funktionellen Aktivität des humanen RFC (HORNE 1990, RAJGOPAL et al. 2001, HORNE u. REED 2002) sowie des Rfc1 im Dünndarm der Ratte (STRUM 1977, NAGAKUBO et al. 2001). Wie anhand einer Reihe von Studien weiterhin gezeigt werden konnte, war die RFC-/Rfc-vermittelte MTX-Aufnahme bei physiologischem pH natriumabhängig und wies keine Hemmung durch Folat auf, während diese bei pH 5,5 natriumunabhängig erfolgte und bei gleichzeitiger Gabe von Folat deutlich reduziert war (HORNE et al. 1976, HONSCHA u. PETZINGER 1999, HONSCHA et al. 2000, RAJGOPAL et al. 2001, MATHERLY u. GOLDMAN 2003, KNEUER et al. 2004). HONSCHA und PETZINGER (1999) wiesen ferner die Hemmung der Rfc1-vermittelten MTX-Aufnahme in primäre Rattenhepatozyten durch reduzierte Folate, Taurocholat und Cholat bei pH 7,4 nach.

2.3 Regulation von Arzneistoffwechselwegen

2.3.1 Das Cytochrom P450 System

Die zelluläre Aufnahme, Metabolisierung und Ausscheidung physiologischer Stoffe und exogener Substanzen wird durch das Zusammenspiel intrazellulär lokalisierter fremdstoffmetabolisierender Enzyme im Rahmen der sog. „Phase I/II-Reaktion“ und membranständiger Transportproteine, die den Import und Export vermitteln, erreicht (MEYER 1996, XU et al. 2005). Die fremdstoffmetabolisierenden Enzyme der Phase I stellen vornehmlich Oxidoreduktasen der Cytochrom P450-Superfamilie dar. Diese werden in hohem Maße in Leber, Gastrointestinaltrakt, Niere sowie Lunge exprimiert und umfassen insgesamt 36 Genfamilien. Die Einteilung der Enzyme in Familien und Unterfamilien erfolgt anhand von Übereinstimmungen in der Sekundärstruktur (RUSHMORE u. KONG 2002). Bei Säugern konnten bisher 12 Cytochrom P450-Familien nachgewiesen werden, wobei den Genfamilien 1, 2, 3, 4 und 7 besondere Bedeutung im Arzneimittelmetabolismus zugesprochen wird (GONZALES u. NEBERT 1990, NEBERT et al. 1991, NELSON et al. 1996, SIMPSON 1997, WAXMAN 1999, LEWIS 2003, PASCUSI et al. 2003). Das humane Cytochrom P450 3A4 besitzt hierbei eine Sonderstellung, da dieses aufgrund der geringen

Substratspezifität etwa 50% aller Arzneistoffe metabolisiert (BERTZ u. GRANNEMAN 1997).

Die vornehmlich in der Leber lokalisierten Cytochrom P450-Enzyme der Unterfamilie 2B vermitteln die Metabolisierung verschiedener Arzneimittel wie Chemotherapeutika, antiretroviraler Substanzen und Anästhetika sowie endogener Substanzen wie Testosteron (ROY et al. 1999, ERICKSON et al. 1999, GERVOT et al. 1999, COURT et al. 2001, WANG et al. 2003a). Die Gensequenz des humanen und murinen Cytochrom P450 2B6 bzw. 2b10 sowie des Cytochrom P450 2B1/2 der Ratte wurden bereits vor einigen Jahren identifiziert und kloniert (FUJII-KURIYAMA et al. 1982, RAMPERSAUD u. WALZ 1983, HOFFMAN et al. 1995, HONKAKOSKI u. NEGISHI 1997). Vertreter der Cytochrom P450 2B-Unterfamilie weisen insgesamt eine geringe und interindividuell stark variable hepatozelluläre Expression auf, welche charakteristischerweise in hohem Maße durch das Antiepileptikum Phenobarbital stimuliert wird (HARDWICK et al. 1983, WAXMAN u. AZAROFF 1992, CODE et al. 1997, CHANG et al. 1997, HONKAKOSKI u. NEGISHI 1997). In diesem Zusammenhang führten WANG et al. (2003a) sowie XIE und EVANS (2001) auf, dass Cytochrom P450 2B6 bis zu 10% der hepatozellulären Cytochrom P450-Enzyme stellt und ferner am Metabolismus von bis zu 25% der handelsüblichen Arzneimittel beteiligt ist.

2.3.1.1 Transkriptionelle Regulation der Cytochrom P450-Enzyme durch Induktoren vom PB-Typ und TCPOBOP

Die Induktion fremdstoffmetabolisierender Enzyme der Cytochrom P450-Superfamilie erfolgt prinzipiell nach Exposition des Organismus gegenüber endogenen oder exogenen Substanzen. Die Regulation findet vornehmlich auf Ebene der Transkription statt und wird über verschiedene Kernrezeptoren vermittelt (s. Abb. 3; OKEY 1990, DENISON u. WHITLOCK 1995, XU et al. 2005). Die Kernrezeptoren AhR sowie die Vertreter der sog. „Orphan nuclear receptors“ PXR (NR1I2), CAR (NR1I3), PPAR (NR1C), LXR (NR1H2/3) und FXR (NR1H4) stellen intrazellulär lokalisierte Transkriptionsfaktoren dar, die in Folge der Exposition mit endogenen Substanzen bzw. Xenobiotika aktiviert werden. Im Zellkern findet nachfolgend die Bildung von Heterodimeren mit den Ko-Faktoren ARNT bzw. RXR (NR2B) statt. Diese binden an die jeweilige Sequenz, das sog. „Response Element“, des Zielgens und regulieren dessen Expression. Infolgedessen kommt es zu einem gesteigerten Metabolismus und Elimination des Induktors, da dieser i.d.R. auch Substrat des induzierten Cytochrom P450

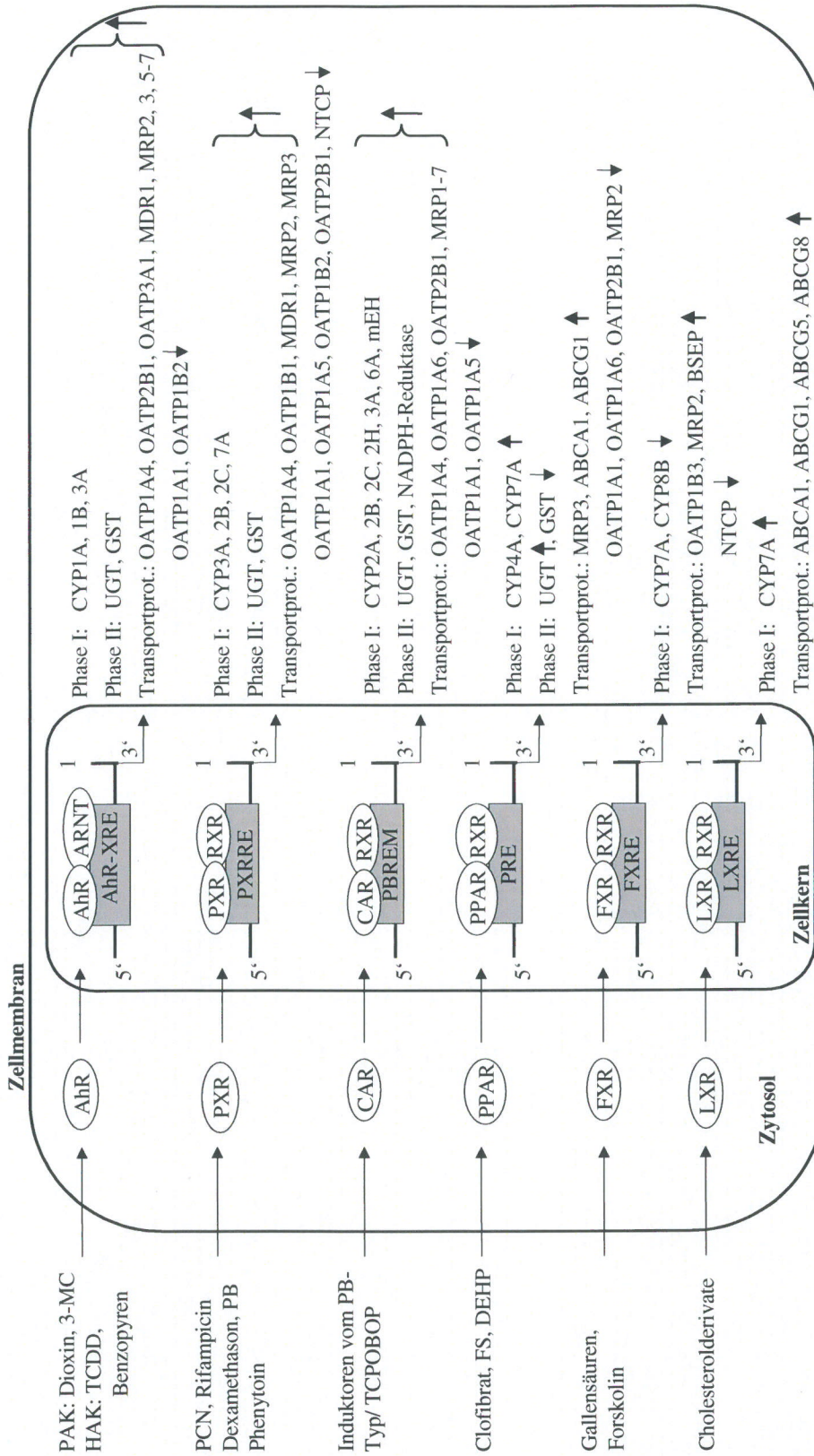


Abb. 3: Schematische Darstellung der Rezeptor-vermittelten transkriptionellen Regulation fremdstoffmetabolisierender Enzyme der Cytochrom P450-Superfamilie, von Phase II-Enzymen und Transportproteinen bei Mensch, Ratte und Maus.

↑ / ↓ = Steigerung/Abnahme der Genexpression.

Aus Gründen der Übersicht wurde auf eine Differenzierung zwischen humanen, murinen und Genen bzw. Genprodukten der Ratte verzichtet. Die Abbildung wurde unter Verwendung folgender Arbeiten erstellt: KIUCHI et al. 1998, COSTET et al. 2000, CZEKAJ 2000, DENSON et al. 2001, SUEYOSHI u. NEGISHI 2001, ZHANG u. CHIANG 2001, FITZGERALD et al. 2002, GUO et al. 2002a, JUNG et al. 2002, RUSHMORE u. KONG 2002, CHENG et al. 2005, FRANK et al. 2005, KLAASSEN u. SLITT 2005, KRUIT et al. 2005, SABOL et al. 2005, XU et al. 2005.

Enzyms ist (GONZALES 1989, SWANSON u. BRADFIELD 1993, MOORE et al. 2000, WANG u. LECLUYSE 2003). Die Kernrezeptoren LXR und FXR stellen Gegenspieler im Rahmen der Cytochrom P450 7A-Regulation dar. LXR stimuliert die durch Cytochrom P450 7A-vermittelte Biosynthese von Gallensäuren (LEHMANN et al. 1997, WANG u. LECLUYSE 2003). Der Kernrezeptor FXR dagegen ist, im Rahmen eines negativen Feedbackmechanismus bei erhöhter Gallensäurenkonzentration, für die SHP-vermittelte Hemmung von Cytochrom P450 7A verantwortlich (GOODWIN et al. 2000).

Das Antiepileptikum Phenobarbital stellt den Prototyp einer großen Gruppe von lipophilen, strukturell unterschiedlichen Substanzen dar, welche die transkriptionelle Regulation der Genexpression von Phase I und II Enzymen sowie Transportproteinen vermitteln (SUEYOSHI u. NEGISHI 2001, XU et al. 2005; s. Abb. 3). Zur Gruppe der Induktoren vom PB-Typ gehören bspw. Arzneimittel wie Carbamazepin, Chlorpromazin, Clotrimazol, Phenytoin, Primidon oder das Chemotherapeutikum Cyclophosphamid. Ferner stellen Pestizide wie Chlordan, Lösungsmittel wie Aceton oder pflanzliche Produkte wie Kampfer und Diallylsulfid Vertreter dieser Gruppe dar (CZEKAJ 2000, SUEYOSHI u. NEGISHI 2001). Es handelt sich vornehmlich um einen hepatozellulären Regulationsmechanismus, wobei dieser jedoch ebenfalls in Hirngewebe (ZELKO u. NEGISHI 2000) und Gliazellen (GENG u. STROBEL 1998) der Ratte nachgewiesen werden konnte. Ferner wurden PB-vermittelte pleiotrope Effekte an der Leber in Form einer Tumorpromotion bei Nagetieren, Zunahme der Lebermasse und Proliferation des endoplasmatischen Retikulums beschrieben (CONNEY 1967, SCHULTE-HERMANN 1974). Die durch PB-induzierte Stimulation der Genexpression scheint ein im Verlauf der Evolution konservierter und in der Natur weit verbreiteter Mechanismus zu sein. So konnte dieser bei Cytochrom P450 2A, 2B, 2C, 3A bzw. 6A von Säugetieren (SUEYOSHI u. NEGISHI 2001), Cytochrom P450 2H vom Huhn (MATTSCHOSS et al. 1986) und Cytochrom P450 2 von Amphibien und Reptilien (ERTL u. WINSTON 1998) nachgewiesen werden. Neben der Regulation der Genexpression in eukaryoten Zellen konnten HE und FULCO (1991) zudem den Nachweis der PB-vermittelten Regulation von Cytochrom P450 Genen in Bakterien erbringen.

Die durch PB bedingte Regulation der hepatozellulären Expression von Cytochrom P450 2B Genen bei Mensch, Ratte und Maus wird durch den Kernrezeptor CAR vermittelt (s. Abb. 4). In diesem Zusammenhang konnten bspw. WEI et al. (2000) zeigen, dass die Vorbehandlung mit PB in Wildtypmäusen, nicht jedoch in CAR (-/-) Mäusen, zu einer Induktion der Cytochrom P450 2b10-Genexpression führte. Der Kernrezeptor CAR ist in Abwesenheit von PB vornehmlich im Zytosol lokalisiert und weist eine hohe basale Genexpressionsrate auf

(CHOI et al. 1997, SUEYOSHI u. NEGISHI 2001). Ferner bildet dieser in inaktiver Form einen Komplex mit dem sog. „CAR cytoplasmatic retention protein“ (CCRP) und dem Hitzeschockprotein HSP90 (KOBAYASHI et al. 2003, YOSHINARI et al. 2003). Die CAR-Aktivierung kann indirekt über die Induktoren vom PB-Typ oder über eine TCPOBOP-vermittelte direkte Aktivierung erfolgen (HONKAKOSKI et al. 1998, MOORE et al. 2000, TZAMELI et al. 2000), welche jedoch eine untergeordnete Rolle in der Cytochrom P450 2B-Regulation zu spielen scheint (MOORE et al. 2000, SUEYOSHI u. NEGISHI 2001). In Anwesenheit von PB kommt es zu einer durch die Protein Phosphatase 2A-vermittelten Dephosphorylierung und Freisetzung von CAR aus dem zytoplasmatischen Proteinkomplex. Anschließend erfolgt die Translokation des Rezeptors in den Zellkern (KAWAMOTO et al. 1999). In Übereinstimmung mit diesen Befunden konnte anhand von *in vivo*- sowie *in vitro*-Studien mittels primärer Ratten- und Maushepatozyten gezeigt werden, dass die PB-bedingte CAR-Translokation und nachfolgende Induktion von Cytochrom P450 2B durch Vorbehandlung mit dem relativ spezifischen Protein Phosphatase 1/2A-Inhibitor Okadaic-Säure gehemmt wurde (COHEN et al. 1990, SIDHU u. OMIECINSKI 1997, HONKAKOSKI u. NEGISHI 1998, KAWAMOTO et al. 1999, PUSTYLNYAK et al. 2005). Im Zellkern erfolgt die vollständige CAR-Aktivierung durch eine Ca^{++} /calmodulin-abhängige Kinase-vermittelte und gegenüber den spezifischen Kinase-Inhibitoren KN-62/KN-93-sensitive Phosphorylierung des Kernrezeptors (NEGISHI 2000, MARC et al. 2000). Weiterhin konnte mittels zahlreicher *in vivo*- sowie *in vitro*-Studien nachgewiesen werden, dass die Steroidderivate Androstenol und Androstanol die Interaktion zwischen CAR und Ko-Aktivatoren wie SRC-1 und Sp1 hemmen (FORMAN et al. 1998, GOODWIN et al. 2002, FRASER et al. 2003, HONKAKOSKI et al. 2003, PASCUSI et al. 2003). Ferner scheint der Kernrezeptor SHP an der Regulation der CAR-Aktivierung und somit ebenfalls an der Cytochrom P450 2B-Genexpression beteiligt zu sein (SEOL et al. 1996, BAE et al. 2004). Nachfolgend bildet CAR mit dem Kernrezeptor RXR ein Heterodimer und bindet an ein 51 bp umfassendes Regulationselement das sog. „Phenobarbital responsive enhancer module“ (PBREM) innerhalb der distalen Promotorregion der Cytochrom P450 2B Gene (HONKAKOSKI et al. 1998, SUEYOSHI u. NEGISHI 2001). Dieses Gensegment wurde bisher in murinem CYP2b10, humanem CYP2B6 und CYP2B1/2 der Ratte nachgewiesen, wobei die DNA-Bindungsstelle bei Ratte und Maus identisch ist und eine Homologie von 95% zur Bindungsstelle des humanen CAR aufweist (HONKAKOSKI et al. 1998, SUEYOSHI et al. 1999, JONES et al. 2000). Das Genregulationselement setzt sich aus zwei Kernrezeptorbindungsstellen NR1 und NR2 sowie einer Bindungsstelle für den Faktor NF1

zusammen. Die Aktivierung des PBREM durch zahlreiche Induktoren vom PB-Typ wird vornehmlich über den Rezeptor NR1 vermittelt. Der Faktor NF1 scheint dagegen eine untergeordnete Rolle zu spielen (HONKAKOSKI et al. 1998, RAMDSEN et al. 1999, GANEM et al. 1999, SUEYOSHI et al. 1999, KIM et al. 2000). Darüber hinaus lieferten WANG et al. (2003a) sowie XIE et al. (2000) Hinweise, dass der Kernrezeptor PXR ebenfalls an NR1 und NR2 des humanen PBREM bindet und ferner ein sog. "Distal response element" (XREM) in der Promotorregion des humanen CYP2B6 an der PB-vermittelten Genregulation beteiligt ist.

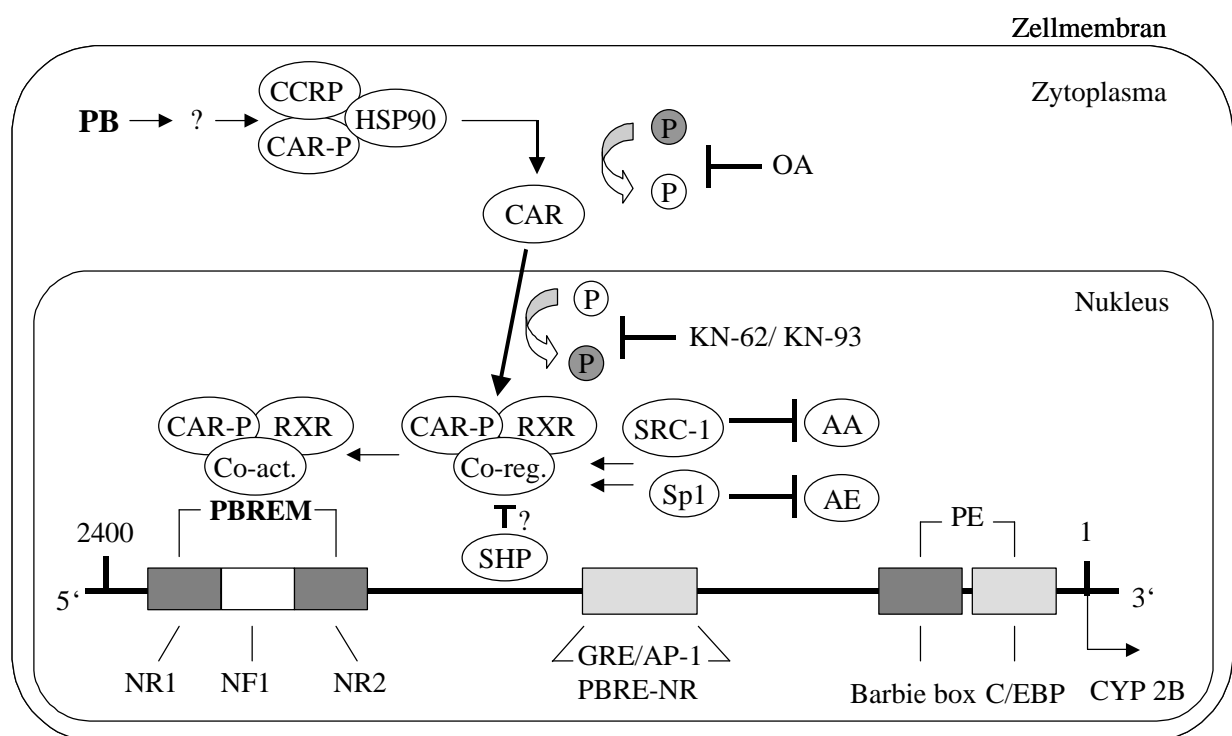


Abb. 4: Hypothetischer Mechanismus der PB-vermittelten Regulation der hepatozellulären Expression von Cytochrom P450 2B Genen bei Mensch, Ratte und Maus.

AA: Androstanol; AE: Androstenol; AP1: Aktivatorprotein 1; CAR: Constitutive androstane receptor; C/EBP: CCAAT/enhancer binding protein; Co-reg: Ko-Regulatoren; CYP: Cytochrom P450; GRE: Glucocorticoid response element; KN-62/-93: Ca⁺⁺/Calmodulin-abhängiger Kinase-Inhibitor-62/-93; NF1: Kernfaktor1; NR: Kernrezeptor; OA: Okadaic-Säure; P: Phosphor; PB: Phenobarbital; PBREM: Phenobarbital responsive enhancer module; PBRE-NR: Phenobarbital responsive enhancer-nuclear receptor; PE: Positive element; SHP: Short heterodimer partner; Sp1: Simian virus 40 Promoterfaktor 1; SRC-1: Steroid Ko-Aktivator-1

TCPOBOP, ein Pestizidbestandteil, vermittelt die Cytochrom P450 2b10 Genregulation durch direkte Bindung an den murinen CAR-Rezeptor (KENDE et al. 1985, TZAMELI et al. 2000, MOORE et al. 2002). Dieser Mechanismus scheint speziesspezifisch zu sein, da die TCPOBOP-vermittelte Induktion von Cytochrom P450 2B der Ratte deutlich geringer ausgeprägt ist bzw. diese für das humane Cytochrom P450 2B6 nicht nachgewiesen werden konnte (NIMS et al. 1993, MOORE et al. 2000). So zeigten MOORE et al. (2000) und TZAMELI et al. (2000) anhand von *in vitro*-Bindungsstudien, dass TCPOBOP nicht an den humanen CAR und PB weder an den CAR der Ratte noch an den humanen CAR bindet. SUEYOSHI und NEGISHI (2001) folgerten, dass die durch TCPOBOP-vermittelte Translokation des murinen CAR speziesspezifisch ist und die CAR-Translokation bzw. Aktivierung insgesamt entgegen dem Musterbeispiel des Steroidrezeptors Ligandenunabhängig über eine komplexe Signalkaskade erfolgt (s. Abb. 4).

Die PB-vermittelte Regulation der Genexpression von Cytochrom P450_{BM-1} (CYP106) und Cytochrom P450_{BM-3} (CYP102) in *Bacillus megaterium* wird durch die sog. „Barbie Box“ vermittelt (FULCO 1991; s. Abb. 5). Die „Barbie Box“ stellt eine 17-bp große Nukleotidsequenz in der Promotorregion der Cytochrome dar, welche in Abwesenheit von PB durch das Repressorprotein Bm3R1 inhibiert wird (s. Abb. 5 A). In Anwesenheit von PB kommt es zu einer Aufhebung der Bm3R1-bedingten Blockade der Genexpression, wobei PB direkt an die für Bm3R1 kodierende Sequenz bindet oder sog. „Positive factors“ wie Bm3P1 mit Bm3R1 um die Promotorbindungsstelle der Cytochrom P450-Enzyme konkurrieren (SHAW u. FULCO 1992, SHAW u. FULCO 1993, KEMPER 1998; s. Abb. 5 B). Die „Barbie Box“ konnte ebenso in der proximalen Promotorregion zahlreicher durch PB regulierbarer eukaryoter Gene nachgewiesen werden (DENISON u. WHITLOCK 1995). Diese scheint jedoch im Rahmen der PB-vermittelten Regulation der Genexpression keine bzw. hinsichtlich der basalen Promotoraktivität in Cytochrom P450 2B Genen eine untergeordnete Rolle zu spielen (RAMSDEN et al. 1993, LIANG et al. 1995, PARK et al. 1996, STOLTZ et al. 1998). Ein proximaler Sequenzbereich, welcher die „Barbie Box“ einschließt, wies jedoch nach Vorbehandlung mit PB eine gesteigerte Promotor- und Proteinbindungsaktivität auf. Dieses Segment wird als sog. „Positive Element“ (PE) bezeichnet (SHEPHARD et al. 1994, PRABHU et al. 1995, MANI et al. 2000, SAMUDRE et al. 2002).

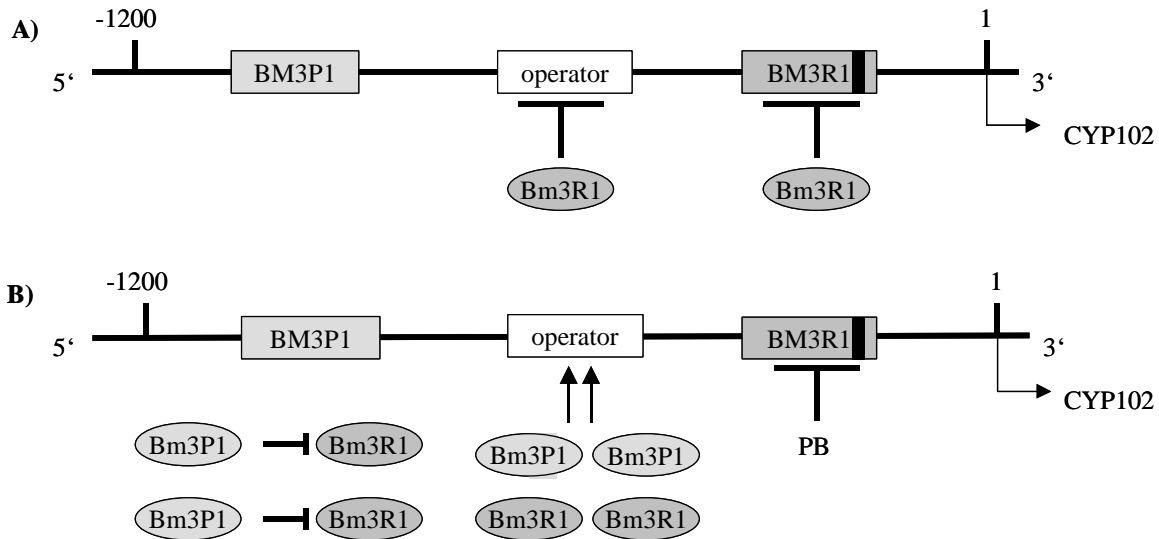


Abb. 5: Schematische Darstellung der PB-vermittelten transkriptionellen Regulation von Cytochrom P450_{BM-3} (CYP102) in *Bacillus megaterium*.

Abb. 5 A: Bm3R1-bedingte Inhibition der CYP102-Genexpression in Abwesenheit von PB.

Abb. 5 B: Aufhebung der Bm3R1-vermittelten Blockade der CYP102-Genexpression in Anwesenheit von PB. Die „Barbie Box“ ist als schwarzer Balken innerhalb der kodierenden Sequenz für das Repressorprotein BM3R1 dargestellt.

2.3.2 Regulation von hepatozellulären Transportproteinen

2.3.2.1 Regulation über Kernrezeptoren am Beispiel von OATP und MRP

Anhand einer Reihe von Studien zur transkriptionellen Regulation von Transportproteinen konnte übereinstimmend gezeigt werden, dass diese in Abstimmung mit Phase I und II Enzymen durch Kernrezeptoren, insbesondere CAR und PXR, reguliert werden und somit einen wichtigen Bestandteil des zellulären Schutzmechanismus gegenüber endogenen Substanzen und Xenobiotika darstellen (XU et al. 2005).

Die Vertreter der Superfamilie der Organischen Anionen Transportierenden Polypeptide (OATP; SLCO21) werden in vielen Geweben wie Niere, Gastrointestinaltrakt und Leber exprimiert und vermitteln den natriumunabhängigen Transport zahlreicher organischer Anionen, sowohl endogenen als auch exogenen Ursprungs (MEIER u. STIEGER 2002, TAMAI et al. 2000, HAGENBUCH u. MEIER 2004). Der humane OATP1B1 (SLCO1B1), welcher vornehmlich in der basolateralen Membran von Hepatozyten lokalisiert ist, zeichnet sich durch den Transport von Gallensäuren sowie Arzneimitteln wie z.B. Rifampicin aus

(HSIANG et al. 1999, ABE et al. 1999, KÖNIG et al. 2000, TAMAI et al. 2000). FRANK et al. (2005) konnten mittels einer *in vitro*-Studie an HepG2-Zellen zeigen, dass die Induktion der OATP1B1-Genexpression nach Vorbehandlung mit Rifampicin PXR-vermittelt erfolgt und wiesen ergänzend Bindungsstellen für das PXR-RXR Heterodimer in der Promotorregion des OATP1B1-Gens nach. Weiterhin konnte die PXR- bzw. CAR-bedingte Regulation des Transportproteins Oatp1a4 (Slco1a4) von Maus und Ratte belegt und wiederum PXR-spezifische Bindungsstellen in der Promotorregion des Transporters nachgewiesen werden (GUO et al. 2002a, b; STAUDINGER et al. 2003). CHENG et al. (2005) zeigten ferner, dass die Oatp1a4-Genexpression nach Vorbehandlung mit dem PXR-Induktor PCN stimuliert wurde, während eine deutliche Reduktion der Genexpression von Oatp1a1 (Slco1a1), Oatp1a5 (Slco1a5) und Oatp1b2 (Slco1b2) zu verzeichnen war. Weiterhin konnte der Nachweis der CAR- bzw. AhR-vermittelten Reduktion der Oatp1a1-Genexpression erbracht werden. Der humane OATP1B3 wird in der Leber und verschiedenen Tumorzelllinien exprimiert und vermittelt den natriumunabhängigen Transport von Gallensäuren und Arzneimitteln wie Methotrexat (ABE et al. 2001, KÖNIG et al. 2000, HAGENBUCH u. Meier 2004). Eine *in vitro*-Studie an HepG2-Zellen lieferte den Hinweis auf eine FXR-bedingte Induktion der OATP1B3-Genexpression nach Vorbehandlung mit Chendesoxycholsäure (JUNG et al. 2002).

Vertreter der sog. „Multidrug Resistance-associated Protein (MRP)“-Transportproteine gehören zu der Superfamilie der „ATP-binding cassette (Abc)“-Transporter, Unterfamilie C. Bisher wurde die mRNA 9 humaner MRP-Proteine nachgewiesen, wobei MRP1-7 eine bedeutende Rolle in der Elimination zahlreicher endogener und exogener organischer Anionen spielen (BORST et al. 2000, XU et al. 2005). MRP2/Mrp2 (cMOAT, ABCC2/Abcc2) wird vornehmlich in Leber, Niere und Gastrointestinaltrakt exprimiert und ist in der kanalikulären Membran lokalisiert. MRP3/Mrp3 (ABCC3/Abcc3) weist dagegen eine subzelluläre Lokalisation in der basolateralen Hepatozytenmembran auf (HIROHASHI et al. 1999, KÖNIG et al. 1999, CHAN et al. 2004). KAST et al. (2002) konnten zeigen, dass nach Vorbehandlung von humanen sowie Rattenhepatozyten mit den spezifischen PXR-, FXR- bzw. CAR-Induktoren PCN, Chenodeoxycholsäure bzw. PB eine deutliche Steigerung der MRP2/Mrp2-Genexpression vorlag. Diese wurde durch ein Genregulationselement in der MRP2/Mrp2-Promotorregion vermittelt, welches als Bindungsstelle für die Kernrezeptor-RXR-Heterodimere diente. Diese Beobachtungen konnten mittels *in vivo*-Studien an Ratten sowie Mäusen bestätigt werden (RUSHMORE u. KONG 2002, STAUDINGER et al. 2003). Weiterhin wurde die CAR- bzw. PXR-vermittelte Regulation der MRP3/Mrp3-Genexpression

in humanen Hepatomzelllinien sowie mittels einer *in vivo*-Studie an Mäusen nachgewiesen (TENG et al. 2003, STAUDINGER et al. 2003). MRP4/Mrp4 ist in der basolateralen Hepatozytenmembran von Mensch und Nager lokalisiert und vermittelt bspw. die Elimination von sulfatkonjugierten Gallensäuren (RIUS et al. 2003). Anhand einer *in vitro*-Studie an HepG2-Zellen bzw. humanen Hepatozyten sowie *in vivo*-Studien an Mäusen konnten ASSEM et al. (2004) zeigen, dass die Regulation der MRP4/Mrp4-Genexpression in Abstimmung mit der Genexpression des Enzyms Sulfotransferase 2a1 CAR-vermittelt erfolgt.

2.3.2.2 Proteinkinase A und C-vermittelte posttranslationale Regulation

Die Proteinkinase C (PKC) und die Proteinkinase A (PKA) spielen eine wichtige Rolle in der schnellen und kurzfristigen posttranslationalen Regulation von Proteinen, deren Aktivität über eine Phosphorylierung der Aminosäurereste Serin/Threonin bzw. Tyrosin beeinflusst wird. Vertreter der Proteinkinase C-Familie stellen eine Gruppe von Serin/Threonin-Kinasen dar, welche ubiquitär exprimiert und charakteristischerweise durch Kalzium und Lipide wie DAG aktiviert werden (LIU u. HECKMAN 1998). Die Proteinkinase A stellt eine cAMP-abhängige Kinase dar, welche in verschiedenste physiologische Signalübertragungswege involviert ist (KRAUSS 2003). Prinzipiell erfolgt die PKC- bzw. die PKA-vermittelte posttranslationale Regulation von Transportproteinen durch direkte Phosphorylierung des Proteins (CONRADT u. STOFFEL 1997, VAUGHAN et al. 1997, LEDERER et al. 2003) oder durch Veränderung der Transportproteindichte in der Plasmamembran (BENEDETTI et al. 1994, BOYER u. SOROKA 1995, HIRSCH et al. 1996, RAMAMOORTHY et al. 1998, ROELOFSEN et al. 1998, PAJOR u. SUN 1999).

Die Transportproteine Oatp1a1 (Slco1a1) und Oatp1a4 (Slco1a4) der Ratte sind verantwortlich für die natriumunabhängige hepatozelluläre Aufnahme zahlreicher organischer Anionen endogenen und exogenen Ursprungs und weisen eine basolaterale Lokalisation auf. Diese Proteine besitzen eine Reihe möglicher PKA- bzw. PKC-Phosphorylierungsstellen (JAQUEMIN et al. 1994, NOE et al. 1997, ABE et al. 1998, CATTORI et al. 2001). GUO und KLAASSEN (2001) konnten zeigen, dass die Oatp1a1- bzw. Oatp1a4-vermittelte Transportaktivität von Estrogen-3-sulfat bzw. Digoxin nach Vorbehandlung mit dem spezifischen PKC-Induktor PMA, nicht aber mit dem PKA-Induktor cAMP, zeit- sowie konzentrationsabhängig reduziert war. Dieser Effekt konnte mit dem spezifischen PKC-Inhibitor Bisindolylmaleimid (BIM) nahezu vollständig aufgehoben werden.

Der Organische Anionen Transporter1/Organische anionen transporter1 (OAT1/Oat1; SLC22A6/Slc22a6) von Mensch, Maus und Ratte wird vornehmlich in der Niere exprimiert und ist in der basolateralen Membran der proximalen Tubuli lokalisiert. Der OAT1/Oat1 vermittelt den Transport vieler endogener und exogener Substanzen wie ρ -Aminohippurat und Methotrexat und weist mehrere mögliche PKC-Phosphorylierungsstellen auf (LOPEZ-NIETO et al. 1997, SEKINE et al. 1997, SWEET et al. 1997, HOSOYAMADA et al. 1999, BAHN et al. 2000, MIYAZAKI et al. 2004). Anhand einer Reihe von *in vitro*-Studien konnte eine Reduktion der OAT1/Oat1-vermittelten Transportaktivität nach Vorbehandlung mit PKC-Induktoren wie PMA nachgewiesen werden (UWAI et al. 1998, YOU et al. 2000, WOLFF et al. 2003). Im Gegensatz dazu wiesen *in vivo*- und *in vitro*-Studien darauf hin, dass die Transportaktivität von Mrp2 (Abcc2) der Ratte, Bsep (Abcb11) der Maus sowie P-Glycoprotein (ABCB1), welche die hepatozelluläre Elimination von Steroidkonjugaten und zahlreichen Arzneimitteln bedingen, durch eine PKC-vermittelte Regulation gesteigert wurde (ENDICOTT u. LING 1989, ROELOFSEN et al. 1991, PIKULA et al. 1994, NOE et al. 2001).

Im Rahmen der PKA-vermittelten posttranslationalen Regulation scheint vornehmlich eine Veränderung der Transportproteindichte in der Plasmamembran zu erfolgen. So zeigten ROELOFSEN et al. (1998), dass es nach Vorbehandlung mit dem spezifischen PKA-Induktor cAMP zu einem gesteigerten Einbau von Mrp2 in die kanalikuläre Membran von Rattenhepatozyten und zu einem deutlichen Anstieg der Mrp2-Exportaktivität kam. Übereinstimmend führte die Vorbehandlung von primären Rattenhepatozyten mit cAMP zu einer gesteigerten kanalikulären Sekretion von Gallensäuren im Vergleich zu unbehandelten Zellen (BOYER u. SOROKA 1995).

Zusammenfassend wird die Pharmakokinetik verschiedenster Arzneimittel und Xenobiotika, welche carrier-vermittelt in Zellen transportiert werden, über direkte Interaktionen von Fremdstoffen am Transportprotein oder durch Regulation der Transporteraktivität beeinflusst. Letztere kann auf Ebene der Transkription durch Regulation der Genexpression oder durch Phosphorylierung und Internalisierung des Transportproteins im Rahmen einer posttranslationalen Regulation erfolgen (s. 2.3.2). Diese Regulationsmechanismen finden in Abstimmung mit der Regulation von Phase I und II Enzymen statt, wodurch die koordinierte Aufnahme, der Metabolismus und die Elimination des jeweiligen Pharmakons gewährleistet wird (XU et al. 2005). Dies ermöglicht gleichzeitig die maximale Elimination des Arzneimittels und stellt somit einen wichtigen zellulären Schutzmechanismus gegenüber

unerwünschten Nebenwirkungen von Xenobiotika dar. Diese koordinierte Regulation von Arzneistoffwechselwegen kann jedoch in der Klinik ebenfalls eine verminderte Therapieeffizienz zur Folge haben. Es kommt bspw. zu der Ausbildung einer Chemoresistenz von Tumorzellen im Verlauf einer Tumorthherapie durch eine verminderte Aufnahme und/oder gesteigerte Elimination des Pharmakons bei gleichzeitiger Induktion des Arzneistoffmetabolismus (s. 2.1.3). Nachfolgend käme es zu einem Abfall der intrazellulären Wirkspiegel des Chemotherapeutikums und auf diese Weise zu einer Verschlechterung der Therapieeffizienz und damit der Patientenprognose. Die Regulation von Transportproteinen als Bestandteil der koordinierten Regulation der Pharmakokinetik verschiedenster Arzneistoffe und Xenobiotika besitzt aufgrund der damit einhergehenden erwünschten und unerwünschten Effekten eine wichtige klinische Bedeutung im Rahmen jeder Arzneimitteltherapie.

2.4 Das HPCT-1E3-Zellkulturmodell

Die Hybridzelllinie HPCT-1E3 wurde Anfang der 90er Jahre unter der Leitung von Prof. Petzinger (Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Fachbereich Veterinärmedizin, Justus-Liebig-Universität, Gießen, Deutschland) aus primären Rattenhepatozyten und Fao Reuber Hepatoma Zellen H35 gewonnen (FÖLLMANN et al. 1989a, 1989b). HPCT-1E3-Zellen weisen sowohl morphologische als auch funktionelle Eigenschaften differenzierter Rattenhepatozyten auf. So zeigten PETZINGER et al. (1994), dass die Hepatocytoma-Zellen in Kultur einen homogenen, einschichtigen Zellrasen bestehend aus polygonalen, polarisierten und kontinuierlich wachsenden Zellen bilden, welcher morphologisch primären Rattenhepatozyten in Kultur gleicht. Ferner konnte weder eine *in vivo*- noch eine *in vitro*-Malignität der Fusionzelllinie festgestellt werden. HPCT-1E3-Zellen besitzen hinsichtlich ihrer Ultrastruktur einen dichten Mikrovillibesatz sowie eine enorme Dichte von Golgi-Komplexen. Weiterhin konnte die Bildung sog. „Pseudokanalikuli“ beobachtet werden, welche phänotypisch Gallengängen von Hepatozytencouplets in Kultur gleichen (GAUTAM et al. 1987, GRAF et al. 1984). Die funktionelle Aktivität der „Pseudokanalikuli“ wurde anhand der Sekretion eines fluoreszierenden Gallensäurederivats nachgewiesen (BLUMRICH et al. 1994). Die Polarität der HPCT-1E3-Zellen wurde ferner mittels spezifischer Antigene sowie der Bestimmung der Enzymaktivität der γ -Glutamyltransferase in der kanalikulären Membran aufgezeigt. Ein weiterer Hinweis auf die hepatozytenspezifischen Eigenschaften der

Hybridzelllinie ist die hormonsensitive Bildung, Metabolisierung und der Transport von Gallensäuren wie Cholat (BLUMRICH et al. 1994). UTESCH et al. (1992) konnten ferner zeigen, dass die Hepatocytoma-Zellen eine mit primären Rattenhepatozyten vergleichbare Phase II- sowie eine schwach ausgeprägte Cytochrom P450-Enzymaktivität (s. 2.3.1) besitzen. Darüber hinaus weisen die HPCT-1E3-Zellen einen hormonsensitiven Kohlenhydratstoffwechsel sowie die insulinsensitive Bildung und Sekretion der Plasmaproteine Albumin und Transferrin auf (KATZ et al. 1992, IMMENSCHUH et al. 1993). HONSCHA u. PETZINGER (1999) lieferten zudem Hinweise auf einen Transport von organischen Anionen wie dem Zytostatikum Methotrexat (s. 2.1).

Um die Regulation des Rfc1-vermittelten Methotrexat-Transportes im HPCT-1E3-Zellkulturmodell untersuchen zu können, wurden die Hepatocytoma-Zellen im Rahmen von Vorarbeiten eingehend hinsichtlich der endogenen Expression einiger wichtiger Transportproteine für organische Anionen untersucht. Die Genexpression der Transportproteine Oat2, Oatp1a1, Oatp1a3, Oatp1a4, Oatp1b2, Rfc1 und FOLR, welche die Aufnahme organischer Anionen vermitteln, sowie der Effluxtransporter Mrp1, Mrp2, Mrp3, Mrp4, Mrp5, Mrp6 und P-Glykoprotein wurde mittels RT-PCR nachgewiesen. Das Expressionsprofil ist mit dem der Rattenleber nahezu identisch bzw. weist deutliche Unterschiede zum Expressionsprofil der Niere auf. So konnte bspw. der Oat1 bzw. der Oatp1a3 nur in der Niere, nicht aber in Leber und HPCT-1E3-Zellen, nachgewiesen werden. Ferner konnte sowohl in Leber als auch in Hepatocytoma-Zellen eine hepatozytenspezifisch ausgeprägte Oat2- bzw. Mrp2-Genexpression ermittelt werden. Nachfolgend wurde die funktionelle Aktivität der Transportproteine Oat2, Oatp1a1, Oatp1a4, Oatp1b2 und Rfc1 sowie Mrp1-6 und P-Glykoprotein bestimmt. Diese konnte unter Verwendung spezifischer Substrate sowie Inhibitoren für den jeweiligen Transporter bzw. die Transporterfamilie bestätigt werden. Die funktionelle Aktivität des Rfc1 wurde mittels der intrazellulären Akkumulation von fluoreszenzmarkiertem Methotrexat (FMTX) über 30 min bestimmt. Die FMTX-Aufnahme war sättigbar und wies in Übereinstimmung mit früheren Studien einen K_m -Wert von 3,4 μM auf (WONG et al. 1995, RAJGOPAL et al. 1995). Ferner konnte die Natriumabhängigkeit des Rfc1 bei neutralem pH bestätigt werden (HONSCHA u. PETZINGER 1999, KNEUER u. HONSCHA 2004). Zusammenfassend vereinigen HPCT-1E3-Zellen wichtige phänotypische Eigenschaften differenzierter Rattenhepatozyten in Kultur mit dem kontinuierlichen Wachstum immortalierter Zelllinien und stellen somit ein geeignetes *in vitro*-Modell für das Studium komplexer Leberfunktionen wie der Regulation von Transportproteinen dar (HALWACHS et al. 2005; s. Anhang).

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Chemikalien und Pufferlösungen

3.1.1 Chemikalien

Gebräuchliche Laborchemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland) und Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Deutschland) bezogen. Alle verwendeten Chemikalien lagen in der höchstmöglichen Reinheit, i.d.R. p.a. Qualität, vor.

Ferner kamen folgende Chemikalien zur Anwendung:

- Bisindolylmaleimid I (Calbiochem, San Diego, CA, USA)
- Chlorpromazin (Fluka, Taufkirchen, Deutschland)
- Dibutyryl-cAMP (Roche, Mannheim, Deutschland)
- H-89 Dihydrochlorid (Calbiochem, San Diego, CA, USA)
- Okadainsäure (A.G. Scientific Inc., San Diego, CA, USA)
- Phorbol-12-myristat-13-acetat (Calbiochem, San Diego, CA, USA)
- WST-1-Tetrazoliumsalz (Roche, Mannheim, Deutschland)

Von der Fa. Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Deutschland) wurden bezogen:

- Clotrimazol
- Diazepam
- 4-Dimethylaminoantipyrin
- DMSO
- Haloperidol
- H₂O₂ 30%
- Phenobarbital

3.1.2 Pufferlösungen

Citrat-Phosphat-Puffer

	<u>Endkonz.</u>
Lösung 1: 14,2 g/L Na ₂ HPO ₄	80 mM
Lösung 2: 10,5 g/L Citronensäuremonohydrat	50 mM

Lösung 1 vorlegen und mit Lösung 2 bis pH 5,0 titrieren.

Cholin-Tyrode-Puffer

<u>Lösung A</u>	<u>Endkonz.</u>	<u>Lösung B</u>	<u>Endkonz.</u>
1 g/L KCl	2,72 mM	57,16 g/L KH ₂ PO ₄	0,42 mM
1,07 g/L MgCl ₂ x 6H ₂ O	1,05 mM	ad 1L Aqua bidest.	
1,32 g/L CaCl ₂ x 2H ₂ O	1,8 mM		
ad 1L Aqua bidest.			
40 ml Stammlösung A			
0,2 ml Stammlösung B			
0,2 g Glukose	5,55 mM		
3,83 g Cholinchlorid	137 mM		
0,496 ml Cholinbicarbonat	12 mM		
ad 0,2 L Aqua bidest.			

Die Stammlösungen wurden bei 4 °C aufbewahrt und der Cholin-Tyrode-Puffer vor jedem Versuch neu hergestellt. Der pH des Cholin-Tyrode-Puffers wurde mit KOH auf 7,4 eingestellt und anschließend erfolgte die Inkubation des Puffers bei 37 °C im Wasserbad unter Carbogen für 30 min. Abschließend wurde der pH erneut mit KOH auf 7,4 eingestellt.

Kalium-Phosphat-Puffer

	<u>Endkonz.</u>
Lösung 1: 13,6 g/L KH ₂ PO ₄	0,1 M
Lösung 2: 22,8 g/L K ₂ HPO ₄	0,1 M

Lösung 2 vorlegen und mit Lösung 1 bis pH 7,4 titrieren.

PBS

		<u>Endkonz.</u>
8,59 g/L	NaCl	147 mM
0,2 g/L	KCl	2,7 mM
0,22 g/L	KH ₂ PO ₄	1,6 mM
1,52 g/L	Na ₂ HPO ₄	8,6 mM

ad 1L Aqua bidest.

Der Puffer wurde anschließend autoklaviert.

Tyrode-Puffer

<u>Lösung A</u>		<u>Endkonz.</u>	<u>Lösung B</u>		<u>Endkonz.</u>
160 g/L	NaCl	137 mM	57,96 g/L	Na ₂ H ₂ PO ₄	0,42 mM
4,06 g/L	KCl	2,72 mM	ad 1L Aqua bidest.		
4,26 g/L	MgCl ₂ x 6H ₂ O	1,05 mM			
5,29 g/L	CaCl ₂ x 2H ₂ O	1,8 mM			

ad 1L Aqua bidest.

12,5 ml Stammlösung A

0,25 ml Stammlösung B

0,25 g Glukose 5,5 mM

0,25 g NaHCO₃ 12 mM

ad 0,25 L Aqua bidest.

Die Stammlösungen wurden bei 4 °C aufbewahrt und der Tyrode-Puffer vor jedem Versuch neu hergestellt. Der pH des Tyrode-Puffers wurde mit NaOH auf 7,4 eingestellt und anschließend erfolgte die Inkubation des Puffers bei 37 °C im Wasserbad unter Carbogen für 30 min. Abschließend wurde der pH erneut mit NaOH auf 7,4 eingestellt.

3.2 Materialien und Reagenzien

- Agarose (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
- Antiserum: Polyklonal Schwein-Anti-Kaninchen-IgG; HRP Konjugat (Dako Cytomation, Hamburg, Deutschland)
- BCA Protein Assay (Pierce, Rockford, IL, USA)

- DEPC (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
- DNA-Standards:
 - Hyperladder™ I (Bioline, Luckenwalde, Deutschland)
 - 100 bp Ladder (GenSura Laboratories, San Diego, CA, USA)
- Erlenmeyerkolben 25 ml (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- FMTX (Molecular Probes, Eugene, NL, USA)

- ³[H]-MTX (6,18 x 10⁸ kBq/mmol; Moravek Biochemicals, Brea, CA, USA)
- Oligo dT₁₆ (MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland)
- Omniscript® RT Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland)
- PCR-Master-Mix S (peqlab, Erlangen, Deutschland)
- DNA Ladepuffer 6X (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland)
- RNeasy® Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland)
- Silikonöl PN 200 (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Silikonöl PK 20 (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Szintillatorflüssigkeit: Rotiszint® eco plus (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- TMB (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
- Trypsin/EDTA (PAA, Cölbe, Deutschland)

Agarosegel

Zur Herstellung eines 1% igen Agarosegels wurde 2 g Agarose mit 200 ml TBE Laufpuffer 0,5X vermischt und erhitzt. Das flüssige Gel wurde nachfolgend auf ca. 50-60 °C abgekühlt und in eine horizontale Elektrophorese-Kammer überführt. Anschließend erfolgte die Abkühlung des Agarosegels. Das Gel nahm durch die fortschreitende Polymerisation der Agarose eine feste Konsistenz an.

DEPC-Wasser

Zur Herstellung von 500 ml DEPC-Wasser wurden 500 ml Aqua bidest 0,5 ml DEPC hinzugefügt. Die Lösung wurde für 12 h bei 37 °C inkubiert und anschließend autoklaviert.

Lowry-Protein-Assay

<u>Lowry-Lösung A</u>	<u>Endkonz.</u>	<u>Lowry-Lösung B</u>	<u>Endkonz.</u>
20 g Na ₂ CO ₃ (H ₂ O frei)	186,8 mM	4 g CuSO ₄ x 5H ₂ O	1,6 mM
4 g NaOH	99 mM	ad 0,1 L Aqua bidest.	
1,6 g K-Na-Tartrat	5,61 mM		
1 g Natriumdodecylsulfat (SDS)	4,95 mM		
ad 1 L Aqua bidest.			

Lowry-Lösung C: 1 Teil Lösung A + 0,01 Teil Lösung B

Eichlösung: Kalium-Phosphat-Puffer 0,1 M pH 7,4 (s. 3.1.2)

PFA-Fixierlösung 4%

Zur Herstellung von PFA-Fixierlösung (4%) wurden 1,6 g PFA, 20 ml Aqua bidest sowie 4 Tropfen 1 N NaOH gut vermischt und die Lösung 10 min im Wasserbad bei 60 °C inkubiert. Anschließend wurde die PFA-Lösung mit 20 ml 2X PBS aufgefüllt und abschließend filtriert (0,2 µm).

Stammlösung ³[H]-MTX/MTX

Herstellung von 1 ml ³[H]-MTX/MTX-Stammlösung:

	<u>Endkonz.</u>
9 µl ³ [H]-Methotrexat (2,2 x 10 ⁶ dpm bzw. 37 kBq)	2 x 10 ⁷ dpm
500 µl 1 mM MTX in 150 mM HEPES/1mM MgCl ₂	500 µM
491 µl Tyrode- bzw. Cholintyrodepuffer (s. 3.1.2)	

10X TBE Laufpuffer

	<u>Endkonz.</u>
55 g Borsäure	44,5 mM
9,6 g Na ₂ -EDTA	1,3 mM
108 g Tris	10 mM

Herstellung von 0,5X TBE Laufpuffer: 25 ml 10X TBE Laufpuffer
 0,25 ml 200 µg/ml Ethidiumbromid
 ad 475 ml Aqua bidest. und mit NaOH auf pH 8,3 einstellen.

TMB-Substratlösung

Zusammensetzung : 1 ml 1mg/ml TMB in DMSO
9 ml 50 mM Citrat-Phosphat-Puffer pH 5,0
2 µl H₂O₂ 30%

3.3 Zellkulturbedarf

3.3.1 Einmalartikel

Die verwendeten 400 µl Zentrifugenröhrchen sowie die Szintillationsgefäße Mini Vials B wurden von der Fa. Roth (Karlsruhe, Deutschland), die 96-well-Zellkulturplatten von der Fa. TPP (Trasadingen, Schweiz) und die real time PCR-Röhrchen von der Fa. TreffLab (Degersheim, Schweiz) bezogen. Alle übrigen Einmalartikel stammen von der Fa. Greiner (Frickenhausen, Deutschland).

3.3.2 Kulturmedien und Zusätze

- DMEM (PAA, Cölbe, Deutschland)
- Dexamethason (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
- FCS (Gibco, Karlsruhe, Deutschland)
- Glutamin (PAA, Cölbe, Deutschland)
- Hypoxanthin (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
- Insulin (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
- Inosin (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
- Thymidin (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)

3.4 Geräte

- CO₂-Inkubator HERAcell® (Heraeus, Hanau, Deutschland)
- Elektrophorese-Kammer (horizontal) Modell Nr. EPS 600 (Pharmacia, Freiburg, Deutschland)
- Fluoreszenzspektrophotometer (Tecan, Crailsheim, Deutschland)

- Flüssigkeitsszintillationszähler Modell Nr. LS 6500
(Beckman, Fullerton, CA, USA)
- Lichtmikroskop Modell DMIL (Leica, Solms, Deutschland)
- pH-Meter Modell Nr. CG 842 (Schott, Mainz, Deutschland)
- Schüttelwasserbad Modell Nr. GL S400 (Grant Instruments Ltd, Cambridge, England)
- Schwenktisch (Stovall, Greensboro, NC, USA)
- Sicherheitswerkbank HERAsafe[®] HS (Heraeus, Hanau, Deutschland)
- Spektrophotometer (Tecan, Crailsheim, Deutschland)
- Software zur Auswertung der real time PCR: iCycler iQ Real Time Detection System
(Biorad, München, Deutschland)
- Software zu Erstellung der Rfc-spezifischen Primer und Proben: Primer Select
(DNASTAR Inc., Madison, WI, USA)
- Thermocycler:
 - Gene Amp[®] PCR System 970 (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland)
 - DNA Engine Peltier Thermal Cycler Modell Nr. PTC-200
(MJ Research, Reno, NV, USA)
 - iCycler iQ Detector (Biorad, München, Deutschland)
- UV-Transilluminator (Biometra, Göttingen, Deutschland)
- Waage Modell Nr. BP 610 (Satorius, Göttingen, Deutschland)
- Wärmeschrank Modell Nr. 304 (Melag, Berlin, Deutschland)
- Zentrifugen (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
 - Tischzentrifuge Modell Nr. 5415 C, Nr. 5415 D, Nr. 5417 C
 - Zentrifuge Modell Nr. 5403

3.5 Zellbiologische Methoden

3.5.1 Kultur der HPCT-1E3-Zellen

Die aus primären Rattenhepatozyten und Fao Reuber Hepatoma Zellen H35 gewonnene Hybridzelllinie HPCT-1E3 wurde freundlicherweise von Prof. Petzinger (Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Fachbereich Veterinärmedizin, Justus-Liebig-Universität,

Gießen, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Zu Beginn der Zellkultur wurden die HPCT-1E3-Zellen eine Woche in Dulbecco modified Eagle's medium (DMEM), supplementiert mit 0,1 mM Hypoxanthin, 0,4 μ M Aminopterin und 16 μ M Thymidin, im Rahmen der sog. „HAT-Selektion“ kultiviert und somit mögliche Zellrevertanten eliminiert. Das Prinzip der „HAT-Selektion“ beruht auf dem Mangel der Fa0 Reuber Hepatoma Zellen an dem Enzym Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase, so dass diese Zellrevertanten in „HAT-Medium“ aufgrund der Verarmung an Purinnucleotiden absterben. HPCT-1E3-Zellen dagegen besitzen dieses Enzym und können daher ebenso in „HAT-Medium“ kultiviert werden.

Die dauerhafte Kultur der Hepatocytoma-Zellen erfolgte in DMEM bei 37 °C unter Carbogen (5%) in T75-Zellkulturflaschen. Das Kulturmedium wurde mit 10% (v/v) fötalem Kälberserum (FCS), 2 mM Glutamin, 10 μ g/ml Insulin, 10 μ g/ml Inosin und 1,5 μ M Dexamethason supplementiert. Die HPCT-1E3-Zellen waren nach 3-4 Tagen differenziert und wiesen ein konfluentes Wachstum auf. Die Gewinnung der HPCT-1E3-Zellsuspension erfolgte durch einen zweimaligen Waschschrift mit 10 ml PBS und nachfolgender Inkubation mit 1 ml Trypsin/EDTA bei 37 °C unter Carbogen (5%) für 1 min. Anschließend wurden die HPCT-1E3-Zellen in 10 ml Kulturmedium resuspendiert, 1 ml dieser Zellsuspension mit 9 ml Kulturmedium in einer T75-Zellkulturflasche vermischt und die Zellkultur fortgesetzt. Die Hepatocytoma-Zellen wurden bis zu Passage 15 für Versuche eingesetzt, um die Einheitlichkeit der HPCT-1E3-Charakteristika zu gewährleisten.

3.5.2 WST-1 Toxizitätsstudien an HPCT-1E3-Zellen

Vor Beginn der Transport- bzw. Regulationsstudien wurde die Viabilität der HPCT-1E3-Zellen nach Vorbehandlung mit verschiedenen Chemikalien unter Verwendung des WST-1-Proliferationstests bestimmt, um die Zytotoxizität der einzelnen Substanzen zu ermitteln. Das Tetrazoliumsalz WST-1 wird durch intrazellulär lokalisierte mitochondriale Dehydrogenasen zu Formazan reduziert. Die spektrophotometrische Bestimmung (OD_{450}) der Formazan-Bildung erlaubt somit die indirekte Quantifizierung der metabolisch aktiven, viablen Zellen in der Probe.

Im Rahmen des WST-1-Proliferationstests wurden die HPCT-1E3-Zellen auf 96-well-Zellkulturplatten in einer Dichte von 18.000 Zellen/cm² ausgesät und nachfolgend über 48 h jeweils mit 10-3000 μ g/ml PB (Stammlösung: max. 300 mg/ml in MeOH), 4,62-92,3 μ g/ml

CBZ (Stammlösung: max. 92,3 mg/ml in MeOH), 0,035-35 µg/ml CPZ (Stammlösung: max. 35 mg/ml in 50% MeOH), 0,0001-20 µg/ml TCPOBOP (Stammlösung: max. 20 mg/ml in DMSO), 1,5-150 µg/ml Diazepam (Stammlösung: max. 150 mg/ml in EtOH), 0,04-4 µg/ml Haloperidol (Stammlösung: max. 4 mg/ml in DMSO) und 1,5-150 µg/ml Amphotericin B (Stammlösung: max. 250 µg/ml in H₂O deionisiert) in supplementiertem DMEM inkubiert. Die Inkubation der HPCT-1E3-Zellen mit 0,068-34 µg/ml CTZ (Stammlösung: max. 34 mg/ml in DMF) erfolgte über 60 h. Ferner diente eine über 48 h mit Triton (0,1% [v/v] in PBS) vorbehandelte Probe als Positiv- sowie unbehandelte HPCT-1E3-Zellen als Negativkontrolle. Die Lösungsmittelkonzentration betrug mit Ausnahme des Amphotericins B maximal 1%. Der Anteil an Lösungsmittel ergab für die Amphotericin B-Konzentration von 15 µg/ml 6% und die Konzentration von 150 µg/ml 60%. Am Tag 3 wurden die Zellen mit 200 µl PBS gewaschen, 200 µl WST-1-Reagenz (5% [v/v] in DMEM) zugesetzt und anschließend die Absorption zum Zeitpunkt $t = 0$ min und $t = 30$ min gemessen. Die Viabilität der Hepatocytoma-Zellen wurde durch Berechnung der absoluten Zunahme der Absorption ermittelt und in Relation zur unbehandelten Kontrolle in % dargestellt.

3.5.3 Regulationsstudien mit HPCT-1E3-Zellen

3.5.3.1 Inkubation der HPCT-1E3 mit Cytochrom P450-Induktoren und TCPOBOP

Zur Bestimmung der funktionellen Aktivität des Rfc1 anhand der Aufnahme von fluoreszenzmarkiertem Methotrexat wurden die HPCT-1E3-Zellen auf 96-well-Zellkulturplatten in einer Dichte von 18.000 Zellen/cm² ausgesät. Im Rahmen der Messung der Rfc1-vermittelten Aufnahme von ³[H]-Methotrexat erfolgte die Kultur der Hepatocytoma-Zellen auf Zellkulturschalen mit 94 mm Durchmesser in einer Aussaatdichte von 12.700 Zellen/cm². Zunächst wurde die Hybridzelllinie mit PB (30 µg/ml) über 6 h, 12 h, 24 h und 48 h vorbehandelt, um die optimale Inkubationsdauer für die Regulationsstudien mit den gewählten Cytochrom P450-Induktoren zu ermitteln. Anschließend wurden die HPCT-1E3-Zellen über 48 h jeweils mit PB (10 und 100 µg/ml), CBZ (3 und 9 µg/ml), CPZ (0,035 und 0,35 µg/ml), TCPOBOP (0,0001 und 0,001 µg/ml), Diazepam (1,5 und 15 µg/ml), Haloperidol (0,005 und 0,05 µg/ml) und Amphotericin B (1 und 10 µg/ml) in supplementiertem DMEM inkubiert. Die Inkubation der HPCT-1E3-Zellen mit CTZ (0,034 µg/ml und 0,34 µg/ml) erfolgte über 60 h (FAUCETTE et al. 2004). Die Lösungsmittelkonzentration betrug maximal

0,1%. Die gewählte Konzentration der jeweiligen Induktoren sowie der Kontrollen entspricht der des therapeutischen Plasmaspiegels in der Humanmedizin (MEYER 1994) bzw. dem 10fachen, im Falle von CBZ dem 3fachen, dieser Konzentration. Ferner wurde alle 24 h ein Mediumwechsel durchgeführt, um konstante Wirkspiegel der jeweiligen Testsubstanzen zu gewährleisten.

3.5.3.2 Inkubation der HPCT-1E3 mit Modulatoren der Phosphorylierung

Um den Einfluss von Modulatoren der Phosphorylierung auf die Rfc1-vermittelte Aufnahme von $^3\text{[H]}$ -Methotrexat zu untersuchen, wurden die HPCT-1E3-Zellen auf Zellkulturschalen mit 94 mm Durchmesser in einer Aussaatdichte von 12.700 Zellen/cm² über einen Zeitraum von drei Tagen kultiviert. Vor Beginn der Transportmessungen wurden die zunächst nicht mit PB-Induktoren vorbehandelten Hepatocytoma-Zellen mit den in Tab. 2 aufgeführten Substanzen 2 h inkubiert.

Tab. 2: Versuchsprotokoll zur Inkubation der HPCT-1E3-Zellen mit Modulatoren der Phosphorylierung.

Modulationsmechanismus	Substanz	Konz.[$\mu\text{g/ml}$]	Inkubationsdauer [h]
Proteinkinase C-Induktor	PMA	0,62	2
Proteinkinase C-Inhibitor	BIM	0,021	2
Proteinkinase A-Induktor	cAMP	5,1	2
Proteinkinase A-Inhibitor	H-89	0,052	2
Phosphatase 2A-Inhibitor	Okadain-säure	0,08	2

Diese wurden weiterhin wie folgt kombiniert:

- PMA ± Okadainsäure
- PMA ± BIM
- cAMP ± H-89

Danach erfolgte die Aufnahmemessung mit $^3\text{[H]}$ -Methotrexat wie unter 3.8.1.2 beschrieben. Abschließend wurde die Beteiligung der Proteinkinase C an der Regulation der Rfc1-vermittelten Aufnahme von $^3\text{[H]}$ -Methotrexat durch Cytochrom P450-Induktoren untersucht. Hierzu wurden die HPCT-1E3-Zellen mit den Cytochrom P450-Induktoren über 48 h (s. 3.5.3.1) und dem spezifischen PKC-Inhibitor BIM (Stammlösung: 22,1 $\mu\text{g/ml}$ in DMSO) über 2 h (s. Tab. 2) in der Kombination Phenobarbital ± BIM und dem CAR-Agonisten TCPOBOP ± BIM vorbehandelt. Die Lösungsmittelkonzentration im Kulturmedium betrug maximal 0,2%. Nachfolgend wurde die $^3\text{[H]}$ -MTX-Aufnahme (5 μM) über 20 min gemessen (s. 3.8.1.2).

3.6 Proteinbiochemische Methoden

3.6.1 Bestimmung der Gesamtproteinmenge mittels BCA Protein-Assay

Der Proteinnachweis beruht auf der sog. „Biuret Reaktion“, im Rahmen derer in einem alkalischen Milieu Cu^{++} zu Cu^+ reduziert wird. Cu^+ bildet ein Chelat mit 2 Molekülen Bicinchoninsäure in Form eines wasserlöslichen violettfarbenen Komplexes. Die Quantifizierung der Farbkomplexbildung und damit der Proteinkonzentration in der Probe erfolgt spektrophotometrisch (OD_{562}).

Das HPCT-1E3-Zellysate wurde unter Verwendung von 100 μl 1% SDS in PBS hergestellt (s. 3.8.1.1 und 3.8.1.2) und nach Beendigung der jeweiligen Aufnahmeversuche 25 μl des Lysats in eine 96-well-Zellkulturplatte pipettiert, wobei im Falle der Rfc1-Aufnahmestudien mit $^3\text{[H]}$ -Methotrexat das jeweilige Probenlysate 1:10 mit 1% SDS in PBS verdünnt wurde. Anschließend wurde 200 μl BCA Protein-Assay-Reagenz (98% [v/v] Reagenz A und 2% [v/v] Reagenz B) hinzugefügt und die Absorption zum Zeitpunkt $t = 0$ min und $t = 30$ min gemessen. Die Bestimmung der Proben-Proteinkonzentration erfolgte durch Berechnung der absoluten Zunahme der Absorption. Die Eichgerade wurde mittels der Verdünnungsreihe eines Albumin-Standards (0-1,5 mg/ml BSA in 1% SDS in PBS) erstellt.

3.6.2 Bestimmung der Gesamtproteinmenge nach der Methode von Lowry

Der Proteinnachweis nach LOWRY et al. (1951) beruht ebenfalls auf der sog. „Biuret Reaktion“ (s.o.) sowie der sog. „Folin-Ciocalteu-Reaktion“, welche auf der durch Cu-Ionen katalysierten Oxidation von aromatischen AS bei gleichzeitiger Reduktion der Folinreagenz basiert, wodurch in alkalischem Milieu ein blauer Farbkomplex entsteht.

Das HPCT-1E3-Zellysate (25 μ l) wurde 1:10 mit 1% SDS in PBS verdünnt, 750 μ l Lowry-Lösung C hinzugefügt, beides gut vermischt und die Probe 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde 37,5 μ l Folin-Reagenz hinzugegeben, wiederum gut vermischt und die Probe 40 min bei RT inkubiert. Die Absorption der Probe (OD_{660}) wurden gegen einen Nullwert (KPP) gemessen. Die Herstellung der Eichgerade erfolgte anhand der Verdünnungsreihe eines Albumin-Standards (0-1 mg/ml BSA in KPP).

3.6.3 Quantifizierung des Rfc1 Proteins in HPCT-1E3-Zellen

Die quantitative Rfc1-Analyse (s. Abb. 6) erfolgte mittels immunzytochemischem Nachweis des Rfc1-Proteins durch ein spezifisches Rfc1 Antiserum (HINKEN 2005). Das primäre Antiserum ist gegen die C-terminale Region des Rfc1 der Ratte gerichtet.

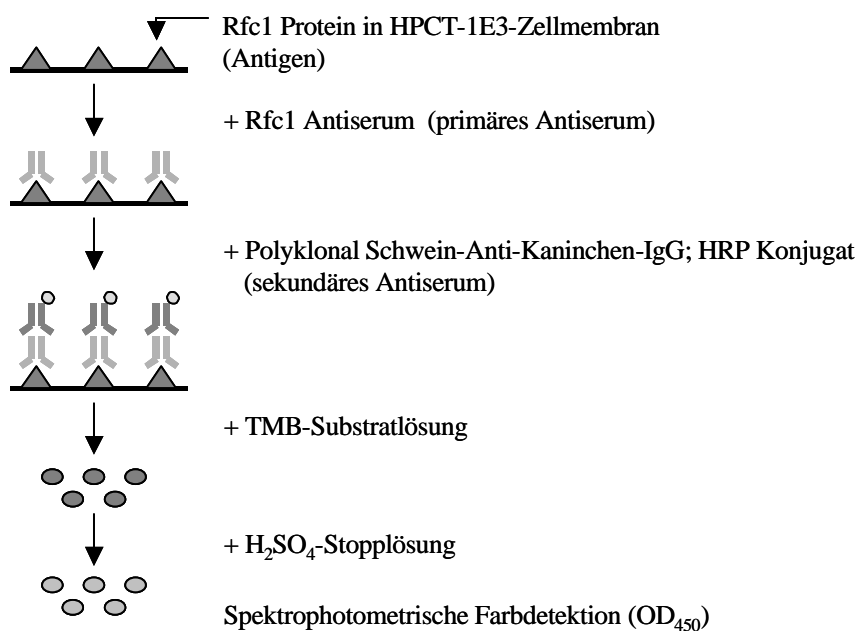


Abb. 6: Schematische Darstellung der Quantifizierung des Rfc1 Proteins in HPCT-1E3-Zellen.

Die HPCT-1E3-Zellen wurden auf 96-well-Zellkulturplatten kultiviert und jeweils mit PB, TCPOBOP und Diazepam über 12, 24 und 48 h vorbehandelt (s. 3.5.3.1). Am Tag 3 wurden die Hepatocytoma-Zellen bei RT zweimal mit 200 μ l PBS gewaschen, 10 min mit 200 μ l PFA (4%) fixiert, mit 200 μ l 50 mM NH_4Cl für 10 min bei RT abgesättigt und anschließend bei RT für 10 min mit 100 μ l 0,1% Triton X-100 permeabilisiert. Die HPCT-1E3-Zellen wurden nachfolgend über Nacht mit 200 μ l 3% BSA in PBS zur Unterdrückung unspezifischer Proteinbindungen inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte nach drei Waschschritten mit 200 μ l PBS die Zugabe von 100 μ l spezifischem Rfc1 Antiserum in einer Verdünnung von 1:500 in 3% BSA in PBS für 1 h bei RT. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit 200 μ l PBS für 10 min bei RT gewaschen und 100 μ l des HRP-konjugierten sekundären Antiserums in einer Verdünnung von 1:2000 in 3% BSA in PBS für 1 h bei RT hinzugefügt. Die Durchführung der nachfolgenden Waschschrritte mit PBS erfolgte wie oben beschrieben. Anschließend wurden die Hepatocytoma-Zellen mit 100 μ l TMB-Substratlösung 30 min bei RT und Dunkelheit inkubiert, die Reaktion mit 100 μ l 2 N H_2SO_4 abgestoppt und abschließend die Farbentwicklung der Proben spektrophotometrisch bestimmt (OD_{450}). Als Negativkontrollen dienten sowohl unbehandelte Zellen als auch Proben ohne Zusatz von primärem Antiserum sowie Proben ohne Zusatz von primärem und sekundärem Antiserum. Der Gesamtproteingehalt der Proben wurde unter Verwendung des BCA Protein-Assay (s. 3.6.1) bestimmt. Die Darstellung der relativen Rfc1-Proteinmenge erfolgte in % Extinktion pro mg Gesamtprotein im Vergleich zur Rfc1-Proteinmenge unbehandelter HPCT-1E3-Zellen.

3.7 Molekularbiologische Methoden

3.7.1 RNA-Isolierung aus HPCT-1E3-Zellen

Die Isolierung der HPCT-1E3-RNA erfolgte unter Verwendung des RNeasy[®] Mini Kit nach Angaben des Herstellers. Das Prinzip der RNA-Isolierung beruht hierbei auf den selektiven Bindungseigenschaften einer Säule mit einer Silikat-Gel-Membran einerseits und der Durchführung aufeinanderfolgender Zentrifugationsschritte mit hoher Umdrehungszahl (> 14.000 x g) andererseits.

Im Rahmen der RNA-Isolierung aus HPCT-1E3-Zellen wurden diese kultiviert, ein Zellvolumen von 5×10^6 Zellen gewonnen (s. 3.5.1) und die Hepatocytoma-Zellen anschließend zweimal mit ca. 1.100 x g bei RT für 5 min sedimentiert und einmal mit 5 ml

PBS resuspendiert. Zunächst wurde das HPCT-1E3-Zellpellet mit 350 µl GITC- sowie βME-haltigen Puffer lysiert und homogenisiert. GITC und β-Merkaptoethanol inaktivieren zudem intrazellulär lokalisierte RNasen und gewährleistet somit die Gewinnung von intakter RNA. Nachfolgend wurde dem HPCT-1E3-Lysat 350 µl 70%iger EtOH hinzugefügt, um ein adäquates Bindungsverhalten der RNA an die Silikat-Gel-Membran zu garantieren. Anschließend erfolgte die Überführung des Zelllysats in ein 2 ml Eppendorf-Sammelröhrchen. Die darin platzierte Säule wurde durch Zentrifugation bei 14.000 x g für 15 s (RT) durch Absorption der RNA an die Silikat-Gel-Membran beladen. Weiterführend wurde der Durchfluss verworfen und die Säule mit 700 µl Guanidin-haltigem Waschpuffer bei 14.000 x g für 15 s (RT) gereinigt. Nachfolgend wurde das Eppendorfgefäß mit dem Durchfluss verworfen und die Säule in ein neues 2 ml Eppendorf-Sammelröhrchen überführt und diese zweimal mit 500 µl EtOH-haltigem Waschpuffer bei 14.000 x g für 15 s (RT) gewaschen, wobei der Durchfluss nach jedem Waschschrift verworfen wurde. Anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 14.000 x g für 60 s (RT), um den noch verbliebenen Puffer zu entfernen. Das 2 ml Sammelröhrchen wurde verworfen und die Säule in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Die Elution der RNA mit RNase-freiem Wasser (30 µl) erfolgte durch Zentrifugation bei 14.000 x g für 60 s (RT). Die Säule wurde daraufhin verworfen und die RNA auf Eis gelagert. Der RNA-Gehalt und die Reinheit der Probe wurden spektrophotometrisch durch Messung der OD₂₆₀ und OD₂₈₀ bestimmt, wobei die Probe zuvor mit DEPC-Wasser verdünnt (2% [v/v]) und davon 80 µl auf eine 340-well-Platte gebracht wurde. Abschließend wurde die Konzentration der RNA-Probe mit DEPC-Wasser auf 1µg/µl RNA eingestellt.

Die Darstellung der zytoplasmatischen RNA erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese. Im Rahmen der Gelelektrophorese wandern geladene Moleküle in Abhängigkeit von der Molekülgröße in einem elektrischen Feld durch eine Gelmatrix, in diesem Fall Agarose. Die Sichtbarmachung der RNA bzw. DNA erfolgt hier mittels Ethidiumbromid. Dieser Farbstoff reichert sich prinzipiell durch Anlagerung an die RNA- bzw. DNA-Basenstruktur an und fluoresziert im UV-Licht (366 nm) orange-rot.

Für die Agarosegelelektrophorese wurde 1 µl Probe mit DEPC-Wasser verdünnt (25% [v/v]), anschließend mit 1 µl 6X DNA-Ladepuffer versetzt und im Agarosegel (1%) in TBE Laufpuffer (0,5X) elektrophoretisch aufgetrennt. Als Standard diente der DNA-Hyperladder™ I (5µl). Die Detektion des HPCT-1E3-RNA erfolgte unter UV-Licht.

3.7.2 Quantifizierung der Rfc1 mRNA durch real time RT-PCR

3.7.2.1 Durchführung der cDNA Synthese

Die Umschreibung von mRNA-Molekülen erfolgt mittels des Enzyms Reverse Transkriptase, einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase. Als Matrize für die Synthese der komplementären Einzelstrang-DNA-Kopien der RNA dienen angelagerte Oligonucleotide.

Die Umschreibung von 1 µg RNA (s. 3.7.1) erfolgte mittels des Omniscript® RT Kit nach Angaben des Herstellers unter Verwendung von 4 U Reverser Transkriptase und 1 µM Oligo dT₁₆-Primer. Die Anlagerung der Oligonucleotide sowie die Synthese der DNA-Kopie erfolgten bei 37 °C für 60 min. Die Reaktion wurde durch Erhitzung auf 93 °C für 5 min abgestoppt.

3.7.2.2 Nachweis der Spezifität der Rfc1 Primer und Proben

Die PCR ermöglicht die Amplifizierung einer spezifischen DNA-Sequenz durch einen dreiteiligen Reaktionszyklus bestehend aus der Denaturierung des DNA-Doppelstranges, Anlagerung von genspezifischen Oligonucleotidprimern an die komplementäre DNA-Sequenz und der Extension zu neuen DNA-Doppelsträngen durch eine thermophile DNA-Polymerase, der Taq-Polymerase.

Zu Beginn der quantitativen Analyse der Rfc1 mRNA wurden unter Verwendung des Programms PrimerSelect und Genbankeinträgen für die betreffenden Gene spezifische Primer zur Detektion von Rfc1 sowie β-Actin ausgewählt (Tab. 3). Die Primer wurden in DEPC-Wasser gelöst und die Konzentration der Stammlösung auf 10 pmol/µl eingestellt. Die PCR-Amplifizierung von 1µl cDNA wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Denaturierung des DNA-Doppelstranges (30 s, 94 °C), Anlagerung der Primer (0,4 pmol) und Extension (45 s, 62 °C) mittels 1,25 U Taq-DNA-Polymerase, 0,25 mM dNTPs, 2 mM MgCl₂ und 1X Reaktionspuffer. Das Volumen des Ansatzes betrug 25 µl. Nachfolgend wurde die Reaktion über 40 Zyklen durchgeführt.

Anschließend wurde 5 µl des PCR-Produktes mit 1 µl 6X Ladepuffer versetzt und im Agarosegel (2%) in TBE Laufpuffer 0,5X elektrophoretisch aufgetrennt. Die Verifizierung der PCR-Produktgröße erfolgte durch Vergleich mit einem DNA-Standard (100 bp Ladder) unter UV-Licht. Als Positivkontrolle diente Rfc1-Plasmid cDNA (1ng in DEPC-Wasser), als

Negativkontrolle RNA in DEPC-Wasser (50 ng).

Tab. 3: Real time PCR Primer und Proben: Sequenzen und zu erwartende Produktgrößen.

	Primer (5´- 3´)	PCR Produktgröße (bp)	T _m (°C)	Konz. [pmol/µl]
Rfc-1				
Mtx_1254 F	CTGGTCATCGCGAGTGTCAT	146	62	10
Mtx_1399 R	GCAATCTGAAAAGTGGCAATG			
MtxProbe_1311 F	FAM- ATCCCGGACATCTGGGTCTGCTA- BHQ-1			
βActin				
ratACTB_695 F	AGAGGGAAATCGTGCGTGAC	137	62	10
ratACTB_832 R	CGATAGTGATGACCTGACCGT			
ratACTBprobe_765 F	TexRed- CACTGCGCATCCTCTTCCTCCC- BHQ-2			

3.7.2.3 Durchführung der real time PCR

Die ABI TaqMan Technologie ermöglicht die Quantifizierung eines PCR Produktes während der Amplifikation durch Einsatz von genspezifischen Fluoreszenzfarbstoffen, den sog. „TaqMan-Proben“. Die TaqMan-Probe weist eine Markierung mit einem Fluoreszenzfarbstoff am 5´-Ende (Reporterfluoreszenz), hier in Form von FAM oder TexRed, sowie mit einem Quencherfarbstoff (BHQ) am 3´-Ende auf und lagert sich im spezifischen Sequenzbereich zwischen den Primerbindungsstellen an. Aufgrund der räumlichen Nähe unterdrückt der Quencherfarbstoff die Reporterfarbstofffluoreszenz. Während der PCR-Reaktion kommt es durch die 5´-Exonuklease-Aktivität der Taq-DNA-Polymerase zur Hydrolyse der TaqMan-Probe (HOLLAND et al. 1991, LEE et al. 1993) und der Effekt des „Quenching“ wird aufgehoben. Die Fluoreszenz des Reporterfarbstoffs wird messbar und wird als C_T-Wert („Threshold Cycle“) dargestellt, der die Zyklenzahl ausdrückt, bei welcher die Reporterfluoreszenz über das konstante Level der Hintergrundfluoreszenz (mittlere Standardabweichung x 10) hinaus ansteigt. Der C_T-Wert steigt in Abhängigkeit der Konzentration der eingesetzten cDNA an und dient somit als Maß für die Quantifizierung des PCR-Produktes.

Die HPCT-1E3-Zellen wurden mit 0,001 µg/ml TCPOBOP bzw. mit 100 µg/ml PB für 12 h, 24 h bzw. 48 h vorbehandelt (s. 3.5.3.1). Nach Synthese der HPCT-1E3-cDNA (s. 3.7.1 und 3.7.2.1) erfolgte die Quantifizierung des Rfc1-cDNA-Fragments unter Verwendung der in 3.7.2.2 aufgeführten genspezifischen Primer und Proben durch real time PCR. Diese wurde unter Gebrauch des „iCycler iQ Detectors“ von Biorad unter den in 3.7.2.2 beschriebenen Bedingungen mittels PCR-Master-Mix S, unter Verwendung von 1,25 U Taq-DNA-Polymerase, 0,2 mM dNTPs, 1,5 mM MgCl₂, 0,4 pmol Forward- bzw. Reverse-Primer und 0,2 pmol TaqMan-Probe (Tab. 3), durchgeführt. Das Reaktionsvolumen betrug 25 µl.

3.7.2.4 Auswertung der real time PCR

Die real time PCR wurde als relative Quantifizierung durchgeführt, d.h. die Normalisierung der PCR erfolgte durch Messung der Rfc1-Genexpression in Relation zur Genexpression eines Referenzgenes (β-Actin) als interner Standard. Schwankungen, unabhängig von der Exonuklease-Aktivität der Taq-DNA-Polymerase, wurden durch die Bestimmung des C_T-Wertes ausgeglichen. Ferner wurden mögliche unspezifische Einflüsse wie eine fehlerhafte Quantifizierung durch Voluminaschwankungen (Pipettierfehler) durch Verwendung eines PCR-Mix minimiert sowie durch die Berechnung sog. „dynamischer Faktoren“ zu Beginn jeder PCR-Reaktion berücksichtigt. Die Berechnung der sog. „dynamischen Faktoren“ erfolgt automatisch durch Erfassung der Fluoreszenz jeder der zu analysierenden PCR-Proben vor Ablauf der eigentlichen PCR-Reaktion, sobald die Arbeitstemperatur über 95 °C ansteigt. Zur Bestimmung der Effizienz (E) der PCR-Reaktion wurde zusätzlich bei jeder PCR eine serielle Verdünnung einer Referenz-cDNA (MTX-1-Plasmid DNA) als sog. externer Standard mitgeführt und daraus eine Eichgerade aus C_T-Wert gegen den dekadischen Logarithmus der Verdünnung der eingesetzten Plasmid DNA erstellt. Die Berechnung der Rfc1-Genexpression in Relation zur Expression des Referenzgenes β-Actin (R) erfolgte nach einem Modell zur relativen Quantifizierung ohne PCR-Effizienz-Korrektur (LIVAK u. SCHMITTGEN 2001):

$$\mathbf{R} = \mathbf{E}^{-\Delta\Delta \text{CT}}$$

$$\mathbf{E} = 1/\text{LOG}(y)$$

$$\Delta \text{CT} = \text{CT Rfc1} - (\text{MW CT } \beta\text{Actin})$$

$$\Delta\Delta \text{CT} = \Delta \text{CT Kontrolle} - (\Delta \text{CT} + \text{Induktor})$$

$$\text{CT} = \text{C}_T\text{-Wert (Treshlod Cycle)}$$

E	= PCR-Effizienz
MW	= Mittelwert
R	= Relative Genexpression
y	= Steigung der Eichgeraden (C_T -Wert gegen den dekadischen Logarithmus der Verdünnung des externen Standards)

3.8 Transportstudien

3.8.1 Bestimmung der funktionellen Aktivität des Rfc1 in HPCT-1E3-Zellen

3.8.1.1 Messung des intrazellulären Gehalts an fluoreszenzmarkiertem Methotrexat mittels Fluoreszenzspektrophotometrie

Die HPCT-1E3-Zellen wurden kultiviert und vorbehandelt (s. 3.5.3.1). Am Tag 3 wurde die Zellkultur zweimal mit 200 μ l PBS gewaschen und 10 min bei 37 °C unter Carbogen (5%) inkubiert. Anschließend wurde der PBS Waschpuffer durch 100 μ l 10 μ M FMTX (Stammlösung: 1 mM FMTX in 150 mM HEPES/1 mM $MgCl_2$ [pH 7,4]) in Tyrode- bzw. Cholin-Tyrode-Puffer ersetzt und die Zellen bei 37 °C unter Carbogen (5%) 30 min inkubiert. Nachfolgend wurden die Hepatocytoma-Zellen zweimal mit 200 μ l PBS gewaschen und diese abschließend mit 100 μ l 1% SDS in PBS lysiert. Die Bestimmung der intrazellulären Akkumulation von FMTX über 30 min erfolgte anschließend mittels Fluoreszenzspektrophotometrie (485 nm/535 nm). Die Eichgerade wurde anhand einer seriellen Verdünnungsreihe von 1 μ M FMTX in 1% SDS in PBS erstellt. Die Proteinbestimmung erfolgte unter Verwendung des BCA-Protein-Assays (s. 3.6.1) und die Darstellung der FMTX-Akkumulation in HPCT-1E3-Zellen in pmol pro mg Protein über 30 min.

3.8.1.2 Messung der Aufnahme von $^3[H]$ -Methotrexat über 20 min

Die HPCT-1E3-Zellen wurden kultiviert und vorbehandelt (s. 3.5.3.1 und 3.5.3.2). Zwei Stunden vor Beginn der Aufnahmemessung erfolgte ein Wechsel des Kulturmediums. Die Hepatocytoma-Zellen wurden zweimal mit 10 ml PBS gewaschen, mit 1 ml Trypsin/EDTA 1 min bei 37 °C unter Carbogen (5%) inkubiert und mit 2 ml Kulturmedium resuspendiert.

Nachfolgend wurde die Zellsuspension von jeweils 6 Zellkulturschalen pro Probe in einem 25 ml Erlenmeyerkolben gesammelt und diese 20 min bei 37 °C unter Carbogen (5%) unter Schwenken inkubiert. Anschließend wurden 4,5 ml HPCT-1E3-Zellsuspension pro Probe in 2 ml Eppendorfgefäße überführt, die Zellen bei 4200 x g für 3 s sedimentiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet jeweils in 1 ml Tyrode- bzw. Cholin-Tyrode-Puffer (37 °C) resuspendiert. Die Sedimentation und Resuspension der Zellen wurde zweimal wiederholt und abschließend das Suspensionsvolumen auf jeweils 1,3 ml eingestellt. 1,2 ml der HPCT-1E3-Zellsuspension wurde in auf 37 °C vorgewärmte 25 ml Erlenmeyerkolben überführt und die Suspension im Wasserbad 10 min unter Schwenken bei 37 °C unter Carbogen (5%) inkubiert. Die verbleibenden 100 µl der Suspension wurden zur Proteinbestimmung zurückbehalten. Anschließend erfolgte die Zugabe von 12 µl eines Gemisches aus ³[H]-MTX und nicht markiertem MTX (Stammlösung: s. 3.2), welches jeweils in Tyrode- bzw. Cholin-Tyrode-Puffer aufgenommen wurde. Im Rahmen der Aufnahmemessung wurde 2 x 10⁷ dpm ³[H]-MTX in 5 µM MTX eingesetzt. Die Entnahme von 100 µl Aliquots erfolgte bei t = 0,25; 0,75; 1,25; 3; 5; 10 und 20 min. Die Zellsuspension wurde in ein 400 µl Zentrifugenröhrchen mit 50 µl 4 M KOH und 150 µl eines Silikonöl 200:Silikonöl 20-Gemisches (3:1) überführt, wobei sich die KOH am Gefäßboden befand und mit dem Silikonölgemisch überschichtet war. Die Sedimentation der Hepatocytoma-Zellen erfolgte bei 10.600 x g für 10 s. Das Zellpellet wurde nachfolgend in der am Gefäßboden befindlichen Kalilauge über Nacht bei RT inkubiert. Nach der Lyse des Zellpellets wurden die Zentrifugenröhrchen unter Verwendung eines Schneidegerätes in der Mitte durchtrennt und das Zelllysate sowie der Überstand der ersten drei Proben jeweils in 3 ml Szintillationsflüssigkeit in Szintillatorröhrchen aufgenommen, die Proben gut durchmischt und diese bei 37 °C über Nacht inkubiert. Abschließend wurden die Proben nochmals gut durchmischt und die inkorporierte Radioaktivität der jeweiligen Probe mittels Flüssigkeitsszintillationszählung über 4 min ermittelt.

Die Bestimmung der Proteinmenge erfolgte bei Vorbehandlung der HPCT-1E3-Zellen mit Cytochrom P450-Induktoren anhand der Methode nach LOWRY et al. (1951; s. 3.6.2) und bei Vorbehandlung der Hepatocytoma-Zellen mit Modulatoren der Phosphorylierung unter Verwendung des BCA-Protein-Assays (s. 3.6.1).

Die Berechnung der aufgenommenen Substratmenge in Mol/mg Protein erfolgte abschließend anhand der Formel:

$$\text{Aufnahme in Mol/mg Protein} = \frac{\Sigma \text{dpm}}{\text{SA} \times 2,22 \times 10^{12}} + \frac{\text{K}}{10^4} \times \frac{\text{dpmp} \times 10}{\Sigma \text{dpm} \times \text{P}}$$

Σdpm = dpm Überstand + dpm Pellet

SA = spezifische Aktivität in Ci/Mol

K = Kaltsubstanz in Mol/L

dpmp = dpm Pellet

P = Proteingehalt in mg/ml

Weiterhin wurde im Falle der Rfc1-vermittelten MTX-Aufnahme nach Vorbehandlung mit Cytochrom P450-Induktoren vom PB-Typ und/oder Modulatoren der Phosphorylierung (s. 4.6.2) die Aufnahmerate (V_{influx}) von $^3\text{[H]}$ -MTX in pmol pro mg Protein und min mittels Regressionsanalyse anhand der nachfolgend aufgeführten Formel berechnet:

$$y = y_0 + a (1 - e^{-bx})$$

y = Zell-assoziiertes MTX [pmol/mg Protein]

x = Zeit [min]

y_0 = unspezifische Proteinbindung

b = Geschwindigkeitskonstante K_e für den Efflux des intrazellulären MTX zurück in das Medium in 1/min

a x b = die Geschwindigkeit des MTX-Influx (V_{influx}) in Anwesenheit der gewählten Konzentration an MTX (5 μM) bzw. Na^+ (137 mM) in pmol/mg Protein/min

3.9 Statistische Auswertung

Die statistische Analyse aller ermittelten Daten wurde unter Verwendung der Microsoft Excel Software (Office 2000) durchgeführt. Die HPCT-1E3-Zellviabilität sowie die Rfc1-Aufnahmeaktivität sind als Mittelwerte von mind. 4 Einzelmesswerten \pm Standardabweichung (SD) dargestellt. Abweichend davon wurde im Falle der Rfc1-vermittelten FMTX-Akkumulation die Standardabweichung des Mittelwertes (SEM) bestimmt. Die Berechnung erfolgte anhand der Formel:

$$\frac{\text{SD}}{\sqrt{n}} \quad (n = \text{Anzahl der Replikate})$$

Im Rahmen der Datenanalyse wurde zunächst ein G-Test zur Ermittlung und Entfernung von der Normalverteilung stark abweichender Werte durchgeführt. Anschließend erfolgte die Bestimmung signifikanter Unterschiede zwischen den jeweiligen Messreihen anhand des Student's *t*-Test, wobei eine statistische Signifikanz bei $P \leq 0,05$ angenommen wurde.

4 ERGEBNISSE

4.1 WST-1 Toxizitätsstudien an HPCT-1E3-Zellen

Vor Beginn der Rfc1-Transport- bzw. Regulationsstudien wurde die Viabilität der HPCT-1E3-Zellen nach Vorbehandlung mit verschiedenen Chemikalien unter Verwendung des WST-1-Proliferationstests bestimmt (s. 3.5.2), um die Zytotoxizität der einzelnen Substanzen zu ermitteln. Die Viabilität der Hepatocytoma-Zellen wurde anhand des WST-1-Umsatzes über 30 min durch Bestimmung der absoluten Zunahme der optischen Dichte bei 450 nm ermittelt und in % der unbehandelten Kontrolle dargestellt. Für die Beurteilung der Zytotoxizität der jeweiligen Substanz war insbesondere die Konzentration, welche der des therapeutischen Plasmaspiegel in der Humanmedizin, bzw. dem 10fachen dieser Konzentration entspricht, von Bedeutung.

4.1.1 Toxizität von Phenobarbital, Carbamazepin und Diazepam

Um den Einfluss von Phenobarbital (PB), Carbamazepin (CBZ) und Diazepam auf die Viabilität der HPCT-1E3-Zellen zu bestimmen, wurden diese jeweils mit 10-3000 µg/ml PB, 4,62-92,3 µg/ml CBZ und 1,5-150 µg/ml Diazepam über 48 h inkubiert. Wie der Abb. 7 zu entnehmen ist, kam es nach Vorbehandlung mit PB, CBZ und Diazepam zunächst zu einem initialen Anstieg und nachfolgend, mit zunehmender Konzentration der jeweiligen Substanz, zur raschen Abnahme der HPCT-1E3-Zellviabilität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die Viabilität der Hepatocytoma-Zellen betrug sowohl nach Vorbehandlung mit 10 und 100 µg/ml PB als auch nach Vorbehandlung mit 3 und 9 µg/ml CBZ sowie 1,5 µg/ml Diazepam mindestens 95%. Nach Inkubation der HPCT-1E3-Zellen mit 15 µg/ml Diazepam lag diese bei ca. 60%. Darüber hinaus konnte nach Vorbehandlung mit 10 µg/ml PB, 4,62 µg/ml CBZ bzw. 1,5 µg/ml Diazepam ein leichter aber nicht signifikanter Anstieg der HPCT-1E3-Zellviabilität beobachtet werden, welcher vermutlich auf einer regenerativen Hyperplasie im Rahmen eines adaptiven, zellulären Schutzmechanismus bei Inkubation mit gering zytotoxischen Konzentrationen der jeweiligen Substanz beruht (GREGUS u. KLAASSEN 1996, CONOLLY u. LUTZ 2004).

Der IC_{50} -Wert, welcher die Inhibitorkonzentration angibt, bei der die HPCT-1E3-Zellviabilität auf die Hälfte abgenommen hat, betrug für PB ca. 900 µg/ml, für CBZ ca. 90 µg/ml und für Diazepam ca. 30 µg/ml.

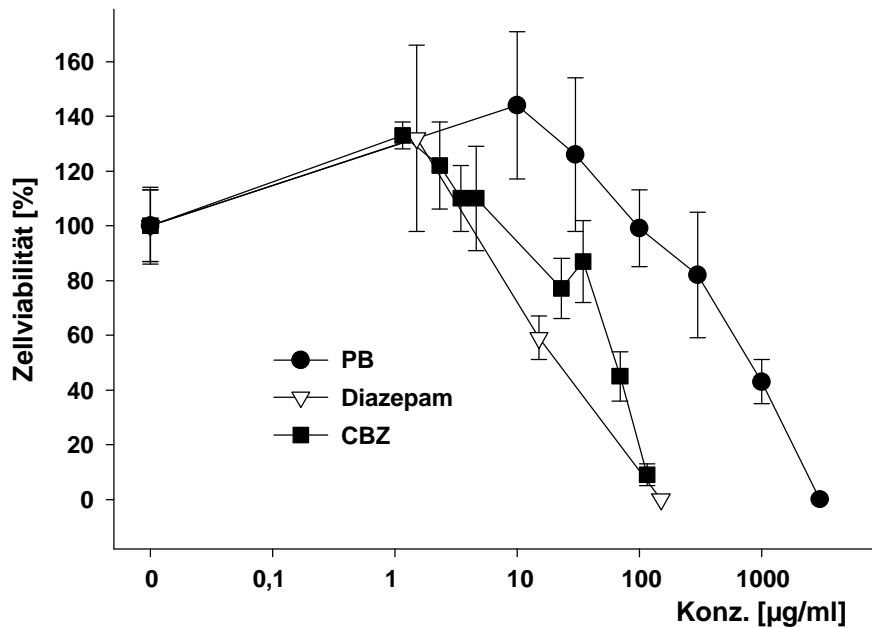


Abb. 7: Toxizität von Phenobarbital, Carbamazepin und Diazepam in HPCT-1E3-Zellen.

HPCT-1E3-Zellen wurden auf 96-well-Zellkulturplatten zu 18.000 Zellen/cm² ausgesät und mit 10-3000 $\mu\text{g/ml}$ PB, 4,62-92,3 $\mu\text{g/ml}$ CBZ und 1,5-150 $\mu\text{g/ml}$ Diazepam über 48 h vorbehandelt. Die Zytotoxizität der jeweiligen Substanz wurde unter Verwendung des WST-1-Proliferationstests bestimmt. Die Ermittlung der HPCT-1E3-Zellviabilität erfolgte durch Bestimmung des WST-1-Umsatzes über 30 min (s. 3.5.2). Die Darstellung der Zellviabilität erfolgte in % der unbehandelten Kontrolle (MW \pm SD; n = 6).

4.1.2 Toxizität von Chlorpromazin und Haloperidol

Um die Zytotoxizität von Chlorpromazin (CPZ) und Haloperidol zu ermitteln, wurden die HPCT-1E3-Zellen jeweils für 48 h mit 0,035-35 $\mu\text{g/ml}$ CPZ und 0,04-4 $\mu\text{g/ml}$ Haloperidol vorbehandelt. Die Viabilität der Hepatocytoma-Zellen betrug nach Vorbehandlung mit 0,035 und 0,35 $\mu\text{g/ml}$ CPZ sowie mit 0,05 und 0,5 $\mu\text{g/ml}$ Haloperidol mindestens 90% (s. Abb. 8). Der IC₅₀-Wert ergab für CPZ ca. 3,5 $\mu\text{g/ml}$, während dieser für Haloperidol jenseits der maximal eingesetzten Wirkstoffkonzentration lag.

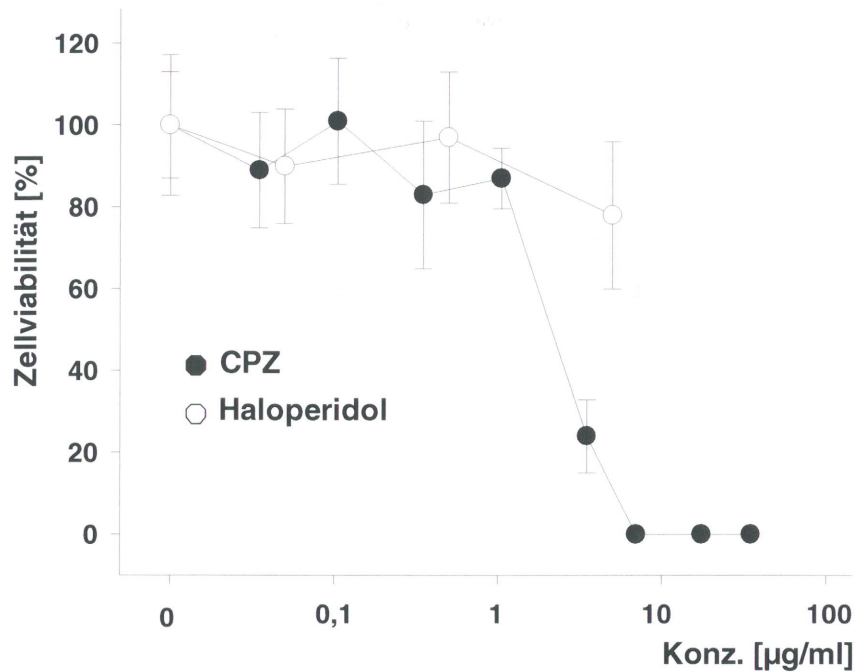


Abb. 8: Toxizität von Chlorpromazin und Haloperidol in HPCT-1E3-Zellen.

HPCT-1E3-Zellen wurden auf 96-well-Zellkulturplatten zu 18.000 Zellen/cm² ausgesät und mit 0,035-35 µg/ml CPZ und 0,04-4 µg/ml Haloperidol über 48 h vorbehandelt. Die Zytotoxizität der jeweiligen Substanz wurde unter Verwendung des WST-1-Proliferationstests bestimmt (s. Abb.7; MW ± SD; n = 6).

4.1.3 Toxizität von Clotrimazol und Amphotericin B

Der Einfluss von Clotrimazol (CTZ) und Amphotericin B auf die HPCT-1E3-Zellviabilität wurde durch die Vorbehandlung der Zelllinie mit 0,068-34 µg/ml CTZ für 60 h und 1,5-150 µg/ml Amphotericin B für 48 h bestimmt. Wie der Abb. 9 zu entnehmen ist, führte die Inkubation mit 0,068 bzw. 0,68 µg/ml CTZ und 1,5 bzw. 15 µg/ml Amphotericin B gleichsam wie die Vorbehandlung mit PB, CBZ bzw. Diazepam (s. Abb. 7) zu einem Anstieg der HPCT-1E3-Zellviabilität, welcher vermutlich wiederum durch adaptive Zellmechanismen bedingt ist (s. 4.1.1). Höhere Konzentrationen an CTZ hatten dagegen einen starken Abfall der Zellviabilität zur Folge.

Der IC₅₀-Wert ergab für CTZ ca. 6 µg/ml. Dieser konnte für Amphotericin B in dem gewählten Konzentrationsbereich von 1,5-150 µg/ml nicht ermittelt werden, da die Viabilität auch nach Vorbehandlung der Zellen mit 150 µg/ml Amphotericin B bei ca. 65 % lag.

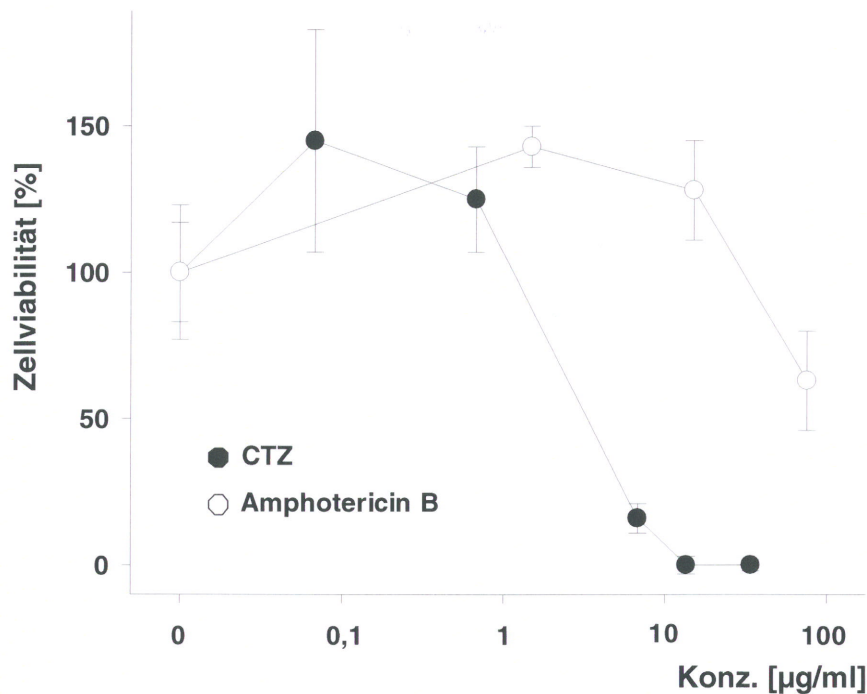


Abb. 9: Toxizität von Clotrimazol und Amphotericin B in HPCT-1E3-Zellen.

HPCT-1E3-Zellen wurden auf 96-well-Zellkulturplatten zu 18.000 Zellen/cm² ausgesät und mit 0,068-34 $\mu\text{g/ml}$ CTZ für 60 h und 1,5-150 $\mu\text{g/ml}$ Amphotericin B für 48 h vorbehandelt. Die Zytotoxizität der jeweiligen Substanz wurde unter Verwendung des WST-1-Proliferationstests bestimmt (s. Abb.7; MW \pm SD; n = 6).

4.1.4 Toxizität von TCPOBOP

Abschließend wurde die Zytotoxizität des CAR-Agonisten TCPOBOP durch Vorbehandlung der HPCT-1E3-Zellen mit 0,0001-20 $\mu\text{g/ml}$ über 48 h bestimmt. Die Viabilität der Hepatocytoma-Zellen betrug nach Vorbehandlung mit 0,0001 und 0,001 $\mu\text{g/ml}$ TCPOBOP ca. 85% bzw. 90% und wies keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle auf (s. Abb. 10). Der IC₅₀-Wert lag über der maximal eingesetzten Wirkstoffkonzentration.

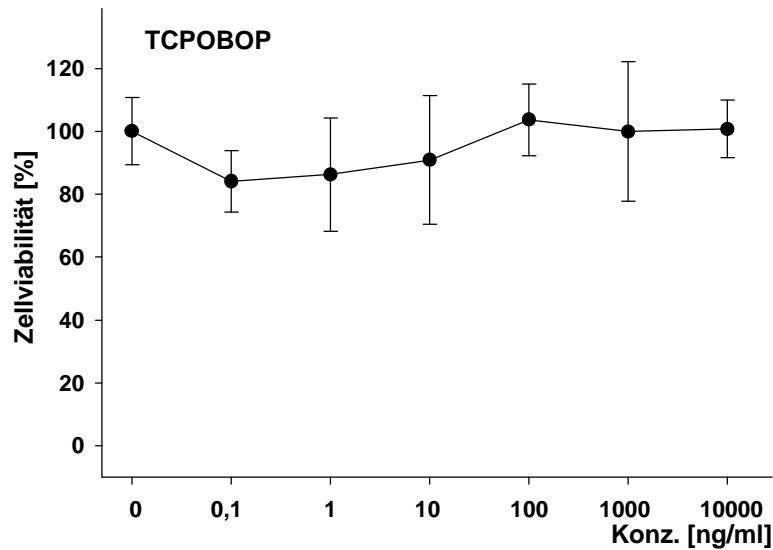


Abb. 10: Toxizität von TCPOBOP in HPCT-1E3-Zellen.

HPCT-1E3-Zellen wurden auf 96-well-Zellkulturplatten zu 18.000 Zellen/cm² ausgesät und mit 0,0001-20 µg/ml TCPOBOP für 48 h vorbehandelt. Die Zytotoxizität von TCPOBOP wurde unter Verwendung des WST-1-Proliferationstests bestimmt (s. Abb.7; MW ± SD; n = 6).

4.2 Beeinflussung der Rfc1-vermittelten Aufnahme von fluoreszenzmarkiertem Methotrexat in HPCT-1E3-Zellen durch Induktoren vom PB-Typ

Der Reduced Folate Transporter1 (Rfc1) vermittelt die Aufnahme von reduzierten Folaten und Antifolaten wie Methotrexat (HONSCHA et al. 2000; s. 2.2.3.2) und dem Methotrexat-Derivat FMTX, welche charakteristischerweise bei pH 7,4 bis zu 90% natriumabhängig ist (KNEUER u. HONSCHA 2004). Für die natriumunabhängige hepatozelluläre Aufnahme von Methotrexat ist dagegen der Oat2 (Slc22a7) verantwortlich (SIMONSON et al. 1994, SEKINE et al. 1998). Die biliäre Elimination des Folatantagonisten wird ferner durch die Effluxtransporter Mrp1 (Abcc1), Mrp2 (Abcc2) und Mrp3 (Abcc3) vermittelt (s. 2.1.2 und Tab. 1; KRUH u. BELINSKY 2003).

Die leberzellähnliche Hybridzelllinie HPCT-1E3 weist die Expression eines funktionell aktiven Rfc1 auf und stellt somit ein der *in vivo*-Situation nahestehendes *in vitro*-Modell für Rfc1-Transport- und Regulationsstudien dar (HONSCHA et al. 2000, s. Anhang).

Um den Einfluss von Cytochrom P450-Induktoren auf die funktionelle Aktivität des Rfc1 zu bestimmen, wurden die HPCT-1E3-Zellen mit den jeweiligen Substanzen vorbehandelt. Die gewählte Konzentration der Induktoren und Kontrollen, d.h. Arzneimittel mit gleicher Indikation, welche aber nicht mit Kernrezeptoren interagieren (s. 2.3.1.1), entspricht der des

therapeutischen Plasmaspiegels in der Humanmedizin (MEYER 1994) bzw. dem 10fachen, im Falle von Carbamazepin dem 3fachen, dieser Konzentration (s. 3.5.3.1). Anschließend wurde die Aufnahme von fluoreszenzmarkiertem Methotrexat in An- oder Abwesenheit von extrazellulärem Natrium gemessen und die intrazelluläre Akkumulation von 10 μM FMTX über 30 min mittels Fluoreszenzspektrophotometrie (485 nm/535 nm) ermittelt (s. 3.8.1.1). Die Darstellung der FMTX-Akkumulation in HPCT-1E3-Zellen erfolgte in pmol pro mg Protein über 30 min.

4.2.1 Phenobarbital in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer

Phenobarbital (PB) ist der Prototyp der sog. „Cytochrom P450-Induktoren vom PB-Typ“ (s. 2.3.1.1), welche charakteristischerweise für die über den Kernrezeptor CAR-vermittelte hepatozelluläre Induktion von CYP 2B verantwortlich sind (CZEKAJ 2000).

Um die optimale Inkubationsdauer für die Regulationsstudien mit den jeweiligen Cytochrom P450-Induktoren zu ermitteln, wurden die Hepatocytoma-Zellen mit PB (30 $\mu\text{g/ml}$) über 6, 12, 24 und 48 h vorbehandelt und anschließend die Aufnahme von 10 μM FMTX über 30 min in Anwesenheit von extrazellulärem Natrium bestimmt. Nach Vorbehandlung der Zelllinie mit PB für 6, 12 und 24 h kam es zu einer leichten, wenn auch nicht signifikanten, Abnahme der FMTX-Aufnahme um durchschnittlich 15% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (s. Abb. 11). Wie der Abb. 11 ferner zu entnehmen ist, führte die Inkubation mit 30 $\mu\text{g/ml}$ PB über 48 h zu einer signifikanten Reduktion der FMTX-Akkumulation in den HPCT-1E3-Zellen um etwa ein Drittel im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Anhand der Ergebnisse dieser FMTX-Transportstudie wurde für die nachfolgenden Regulationsstudien, mit Ausnahme der Vorbehandlung mit Clotrimazol, durchgängig eine Inkubationsdauer von 48 h gewählt.

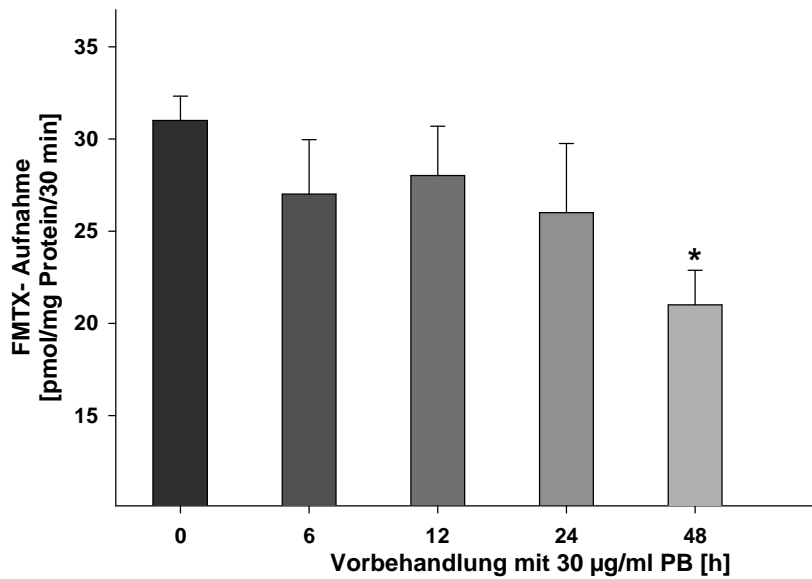


Abb. 11: Einfluss von Phenobarbital auf die Rfc1-vermittelte FMTX-Aufnahme in HPCT-1E3-Zellen in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer.

HPCT-1E3-Zellen wurden auf 96-well-Zellkulturplatten in einer Dichte von 18.000 Zellen/cm² ausgesät und diese mit 30 µg/ml PB für 6, 12, 24 und 48 h vorbehandelt. Die Rfc1-Aktivität wurde anhand der intrazellulären Akkumulation von 10 µM FMTX über 30 min in natriumhaltigem Tyrode-Puffer bestimmt (MW ± SEM; * P<0.05; n = 8).

4.2.2 Phenobarbital, Carbamazepin und Diazepam

Das Antiepileptikum Carbamazepin gehört ebenso wie Phenobarbital zur Gruppe der sog. „Cytochrom P450-Induktoren vom PB-Typ“ (CZEKAJ 2000). Diazepam dagegen wird zwar in der gleichen klinischen Indikation wie PB und CBZ eingesetzt, stellt jedoch *in vitro* keinen CYP 2B-Induktor dar (NIMS et al. 1997).

Um den Einfluss von Phenobarbital, Carbamazepin und Diazepam auf die Rfc1-vermittelte Aufnahme von FMTX in HPCT-1E3-Zellen zu ermitteln, wurden diese, wie in 3.5.3.1 beschrieben, vorbehandelt und anschließend die intrazelluläre FMTX-Akkumulation (10 µM) in An- oder Abwesenheit von extrazellulärem Natrium über 30 min bestimmt. Wie in der Abb. 12 zu sehen ist, führte die Inkubation mit PB und CBZ zu einer signifikanten Abnahme der FMTX-Akkumulation in natriumhaltigem Tyrode-Puffer. Ferner wies die Substrataufnahme nach Vorbehandlung mit Diazepam eine leichte, aber nicht signifikante, Reduktion auf. Die Akkumulation in Abwesenheit von Natrium war dagegen, im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, sowohl nach Vorbehandlung mit PB und CBZ als auch mit Diazepam nicht signifikant verändert. Die natriumabhängige Rfc1-vermittelte FMTX-

Aufnahme, welche als Differenz der FMTX-Akkumulation in An- und Abwesenheit von Natrium berechnet wird, war sowohl nach Vorbehandlung mit PB und CBZ, nicht aber Diazepam, deutlich reduziert.

Die Ergebnisse dieser Transportstudie sprechen für eine Regulation der Rfc1-Aktivität, nicht aber der des natriumunabhängigen Oat2, durch Induktoren vom PB-Typ. Im weiteren Versuchsablauf wurde in nachfolgenden FMTX-Transportstudien die mögliche Regulation des Rfc1 durch weitere PB-artige Induktoren wie Chlorpromazin (CPZ) und Clotrimazol (CTZ) sowie dem direkten CAR-Agonisten TCPOBOP untersucht.

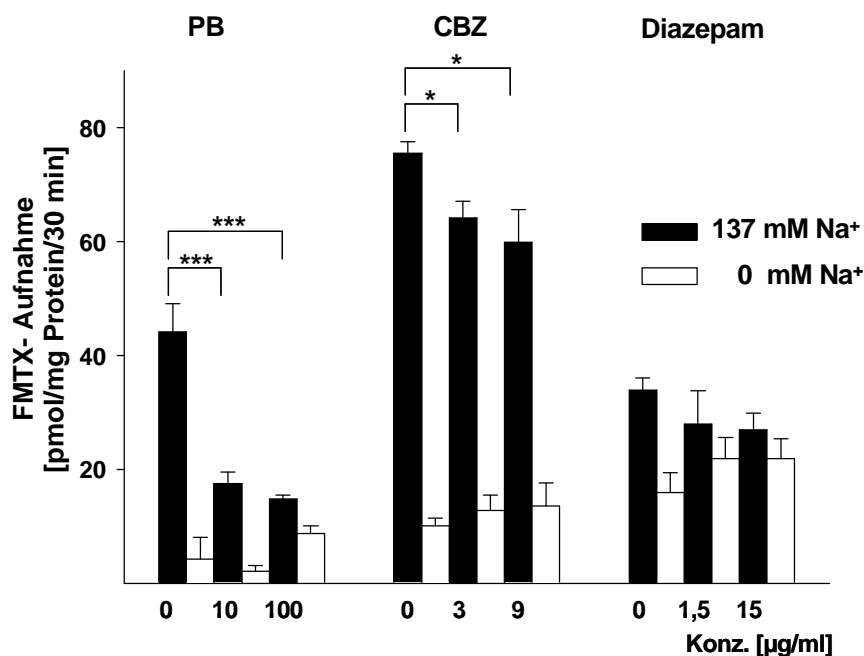


Abb. 12: Einfluss von Phenobarbital, Carbamazepin und Diazepam auf die Rfc1-vermittelte Aufnahme von FMTX.

HPCT-1E3-Zellen wurden auf 96-well-Zellkulturplatten zu 18.000 Zellen/cm² ausgesät und diese für 48 h mit 10 und 100 µg/ml PB, 3 und 9 µg/ml CBZ und 1,5 und 15 µg/ml Diazepam vorbehandelt. Dargestellt ist die Akkumulation von 10 µM FMTX über 30 min in natriumhaltigem Tyrode-Puffer bzw. in natriumdepletiertem Cholin-Tyrode-Puffer. Die Rfc1-Aktivität wurde anhand der Differenz der intrazellulären Akkumulation von 10 µM FMTX über 30 min in An- oder Abwesenheit von extrazellulärem Natrium bestimmt (MW ± SEM; * P<0.05, *** P<0.001; n = 8).

4.2.3 Chlorpromazin und Haloperidol

Das Neuroleptikum Chlorpromazin (CPZ), nicht aber Haloperidol (KUDO u. ISHIZAKI 1999), welches in gleicher klinischer Indikation wie CPZ eingesetzt wird, stellt einen weiteren Vertreter der Gruppe der PB-artigen Induktoren dar (SUEYOSHI et al. 1999).

Die mögliche Regulation der Rfc1-Aufnahmeaktivität durch CPZ und Haloperidol wurde mittels der Vorbehandlung der HPCT-1E3-Zellen (s. 3.5.3.1) und anschließender Bestimmung der intrazellulären Akkumulation von 10 μ M FMTX in An- oder Abwesenheit von extrazellulärem Natrium über 30 min untersucht. Die FMTX-Akkumulation in natriumhaltigem Tyrode-Puffer wies nach Vorbehandlung mit 0,035 und 0,35 μ g/ml CPZ eine stark signifikante Reduktion auf (s. Abb. 13). Die Inkubation mit 0,005 μ g/ml Haloperidol führte zu einem schwach signifikanten Anstieg der FMTX-Akkumulation in Anwesenheit von extrazellulärem Natrium, während die mit 0,05 μ g/ml Haloperidol vorbehandelten Hepatocytoma-Zellen keine signifikant unterschiedliche FMTX-Akkumulation im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle aufwiesen. Weiterhin konnte keine signifikante Veränderung der Akkumulation des MTX-Analogons nach Vorbehandlung mit Chlorpromazin bzw. Haloperidol in natriumfreiem Cholin-Tyrode-Puffer ermittelt werden. Die Rfc1-vermittelte FMTX-Aufnahme, welche als Differenz der intrazellulären Akkumulation von FMTX in An- oder Abwesenheit von extrazellulärem Natrium berechnet wird, wies nach Vorbehandlung mit CPZ eine stark signifikante Reduktion auf. Dagegen führte die Inkubation mit Haloperidol nicht zu einer deutlich veränderten Rfc1-Aktivität.

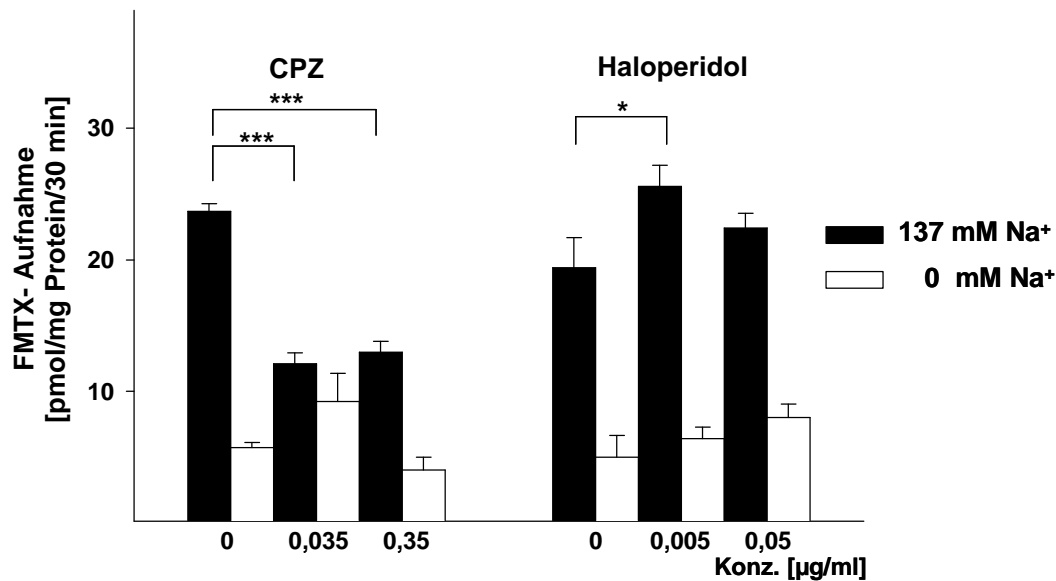


Abb. 13: Einfluss von Chlorpromazin und Haloperidol auf die Rfc1-vermittelte Aufnahme von FMTX.

HPCT-1E3-Zellen wurden auf 96-well-Zellkulturplatten zu 18.000 Zellen/cm² ausgesät und diese für 48 h mit 0,035 und 0,35 µg/ml CPZ sowie 0,005 und 0,05 µg/ml Haloperidol vorbehandelt. Dargestellt ist die Akkumulation von 10 µM FMTX über 30 min in natriumhaltigem Tyrode-Puffer bzw. in natriumfreiem Cholin-Tyrode-Puffer. Die Rfc1-Aktivität wurde mittels der intrazellulären Akkumulation von 10 µM FMTX über 30 min in An- oder Abwesenheit von extrazellulärem Natrium bestimmt (MW ± SEM; * P<0.05, *** P<0.001; n = 8).

4.2.4 Clotrimazol und Amphotericin B

Das Antimykotikum Clotrimazol (CTZ) gehört ebenfalls in die Gruppe der „Cytochrom P450-Induktoren vom PB-Typ“ (CZEKAJ 2000). Amphotericin B wird in der gleichen klinischen Indikation wie Clotrimazol eingesetzt, stellt jedoch keinen CYP 2B-Induktor dar (BEKERSKY et al. 2002).

Im Rahmen der Rfc1-Regulationsstudie wurden die HPCT-1E3-Zellen wie in 3.5.3.1 beschrieben mit CTZ bzw. Amphotericin B vorbehandelt und anschließend die intrazelluläre FMTX-Akkumulation (10 µM) wie oben dargestellt ermittelt. Wie der Abb. 14 zu entnehmen ist, hatte die Vorbehandlung mit CTZ eine signifikante Abnahme der FMTX-Akkumulation in Anwesenheit von Natrium zur Folge. Die Inkubation mit 1 und 10 µg/ml Amphotericin B führte dagegen, im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, zu keiner abweichenden intrazellulären Akkumulation von fluoreszenzmarkiertem Methotrexat. Ferner war die natriumunabhängige FMTX-Akkumulation nach Vorbehandlung mit CTZ leicht, aber nicht

signifikant, reduziert, während diese nach Inkubation mit Amphotericin B, in Relation zur Kontrolle, keine signifikante Veränderung aufwies. Weiterhin führte die Vorbehandlung mit CTZ nicht aber Amphotericin B zu einer signifikanten Reduktion der natriumabhängigen, Rfc1-vermittelten Aufnahme von FMTX in HPCT-1E3-Zellen.

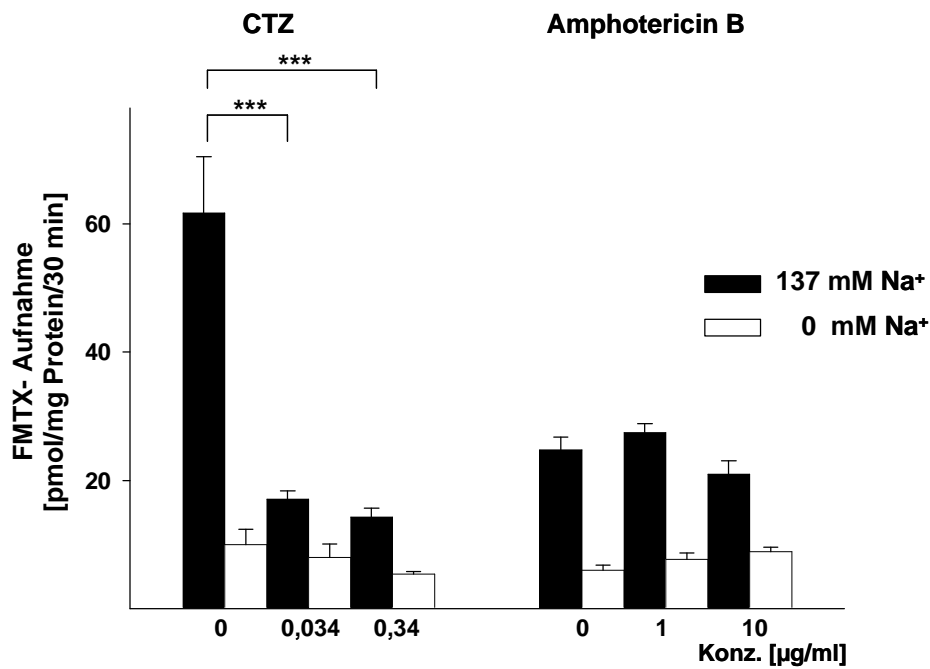


Abb. 14: Einfluss von Clotrimazol und Amphotericin B auf die Rfc1-vermittelte Aufnahme von FMTX.

HPCT-1E3-Zellen wurden auf 96-well-Zellkulturplatten zu 18.000 Zellen/cm² ausgesät und diese jeweils für 60 h mit 0,034 und 0,34 µg/ml CTZ bzw. für 48 h mit 1 und 10 µg/ml Amphotericin B vorbehandelt. Dargestellt ist die Akkumulation von 10 µM FMTX über 30 min in natriumhaltigem Tyrode-Puffer bzw. in natriumdepletiertem Cholin-Tyrode-Puffer. Die Rfc1-Aktivität wurde anhand der intrazellulären Akkumulation von 10 µM FMTX über 30 min in An- oder Abwesenheit von extrazellulärem Natrium bestimmt (MW ± SEM; *** P<0.001; n = 8).

4.2.5 TCPOBOP

Die CYP 2B Induktion durch den CAR-Agonisten TCPOBOP erfolgt im Gegensatz zu den genannten Cytochrom P450-Induktoren vom PB-Typ, die eine indirekte CAR-Aktivierung vermitteln, durch direkte Bindung des TCPOBOP an den CAR-Rezeptor (TZAMELI et al. 2000).

Um den Einfluss des direkten CAR-Agonisten TCPOBOP und somit der CAR-Signalkaskade (s. 2.3.1.1) auf die Rfc1-vermittelte FMTX-Aufnahme in HPCT-1E3-Zellen zu ermitteln, wurden diese, wie in 3.5.3.1 beschrieben, vorbehandelt und anschließend die intrazelluläre Akkumulation von 10 µM FMTX bestimmt. Die Vorbehandlung mit dem CAR-Agonisten führte zu einer stark signifikanten Abnahme der FMTX-Akkumulation in natriumhaltigem Tyrode-Puffer (s. Abb. 15). Die intrazelluläre Akkumulation in Abwesenheit von Natrium wies dagegen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle keine signifikante Veränderung auf. Wie in der Abb. 15 ferner zu erkennen ist, war die natriumabhängige, Rfc1-vermittelte FMTX-Aufnahme nach Inkubation mit TCPOBOP signifikant reduziert.

Zusammenfassend konnte anhand dieser Studien gezeigt werden, dass die Rfc1-vermittelte FMTX-Aufnahme über 30 min durch Induktoren vom PB-Typ, wahrscheinlich unter Beteiligung der CAR-Signalkaskade, reguliert wird. Es handelt sich weiterhin um einen Rfc1-spezifischen Mechanismus, da die natriumunabhängige FMTX-Aufnahme, welche in der Leber durch den Oat2 vermittelt wird (s. 4.2), keine signifikante Veränderung aufwies. Im Rahmen dieser Transportstudien wurde allerdings nur das intrazelluläre FMTX-Transportgleichgewicht nach 30 min in An- bzw. Abwesenheit von extrazellulärem Natrium bestimmt. Der mögliche Einfluss der Mrp-vermittelten Elimination des Fluoreszenzanalogs auf das FMTX-Transportgleichgewicht blieb dagegen unberücksichtigt. Im Anschluss an die FMTX-Transportstudien wurde deshalb die zeitabhängige Aufnahme von ³[H]-Methotrexat in HPCT-1E3-Zellen in An- bzw. Abwesenheit von extrazellulären Natriumionen bei t = 0,25; 0,75; 1,25; 3; 5; 10 und 20 min gemessen (s. 3.8.1.2) und deren Beeinflussung durch Induktoren vom PB-Typ bestimmt.

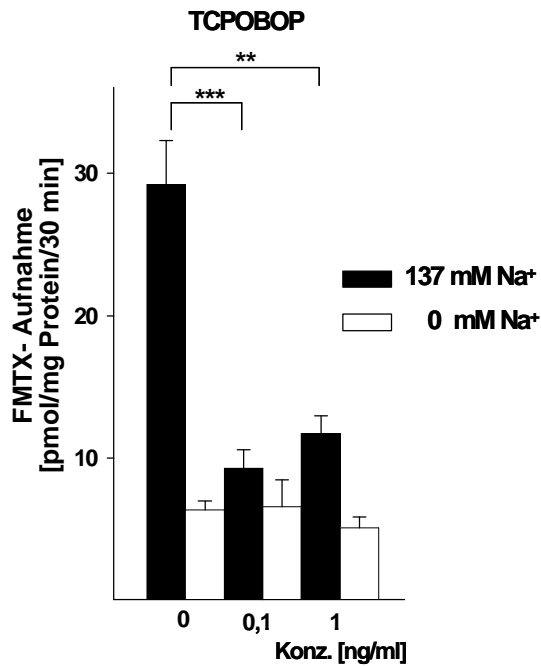


Abb. 15: Einfluss des direkten CAR-Agonisten TCPOBOP auf die Rfc1-vermittelte FMTX-Aufnahme.

HPCT-1E3-Zellen wurden auf 96-well-Zellkulturplatten zu 18.000 Zellen/cm² ausgesät und diese für 48 h mit 0,1 und 1 ng/ml TCPOBOP vorbehandelt. Dargestellt ist die Akkumulation von 10 µM FMTX über 30 min in natriumhaltigem Tyrode-Puffer bzw. in natriumfreiem Cholin-Tyrode-Puffer. Die Rfc1-Aktivität wurde anhand der intrazellulären Akkumulation von 10 µM FMTX über 30 min in An- oder Abwesenheit von extrazellulärem Natrium bestimmt (MW ± SEM; ** P<0,01, *** P<0.001; n = 8).

4.3 Zeitabhängige Beeinflussung der Rfc1-vermittelten Aufnahme von ³[H]-Methotrexat in HPCT-1E3-Zellen durch Induktoren vom PB-Typ

Die Bestimmung der Rfc1-vermittelten Aufnahme von ³[H]-Methotrexat diente der Abgrenzung einer möglichen Mrp-vermittelten MTX-Exportaktivität sowie der Aufklärung einer möglichen Veränderung der Rfc1-bedingten MTX-Transportrate in HPCT-1E3-Zellen nach Inkubation mit PB-artigen Induktoren. Hierzu erfolgte die Messung der Rfc1-vermittelten ³[H]-MTX-Aufnahme (s. 3.8.1.2), wobei die aufgenommene Substratmenge in pmol pro mg Protein dargestellt wurde.

Im Rahmen der Aufnahme von ³[H]-MTX (5µM) über 20 min in unbehandelte HPCT-1E3-Zellen kam es jeweils zur Einstellung eines intrazellulären Transportgleichgewichts des Chemotherapeutikums (s. Abb. 16-20). Die MTX-Aufnahme bei t = 0,25 min diente als sog. „Nullpunkt“ der Aufnahmekurve. Dieser lag jeweils bei ca. 15-25 pmol/mg Protein.

Anschließend konnte über 3 min eine initiale Aufnahmephase von ca. 40 pmol MTX/mg Protein verzeichnet werden. Der Beginn der Einstellung einer intrazellulären Plateauphase der MTX-Aufnahme trat nach einer Inkubationsdauer von 5 min auf. Die intrazelluläre Akkumulation von $^3\text{[H]}$ -MTX über 20 min betrug in natriumhaltigem Tyrode-Puffer ca. 50-55 pmol/mg Protein und in natriumfreiem Cholin-Tyrode-Puffer im Mittel 30 pmol/mg Protein. Hierbei entsprach die intrazelluläre MTX-Konzentration nach 20 min in Anwesenheit extrazellulärer Natriumionen durchschnittlich dem 2,5fachen des MTX-Gehaltes zum Zeitpunkt $t = 0,25$ min. Die natriumabhängige, Rfc1-vermittelte $^3\text{[H]}$ -MTX-Aufnahme wurde als Differenz zwischen der intrazellulären MTX-Akkumulation in An- und Abwesenheit von extrazellulärem Natrium berechnet. Als Beurteilungskriterium für die Rfc1-Aktivität diente der Anteil der natriumabhängigen Akkumulation von Methotrexat nach Einstellung des intrazellulären Transportgleichgewichts sowie insbesondere die Aufnahmegeschwindigkeit innerhalb der initialen Aufnahmephase, da das Transportgleichgewicht möglicherweise auch durch andere Faktoren wie einer möglichen Mrp-Effluxaktivität beeinflusst wird. Zusammenfassend wiesen die Aufnahmedaten darauf hin, dass 50-70% der $^3\text{[H]}$ -MTX-Aufnahme in die HPCT-1E3-Zellen Rfc1-vermittelt erfolgt, wobei jedoch der Anteil der unspezifischen Membranbindung unberücksichtigt blieb.

Um den Einfluss der Cytochrom P450-Induktoren vom PB-Typ (s. 2.3.1.1) auf die zeitabhängige Rfc1-vermittelte Aufnahme von $^3\text{[H]}$ -MTX zu bestimmen, wurden die HPCT-1E3-Zellen kultiviert und mit der jeweiligen Substanz vorbehandelt (s. 3.5.3.1). Eine Vorbehandlung mit den jeweiligen Kontrollsubstanzen erfolgte im Rahmen der $^3\text{[H]}$ -MTX-Aufnahmemessungen exemplarisch mit Diazepam. Ferner wurden zu allen Messzeitpunkten signifikante bis sehr hoch signifikante Unterschiede der Rfc1-Aufnahmeaktivität in vorbehandelten Hepatozytoma-Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ermittelt (s. Tab. 4).

4.3.1 Phenobarbital, Carbamazepin und Diazepam

Der Einfluss der Induktoren Phenobarbital (PB) und Carbamazepin (CBZ) sowie der Kontrollsubstanz Diazepam auf die Rfc1-vermittelte MTX-Aufnahme wurde nach Inkubation der Hepatozytoma-Zellen, wie in 3.5.3.1 aufgeführt, ermittelt. Die Vorbehandlung mit PB und CBZ führte zu einer signifikanten Reduktion der MTX-Akkumulation über 20 min in natriumhaltigem Tyrode-Puffer (s. Abb. 16). In Abwesenheit von Natrium hingegen wies die

initiale MTX-Aufnahmegeschwindigkeit sowie der MTX-Gehalt nach Einstellung des intrazellulären Transportgleichgewichts sowohl nach Vorbehandlung mit PB als auch mit CBZ keine signifikante Veränderung auf. Die Inkubation mit PB und CBZ führte im Vergleich zu unbehandelten HPCT-1E3-Zellen zu einer stark signifikanten Reduktion der Rfc1-vermittelten MTX-Aufnahme (s. Tab. 4). Diese betrug innerhalb der initialen Aufnahmephase nach Vorbehandlung mit PB ca. 80% bzw. nach Beginn der Einstellung des intrazellulären MTX-Transportgleichgewichts ca. 75% und nach Vorbehandlung mit CBZ ca. 80 bzw. 60%.

Im Gegensatz dazu wies die MTX-Aufnahmegeschwindigkeit sowie die MTX-Akkumulation über 20 min nach Vorbehandlung mit 1,5 und 15 µg/ml Diazepam für 48 h sowohl in An- als auch in Abwesenheit von extrazellulären Natriumionen keine statistisch signifikante Reduktion im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle auf (s. Abb. 17).

Die Ergebnisse dieser Transportstudie sprechen für eine Regulation der Rfc1-Aktivität durch Induktoren vom PB-Typ. Im weiteren Versuchsablauf wurde in nachfolgenden ³[H]-MTX-Transportstudien die mögliche Regulation des Rfc1 durch weitere PB-artige Induktoren wie Chlorpromazin (CPZ) und Clotrimazol (CTZ) sowie dem direkten CAR-Agonisten TCPOBOP untersucht.

Tab. 4: Statistische Signifikanz der Beeinflussung der Rfc1-vermittelten ³[H]-Methotrexat-Aufnahme durch Cytochrom P450-Induktoren vom PB-Typ (MW; * = P<0,05%, ** = P<0,01%, *** = P<0,001%; n = 7).

			Na-abh. Aufnahme	Na-unabh. Aufnahme
PB	10	µg/ml	***	n.s.
PB	100	µg/ml	***	n.s.
CBZ	3	µg/ml	**	n.s.
CBZ	9	µg/ml	**	n.s.
CPZ	0,035	µg/ml	**	n.s.
CPZ	0,35	µg/ml	***	n.s.
CTZ	0,034	µg/ml	*	n.s.
CTZ	0,34	µg/ml	**	n.s.
TCPOBOP	0,1	ng/ml	**	n.s.
TCPOBOP	1	ng/ml	**	n.s.

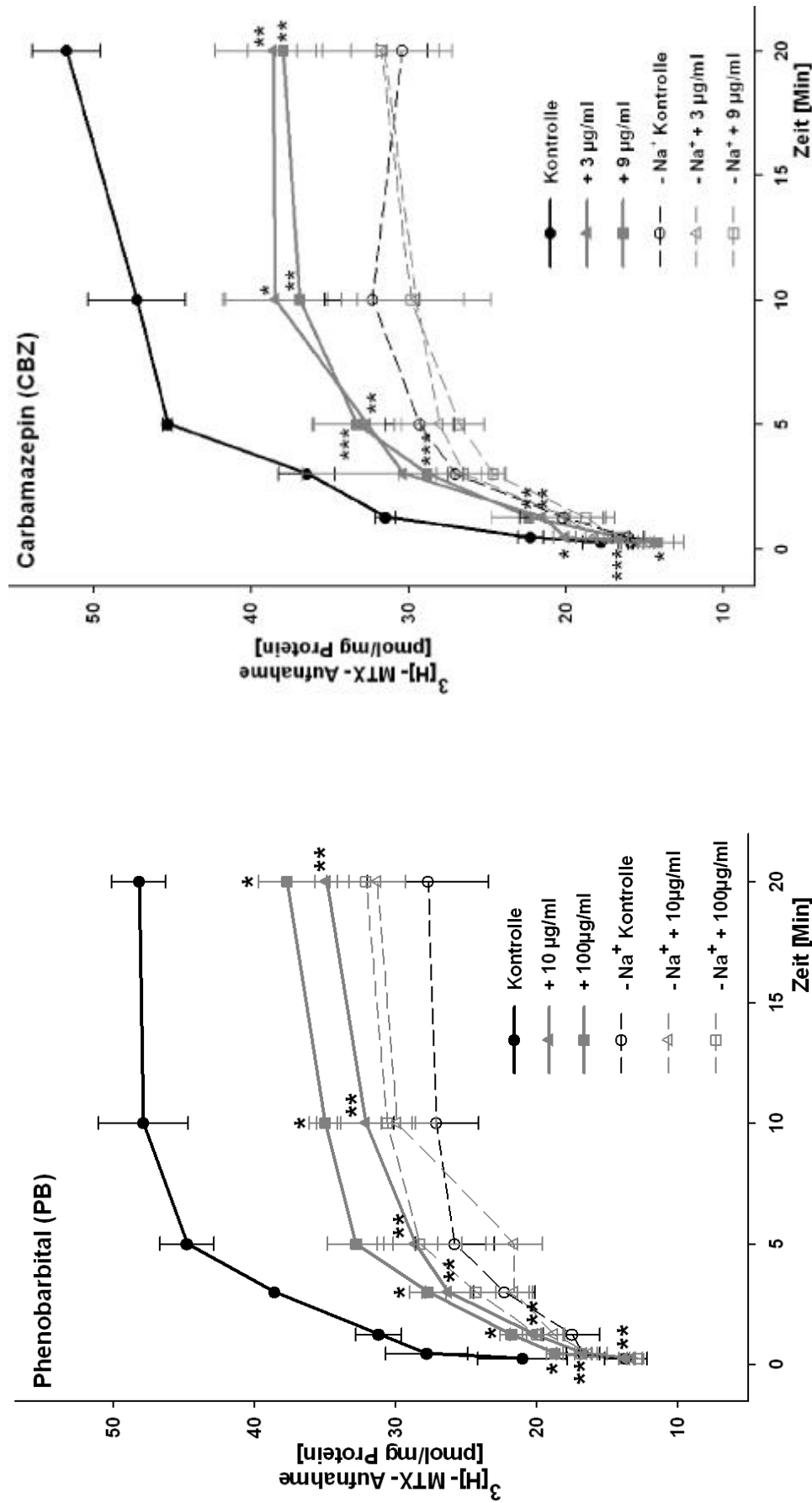


Abb. 16: Beeinflussung der ³[H]-MTX-Aufnahme in HPCT-1E3-Zellen durch Phenobarbital und Carbamazepin. HPCT-1E3-Zellen wurden auf Zellkulturschalen in einer Aussaatdichte von 12.700 Zellen/cm² kultiviert und für 48 h mit 10 und 100 µg/ml PB sowie 3 und 9 µg/ml CBZ vorbehandelt. Dargestellt ist die Messung der ³[H]-MTX-Aufnahme (5 µM) in An- (durchgezogene Linie) bzw. Abwesenheit (gestrichelte Linie) von extrazellulärem Natrium bei t = 0,25; 0,75; 1,25; 3; 5; 10 und 20 min. Die zellassoziierte Radioaktivität der jeweiligen Proben wurde mittels Flüssigkeitsszintillationszählung bestimmt. Als Kontrolle dienten unbehandelte HPCT-1E3-Zellen (MW± SD; * = P<0,05, ** = P<0,01, *** = P<0,001%; n = 4).

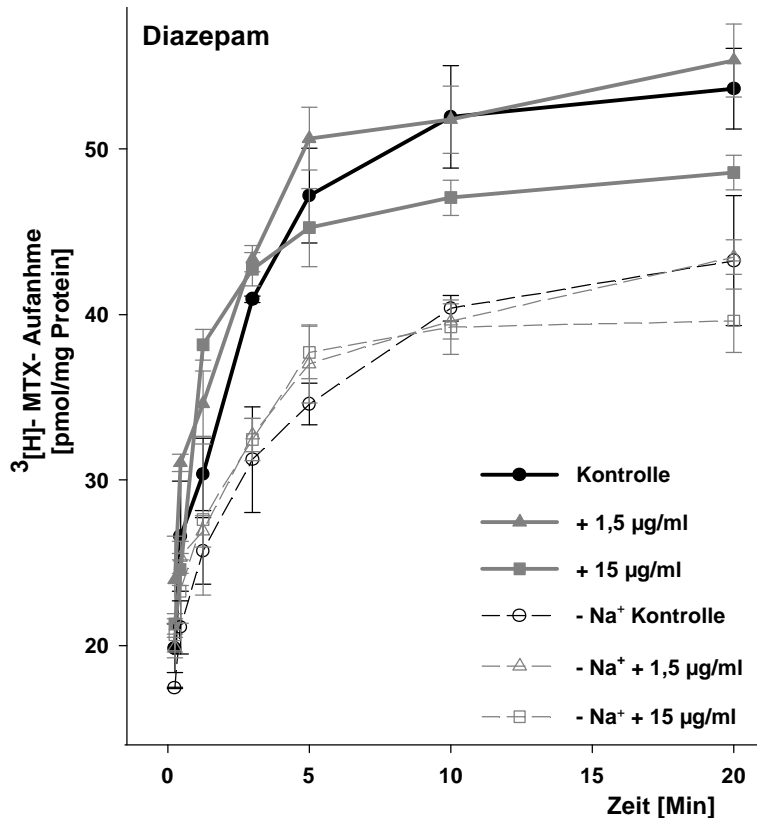


Abb. 17: ³[H]-MTX-Aufnahme in HPCT-1E3-Zellen nach Vorbehandlung mit Diazepam.

HPCT-1E3-Zellen wurden auf Zellkulturschalen zu 12.700 Zellen/cm² kultiviert und für 48 h mit 1,5 und 15 µg/ml Diazepam vorbehandelt. Anschließend erfolgte die Messung der ³[H]-MTX-Aufnahme (5 µM) in An- (durchgezogene Linie) bzw. Abwesenheit (gestrichelte Linie) von extrazellulärem Natrium bei t = 0,25; 0,75; 1,25; 3; 5; 10 und 20 min. Die zellassoziierte Radioaktivität der jeweiligen Proben wurde mittels Flüssigkeitsszintillationszählung bestimmt. Als Kontrolle dienen unbehandelte HPCT-1E3-Zellen. (MW ± SD; n = 4).

4.3.2 Chlorpromazin

Um den Einfluss des P450-Induktors Chlorpromazin (CPZ; s. 2.3.1.1) auf die Rfc1-vermittelte ³[H]-MTX-Aufnahme zu ermitteln, wurden die HPCT-1E3-Zellen wie in 3.5.3.1 beschrieben vorbehandelt. Wie der Abb. 18 zu entnehmen ist, kam es nach Inkubation mit CPZ zu einer signifikanten Abnahme der MTX-Akkumulation in natriumhaltigem Tyrode-Puffer. Dagegen wies die initiale MTX-Aufnahmegeschwindigkeit und die Plateauphase der MTX-Aufnahme in natriumfreiem Cholin-Tyrode-Puffer keine signifikante Veränderung auf. Nach Vorbehandlung in beiden Konzentrationen lag ferner, im Vergleich zu unbehandelten HPCT-1E3-Zellen, eine signifikante Reduktion der Rfc1-bedingten MTX-Aufnahmegeschwindigkeit innerhalb der initialen Aufnahmephase über 3 min um ca. 60 bzw.

70% und eine Abnahme der natriumabhängigen MTX-Akkumulation nach Einstellung des Transportgleichgewichts um ca. 40 bzw. 75% vor (s. Tab. 4).

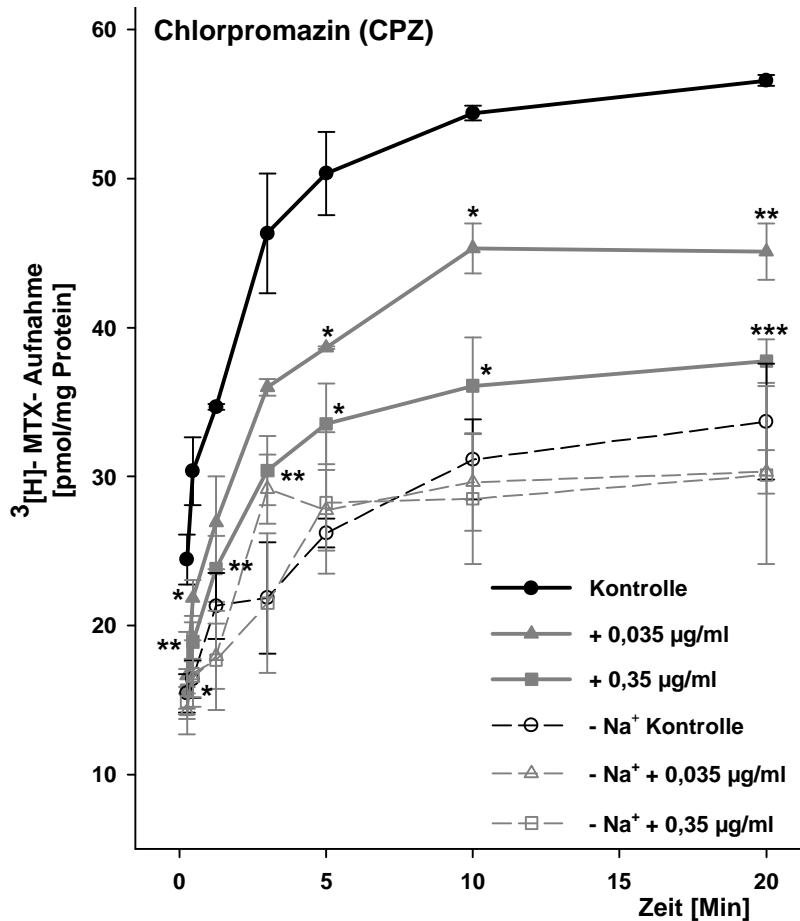


Abb. 18: Beeinflussung der ^3H -MTX-Aufnahme in HPCT-1E3-Zellen durch Chlorpromazin. HPCT-1E3-Zellen wurden auf Zellkulturschalen zu 12.700 Zellen/cm² ausgesät und mit 0,035 und 0,35 µg/ml CPZ über 48 h vorbehandelt. Dargestellt ist die Messung der ^3H -MTX-Aufnahme (5 µM) in An- (durchgezogene Linie) bzw. Abwesenheit (gestrichelte Linie) von extrazellulärem Natrium bei $t = 0,25; 0,75; 1,25; 3; 5; 10$ und 20 min. Die zellassoziierte Radioaktivität der jeweiligen Proben wurde mittels Flüssigkeitsszintillationszählung bestimmt. Als Kontrolle dienten unbehandelte HPCT-1E3-Zellen (MW± SD; * = P<0,05%, ** = P<0,01%, *** = P<0,001%; n = 4).

4.3.3 Clotrimazol

Die HPCT-1E3-Zellen wurden mit Clotrimazol inkubiert (s. 3.5.3.1) und nachfolgend der Einfluss des P450-Induktors (s. 2.3.1.1) auf die Rfc1-vermittelte ^3H -MTX-Aufnahme untersucht. Die Vorbehandlung mit CTZ hatte eine stark signifikante Reduktion der MTX-Akkumulation über 20 min in natriumhaltigem Tyrode-Puffer zur Folge (s. Abb. 19). In

natriumfreiem Cholin-Tyrode-Puffer dagegen wies die initiale MTX-Aufnahmegeschwindigkeit sowie der MTX-Gehalt nach Einstellung des Transportgleichgewichts keine signifikante Veränderung auf. Die Rfc1-vermittelte MTX-Aufnahme über 20 min war, ebenso wie die initiale Aufnahmegeschwindigkeit, nach Vorbehandlung mit 0,034 und 0,34 $\mu\text{g/ml}$ CTZ signifikant reduziert (s. Tab. 4). Die Abnahme der Rfc1-Aktivität betrug im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle innerhalb der initialen Aufnahmephase ca. 60 bzw. 80% und nach Einstellung des Transportgleichgewichts ca. 60 bzw. 70%.

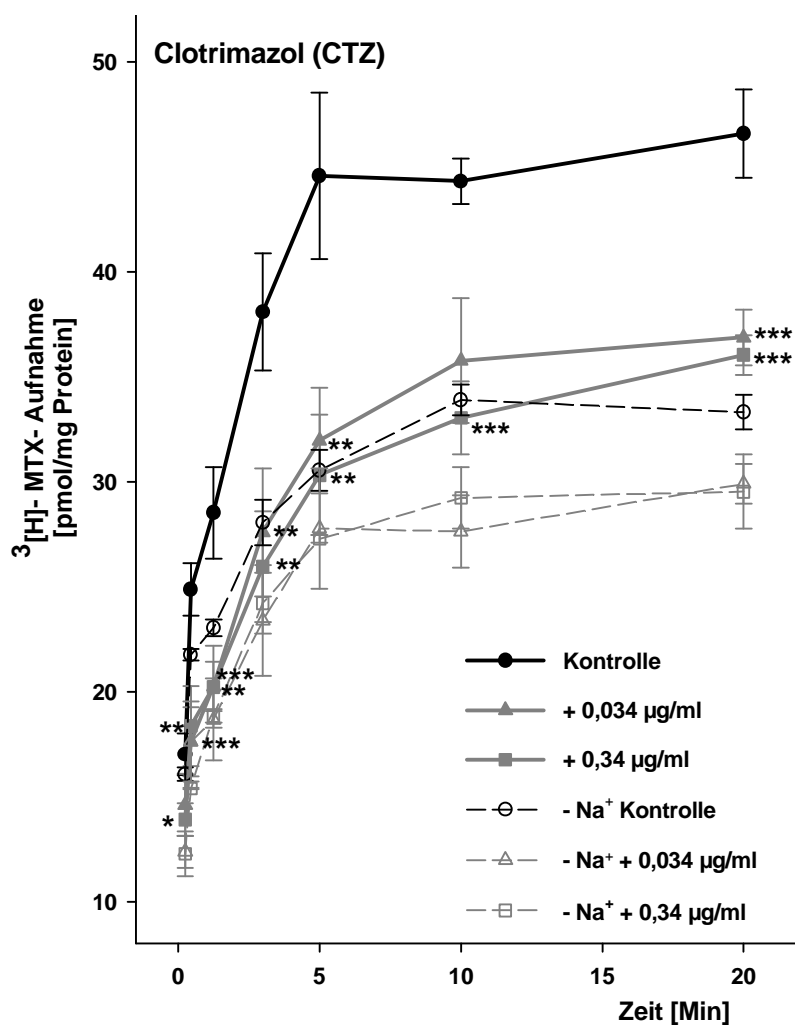


Abb. 19: Beeinflussung der $^3\text{[H]}$ -MTX-Aufnahme in HPCT-1E3-Zellen durch Clotrimazol.

HPCT-1E3-Zellen wurden auf Zellkulturschalen zu 12.700 Zellen/ cm^2 ausgesät und für 60 h mit 0,034 und 0,34 $\mu\text{g/ml}$ CTZ vorbehandelt. Dargestellt ist die Messung der $^3\text{[H]}$ -MTX-Aufnahme (5 μM) in An- (durchgezogene Linie) bzw. Abwesenheit (gestrichelte Linie) von extrazellulärem Natrium bei $t = 0,25; 0,75; 1,25; 3; 5; 10$ und 20 min. Die zellassoziierte Radioaktivität der jeweiligen Proben wurde mittels Flüssigkeitsszintillationszählung bestimmt. Als Kontrolle dienten unbehandelte HPCT-1E3-Zellen (MW \pm SD; * = $P < 0,05\%$, ** = $P < 0,01\%$, *** = $P < 0,001\%$; $n = 4$).

4.3.4 TCPOBOP

Abschließend wurde der Einfluss des direkten CAR-Agonisten TCPOBOP (s. 2.3.1.1) auf die Rfc1-vermittelte Aufnahme von $^3\text{[H]}$ -MTX bestimmt. Hierzu wurden die Hepatocytoma-Zellen für 48 h mit 0,1 und 1 ng/ml TCPOBOP inkubiert (s. 3.5.3.1). Die Vorbehandlung mit dem direkten Agonisten führte zu einer signifikanten Abnahme der MTX-Akkumulation über 20 min in natriumhaltigem Tyrode-Puffer (s. Abb. 20). In Abwesenheit von extrazellulären Natriumionen indessen war die initiale MTX-Aufnahmegeschwindigkeit sowie der MTX-Gehalt nach Einstellung des intrazellulären Transportgleichgewichts nicht signifikant verändert. Weiterhin führte die Inkubation in beiden Konzentrationen zu einer signifikanten Reduktion der Rfc1-vermittelten Aufnahme des Folatantagonisten (s. Tab. 4). Die Reduktion der MTX-Aufnahmegeschwindigkeit betrug im Vergleich zu unbehandelten HPCT-1E3-Zellen innerhalb der initialen Aufnahmephase ca. 85 bzw. > 90% und nach Einstellung des intrazellulären MTX-Transportgleichgewichts ca. 70 bzw. 80%.

Zusammenfassend konnte anhand der Transportstudien gezeigt werden, dass die Rfc1-vermittelte Aufnahme von $^3\text{[H]}$ -Methotrexat durch Induktoren vom PB-Typ, unter Beteiligung des Kernrezeptors CAR, reguliert wird. Eine Regulation des Oat2, welcher für die natriumunabhängige, hepatozelluläre Aufnahme von MTX verantwortlich ist, scheint unwahrscheinlich, da diese im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nicht signifikant verändert war. Ferner spricht die in dieser Arbeit gewählte Substrat- bzw. Induktorkonzentration vermutlich gegen eine signifikante Beeinflussung der Rfc1-vermittelten MTX-Aufnahme durch eine mögliche Mrp-bedingte Elimination des Zytostatikums, da die Mrp-Effluxtransporter prinzipiell eine geringe Substrataffinität gegenüber MTX und ein schwaches Induktionspotential durch PB-artige Induktoren aufweisen (s. 5.1). Darüber hinaus konnte kein Abfall der natriumabhängigen MTX-Aufnahmekurve nach Beendigung der initialen Aufnahmephase beobachtet werden.

Im weiteren Versuchsablauf wurde nachfolgend ermittelt, ob es sich bei der Abnahme der Rfc1-Aktivität um eine transkriptionelle oder eine translationale Regulation des Transportproteins handelt.

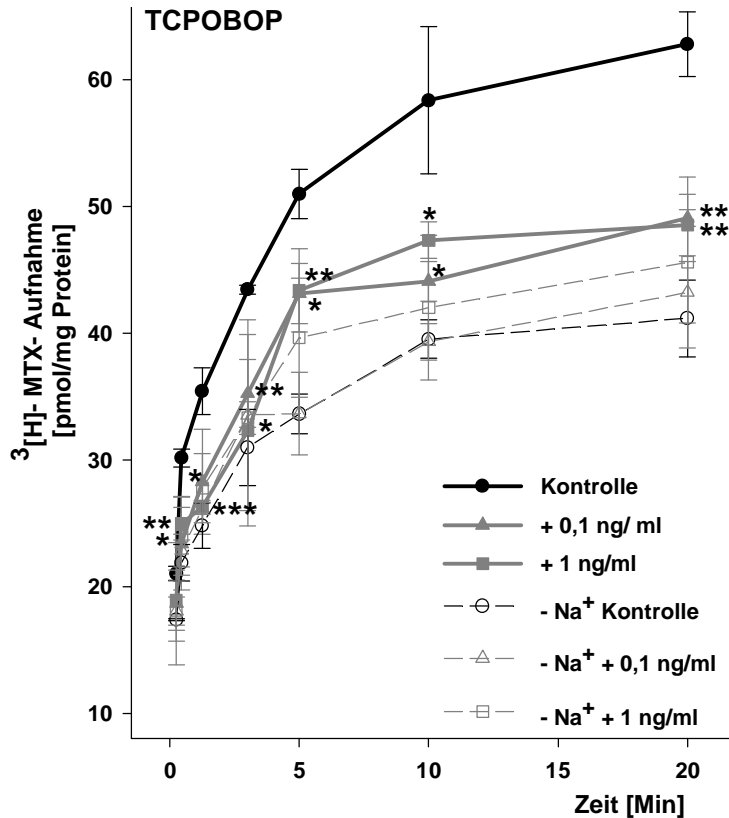


Abb. 20: Beeinflussung der $^3\text{[H]}$ -MTX-Aufnahme in HPCT-1E3-Zellen durch den CAR-Agonisten TCPOBOP.

HPCT-1E3-Zellen wurden auf Zellkulturschalen zu 12.700 Zellen/cm² ausgesät und für 48 h mit 0,1 und 1 ng/ml TCPOBOP vorbehandelt. Dargestellt ist die Messung der $^3\text{[H]}$ -MTX-Aufnahme (5 μM) in An- (durchgezogene Linie) bzw. Abwesenheit (gestrichelte Linie) von extrazellulären Natriumionen bei t = 0,25; 0,75; 1,25; 3; 5; 10 und 20 min. Die zellassoziierte Radioaktivität der jeweiligen Proben wurde mittels Flüssigkeitsszintillationszählung bestimmt. Als Kontrolle dienten unbehandelte HPCT-1E3-Zellen (MW \pm SD; * = P < 0,05%, ** = P < 0,01%, *** = P < 0,001%; n = 4).

4.4 Quantifizierung der Rfc1 mRNA in HPCT-1E3-Zellen

4.4.1 Nachweis der Spezifität der Rfc1 Primer und Proben

Die HPCT-1E3-RNA wurde isoliert (s. 3.7.1) und 1 μg RNA in cDNA umgeschrieben (s. 3.7.2.1). Zum Nachweis der Spezifität der Rfc Primer Mtx_1254 F und Mtx_1399 R (s. Tab. 3) erfolgte die PCR-Amplifizierung von 1 μl cDNA und die nachfolgende elektrophoretische Auftrennung des PCR-Produktes (s. 3.7.2.2). Die Verifizierung der PCR-Produktgröße erfolgte durch Vergleich mit einem DNA-Standard (100 bp Ladder) unter UV-Licht. Als Positivkontrolle diente Rfc1-Plasmid cDNA (1ng) und als Negativkontrolle RNA (50 ng).

Die elektrophoretische Auftrennung des HPCT-1E3-PCR-Produktes ergab eine für den Rfc1 spezifische Bande mit einer Produktgröße von 146 bp (s. Abb. 21). Deren Identität wurde durch die prominente Bande der Positivkontrolle auf gleicher Höhe bestätigt. Die Spezifität der Rfc1-Bande konnte durch das Fehlen weiterer Banden im HPCT-1E3-PCR-Produkt nachgewiesen werden. Mögliche Kontaminationen der Primer oder Proben wurden durch die RNA-Negativkontrolle ausgeschlossen.

Eine entsprechende PCR mit den β -Actin-spezifischen Primern (s. Tab. 3) ergab nach elektrophoretischer Auftrennung ein Produkt mit der zu erwartenden Größe von 137 bp (nicht abgebildet). Darüber hinaus wurden keine Nebenprodukte der PCR verzeichnet. Die mögliche Kontamination der Primer oder Proben konnte wiederum durch die RNA-Negativkontrolle ausgeschlossen werden.

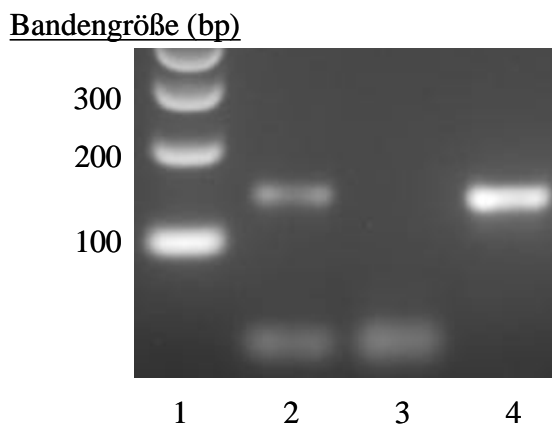


Abb. 21: Nachweis der Spezifität der Rfc1 Primer.

Die Spezifität der Rfc Primer Mtx_1254 F und Mtx_1399 R wurde mittels PCR-Analyse in HPCT-1E3-Zellen [2] unter Verwendung von 1 μ g Gesamt-RNA und 1,25 U Taq-DNA-Polymerase ermittelt (s. 3.7.2.2). Als Positivkontrolle diente 1 ng Rfc-1-DNA-Plasmid [4] und als Negativkontrolle 50 ng RNA [3]. Die Verifizierung der PCR-Produktgröße erfolgte durch einen DNA-Standard (100 bp Ladder) [1].

4.4.2 Einfluss von Phenobarbital und TCPOBOP auf die Rfc1-Genexpression in HPCT-1E3-Zellen

Um den Einfluss von PB und TCPOBOP auf die Rfc1-Genexpression zu ermitteln, wurden die HPCT-1E3-Zellen vorbehandelt (s. 3.5.3.1). Anschließend erfolgte die Synthese der HPCT-1E3-cDNA (s. 3.7.1 und 3.7.2.1) sowie, unter Verwendung der in 3.7.2.2 aufgeführten

genspezifischen Primer und Proben, die Quantifizierung des Rfc1-cDNA- Fragments durch real time PCR. Die PCR wurde mittels „iCycler iQ Detector“ von Biorad unter den in 3.7.2.3 beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Die Berechnung der Rfc1 Genexpression in Relation zur Expression des Referenzgenes β -Actin erfolgte nach einem Modell zur relativen Quantifizierung ohne PCR-Effizienz-Korrektur (s. 3.7.2.4).

Die relative Rfc1-Genexpression war nach Inkubation der HPCT-1E3-Zellen mit 100 μ g/ml PB bzw. 1 ng/ml TCPOBOP über 12, 24 und 48 h nicht signifikant verändert (s. Abb. 22). Die Schwankung der Transkriptionsrate in Relation zur unbehandelten Kontrolle betrug ca. 15-20%.

Die Ergebnisse der Rfc1-Genexpressionsstudie sprechen gegen eine transkriptionelle Regulation des Transportproteins durch Induktoren vom PB-Typ.

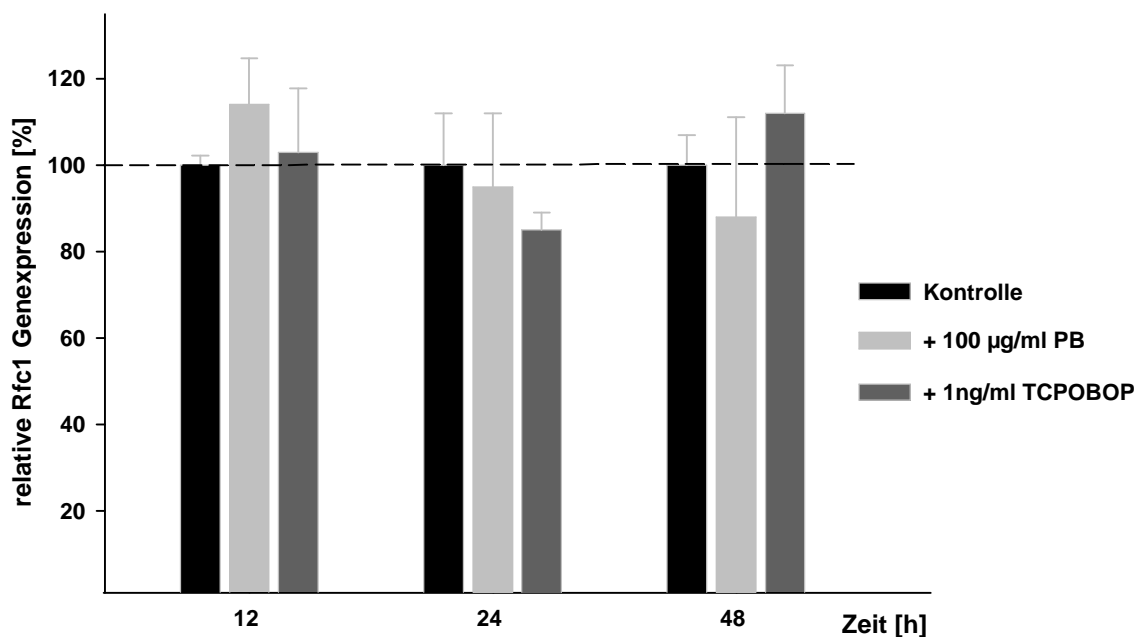


Abb. 22: Einfluss von Phenobarbital und dem direkten CAR-Agonisten TCPOBOP auf die Rfc1-Genexpression in HPCT-1E3-Zellen.

Die real-time PCR-Analyse der Rfc1-Genexpression (1 μ g/ μ l cDNA) erfolgte nach Vorbehandlung der Hepatocytoma-Zellen mit 100 μ g/ml PB bzw. 1 ng/ml TCPOBOP über 12, 24 und 48 h. Die HPCT-1E3-RNA wurde isoliert (s. 3.7.1) und 1 μ g RNA in cDNA umgeschrieben (s. 3.7.2.1). Anschließend wurde die PCR-Reaktion mittels PCR-Master-Mix S mit 1,25 U Taq-DNA-Polymerase, den genspezifischen Primern und TaqMan-Proben (s. Tab. 3) unter Verwendung des „iCycler iQ Detectors“ von Biorad durchgeführt (s. 3.7.2.3). Die Genexpression der unbehandelten Kontrolle entspricht 100% (MW \pm SD; n = 8).

4.5 Einfluss von Phenobarbital, TCPOBOP und Diazepam auf die Rfc1-Proteinmenge in HPCT-1E3-Zellen

Die semiquantitative Analyse des Rfc1-Proteins (s. Abb. 6) wurde mittels eines immunzytochemischen Nachweisverfahrens durchgeführt (s. 3.6.3). Als Negativkontrollen dienten unbehandelte Zellen, Proben ohne Zusatz von primärem Antiserum sowie Proben ohne Zusatz von primärem und sekundärem Antiserum. Der Gesamtproteingehalt diente als interner Standard.

Wie Abb. 23 zu entnehmen ist, lag nach Vorbehandlung mit 10 und 100 $\mu\text{g/ml}$ PB, 0,1 und 1 ng/ml TCPOBOP sowie 1,5 $\mu\text{g/ml}$ Diazepam über 12, 24 und 48 h keine signifikante Veränderung in der Rfc1-Proteinmenge vor. Die Varianz der Rfc1-Proteinmenge der vorbehandelten Proben, in Relation zur unbehandelten Kontrolle, betrug jeweils ca. 15-20%. Abweichend davon war nach Vorbehandlung der HPCT-1E3-Zellen mit 15 $\mu\text{g/ml}$ Diazepam für 48 h eine Abnahme der Rfc1-Proteinmenge um ca. 25% zu verzeichnen, welche sich jedoch nicht signifikant von der Rfc1-Proteinmenge unbehandelter Zellen unterschied.

Diese Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass es sich in Bezug auf die Reduktion der Rfc1-Aktivität durch Induktoren vom PB-Typ bzw. TCPOBOP nicht um eine translationale Regulation des Transportproteins handelt.

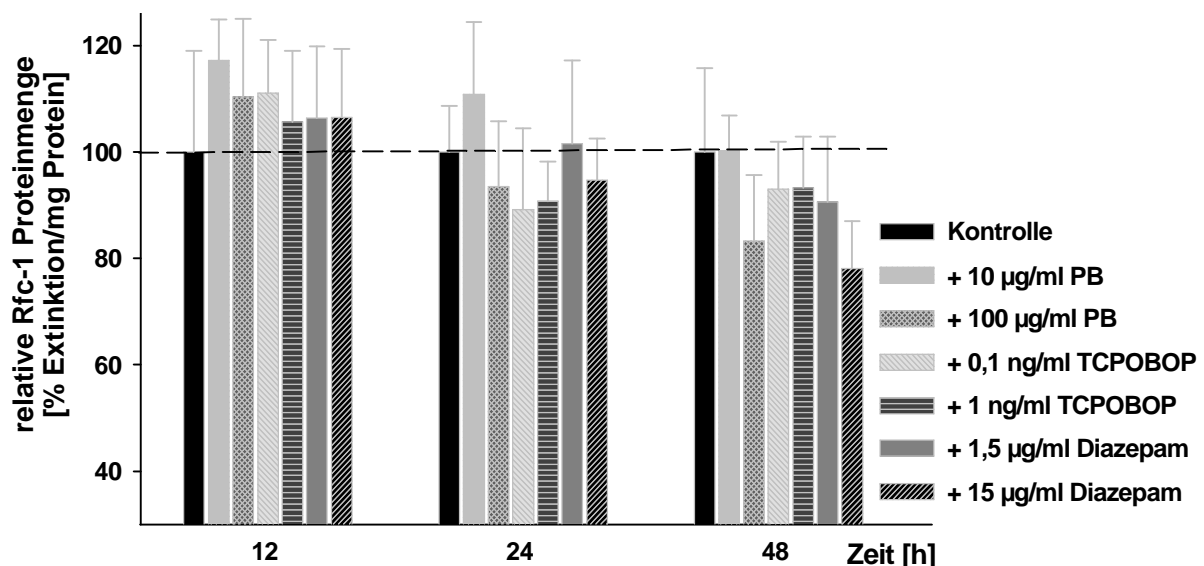


Abb. 23: Einfluss von Phenobarbital, TCPOBOP und Diazepam auf die Rfc1-Proteinmenge in HPCT-1E3-Zellen.

HPCT-1E3-Zellen wurden auf 96-well-Zellkulturplatten kultiviert und mit 10 und 100 $\mu\text{g/ml}$ PB, 0,1 und 1 ng/ml TCPOBOP sowie 1,5 und 15 $\mu\text{g/ml}$ Diazepam über 12, 24 und 48 h vorbehandelt. Die

Bestimmung der Rfc1-Proteinmenge wurde mittels semiquantitativer Immunzytochemie unter Verwendung eines spezifischen Rfc1-Antiserums durchgeführt. Die Darstellung der relativen Rfc1-Proteinmenge erfolgte in % Extinktion pro mg Gesamtprotein der unbehandelten Kontrolle. (MW \pm SD; n = 6).

4.6 Regulation der funktionellen Aktivität des Rfc1 in HPCT-1E3-Zellen

4.6.1 Modulatoren der Phosphorylierung

Neben der Regulation der Genexpression (s. 2.3.2.1) stellt die schnelle und kurzfristige posttranslationale Phosphorylierung von Transportproteinen einen weiteren wichtigen Regulationsmechanismus dar (KRAUSS 2003; s. 2.3.2.2). Der Rfc1 weist zwei mögliche Phosphorylierungsstellen auf (HONSCHA et al. 2000). Daher könnte die reduzierte Rfc1-Aktivität in HPCT-1E3-Zellen nach Inkubation mit Induktoren vom PB-Typ bzw. TCPOBOP, in Verbindung mit den fehlenden Hinweisen auf eine transkriptionelle bzw. translationale Regulation, durch einen veränderten Phosphorylierungsstatus des Transportproteins bedingt sein.

Um den Einfluss von Modulatoren der Phosphorylierung auf die Rfc1-vermittelte Aufnahme von $^3\text{[H]}$ -Methotrexat zu untersuchen, wurden die HPCT-1E3-Zellen wie in 3.5.3.2 beschrieben mit den in Tab. 2 aufgeführten Substanzen vorbehandelt. Die gewählte Konzentration der jeweiligen Modulatoren wurde der Literatur entnommen (CHIJIWA et al. 1990, MUKHOPADHYAY et al. 1998, YOU et al. 2000, GUO u. KLAASEN 2001).

Anschließend erfolgte die Bestimmung der $^3\text{[H]}$ -MTX-Aufnahme über 20 min mittels Flüssigkeitsszintillationszählung (s. 3.8.1.2). Die natriumabhängige Rfc1-vermittelte Aufnahme des Zytostatikums wurde als Differenz zwischen der intrazellulären MTX-Akkumulation über 20 min in An- und Abwesenheit von extrazellulärem Natrium berechnet und in pmol/mg Protein dargestellt (s. Abb. 24-26). Als Beurteilungskriterium für die Rfc1-Aktivität diente der Anteil der natriumabhängigen Akkumulation von Methotrexat nach Einstellung des intrazellulären Transportgleichgewichts sowie insbesondere die Transportgeschwindigkeit während der initialen Aufnahmephase. Als Kontrolle wurden erneut unbehandelte HPCT-1E3-Zellen verwendet.

4.6.1.1 PMA und/oder Okadainsäure

PMA ist für die konzentrations- und zeitabhängige Induktion der Proteinkinase C verantwortlich (NISHIZUKA 1992). Dagegen führt Okadainsäure (OA) zu einer Inhibition der über die Protein Phosphatase 1 und 2A-vermittelten Dephosphorylierung von Proteinen (COHEN et al. 1990).

Um den Einfluss der Proteinkinase C sowie der Protein Phosphatase 2A auf die Rfc1-vermittelte Aufnahme von ^3H -MTX zu untersuchen, wurden die HPCT-1E3-Zellen, wie in 3.5.3.2 aufgeführt, vorbehandelt.

Die Inkubation der Hepatocytoma-Zellen mit PMA hatte die Reduktion der MTX-Transportgeschwindigkeit innerhalb der initialen Aufnahmephase bzw. eine Abnahme der Rfc1-bedingten Akkumulation des Folatantagonisten nach Einstellung des intrazellulären Transportgleichgewichts um durchschnittlich 75% zur Folge (s. Abb. 24). Nach Vorbehandlung mit Okadainsäure war die Geschwindigkeit der Rfc1-vermittelten Aufnahme sowie die Rfc1-bedingte MTX-Akkumulation um ca. 65% reduziert. Weiterhin hatte die Inkubation mit beiden Substanzen wie erwartet einen synergistischen Effekt auf die Rfc1-vermittelte MTX-Aufnahme. So lag nach synchroner PMA- und OA-Vorbehandlung eine vollständige Hemmung der Rfc1-Aktivität während der initialen Aufnahmephase über 3 min bzw. eine Abnahme der Rfc1-vermittelten MTX-Akkumulation nach Einstellung des intrazellulären Transportgleichgewichts um > 95% vor (s. Abb. 24).

Die natriumunabhängige MTX-Aufnahme wies nach Inkubation mit PMA und/oder Okadainsäure im Vergleich zu unbehandelten Zellen keine signifikanten Unterschiede auf (nicht dargestellt).

Zusammenfassend führt die PKC-vermittelte Phosphorylierung des Carriers bzw. die Hemmung der Proteindephosphorylierung durch Vorbehandlung mit dem PP 1/2A-Inhibitor Okadainsäure zu einer verminderten Rfc1-Transportaktivität in HPCT-1E3-Zellen.

4.6.1.2 PMA und BIM

Bisindolylmaleimid (BIM) stellt einen spezifischen Inhibitor der Proteinkinase C dar (DAVIS et al. 1992).

Die HPCT-1E3-Zellen wurden wie in 3.5.3.2 beschrieben vorbehandelt, um die Beteiligung der Proteinkinase C an der Reduktion der Rfc1-Aufnahmeaktivität eindeutig nachzuweisen. Die Inkubation mit dem PKC-Induktor PMA führte wie in 4.6.1.1 beschrieben zu einer fast vollständigen Hemmung der Rfc1-Aktivität (s. Abb. 24). Diese Inhibition war bei gleichzeitiger Vorbehandlung mit dem spezifischen PKC-Inhibitor BIM zu ca. 50-70% reversibel. Ohne Vorbehandlung mit PMA führte der Inhibitor BIM, in Relation zur unbehandelten Kontrolle, zu keiner signifikant unterschiedlichen Rfc1-vermittelten MTX-Aufnahme.

Die Vorbehandlung mit PMA und/oder BIM dagegen hatte im Vergleich zu unbehandelten HPCT-1E3-Zellen keine signifikanten Unterschiede in der natriumunabhängigen Aufnahme des Folatantagonisten zur Folge (nicht dargestellt).

4.6.1.3 cAMP und H-89

Dibutyryl-cAMP, ein Derivat des zyklischen AMP, gelangt durch Diffusion in die Zelle, wo der Butyrat-Rest durch intrazellulär lokalisierte Esterasen abgespalten wird. cAMP vermittelt nachfolgend die Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (TAYLOR et al. 1990), welche die kurzfristige posttranslationale Regulation von Transportproteinen bedingt (GRUNE et al. 1993, MUKHOPADHYAY et al. 1998). Im Gegensatz dazu ist das Sulfonamid-Derivat H-89 für die spezifische Inhibition der cAMP-abhängigen PKA verantwortlich (CHIJIWA et al. 1990).

Um den Einfluss der Proteinkinase A auf die Rfc1-vermittelte Aufnahme von $^3\text{[H]-MTX}$ zu untersuchen, wurden die HPCT-1E3-Zellen wie in 3.5.3.2 aufgeführt vorbehandelt. Die Hepatocytoma-Zellen wiesen in Relation zur unbehandelten Kontrolle nach Inkubation mit cAMP und/oder dem Inhibitor H-89 keine signifikant veränderte Rfc1-Aktivität auf (s. Abb. 25). Dies gilt ebenso für die MTX-Akkumulation in natriumfreiem Cholin-Tyrode-Puffer (nicht dargestellt).

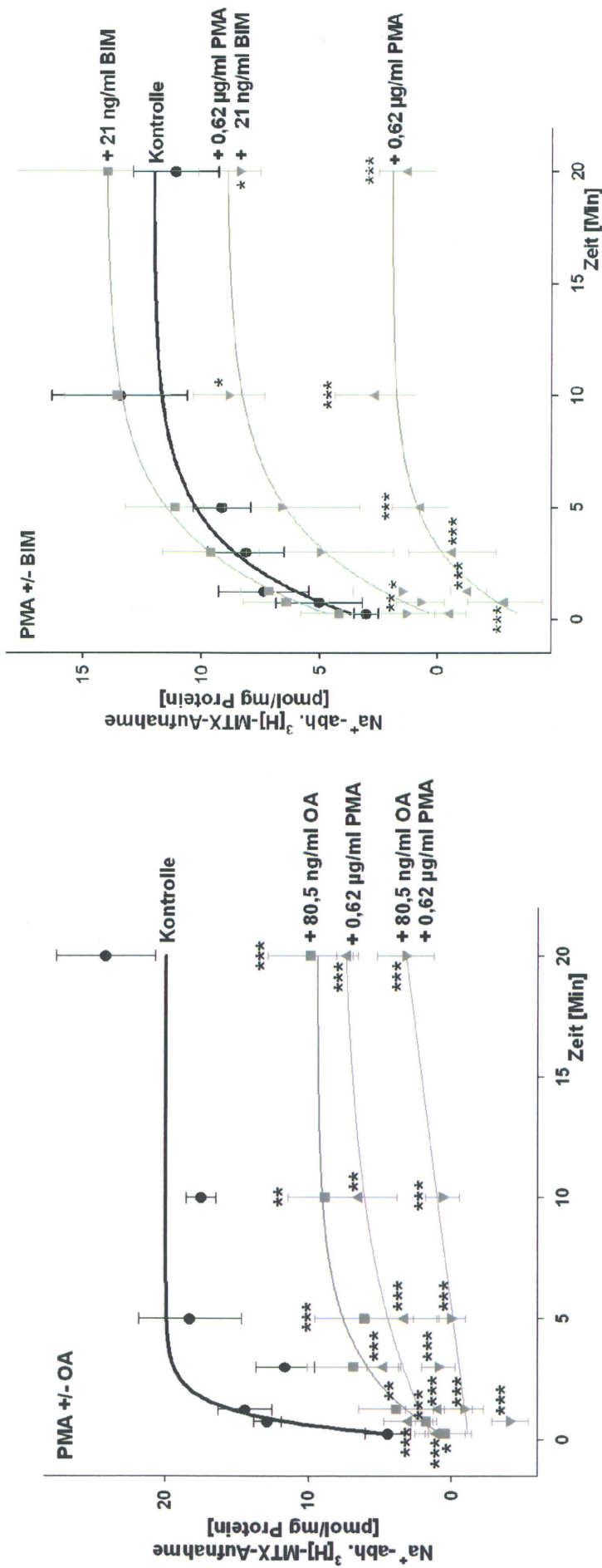


Abb. 24: Beeinflussung der Rfc1-vermittelten ³[H]-MTX-Aufnahme in HPCT-1E3-Zellen durch den PKC-Induktor PMA und/oder den Phosphatase 1/2A-Inhibitor Okadainsäure (OA) bzw. PMA und/oder den PKC-Inhibitor Bisindolylmaleimid (BIM).

HPCT-1E3-Zellen wurden auf Zellkulturschalen zu 12.700 Zellen/cm² ausgesät und für 2 h mit 0,62 µg/ml PMA und/oder 80,5 ng/ml Okadainsäure bzw. und/oder mit 21 ng/ml BIM vorbehandelt. Die Messung der ³[H]-MTX-Aufnahme (5 µM) erfolgte in An- bzw. Abwesenheit von extrazellulärem Natrium bei t = 0,25; 0,75; 1,25; 3; 5; 10 und 20 min. Die zellassoziierte Radioaktivität der jeweiligen Proben wurde mittels Flüssigkeitszintillationszählung bestimmt. Dargestellt ist die Rfc1-vermittelte MTX-Aufnahme, welche als Differenz zwischen der intrazellulären MTX-Akkumulation über 20 min in An- und Abwesenheit von extrazellulärem Natrium berechnet und in pmol/mg Protein dargestellt wurde. Als Kontrolle dienten unbehandelte HPCT-1E3-Zellen (MW ± SD; * = P < 0,05%, ** = P < 0,01%, *** = P < 0,001%; n = 4).

Zusammenfassend sprechen die Ergebnisse für eine Regulation der Rfc1-bedingten MTX-Aufnahme in HPCT-1E3-Zellen durch die Proteinkinase C, nicht aber durch die Proteinkinase A. Weiterhin ist eine PKC- bzw. PKA-bedingte posttranslationale Regulation des Oat2, welcher die natriumunabhängige, hepatozelluläre Aufnahme von Methotrexat vermittelt, in Hinblick auf die gewonnenen Daten unwahrscheinlich. Im weiteren Versuchsablauf soll anhand nachfolgender Regulationsstudien geprüft werden, ob die Proteinkinase C an der Regulation der Rfc1-vermittelten Aufnahme von $^3\text{[H]}$ -MTX durch Cytochrom P450-Induktoren beteiligt ist.

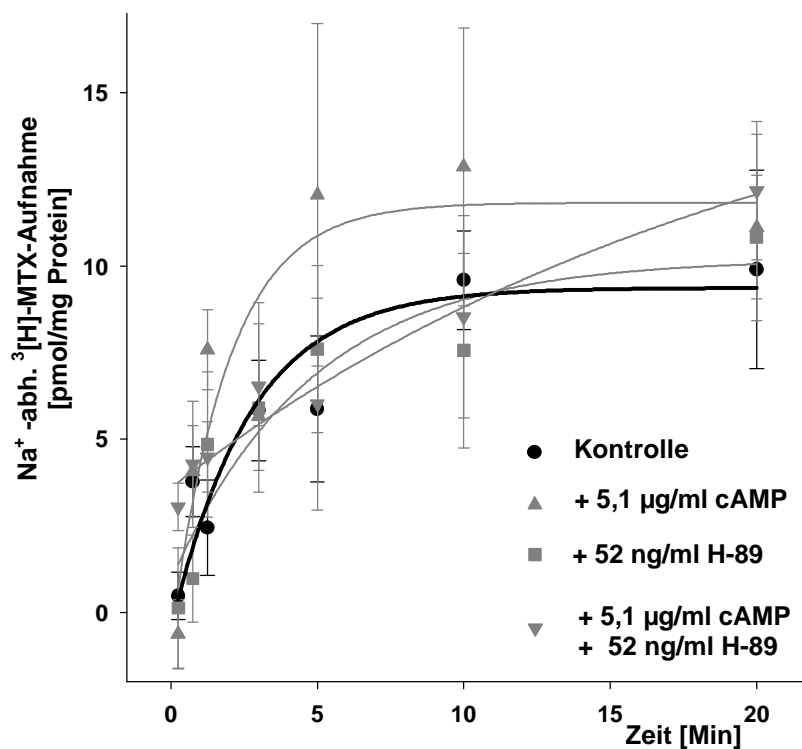


Abb. 25: Beeinflussung der Rfc1-vermittelten $^3\text{[H]}$ -MTX-Aufnahme in HPCT-1E3-Zellen durch PKA-Modulatoren.

HPCT-1E3-Zellen wurden auf Zellkulturschalen zu 12.700 Zellen/cm² ausgesät und für 2 h mit 5,1 µg/ml cAMP und/oder 52 ng/ml H-89 vorbehandelt. Die Messung der $^3\text{[H]}$ -MTX-Aufnahme (5 µM) erfolgte in An- bzw. Abwesenheit von extrazellulärem Natrium bei t = 0,25; 0,75; 1,25; 3; 5; 10 und 20 min. Die zellassoziierte Radioaktivität der jeweiligen Proben wurde mittels Flüssigkeitsszintillationszählung bestimmt. Dargestellt ist die Rfc1-vermittelte MTX-Aufnahme, welche als Differenz zwischen der intrazellulären MTX-Akkumulation über 20 min in An- und Abwesenheit von extrazellulären Natriumionen berechnet und in pmol/mg Protein dargestellt wurde. Als Kontrolle dienten unbehandelte HPCT-1E3-Zellen (MW ± SD; * = P < 0,05%; n = 4).

4.6.2 Beteiligung der Proteinkinase C an der Regulation der Rfc1-vermittelten Aufnahme von ³[H]-Methotrexat durch Cytochrom P450-Induktoren

4.6.2.1 Vorbehandlung mit Phenobarbital und BIM

Um die Beteiligung der Proteinkinase C an der Regulation der Rfc1-vermittelten Aufnahme von ³[H]-MTX (s. 3.8.1.2) durch Cytochrom P450-Induktoren vom PB-Typ zu ermitteln, wurden die HPCT-1E3-Zellen, wie in 3.5.3.2 beschrieben, vorbehandelt. Als Positivkontrolle diente die Inkubation mit dem PKC-Induktor PMA und/oder dem PKC-Inhibitor BIM über 2 h (s. 4.6.1.2; nicht dargestellt). Die Vorbehandlung mit PB führte zu einer Reduktion der Rfc1-vermittelten ³[H]-MTX-Aufnahme während der initialen Aufnahmephase um > 95% bzw. nach Einstellung des intrazellulären MTX-Transportgleichgewichts um ca. 85% (s. Abb. 26). Diese Reduktion konnte bei gleichzeitiger Vorbehandlung mit dem spezifischen PKC-Inhibitor BIM um durchschnittlich 70% aufgehoben werden. Ohne Vorbehandlung mit PB führte der Inhibitor, in Relation zur unbehandelten Kontrolle, zu keiner signifikant unterschiedlichen Rfc1-vermittelten MTX-Aufnahme. Die natriumunabhängige Aufnahme des Zytostatikums wies nach Vorbehandlung mit PB bzw. PMA und/oder BIM im Vergleich zu unbehandelten HPCT-1E3-Zellen keine signifikanten Unterschiede auf (nicht dargestellt). Weiterhin erfolgte die Bestimmung der MTX-Aufnahmerate (V_{influx} ; s. 3.8.1.2), welche prinzipiell, in Abhängigkeit von der gewählten Substratkonzentration, eine direkte Proportionalität zur Anzahl der aktiven Transporter in der Plasmamembran aufweist. Die natriumabhängige, Rfc1-vermittelte MTX-Aufnahmerate war, in Relation zur Kontrolle, nach Inkubation mit PB bzw. PMA signifikant vermindert (s. Tab. 5). Diese Reduktion konnte durch die gleichzeitige Vorbehandlung mit dem PKC-Inhibitor BIM vollständig umgekehrt werden. Die Geschwindigkeit der natriumunabhängigen MTX-Aufnahme wies nach Inkubation mit PB und/oder den Modulatoren der Phosphorylierung keine signifikante Veränderung auf.

4.6.2.2 Vorbehandlung mit TCPOBOP und BIM

Abschließend wurde die Beteiligung der Proteinkinase C an der Regulation der Rfc1-vermittelten ³[H]-MTX-Aufnahme durch den direkten CAR-Agonisten TCPOBOP untersucht (s. 3.5.3.2 und 3.8.1.2). Als Positivkontrolle diente erneut die Inkubation mit dem PKC-

Induktor PMA und/oder dem PKC-Inhibitor BIM (s. 4.6.1.2; nicht dargestellt). Wie Abb. 26 zu entnehmen ist, führte die Vorbehandlung mit dem CAR-Agonisten zu einer Reduktion der Rfc1-bedingten initialen Aufnahmegeschwindigkeit von Methotrexat um ca. 70%. Ferner wies die Rfc1-vermittelte MTX-Akkumulation nach Einstellung des intrazellulären Transportgleichgewichts im Vergleich zu unbehandelten HPCT-1E3-Zellen eine Abnahme um ca. 60-70% auf. Die Reduktion der Rfc1-Aktivität konnte bei gleichzeitiger Vorbehandlung mit dem spezifischen PKC-Inhibitor BIM um > 90% aufgehoben werden. Ohne Vorbehandlung mit TCPOBOP führte der Inhibitor, im Vergleich zur Kontrolle, zu keiner signifikanten Veränderung der Rfc1-vermittelten MTX-Aufnahme (s. Abb. 26). Die natriumunabhängige Aufnahme des Folatantagonisten wies sowohl nach Inkubation mit TCPOBOP als auch mit PMA und/oder BIM, im Vergleich zu unbehandelten HPCT-1E3-Zellen, keine signifikanten Unterschiede auf (nicht dargestellt).

Übereinstimmend führte die Vorbehandlung mit dem CAR-Agonisten bzw. mit PMA zu einer signifikanten Reduktion der natriumabhängigen, Rfc1-vermittelten MTX-Aufnahmerate (V_{influx}), welche durch die gleichzeitige Inkubation mit dem PKC-Inhibitor BIM vollständig aufgehoben werden konnte (s. Tab. 5). Im Gegensatz dazu hatte die Inkubation mit TCPOBOP und/oder den Modulatoren der Phosphorylierung keine Änderung der natriumunabhängigen MTX-Aufnahmegeschwindigkeit zur Folge.

Zusammenfassend weisen die Befunde der vorliegenden Untersuchungen darauf hin, dass die Cytochrom P450-Induktoren vom PB-Typ bzw. TCPOBOP unter Beteiligung der Proteinkinase C zu einer Reduktion der Rfc1-vermittelten Aufnahme des Chemotherapeutikums Methotrexat in HPCT-1E3-Zellen führen. Die Bestimmung der MTX-Aufnahmeraten (V_{influx}) nach Vorbehandlung mit PB bzw. TCPOBOP und/oder Modulatoren der Phosphorylierung lassen weiterhin die Schlussfolgerung zu, dass diese Reduktion durch eine Abnahme der Anzahl an funktionell aktiven Rfc1-Transportern bedingt ist. Zudem deuten die Regulationsstudien mit dem CAR-Agonisten TCPOBOP auf eine Beteiligung der CAR-Signalkaskade an der Regulation der Rfc1-Aktivität hin.

Tab. 5: Beeinflussung der natriumabhängigen, Rfc1-vermittelten bzw. der natriumunabhängigen $^3\text{[H]}$ -Methotrexat-Aufnahmerate (V_{influx}) durch Cytochrom P450-Induktoren vom PB-Typ bzw. Modulatoren der Phosphorylierung.

	V_i -Wert Na^+ -abh. Aufnahme	V_i -Wert Na^+ -unabh. Aufnahme
Kontrolle	$6,51 \pm 0,46$	$4,24 \pm 0,77$ ¶ §
+ 100 $\mu\text{g/ml}$ PB	$4,29 \pm 0,45$ ***	$4,07 \pm 0,58$
+ 100 $\mu\text{g/ml}$ PB + 21 ng/ml BIM	} $6,42 \pm 1,58$	$3,93 \pm 0,61$
+ 0,62 $\mu\text{g/ml}$ PMA	$3,32 \pm 0,42$ ***	$5,1 \pm 0,46$
+ 0,62 $\mu\text{g/ml}$ PMA + 21 ng/ml BIM	} $6,09 \pm 0,5$	$4,44 \pm 0,32$

Kontrolle	$2,4 \pm 0,38$	$6,44 \pm 0,58$
+ 1 ng/ml TCPOBOP	$0,18 \pm 0,65$ **	$6,75 \pm 1,06$
+ 1 ng/ml TCPOBOP + 21 ng/ml BIM	} $3,02 \pm 0,51$	$6,43 \pm 0,79$
+ 0,62 $\mu\text{g/ml}$ PMA	$0 \pm 0,39$ ***	$7,57 \pm 0,67$
+ 0,62 $\mu\text{g/ml}$ PMA + 21 ng/ml BIM	} $1,69 \pm 0,38$	$6,59 \pm 0,48$

¶ = Die Darstellung der MTX-Aufnahmerate (V_{influx}) in HPCT-1E3-Zellen erfolgte in pmol/mg Protein/min.

§ = Die vorliegenden Daten stellen Mittelwerte aus mindestens drei Replikaten \pm SD dar.

** = $P < 0,01\%$

*** = $P < 0,001\%$

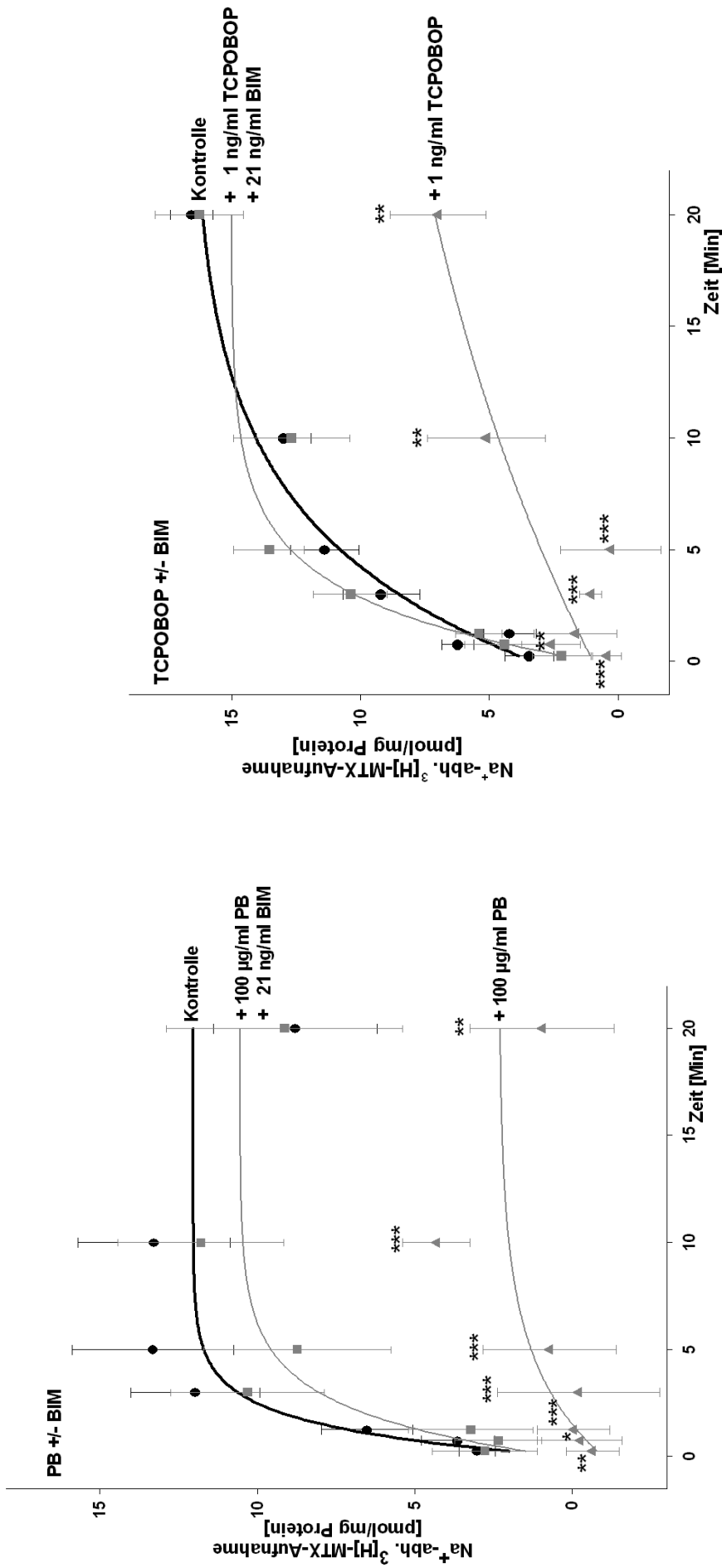


Abb. 26: Beteiligung der Proteinkinase C an der Regulation der Rfc1-vermittelten Aufnahme von ³[H]-MTX in HPCT-1E3-Zellen durch Cytochrom P450-Induktoren.

HPCT-1E3-Zellen wurden auf Zellkulturschalen zu 12.700 Zellen/cm² ausgesät und für 48 h mit 100 µg/ml PB bzw. mit 1 ng/ml TCPOBOP und/oder 21 ng/ml BIM für 2 h vorbehandelt. Die Messung der ³[H]-MTX-Aufnahme (5 µM) erfolgte in An- bzw. Abwesenheit von extrazellulärem Natrium bei t = 0,25; 0,75; 1,25; 3; 5; 10 und 20 min. Die zellassoziierte Radioaktivität der jeweiligen Proben wurde mittels Flüssigkeitsszintillationszählung bestimmt. Dargestellt ist die Rfc1-vermittelte MTX-Aufnahme, welche als Differenz zwischen der intrazellulären MTX-Akkumulation über 20 min in An- und Abwesenheit von extrazellulären Natriumionen berechnet und in pmol/mg Protein dargestellt wurde. Als Kontrolle dienten unbehandelte HPCT-1E3-Zellen (MW ± SD; * = P < 0,05%, ** = P < 0,01%, *** = P < 0,001%; n = 4).

5 DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde die Regulation des hepatozellulären Transportproteins Rfc1 der Ratte durch Cytochrom P450-Induktoren vom PB-Typ und dem CAR-Agonisten TCPOBOP in dem *in vitro*-Zellkulturmodell HPCT-1E3 (s. 2.4) untersucht. Die Regulation von Transportproteinen erfolgt nach bisherigem Erkenntnisstand vorwiegend entweder auf der Ebene der Transkription durch Regulation der Genexpression (XU et al. 2005) oder durch die schnelle und kurzfristige Phosphorylierung des jeweiligen Carrierproteins im Rahmen einer posttranslationalen Regulation (ROELOFSEN et al. 1998, NOE et al. 2001, WOLFF et al. 2003). Innerhalb dieser Arbeit wurde daher der Einfluss der PB-artigen Induktoren auf die Rfc1-Genexpression mittels quantitativer real time PCR bzw. auf die Rfc1-Proteinmenge mittels eines semiquantitativen immunzytochemischen Nachweisverfahrens bestimmt. Ferner wurde die funktionelle Aktivität des Rfc1 nach Inkubation mit den jeweiligen Induktoren vom PB-Typ (s. 3.5.3.1) bzw. Modulatoren der Phosphorylierung (s. 3.5.3.2) als natriumabhängige Aufnahme von fluoreszenzmarkiertem Methotrexat (FMTX; s. 3.8.1.1) bzw. ³[H]-Methotrexat in HPCT-1E3-Zellen ermittelt (s. 3.8.1.2).

5.1 Transport von Methotrexat in HPCT-1E3-Zellen

Die zelluläre Aufnahme, Verteilung und Ausscheidung von Arzneimitteln wie Methotrexat wird im Organismus über verschiedene Import- bzw. Exportcarrier vermittelt. Hierbei wird die aktuelle, intrazelluläre Arzneistoffkonzentration durch vielschichtige Prozesse bestimmt, welche einer fein abgestuften Regulation unterliegen (XU et al. 2005). Die Aufklärung dieser komplexen und zumeist koordinierten Regulation von Arzneistoffwechselwegen ist daher prinzipiell nur in einem der *in vivo*-Situation nahestehenden *in vitro*-Zellkulturmodell möglich.

An dem hepatozellulären MTX-Transport sind verschiedene, lebertypische Transportproteine wie die Importcarrier Rfc1 und Oat2 sowie die Effluxtransporter Mrp1-4 beteiligt (s. Tab. 1). Dieser Sachverhalt erschwert die selektive Bestimmung einer Rfc1-vermittelten MTX-Aufnahme in isolierten Hepatozyten im Vergleich zu einer mit Rfc1-cDNA transfizierten Zelllinie. Letztere eignen sich jedoch aufgrund der fehlenden transkriptionellen Regulation und leberspezifischen Signalkaskaden grundsätzlich nicht zum Studium komplexer Leberfunktionen wie der Regulation von Transportproteinen. Zudem ist der Einsatz von

primären Hepatozyten limitiert, da diese in Kultur nicht proliferieren und innerhalb von 48 h viele ihrer phänotypischen Eigenschaften verlieren (FÖLLMANN et al. 1990, GUILLOUZO et al. 1990).

HPCT-1E3-Hepatocytomazellen vereinigen wichtige phänotypische Eigenschaften differenzierter Rattenhepatozyten in Kultur wie die endogene Expression oben genannter Import- bzw. Effluxtransporter für MTX (HALWACHS et al. 2005; s. Anhang) mit dem kontinuierlichen Wachstum immortaler Zelllinien (s. 2.4). Die Hybridzelllinie stellt somit ein geeignetes *in vitro*-Modell für das Studium der hepatozellulären Rfc1-Regulation dar.

Anhand verschiedener Beurteilungskriterien ist es möglich, die Rfc1-Aktivität und deren Regulation durch Induktoren vom PB-Typ und TCPOBOP in HPCT-1E3-Zellen selektiv zu ermitteln. Die Bestimmung der natriumabhängigen MTX-/FMTX-Aufnahme dient der Abgrenzung einer Rfc1-vermittelten von der natriumunabhängigen, Oat2-vermittelten Aufnahme des Chemotherapeutikums. Dagegen erfolgt die Messung des natrium- und zeitabhängigen ³[H]-MTX-Transports (s. 3.8.1.2), im Rahmen derer insbesondere die Aufnahmegeschwindigkeit innerhalb der initialen Aufnahmephase mit dem Ziel beurteilt wird, den Einfluss einer möglichen Mrp-bedingten MTX-Elimination von der Rfc1-vermittelten Anreicherung des Zytostatikums abzugrenzen. Darüber hinaus dient ebenso die gewählte Substrat- bzw. Induktorkonzentration der selektiven Beurteilung der Rfc1-Aktivität, da der Rfc1 im Vergleich zu den MRP-/Mrp-Effluxproteinen eine ca. 100-500fach höhere Substrataffinität für Methotrexat besitzt und die Effluxtransporter zudem ein schwächeres Induktionspotential nach Vorbehandlung mit PB-artigen Induktoren aufweisen.

In niedriger Konzentration (30-50 mg/m² bzw. Serumspiegel < 20 µM; BERGER et al. 1996, HEINEMANN et al. 2001) wird das zweifach negativ geladene Methotrexat (MTX) durch verschiedene sättigbare und energieabhängige Transportproteine in die Zelle aufgenommen bzw. ausgeschieden (s. Tab. 1). Anhand des HPCT-1E3-Zellkulturmodells ergeben sich daher prinzipiell verschiedene Möglichkeiten der Regulation des zellulären MTX-Gehaltes.

Für die natriumunabhängige Aufnahme des Zytostatikums ist der in der basolateralen Hepatozytenmembran lokalisierte Oat2 (Slc22a7) verantwortlich (SIMONSON et al. 1994, SEKINE et al. 1998, MIYAZAKI et al. 2004). MORITA et al. (2001) zeigten jedoch mittels einer Inhibitionsstudie an Oat2-transfizierten Zellen auf, dass der Salicylat-Transport (5 µM) nach Vorbehandlung mit einem 200fachen Überschuss an MTX nur um ca. 35% inhibiert wird. Diese Befunde deuten auf eine geringe MTX-Substrataffinität des Importcarriers für das Zytostatikum hin. Weiterhin konnten SWEET et al. (2002) bzw. BREEN et al. (2004)

nachweisen, dass Fluoreszein bzw. MTX, nicht aber FMTX, Substrate des murinen Oat3 bzw. des Oat3 (Slc22a8) der Ratte darstellen. Hinsichtlich der FMTX-Substratspezifität des Oat2 liegen in der Literatur bislang keine Daten vor. Es ist jedoch möglich, dass FMTX im Gegensatz zu MTX kein Substrat des Oat2 darstellt, da der hepatozelluläre Oat3 der Ratte ein mit dem Oat2 überlappendes Substratspektrum aufweist (MIYAZAKI et al. 2004, LEE u. KIM 2004). Darüber hinaus konnte nach Vorbehandlung der Hepatocytoma-Zellen mit dem CAR-Agonisten TCPOBOP sowie den gewählten PB-artigen Induktoren und Kontrollen (s. 3.5.3.1) keine signifikante Veränderung der natriumunabhängigen FMTX-Akkumulation (s. Abb. 12-15) bzw. der $^3\text{[H]}$ -MTX-Aufnahme (s. Abb. 16-20) beobachtet werden. Ferner liegen in der Literatur bislang keine Daten zur Regulation der OAT-/Oat-Transportproteine durch Induktoren vom PB-Typ vor. So konnte bisher einzig die PKC-vermittelte posttranslationale Phosphorylierung des OAT1/Oat1 bzw. Oat3 der Ratte, welche mit einer Reduktion der Transporteraktivität einherging, nachgewiesen werden (MIYAZAKI et al. 2004, YOU 2004). Insgesamt kann daher eine maßgebliche Beeinflussung des MTX-Gehaltes in HPCT-1E3-Zellen durch eine Oat2-vermittelte FMTX-/MTX-Anreicherung nach Inkubation mit PB-artigen Induktoren bzw. TCPOBOP ausgeschlossen werden.

Der Reduced Folate Carrier1 (Rfc1, Slc19a1) vermittelt die bei pH 7,4 überwiegend natriumabhängige Aufnahme von Methotrexat wie auch des Methotrexat-Derivats FMTX (HONSCHA et al. 2000, KNEUER u. HONSCHA 2004; s. 2.2.3.2). Diese wurde als Differenz zwischen der intrazellulären MTX-/FMTX-Akkumulation in HPCT-1E3-Zellen in An- bzw. Abwesenheit extrazellulärer Natriumionen bestimmt (s. 3.8.1.1 und 3.8.1.2). In Übereinstimmung mit früheren *in vitro*-Studien an HPCT-1E3-, MDCK- sowie Caco-2-Zellen war die Rfc1-vermittelte FMTX-Aufnahme bei neutralem pH natriumabhängig (KNEUER u. HONSCHA 2004, KNEUER et al. 2005b, HALWACHS et al. 2005; s. Anhang) und betrug in unbehandelten HPCT-1E3-Zellen ca. 20-40 pmol/mg Protein/30 min (s. Abb. 12-15). Zusammenfassend wiesen die Aufnahmedaten darauf hin, dass bei neutralem pH, in Übereinstimmung mit den von KNEUER u. HONSCHA (2004) ermittelten Werten, 50-80% der FMTX-Aufnahme in HPCT-1E3-Zellen Rfc1-vermittelt erfolgt.

Um die Rfc1-bedingte MTX-Transportrate in den Hepatocytoma-Zellen zu ermitteln, wurde nachfolgend die natrium- und zeitabhängige $^3\text{[H]}$ -MTX-Aufnahme bestimmt (s. 3.8.1.2). Ferner dienten diese Transportstudien der Abgrenzung einer möglichen Mrp-bedingten MTX-Elimination (ZHAO u. GOLDMAN 2003) in HPCT-1E3-Zellen, welche im Rahmen der FMTX-Transportstudien nicht eindeutig möglich war. Als Beurteilungskriterium für die Rfc1-

Aktivität diene der Anteil der natriumabhängigen Akkumulation von Methotrexat nach Einstellung des intrazellulären Transportgleichgewichts sowie insbesondere die Aufnahmegeschwindigkeit innerhalb der initialen Aufnahmephase, da das MTX-Transportgleichgewicht möglicherweise durch Faktoren wie der oben genannten Mrp-vermittelten MTX-Elimination beeinflusst wird.

Der Beginn der Einstellung eines intrazellulären MTX-Transportgleichgewichts bzw. deren Höhe in An- bzw. Abwesenheit von extrazellulären Natriumionen (s. 4.3 und Abb. 16-20) liegt im Bereich wie die von HONSCHA u. PETZINGER (1999) an primären Rattenhepatozyten bzw. HPCT-1E3-Zellen ermittelten Werte. Dies gilt ebenfalls für die intrazelluläre MTX-Akkumulationsrate in natriumhaltigem Tyrodepuffer sowie dem Anteil der natriumabhängigen, Rfc1-bedingten MTX-Aufnahme. Weiterhin bestätigen die Natriumabhängigkeit bei neutralem pH sowie die Einstellung eines intrazellulären Transportgleichgewichts Ergebnisse zum MTX-Transport in primären Rattenhepatozyten (HORNE et al. 1976, GEWIRTZ et al. 1980, HORNE 1990).

Die hepatozelluläre Elimination von MTX (KRUH u. BELINSKY 2003) bzw. FMTX (LEE et al. 2000, TERLOUW et al. 2003, LI et al. 2003, BREEN et al. 2004) wird durch die Effluxtransporter Mrp1 (Abcc1), Mrp2 (Abcc2), Mrp3 (Abcc3) und Mrp4 (Abcc4) vermittelt. Im Rahmen von Vorarbeiten konnte die Beeinflussung der intrazellulären Akkumulation des Zytostatikums durch eine Mrp-bedingte MTX-Elimination nachgewiesen werden (HALWACHS et al. 2005; s. Anhang). Hierzu wurde wie in 3.8.1.2 beschrieben die ³[H]-MTX-Aufnahme (5 µM) in HPCT-1E3-Zellen über 30 min in Ab- bzw. Anwesenheit des spezifischen Mrp-Inhibitors MK 571 (50 µM) bestimmt. Die Inkubation mit MK 571 hatte erst zum Zeitpunkt t = 30 min, d.h. bei Einstellung des Transportgleichgewichts, nicht aber zu einem früheren Messzeitpunkt, eine signifikante Zunahme (P<0,05) der intrazellulären MTX-Akkumulation zur Folge. Ein Mrp-vermittelter FMTX-Export könnte daher die FMTX-Akkumulationsrate über 30 min in HPCT-1E3-Zellen beeinflussen. Zur Abgrenzung dieser möglichen Mrp-bedingten MTX-Elimination wurde die zeitabhängige Aufnahme von ³[H]-Methotrexat (5 µM) und deren Beeinflussung durch Induktoren vom PB-Typ bzw. TCPOBOP bestimmt (s. 3.5.3.1 und 3.8.1.2). Hierbei diene insbesondere die Aufnahmegeschwindigkeit innerhalb der initialen Aufnahmephase als selektives Beurteilungskriterium der Rfc1-Aktivität. Die Exportcarrier weisen allerdings nur eine geringe Affinität gegenüber MTX auf (K_m = 2,2 mM für MRP1, 0,3 mM für Mrp2, 0,62 mM für MRP3 bzw. 0,22 mM für Mrp4; MASUDA et al. 1997, KRUH u. BELINSKY 2003), welche ca. 100-500fach geringer als die

des RFC1/Rfc1 für MTX/FMTX ist ($K_m \sim 1-5 \mu\text{M}$; GOLDMAN et al. 1968, HONSCHA u. PETZINGER 1999, WONG et al. 1999, RAJGOPAL et al. 2001, CAI u. HORNE 2003, FLINTOFF et al. 2004, HALWACHS et al. 2005; s. Anhang). Diese Transportcharakteristika liegen in Einklang mit der Mrp-bedingten MTX-Chemoresistenz, da die Effluxtransporter lediglich in Anwesenheit hoher MTX-Konzentrationen potente MTX-Resistenzfaktoren darstellen (HOOIJBERG et al. 1999, KOOL et al. 1999, LEE et al. 2000). In Abhängigkeit von der Dauer der $^3\text{[H]}$ -MTX-Aufnahme bzw. der FMTX-Akkumulation kann es jedoch, wie anhand der Mrp-Inhibitionsstudie mit MK 571 aufgezeigt wurde (s.o.), prinzipiell zur Bildung ausreichend hoher intrazellulärer Substrat-Spiegel kommen. Aus diesem Grunde lässt sich eine Beeinflussung der MTX-/FMTX-Anreicherung in HPCT-1E3-Zellen durch eine MRP-vermittelte Elimination des Chemotherapeutikums nicht vollständig ausschließen.

Interessanterweise liegt die hier gewählte MTX-Arbeitskonzentration (s. 3.8.1.2) im Bereich des K_m -Wertes ($K_m \sim 40 \mu\text{M}$) der Folylpolylglutamat-synthetase (FPGS; s. 2.1.2; SANGHANI u. MORAN 2000). SANGHANI u. MORAN (2000) stellten die Hypothese auf, dass die Vertreter der MRP-/Mrp-Familie mit der FPGS um die Bindung der intrazellulär lokalisierten MTX-Moleküle konkurrieren und MTX in geringer Konzentration aufgrund deren höherer Substrataffinität vornehmlich an die FPGS bindet. Ein entsprechender Mechanismus ist aufgrund der ähnlichen phänotypischen Eigenschaften der Hybridzelllinie mit primären Rattenhepatozyten prinzipiell möglich, wobei aber bislang in der Literatur keine Hinweise auf eine Expression der FPGS in HPCT-1E3-Zellen vorliegen.

PB vermittelt nach bisherigem Erkenntnisstand die *in vitro*-Induktion der Mrp1-, Mrp2-, Mrp3- und Mrp4-Genexpression (KIUCHI et al. 1998, SCHRENCK et al. 2001, CHERRINGTON et al. 2002, KAST et al. 2002, STAUDINGER et al. 2003, MAHER et al. 2005), wobei in Rattenhepatozyten bislang einzig die Induktion der Mrp2- bzw. Mrp3-Genexpression nachgewiesen wurde (OGAWA et al. 2000, KAST et al. 2002, CHERRINGTON et al. 2002). Aus diesem Grunde ist prinzipiell zu erwarten, dass die FMTX-/MTX-Akkumulation durch eine gesteigerte Mrp-vermittelte Eliminationsrate verringert werden kann. Der in dieser Arbeit nach Vorbehandlung mit den Cytochrom P450-Induktoren beobachtete Kurvenverlauf der $^3\text{[H]}$ -MTX-Aufnahme (s. Abb. 16-20) spricht jedoch gegen eine signifikante Beteiligung der MRP-/Mrp-Effluxtransporter an der Regulation der MTX-Aufnahme in HPCT-1E3-Zellen. Diese hätte, im Gegensatz zu der hier beobachteten signifikanten Abnahme der natriumabhängigen, initialen MTX-Aufnahmegeschwindigkeit und der natriumabhängigen MTX-Akkumulationsrate nach Einstellung des intrazellulären Transportgleichgewichts, eine Reduktion des MTX-Gehaltes

nach Einstellung des intrazellulären Transportgleichgewichts bei unveränderter initialer MTX-Aufnahmegeschwindigkeit zur Folge. Darüber hinaus konnte die PB-vermittelte Induktion der Mrp-Genexpression und damit der Mrp-Exportaktivität bislang nur in Anwesenheit hoher PB-Konzentrationen (200-700 µg/ml) nachgewiesen werden (KAUFFMANN u. SCHRENCK 1998, KIUCHI et al. 1998, COURTOIS et al. 2002). Zudem weist der unter physiologischen Bedingungen nur gering exprimierte hepatozelluläre MRP3/Mrp3 das stärkste Induktionspotential auf (KIUCHI et al. 1998, Xu et al. 2005).

Weiterhin beobachteten GIESSMANN et al. (2004) eine Steigerung der humanen, enteralen MRP2-Genexpression sowie eine Zunahme an MDR1-mRNA nach chronischer Carbamazepinapplikation. Die Induktion der Genexpression beider Carrier führte nach oraler, nicht aber nach intravenöser Gabe, zu einer herabgesetzten Bioverfügbarkeit des β_1 -Adrenozeptorblockers Taninolol, während die Pharmakokinetik des Arzneimittels keine signifikanten Veränderungen aufwies. Diese Ergebnisse sind jedoch durch die fehlende Differenzierung der MRP2- bzw. MDR1-Aktivität sowie durch die mögliche kompetitive Hemmung des Pgp-bedingten Talinolol-Efflux durch das Antiepileptikum limitiert (WEISS et al. 2003). Darüber hinaus vermittelt Carbamazepin im Vergleich mit dem Prototyp der PXR-Induktoren Rifampicin eine relativ schwache Induktion der MRP2-Genexpression (GEICK et al. 2001, LUO et al. 2002).

Ferner kann eine Haloperidol-vermittelte Inhibition der Mrp-bedingten FMTX-Elimination nicht ausgeschlossen werden, da die FMTX-Akkumulation sowohl in An- als auch in Abwesenheit extrazellulärer Natriumionen eine moderaten, wenn auch vornehmlich nicht signifikanten, Anstieg aufwies (s. Abb.13). ZHOU u. WU (2005) beschrieben die Reduktion der MRP-Genexpression in einer Doxorubicin-resistenten Zelllinie nach Vorbehandlung mit 0,65 µg/ml Haloperidol über 72 h. Diese Konzentration liegt allerdings 10 bzw. 100fach über der des therapeutischen Plasmaspiegels bzw. dem in dieser Arbeit gewählten Konzentrationsbereich. Dies könnte eine Ursache für die fehlende statistische Signifikanz der zu beobachtenden gesteigerten FMTX-Akkumulation in HPCT-1E3-Zellen nach Haloperidol-Inkubation sein.

KLOKOUZAS et al. (2003) konnten zeigen, dass die Vorbehandlung mit Clotrimazol (CTZ) eine verminderte, nach Meinung der Autoren, vornehmlich MRP4-vermittelte cGMP-Aufnahme in Membranvesikel von humanen Erythrozyten zu Folge hatte. Der IC_{50} -Wert, welcher die Konzentration angibt, bei der die Transporteraktivität um die Hälfte abgenommen hat, betrug jedoch ca. 24 µM und liegt somit 10-100fach über dem therapeutischen Plasmaspiegel für CTZ. Eine PB-artige Regulation wurde bisher für MRP1, MRP2/Mrp2,

MRP3/Mrp3 sowie den humanen und murinen MRP4 beschrieben (KIUCHI et al. 1998, SCHRENCK et al. 2001, CHERRINGTON et al. 2002, KAST et al. 2002, STAUDINGER et al. 2003, ASSEM et al. 2004, MAHER et al. 2005). Dagegen wiesen CHEN u. KLAASSEN (2004) nach, dass die Mrp4-Genexpression in Leber und Niere der Ratte nicht durch PB, den Prototyp der PB-artigen Induktoren, reguliert wird. Studien zur funktionellen Aktivität der Mrp-Transportproteine in HPCT-1E3-Zellen wiesen zudem auf eine im Vergleich mit Mrp1-3 untergeordnete Rolle der Mrp4-Exportaktivität hin (HALWACHS et al. 2005; s. Anhang). Diese Beobachtungen bestätigen Ergebnisse einer *in vitro*-Studie zur MRP4-bedingten MTX-Chemoresistenz (LEE et al. 2000). Die Autoren führten das in Relation zu Mrp1-3 schwache Mrp4-Resistenzpotential auf Unterschiede in der Substratspezifität in Verbindung mit der von Mrp1-3 abweichenden AS-Struktur zurück (LEE et al. 1998, BELINSKY u. KRUIH 1999).

Anhand von *in vivo*- bzw. *in vitro*-Studien wurde die TCPOBOP-bedingte Regulation von Transportproteinen wie der murinen Mrp2-7 nachgewiesen (STAUDINGER et al. 2003, ASSEM et al. 2004, MAHER et al. 2005). Daten zur TCPOBOP-vermittelten Induktion der Mrp-Effluxtransporter der Ratte liegen in der Literatur bislang nicht vor. Aufgrund der homologen Struktur der CAR-Bindungsdomäne von Maus und Ratte (JONES et al. 2000) ist jedoch eine Beteiligung der Mrp-Transporter an der hier beobachteten TCPOBOP-vermittelten Reduktion der MTX-/FMTX-Anreicherung möglich.

Zusammenfassend scheint eine Beeinflussung der MTX/FMTX-Akkumulation durch eine gesteigerte Mrp-vermittelte MTX-Eliminationsrate nach Vorbehandlung mit den gewählten PB-artigen Induktoren bzw. TCPOBOP prinzipiell möglich. Es ist jedoch in Hinblick auf die in dieser Arbeit gewählten Versuchsbedingungen wenig wahrscheinlich, dass die Mrp-Exportaktivität statistisch signifikante Veränderungen der intrazellulären MTX/FMTX-Anreicherung in HPCT-1E3-Zellen zur Folge hat.

Anhand einer Reihe von *in vitro*-Studien konnte gezeigt werden, dass FMTX/MTX neben dem aktiven, sättigbaren Transportmechanismus ebenso mittels passiver Diffusion in die Zellen aufgenommen wird (HENDERSON et al. 1980, ASSARAF u. SCHIMKE 1987, NAGAKUBO et al. 2001, NOZAKI et al. 2004, BREEN et al. 2004). Letztere trägt bspw. mit ca. 20% zur renalen MTX-Aufnahme bei (NOZAKI et al. 2004) und nimmt mit steigender Substratkonzentration ($> 20 \mu\text{M}$) zu (BERGER et al. 1996). Im Rahmen der hier gewählten Versuchsbedingungen (s. 3.8.1.2) spielt der Anteil der passiven, hepatozellulären MTX-Aufnahme höchstwahrscheinlich nur eine untergeordnete Rolle.

5.2 Beeinflussung der Rfc1-vermittelten FMTX- bzw. $^3\text{[H]}$ -MTX-Aufnahme in HPCT-1E3-Zellen durch Induktoren vom PB-Typ und TCPOBOP

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit wurde zunächst der Einfluss von Phenobarbital auf den FMTX-Gehalt in HPCT-1E3-Zellen nach 30 min in Abhängigkeit von der Dauer der Vorbehandlung bestimmt, um den optimalen Inkubationszeitraum für die Regulationsstudien mit den jeweiligen Cytochrom P450-Induktoren zu ermitteln. Die Vorbehandlung mit PB über 6, 12 bzw. 24 h führte zu einer leichten, nach 48 h zu einer signifikanten Reduktion der intrazellulären FMTX-Akkumulation in HPCT-1E3-Zellen (s. Abb. 11). Anhand dieser Ergebnisse wurde für die nachfolgenden Regulationsstudien eine Inkubationsdauer von 48 h gewählt. Die Vorbehandlung mit Clotrimazol über 60 h erfolgte gemäß einer Studie von FAUCETTE et al. (2004), im Rahmen derer eine CTZ-vermittelte Induktion der CYP2B6-Genexpression bzw. -Aktivität in primären humanen Hepatozyten nach 72 h beschrieben wurde. Eine Erhöhung der Induktorkonzentration bei gleichzeitiger Reduzierung der Inkubationsdauer auf 48 h war hinsichtlich der gewünschten klinischen Relevanz der vorliegenden Studien sowie aufgrund der relativ hohen Zytotoxizität von CTZ (s. 4.1.3 und Abb. 9) nicht möglich.

Phenobarbital und Carbamazepin

HONSCHA et al. (2000) wiesen anhand einer *in vivo*-Studie nach, dass die Vorbehandlung von Ratten mit 100 mg/kg PB über 36 h zu einer signifikanten Reduktion der MTX-Akkumulation in primären Hepatozyten führt. Die Autoren stellten in diesem Zusammenhang die Hypothese auf, dass diese Reduktion durch eine verminderte Rfc1-vermittelte Aufnahme des Zytostatikums bedingt sein könnte. Übereinstimmend konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Vorbehandlung der HPCT-1E3-Zellen mit dem Antiepileptikum bei einer Dosis, welche dem therapeutischen Plasmaspiegel in der Humanmedizin bzw. dem 10fachen dieser Konzentration entspricht (s. 3.5.3.1), eine hoch signifikante Reduktion der intrazellulären $^3\text{[H]}$ -MTX-/FMTX-Anreicherung zur Folge hatte (s. Abb. 12 und Abb. 16). Diese Reduktion war, nach dem Verlauf der $^3\text{[H]}$ -MTX-Aufnahmekurve (s. Abb. 16) sowie der FMTX-Akkumulation (s. Abb. 12) in An- oder Abwesenheit extrazellulärer Natriumionen zu folgern, durch eine verminderte Rfc1-vermittelte Aufnahme bedingt (s. 4.2.2, 4.3.1 und Tab. 4). Hierbei ist die Reduktion der Rfc1-Aktivität durch eine signifikante Abnahme der natriumabhängigen $^3\text{[H]}$ -MTX-Aufnahmerate nach Einstellung des intrazellulären Transportgleichgewichts und insbesondere einer verminderten natriumabhängigen, initialen

MTX-Aufnahmegeschwindigkeit gekennzeichnet (s. Abb. 16). Dies gilt ebenso für die Inkubation mit dem PB-artigen Induktor CBZ (s. Abb. 12 und 16; Tab. 4). Ähnliche Befunde lieferten eine Reihe von *in vivo*- bzw. *in vitro*-Studien von RELLING et al. (2000), RIVA et al. (2000) sowie TOFFOLI et al. (2000), im Rahmen derer eine signifikante Abnahme der intrazellulären MTX-Akkumulationsrate nach Vorbehandlung mit den Antiepileptika PB bzw. CBZ nachgewiesen wurde.

Die Reduktion der Rfc1-vermittelten FMTX-Aufnahme betrug nach PB-Vorbehandlung ca. 50-60% bzw. nach Vorbehandlung mit CBZ ca. 10-15%. Eine Ursache für die moderate Regulation der Rfc1-Aktivität durch CBZ könnte die gewählte niedrige Arbeitskonzentration darstellen (s. 3.5.3.1), welche durch die geringe therapeutische Breite des Antiepileptikums bedingt ist (MEYER 1994). Übereinstimmend konnte in dieser Arbeit mittels WST-1-Toxizitätsstudien gezeigt werden, dass die HPCT-1E3-Zellviabilität nach Vorbehandlung mit 20 µg/ml CBZ über 48 h bereits weniger als 80% betrug (s. Abb. 7). Weiterhin vermittelt CBZ, neben CYP 2B, ebenso die Induktion einer Reihe anderer fremdstoffmetabolisierender Enzyme wie bspw. CYP 3A4 oder CYP 2C6 (PANESAR et al. 1996, TATEISHI et al. 1999, FAUCETTE et al. 2004). Dies könnte nach Vorbehandlung mit CBZ zu einer Kreuzreaktion verschiedener Kernrezeptor-vermittelter Regulationskaskaden führen und in Abhängigkeit der jeweiligen Kernrezeptorexpression und deren Affinität für das sog. „PBREM“, das in dieser Arbeit beobachtete moderate „PB-artige“ Induktionspotential des Antiepileptikums hervorrufen (TATEISHI et al. 1999, FAUCETTE et al. 2004). Dieses scheint weiterhin insbesondere durch die Induktor-Konzentration bedingt zu sein (KOCAREK et al. 1990). In Abhängigkeit der hier gewählten CBZ-Konzentration kann daher eine Beteiligung verschiedener, konkurrierender Regulationsmechanismen an der Regulation der Rfc1-Aktivität nicht ausgeschlossen werden.

ZHAO et al. (1997) stellten die Hypothese auf, dass es sich bei dem Importcarrier Rfc1 um einen sog. „Anionenaustauscher“ handelt, welcher den bidirektionalen Transport von organischen Anionen wie MTX vermittelt. Das in der vorliegenden Arbeit nachgewiesene PB-bedingte Regulationsmuster der Rfc1-Aktivität steht jedoch nicht im Einklang mit dieser Hypothese. Wie anhand der Abb. 16-20 zu erkennen ist, hat die Vorbehandlung mit Induktoren vom PB-Typ durchgehend eine signifikante Abnahme der natriumabhängigen, initialen MTX-Aufnahmegeschwindigkeit und der natriumabhängigen MTX-Akkumulationsrate nach Einstellung des intrazellulären Transportgleichgewichts zur Folge. Die PB-bedingte Abnahme der Rfc1-Aktivität bei vorhandenem bidirektionalem MTX-Transport hätte zwar ebenso die Reduktion der initialen MTX-Aufnahmegeschwindigkeit,

nicht aber des intrazellulären MTX-Transportgleichgewichts als Konsequenz. Letzteres würde sich im Vergleich zu unbehandelten Zellen verzögert, aber in gleicher Höhe einstellen.

Diazepam

Um die Spezifität der PB-artigen Rfc1-Regulation in HPCT-1E3-Zellen zu überprüfen, erfolgte im Anschluss die Vorbehandlung mit Diazepam (s. 3.5.3.1). Das Antiepileptikum wird in der gleichen klinischen Indikation wie PB und CBZ eingesetzt, stellt jedoch *in vitro* keinen CYP 2B-Induktor dar (NIMS et al. 1997). Dementsprechend führte die Inkubation mit Diazepam zu keiner signifikanten Veränderung der natriumabhängigen, Rfc1-vermittelten ³[H]-MTX-/FMTX-Aufnahme in HPCT-1E3-Zellen (s. Abb. 12 und 17). Nach Vorbehandlung der Hepatocytoma-Zellen mit 15 µg/ml Diazepam konnte jedoch nach Einstellung des intrazellulären MTX-Transportgleichgewichts sowohl in An- als auch in Abwesenheit extrazellulärer Natriumionen eine teilweise signifikante Abnahme des ³[H]-MTX-Gehaltes verzeichnet werden. Diese Ergebnisse sind sehr wahrscheinlich auf eine Diazepam-bedingte Zytotoxizität zurückzuführen. Diese Hypothese wird anhand des hier für Diazepam ermittelten IC₅₀-Wertes (s. 4.1.1) von 30 µg/ml bekräftigt (s. Abb. 7). Übereinstimmend wurde bei Mensch und Ratte eine Hepatotoxizität nach chronischer Diazepam-Applikation bereits bei Serumkonzentrationen von > 3 µg/ml beobachtet (SELIM u. KAPLOWITZ 1999, SECKIN et al. 2003, MEYER 1994). Zudem führt die Diazepam-bedingte Zytotoxizität möglicherweise zu einer Schädigung der HPCT-1E3-Zellmembran, welche mit einer Störung der carrier-vermittelten MTX-Aufnahme einhergehen würde. Diazepam wird vornehmlich durch Cytochrom P450 3A und in nur geringerem Umfang ebenfalls durch Cytochrom P450 2D, 2C und 2B metabolisiert (CARLILE et al. 1997, REILLY et al. 1990, NEVILLE et al. 1993), stellt jedoch wie bereits erwähnt *in vitro* keinen CYP 2B-Induktor dar (NIMS et al. 1997). Insgesamt scheint daher eine Reduktion der MTX-Aufnahme durch eine Diazepam-vermittelte Regulation der Rfc1-Aktivität unwahrscheinlich.

Andere Induktoren vom PB-Typ und Kontrollen

In den vorliegenden Untersuchungen wurde darüber hinaus der Frage nachgegangen, welche Auswirkungen andere Induktoren vom PB-Typ auf die funktionelle Aktivität des hepatozellulären Rfc1 haben. Hierzu wurden die Hepatocytoma-Zellen mit dem

Neuroleptikum Chlorpromazin (CPZ) sowie dem Antimykotikum Clotrimazol (CTZ) vorbehandelt (s. 3.5.3.1). Die Inkubation mit beiden PB-artigen Induktoren (s. 2.3.1.1) führte wie die Vorbehandlung mit dem Prototyp PB zu einer signifikanten bis sehr stark signifikanten Reduktion der Rfc1-vermittelten ³[H]-MTX-/FMTX-Anreicherung in HPCT-1E3-Zellen (s. Abb. 13 und 14 bzw. Abb. 18 und 19; Tab. 4). Der einheitliche Verlauf der MTX-Aufnahmekurve nach Vorbehandlung mit den jeweiligen Induktoren spricht für einen gleichartigen Mechanismus der Rfc1-Regulation nach PB-, CPZ- bzw. CTZ-Inkubation in HPCT-1E3-Zellen.

Interessanterweise weist die durch Clotrimazol-vermittelte Induktion des Kernrezeptors CAR speziesspezifische Unterschiede auf. SUEYOSHI u. NEGISHI (2001) wiesen nach, dass Clotrimazol bei Nagern zur Gruppe der Induktoren vom PB-Typ gehört, welche für die indirekte Aktivierung von CAR bzw. des sog. „PBREM“ verantwortlich sind. Dagegen konnten MOORE et al. (2002) zeigen, dass das Antimykotikum im Falle des humanen CAR1 als inverser Agonist fungiert, welcher eine moderate Inhibition der CAR-Induktion vermittelt. Der humane CAR3, welcher eine annähernd hohe Genexpressionsrate wie die des CAR1 aufweist und dessen Ligandenbindungsdomäne mit der des CAR1 identisch ist (AUERBACH et al. 2003, JINNO et al. 2004), wird jedoch durch Clotrimazol direkt aktiviert (AUERBACH et al. 2005). In der Folge kommt es in Analogie zur CAR1-Aktivierung zur Heterodimerbildung mit dem RXR-Rezeptor, der Bindung an das sog. „DR-4-Motif“ innerhalb der „PBREM“ und der nachfolgenden Induktion der CYP2B6-Genexpression. Weiterhin aktiviert das Antimykotikum neben dem CAR-Rezeptor ebenso den Kernrezeptor PXR (WANG et al. 2003b), welcher die CYP 3A-Induktion vermittelt (XU et al. 2005). Der PXR-Rezeptor weist allerdings im Vergleich mit CAR eine ca. 100fach geringere Affinität gegenüber CTZ auf (WANG et al. 2003b, FAUCETTE et al. 2004, AUERBACH et al. 2005). So liegt die von WANG et al. (2003b) gewählte CTZ-Konzentration (3,4 µg/ml) gemäß der hier durchgeführten WST1-Toxizitätsstudie (s. 4.1.3 und Abb. 9) bereits im stark zytotoxischen Bereich sowie 10 bzw. 100fach über dem therapeutischen Plasmaspiegel in der Humanmedizin bzw. der hier gewählten Induktorkonzentration (s. 3.5.3.1). Diese Beobachtungen sprechen insgesamt für eine PB-artige Regulation des Rfc1 nach CTZ-Vorbehandlung in HPCT-1E3-Zellen. Eine Kreuzreaktion der verschiedenen Kernrezeptor-vermittelten Regulationskaskaden kann dennoch, in Abhängigkeit der CAR- bzw. PXR-Expression und deren Affinität für das sog. „PBREM“, nicht ausgeschlossen werden.

Als Negativkontrolle diente nachfolgend die Inkubation mit Haloperidol bzw. Amphotericin B, welche in der gleichen klinischen Indikation wie Chlorpromazin bzw. Clotrimazol

eingesetzt werden. Beide Substanzen stellen jedoch keinen PB-artigen Induktoren dar (KUDO u. ISHIZAKI 1999, BEKERSKY et al. 2002). Die Inkubation mit 0,005 µg/ml Haloperidol führte zu einem signifikanten Anstieg der intrazellulären FMTX-Anreicherung in natriumhaltigen Tyrodepuffer (s. Abb. 13). BASTA-KAIM et al. (2002) sowie DWIVEDI u. PANDEY (1999) wiesen die Haloperidol-vermittelte Hemmung der PKC α -Genexpression und -Aktivität mittels einer *in vitro*-Studie bzw. in verschiedenen Hirnarealen der Ratte nach. Da im Verlauf dieser Arbeit die Beteiligung der PKC an der Reduktion der Rfc1-vermittelten MTX-Aufnahme nachgewiesen werden konnte (s. 4.6.1.2 und Abb. 24), kann eine Zunahme der Rfc1-Aktivität durch eine Haloperidol-bedingte PKC-Inhibition nicht ausgeschlossen werden. Aufgrund der hier gewählten 10-100fach niedrigeren Arzneistoffkonzentration sowie in Abhängigkeit der PKC α -Aktivität in HPCT-1E3-Zellen, scheint dieser Haloperidol-bedingte Effekt auf die FMTX-Anreicherung allerdings von untergeordneter Bedeutung zu sein, zumal nach Vorbehandlung mit 0,05 µg/ml Haloperidol keine signifikant erhöhte FMTX-Akkumulation beobachtet wurde (s. Abb. 13).

Die Inkubation mit Amphotericin B führte wie erwartet zu keiner signifikanten Reduktion der Rfc1-Aktivität in HPCT-1E3-Zellen (s. Abb. 14). Übereinstimmend konnte bislang ebenso wenig die Amphotericin B-vermittelte Regulation anderer Transportproteine wie bspw. der Multidrug Resistance Proteine der ATP-binding cassette (Abc)-Superfamilie nachgewiesen werden (HERNAEZ et al. 1998, GRAY et al. 2003).

TCPOBOP

Die Induktion der Cytochrom P450 Genexpression durch TCPOBOP erfolgt im Gegensatz zu den PB-artigen Induktoren, welche eine indirekte CAR-Aktivierung vermitteln, durch direkte Bindung des Herbizidbestandteils an den Kernrezeptor CAR (KENDE et al. 1985, TZAMELI et al. 2000, MOORE et al. 2002). Durch Vorbehandlung mit TCPOBOP ist es daher möglich, die Beteiligung der CAR-Signalkaskade an der Regulation der Rfc1-vermittelten ³[H]-MTX-Aufnahme bzw. FMTX-Akkumulation in HPCT-1E3-Zellen zu untersuchen (s. 3.5.3.1, 3.8.1.1 und 3.8.1.2).

Die Inkubation mit dem direkten CAR-Agonisten führte in Übereinstimmung mit der Rfc1-Regulation durch Induktoren vom PB-Typ zur einer signifikanten Reduktion der Rfc1-vermittelten MTX-/FMTX-Anreicherung (s. Abb. 15 und 20; Tab. 4). Darüber hinaus konnte ebenfalls der für die PB-artige Regulation der Rfc1-Aktivität typische Verlauf der ³[H]-MTX-Aufnahmekurve beobachtet werden (s. 4.3.4 und Abb. 20).

Der von TZAMELI et al. (2000) für die Aktivierung des murinen CAR-Rezeptors ermittelte

ED₅₀-Wert, der die Induktor-Konzentration angibt, welche die halbmaximale Induktion des jeweiligen regulierten Gens vermittelt, betrug ca. 8 ng/ml und liegt damit im Bereich der in der vorliegenden Arbeit gewählten TCPOBOP-Konzentration (s. 3.5.3.1).

TCPOBOP wurde in bisherigen Publikationen als ein spezifischer Agonist des murinen, nicht aber des humanen CAR beschrieben (MOORE et al. 2000, TZAMELI et al. 2000). Übereinstimmend konnte anhand von *in vivo*- bzw. *in vitro*-Studien bislang nur die TCPOBOP-vermittelte Regulation von murinen Transportproteinen wie des Oatp1a1, Oatp1a4, Oatp2b1, Mrp2, Mrp3, Mrp4, Mrp5, Mrp6 und Mrp7 (STAUDINGER et al. 2003, ASSEM et al. 2004, CHENG et al. 2005, MAHER et al. 2005) nachgewiesen werden. SUEYOSHI et al. (1999) stellten die Hypothese auf, dass die Aktivierung des murinen CAR durch Bindung und gleichzeitige Verdrängung von Steroidderivaten, welche an den Kernrezeptor binden und diesen inhibieren (FORMAN et al. 1998), erfolgt. Eine detaillierte Charakterisierung hinsichtlich des Bindungsvermögens von TCPOBOP an den CAR-Rezeptor der Ratte liegt in der Literatur bisher nicht vor. Anhand der Befunde dieser und einer Regulationsstudie von NIMS et al. (1993) zur TCPOBOP-vermittelten Induktion der CYP2B Genexpression in Rattenhepatozyten sowie aufgrund der homologen Struktur der CAR-Bindungsdomäne von Maus und Ratte ist jedoch eine ligandenabhängige, TCPOBOP-vermittelte Regulation von CYP 2B bzw. des Rfc1 in HPCT-1E3-Zellen sehr wahrscheinlich.

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass die Rfc1-vermittelte Aufnahme von ³[H]-Methotrexat durch Induktoren vom PB-Typ, wahrscheinlich unter Beteiligung des Kernrezeptors CAR, reguliert wird. Hierbei hatte die jeweils höhere Induktorkonzentration nur teilweise eine signifikant stärkere Reduktion der Rfc1-vermittelten MTX-Aufnahme zur Folge (s. Abb. 16-20). Diese Befunde könnten durch die, im Vergleich mit einer Reihe anderer Studien zur Regulation von Transportproteinen sowie fremdstoffmetabolisierenden Enzymen (SUEYOSHI et al. 1999, TOFFOLI et al. 2000, COURTOIS et al. 2002, KAST et al. 2002, WANG et al. 2003b), relativ geringen Induktorkonzentrationen bedingt sein. Da die Rfc1-Regulation in HPCT-1E3-Zellen ein Modell darstellen soll, welches den *in vivo*-Verhältnissen nahe steht, wurden in dieser Arbeit Konzentrationen der jeweiligen Induktoren bzw. Kontrollen gewählt, welche denen des therapeutischen Plasmaspiegels in der Humanmedizin (MEYER 1994) bzw. dem 10fachen, im Falle von CBZ dem 3fachen dieser Konzentrationen entsprechen (s. 3.5.3.1).

Weiterhin könnten geringe CAR-Genexpressionslevel in HPCT-1E3-Zellen das Regulationspotential der PB-artigen Induktoren limitieren. So wiesen eine Reihe von

Arbeitsgruppen nach, dass männliche Ratten hohe, weibliche Tiere dagegen nur eine sehr geringe CAR-Expressionrate ausweisen (YOSHINARI et al. 2001, XIONG et al. 2002, CHERRINGTON et al. 2003). Letztere ging mit einer deutlichen Verschlechterung der PB-bedingten Induktion von CYP 2B einher. Die primären Rattenhepatozyten, welche für die Generierung der HPCT-1E3-Zellen verwendet wurden, stammen zwar von männlichen Wistar Kyoto Ratten (FÖLLMANN et al. 1989a, 1989b), die HPCT-1E3-Zellkultur erfolgte jedoch ohne Ergänzung von männlichen Sexualhormonen (s. 3.5.1). Es ist daher wahrscheinlich, dass HPCT-1E3-Zellen in Kultur eine relativ geringe CAR-Expressionrate aufweisen bzw. diese durch Zusatz von Testosteron stimuliert werden könnte. Diese Hypothese steht im Einklang mit der im Rahmen von Vorarbeiten beobachteten geringen Expression des Transportproteins Oat3 in HPCT-1E3-Zellen (HALWACHS et al. 2005; s. Anhang) sowie in isolierten Hepatozyten weiblicher Ratten (KOBAYASHI et al. 2002).

5.3 Mechanismus der Regulation der Rfc1-Aktivität in HPCT-1E3-Zellen durch Cytochrom P450-Induktoren vom PB-Typ und TCPOBOP

5.3.1 Regulation der Rfc1-Genexpression

Anhand einer Reihe von Studien zur transkriptionellen Regulation von Arzneistoffwechselwegen konnte übereinstimmend gezeigt werden, dass Transportproteine wie bspw. MRP2/Mrp2 in Abstimmung mit fremdstoffmetabolisierenden Enzymen durch Kernrezeptoren wie dem „Constitutive Androstane Receptor (CAR)“ reguliert werden (XU et al. 2005, s. auch 2.3.2.1). In diesem Zusammenhang konnten ASSEM et al. (2004) anhand einer *in vitro*-Studie an HepG2-Zellen bzw. humanen Hepatozyten sowie durch *in vivo*-Studien an Mäusen zeigen, dass die Vorbehandlung mit den Cytochrom P450-Induktoren Phenobarbital und TCPOBOP (s. 2.3.1.1) zu einer koordinierten CAR-vermittelten Regulation der Cyp2b10-, Sult2a1- sowie der Mrp4-Genexpression führte. In der Literatur gibt es jedoch bislang keine Hinweise auf eine Kernrezeptor-vermittelte Regulation des Rfc1. Um den Einfluss von PB und dem CAR-Agonisten TCPOBOP auf die Rfc1-Genexpression zu ermitteln, wurden die HPCT-1E3-Zellen mit 100 µg/ml PB bzw. 1 ng/ml TCPOBOP über 12, 24 und 48 h vorbehandelt und die Menge an Rfc1-mRNA mittels quantitativer RT-PCR bestimmt (s. 3.7.2.3). Anschließend wurde die Rfc1-Genexpression in Relation zur Expression des Referenzgenes β -Actin berechnet (s. 3.7.2.4). Die Expression des rfc1-Gens

wies im Vergleich zu unbehandelten HPCT-1E3-Zellen sowohl nach Vorbehandlung mit PB als auch mit TCPOBOP über die verschiedenen Zeiträume keine signifikante Veränderung auf (s. Abb. 22).

Diese Befunde stehen in Einklang mit Ergebnissen einer Reportergenexpressionsstudie an MDCK-, HPCT-1E3- sowie an COS-Zellen, welche mit dem Plasmid pPMTX-SEAP transfiziert wurden (persönliche Mitteilung, Dr. Carsten Kneuer, Leipzig, 6. September 2005). Das Plasmid umfasst den Rfc1-Promotorbereich mit Exon 1a, Intron 1a sowie Exon 1b, welcher u.a. das durch PB regulierbare Genelement „Barbie Box“ (s. 2.3.1.1) des hepatozellulären Rfc1 umfasst. Die Promotoraktivität wurde als die Aktivität der sekretorischen alkalischen Phosphatase (SEAP) im Überstand bestimmt. Die Vorbehandlung der jeweiligen Zelllinie für 6 h mit dem Prototyp der PB-artigen Induktoren Phenobarbital (30 und 100 µg/ml) bzw. der Negativkontrolle Diazepam (15 µg/ml) führte, in Relation zur Kontrolle, zu keiner signifikant veränderten Rfc1-Promotoraktivität. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stimmen ferner mit einer *in vitro*-Studie von TOFFOLI et al. (2000) überein. Die Autoren konnten zeigen, dass es nach chronischer Carbamazepinapplikation (50 bzw. 100 µg/ml über 2 Monate) zu einer Reduktion der Rfc-vermittelten MTX-Aufnahme (1 µM) in „Human ovarian carcinoma cells (SKOV-3)“ kam, welche jedoch nicht mit einer verminderten Rfc-Genexpression einherging.

Darüber hinaus wiesen PINKUS et al. (1993) die Phosphorylierung und die nachfolgend erhöhte DNA-Bindungsaktivität des Transkriptionsfaktors AP1 in der GSTa-Promotorregion nach PB-Inkubation nach. AP1-Bindungsstellen wurden zwar sowohl in der Promotorregion der CYP 2B-Gene als auch der Gensequenz des RFC1-/Rfc1 ermittelt (SUEYOSHI u. NEGISHI 2001; s. 2.2.2), eine AP1-vermittelte Induktion der Rfc1-Genexpression ist allerdings aufgrund der nicht signifikant veränderten mRNA-Menge nach PB- bzw. TCPOBOP-Inkubation unwahrscheinlich (s. Abb. 22).

Der Cytochrom P450-Induktor PB ist ebenfalls für die Phosphorylierung und Aktivierung des Transkriptionsfaktor NF- κ B verantwortlich (MEJDOUBI et al. 1999). Dieser bindet nachfolgend an die „Barbie Box“ und vermittelt die PB-bedingte Induktion der α -1-Glykoprotein-Genexpression in Rattenhepatozyten. Die „Barbie Box“ wurde in der Promotorregion des Rfc1 der Ratte (HONSCHA et al. 2000), nicht aber in der Gensequenz des humanen bzw. murinen RFC1/Rfc1 nachgewiesen (s. 2.2.2).

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen darauf hin, dass die Reduktion der Rfc1-bedingten MTX-Aufnahme in HPCT-1E3-Zellen nach Vorbehandlung mit PB-artigen Induktoren bzw. TCPOBOP nicht durch eine verminderte

Rfc1-Genexpression bedingt ist, zumal das Genregulationselement „PBREM“ (s. 2.3.1.1) bisher nicht in der RFC1-/Rfc1-Promotorregion der Ratte nachgewiesen werden konnte (HONSCHA et al. 2000, MATHERLY u. GOLDMAN 2003). Daher sollte im Rahmen der nachfolgenden Untersuchungen geklärt werden, ob die reduzierte Rfc1-Aktivität auf einer Regulation der Rfc1-Proteinmenge beruht.

5.3.2 Regulation der Rfc1-Proteinmenge

Die Proteinbiosynthese wird nicht nur auf Ebene der Transkription, sondern ebenfalls im Rahmen der Translation reguliert. Letztere kann sowohl durch chemische als auch durch nutritive Stimuli aktiviert bzw. inhibiert werden, welche die Induktion spezifischer Translationsfaktoren zur Folge haben (DEVER 2002). In diesem Zusammenhang konnten bspw. JOHNSON et al. (2002) mittels einer *in vivo*-Studie an Ratten zeigen, dass die Vorbehandlung mit PB zu einer signifikanten Steigerung der Mrp2-Proteinmenge und damit der Mrp2-Exportaktivität, nicht aber zu einer gesteigerten Mrp2-Genexpression führte. Diese Beobachtungen stehen in Einklang mit Daten einer Reihe anderer Untersuchungen zur posttranskriptionellen Regulation von Mrp2 *in vivo* (TRAUNER et al. 1997, GOTOH et al. 2000, PAULUSMA et al. 2000).

Darüber hinaus ist eine Regulation der Rfc1-Proteinmenge im Rahmen der sog. „Ubiquitinylierung“ möglich. Das Protein Ubiquitin vermittelt durch Bindung an das jeweilige Substratmolekül dessen Abbau in Proteasomen oder die Modulation dessen subzellulärer Verteilung bzw. funktioneller Eigenschaften (BIEL et al. 2004). Eine derartige posttranslationale Modifikation des Rfc1-Transportproteins wurde jedoch in der Literatur bislang nicht beschrieben.

Um den Einfluss der Induktoren vom PB-Typ auf die Rfc1-Proteinmenge zu untersuchen, wurden die HPCT-1E3-Zellen mit PB bzw. dem direkten CAR-Agonisten TCPOBOP über 12, 24 und 48 h vorbehandelt (s. 3.5.3.1). Als Negativkontrolle diente wiederum die Inkubation mit dem Antiepileptikum Diazepam (NIMS et al. 1997). Anschließend erfolgte die Bestimmung der Rfc1-Proteinmenge mittels eines semiquantitativen immunzytochemischen Nachweisverfahrens (s. 3.6.3). Die Vorbehandlung mit PB, TCPOBOP sowie 1,5 µg/ml Diazepam über die verschiedenen Zeiträume führte zu keiner signifikanten Veränderung der Rfc1-Proteinmenge (s. Abb. 23). Dagegen war nach Inkubation der HPCT-1E3-Zellen mit 15 µg/ml Diazepam über 48 h, nicht aber nach 12 bzw. 24 h, eine Abnahme dieser um ca. 25%

zu verzeichnen, welche jedoch im Vergleich mit unbehandelten HPCT-1E3-Zellen keine statistische Signifikanz erreichte. Diese Reduktion der Rfc1-Proteinmenge ist sehr wahrscheinlich auf die bereits in 5.2 diskutierte Diazepam-bedingte Zytotoxizität zurückzuführen und beruht nicht auf einer Diazepam-vermittelten Regulation der Rfc1-Proteinbiosynthese.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Reduktion der Rfc1-vermittelten MTX-Aufnahme in HPCT-1E3-Zellen nach Inkubation mit Induktoren vom PB-Typ bzw. TCPOBOP nicht durch eine transkriptionelle Regulation des Transportproteins oder durch eine Abnahme der Rfc1-Proteinmenge bedingt ist. Ähnliche Beobachtungen wurden im Rahmen einer Studie zur Regulation der Glukoneogenese in Rattenhepatozyten beschrieben (CHAUVIN et al. 1996). Die Autoren wiesen nach, dass die Vorbehandlung mit PB zu einer signifikanten Reduktion der Phosphoenolpyruvatkinase-Aktivität führte, welche jedoch nicht mit einer reduzierten mRNA- bzw. Proteinmenge des Enzyms einherging. Nachfolgende Untersuchungen wiesen auf eine Veränderung der Proteinstruktur und damit einer herabgesetzten Substrataffinität der Pyruvatkinase nach PB-Vorbehandlung hin.

Möglicherweise handelt es sich um einen indirekten posttranslationalen Regulationsmechanismus des Rfc1-Transportproteins durch Änderung des intrazellulären Phosphorylierungsstatus nach Aktivierung der CAR-Signalkaskade (SUEYOSHI u. NEGISHI 2001). Ziel der nachfolgenden Studien war es daher, die mögliche Regulation der Rfc1-Aktivität in HPCT-1E3-Zellen durch Modulatoren der Phosphorylierung zu untersuchen.

5.3.3 Regulation der Rfc1-Aktivität in HPCT-1E3-Zellen durch Modulatoren der Phosphorylierung

Neben der Regulation der Genexpression (s. 2.3.2.1) stellt die schnelle und kurzfristige posttranslationale Phosphorylierung einen weiteren wichtigen Regulationsmechanismus von Transportproteinen dar (KRAUSS 2003; s. 2.3.2.2). Hierbei spielen bspw. die Proteinkinase C (PKC) sowie die Proteinkinase A (PKA) eine wichtige Rolle, welche die funktionelle Aktivität zahlreicher Proteine durch eine Phosphorylierung der Aminosäurereste Serin/Threonin bzw. Tyrosin regulieren (LIU u. HECKMAN 1998, KRAUSS 2003).

Als Beurteilungskriterium für die Rfc1-Aktivität, welche wie in 4.3 beschrieben berechnet wurde, diente wiederum der Anteil der natriumabhängigen Akkumulation von Methotrexat

nach Einstellung des intrazellulären Transportgleichgewichts sowie insbesondere die Transportgeschwindigkeit während der initialen Aufnahmephase (s. 4.3 und 5.1). Weiterhin wurde im Falle der in 4.6.2 aufgeführten Untersuchungen die Rfc1-vermittelte MTX-Aufnahmerate (V_{influx}) in HPCT-1E3-Zellen bestimmt (s. 3.8.1.2), welche sich i.d.R. direkt proportional zur Anzahl funktionell aktiver Rfc1-Transporter verhält.

Zunächst wurde der Einfluss des PKC-Induktors PMA (NISHIZUKA 1992) bzw. des Protein Phosphatase 1/2A-Inhibitors Okadainsäure (OA; COHEN et al. 1990) auf die Rfc1-vermittelte MTX-Aufnahme in HPCT-1E3-Zellen untersucht (s. 3.8.1.2). Die Vorbehandlung der Hepatocytoma-Zellen mit PMA bzw. OA (s. 3.5.3.2 und Tab. 2) führte im Vergleich mit einer unbehandelten Kontrolle zur Reduktion der Rfc1-Aktivität um 75 bzw. 65% (s. Abb. 24). Die OA-vermittelte Abnahme der Rfc1-Aktivität liegt hierbei im gleichen Bereich wie die von MUKHOPADHYAY et al. (1998) im Rahmen einer Ntcp-Regulationsstudie an Rattenhepatozyten ermittelten Werte. Weiterhin hatten beide Substanzen wie erwartet einen synergistischen Effekt auf die Rfc1-vermittelte MTX-Aufnahme (s. Abb. 24). Ferner stimmte der Verlauf der MTX-Aufnahmekurve in natriumhaltigen Tyrodepuffer nach PMA- bzw. OA-Inkubation mit dem nach Vorbehandlung mit PB-artigen Induktoren bzw. TCPOBOP charakteristischen Kurvenverlauf überein. Dagegen wies die natriumunabhängige, Oat2-bedingte MTX-Aufnahme, nach Vorbehandlung mit den jeweiligen Modulatoren, keine signifikanten Veränderungen auf. Übereinstimmend wurde in der Literatur bislang einzig die PKC-vermittelte Regulation von OAT1/Oat1 sowie von Oat3 der Ratte bzw. die OA-vermittelte Regulation des murinen Oat1 beschrieben (UWAI et al. 1998, TAKEDA et al. 2000, YOU et al. 2000).

Um die Beteiligung der Proteinkinase C an der Reduktion der Rfc1-Aufnahmeaktivität eindeutig nachzuweisen, wurden die HPCT-1E3-Zellen nachfolgend mit dem PKC-Induktor PMA und/oder dem spezifischen PKC-Inhibitor Bisindolylmaleimid (BIM; DAVIS et al. 1992) vorbehandelt (s. 3.5.3.2 und Tab. 2) und anschließend die MTX-Aufnahme in An- bzw. Abwesenheit von extrazellulären Natriumionen bestimmt (s. 3.8.1.2). Die Vorbehandlung mit PMA hatte wiederum die fast vollständige Reduktion der natriumabhängigen, Rfc1-vermittelten (s. Abb. 24), nicht aber der natriumunabhängigen, MTX-Aufnahme zur Folge. Die zeitgleiche Inkubation mit BIM führte zu einer Aufhebung der PMA-vermittelten Abnahme der Rfc1-Aktivität zu ca. 50-70%, während die alleinige Vorbehandlung mit dem spezifischen Inhibitor keinen Einfluss auf die Rfc1-bedingte Aufnahme des Folatantagonisten

hatte. Der fehlende regulatorische Effekt bei alleiniger Inkubation mit dem PKC-Inhibitor bestätigt Befunde von SAID et al. (1997). Die Autoren zeigten auf, dass der durch DIDS hemmbare Anteil der Rfc-bedingten Folataufnahme (9,2 nM) in IEC-6-Zellen bei pH 5,5 nach Vorbehandlung mit dem PKC-Inhibitor Staurosporin (0,1-100 μ M) bzw. dem PKA-Inhibitor H-89 (100 μ M) nicht beeinflusst wurde. DIDS vermittelt die relativ unspezifische Inhibition des Transportes von Anionen (SAITO et al. 1996).

Insgesamt sprechen die vorliegenden Ergebnisse für eine PKC- bzw. PPA 1/2A-vermittelte posttranslationale Regulation der Rfc1-Aktivität, nicht aber für eine Veränderung der Mrp- sowie Oat2-bedingten MTX-Transportrate in HPCT-1E3-Zellen (s. 4.6.1.2). ROELOFSEN et al. (1991) zeigten auf, dass die Vorbehandlung von Rattenhepatozyten mit 1 μ g/ml PMA zu einer Steigerung der Mrp2-Exportaktivität um ca. 50% führte, welche durch den PK-Inhibitor Staurosporin gehemmt wurde. Die Aussagekraft dieser Regulationsstudie ist allerdings auf Grund der relativ hohen Inhibitorkonzentration (10 μ M) limitiert (VEGESNA et al. 1988, DEWALD et al. 1989), da Staurosporin konzentrationsabhängig neben der PKC ebenfalls eine Reihe anderer Serin-/Threonin-Kinasen inhibiert (GORDGE u. RYVES 1994, OMURA et al. 1995, LITTLEPAGE et al. 2002).

Im Gegensatz zu der Vorbehandlung mit PMA bzw. OA hatte die nachfolgende Inkubation der HPCT-1E3-Zellen mit dem PKA-Induktor cAMP (TAYLOR et al. 1990) in An- oder Abwesenheit des spezifischen PKA-Inhibitors H-89 (CHIJIWA et al. 1990; s. 3.5.3.2 und Tab. 2) keine signifikante Veränderung der natriumabhängigen, Rfc1-vermittelten sowie der natriumunabhängigen, Oat2-bedingten ³[H]-MTX-Aufnahme zur Folge (s. 3.8.1.2 und Abb. 25). Übereinstimmend zeigten HALPIN u. RENFRO (1996), TAKANO et al. (1996) bzw. LU et al. (1999) auf, dass die Vorbehandlung mit PKA-Induktoren bzw. -Inhibitoren keine Veränderung der Aufnahme organischer Anionen wie bspw. den Transport von PAH in Nierenepithelzellen zur Folge hatte.

Zusammenfassend sprechen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit für eine PKC- nicht aber eine PKA-vermittelte Regulation der Rfc1-vermittelten MTX-Aufnahme in HPCT-1E3-Zellen.

5.3.4 Beteiligung der PKC an der Regulation der Rfc1-Aktivität in HPCT-1E3-Zellen durch Cytochrom P450-Induktoren vom PB-Typ und TCPOBOP

Der einheitliche Verlauf der MTX-Aufnahmekurve nach Vorbehandlung mit den jeweiligen PB-artigen Induktoren, TCPOBOP bzw. PMA spricht für einen analogen Regulationsmechanismus der Rfc1-Aktivität nach Inkubation mit Cytochrom P450-Induktoren bzw. mit PKC-Induktoren in HPCT-1E3-Zellen.

Aus diesem Grunde wurde im Rahmen nachfolgender Studien untersucht, ob die PKC an der Regulation der Rfc1-vermittelten $^3\text{[H]}$ -MTX-Aufnahme in HPCT-1E3-Zellen durch Cytochrom P450-Induktoren vom PB-Typ und TCPOBOP beteiligt ist. Hierzu wurden die Hepatocytoma-Zellen mit PB bzw. TCPOBOP über 48 h und dem spezifischen PKC-Inhibitor BIM über 2 h in der Kombination Phenobarbital bzw. TCPOBOP \pm BIM vorbehandelt (s. 3.5.3.2 und Tab. 2) und nachfolgend die Rfc1-vermittelte MTX-Aufnahme bestimmt (s. 3.8.1.2 und 4.3). In Übereinstimmung mit in dieser Arbeit vorangegangenen Untersuchungen (s. Abb. 16 und 20) führte die Inkubation mit PB bzw. TCPOBOP zu einer stark signifikanten Abnahme der Rfc1-Aufnahmeaktivität (s. Abb. 26), welche durch den spezifischen PKC-Inhibitor BIM zu 70 bzw. 90% aufgehoben wurde. Dagegen hatte die alleinige Vorbehandlung mit BIM, in Relation zur unbehandelten Kontrolle, keine signifikant unterschiedliche Rfc1-vermittelte MTX-Aufnahme zur Folge. Übereinstimmende Befunde wurden ebenso für die natriumabhängige, Rfc1-vermittelte MTX-Aufnahmerate (V_{influx}) gewonnen (s. Tab. 5), welche sich in der gewählten Substratkonzentration i.d.R. proportional zur Anzahl der funktionell aktiven Rfc1-Transporter in der HPCT-1E3-Zellmembran verhält.

Anhand der Ergebnisse dieser Studien lässt sich daher insgesamt schlussfolgern, dass die Rfc1-Aktivität in HPCT-1E3-Zellen durch Cytochrom P450-Induktoren vom PB-Typ unter Beteiligung der PKC reguliert wird. Dieser Regulationsmechanismus beruht wahrscheinlich auf einer variierenden Anzahl funktionell aktiver Rfc1-Transporter in der HPCT-1E3-Zellmembran. So könnte eine Änderung des Rfc1-Phosphorylierungsstatus nach PB-Vorbehandlung zu der hier beobachteten Reduktion der Rfc1-vermittelten MTX-Aufnahme in HPCT-1E3-Zellen führen, zumal der Rfc1 auf Proteinebene zwei mögliche Phosphorylierungsstellen aufweist (HONSCHA et al. 2000; s. Abb. 2).

Die PB-bedingte Aktivierung der CAR-Signalkaskade geht mit einer Reihe von Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsschritten einher (SUEYOSHI u. NEGISHI 2001), welche eine Verschiebung des intrazellulären Kinase-/Phosphatase-Gleichgewichts

und auf diese Weise eine gesteigerte PKC-vermittelte Phosphorylierung und Deaktivierung des Rfc1-Transportproteins zur Folge haben könnte. Diese Hypothese wird durch die hier beobachtete Abnahme der Rfc1-Aktivität nach Inkubation mit dem spezifischen Protein Phosphatase 1/2A-Inhibitor Okadainsäure bestätigt, da die Hemmung der PPA 1/2A indirekt ebenso zu einer vermehrten Phosphorylierung und Deaktivierung des Rfc1-Transportproteins führen würde (s. Abb. 24). Zudem lieferte eine Studie von CHAUVIN et al. (1996) zur PB-bedingten Regulation der Phosphoenolpyruvatkinase-Aktivität ähnliche Befunde (s. 5.3.2).

Im Gegensatz zu den Induktoren vom PB-Typ führte die PMA-vermittelte PKC-Induktion bereits nach einer Vorbehandlung über 2 h zu einer signifikanten Reduktion der Rfc1-Aktivität in HPCT-1E3-Zellen. Es handelt sich hierbei um einen direkten posttranslationalen Regulationsmechanismus, während nach PB-Vorbehandlung höchstwahrscheinlich eine indirekte, mehrere Schritte umfassende, posttranslationale Rfc1-Regulation vorliegt. Dies ist möglicherweise eine Begründung für die im Vergleich zur PMA-Vorbehandlung lange Inkubationsdauer (s. 3.5.3.2), welche zu der beobachtenden PKC-vermittelten Regulation der Rfc1-Aktivität nach PB-Inkubation führte.

5.4 Ausblick

Die PKC stellt eine Familie von Isoenzymen dar, welche nahezu ubiquitär exprimiert und durch verschiedenste endogene und exogene Faktoren reguliert wird (LIU u. HECKMAN 1998), wobei jedoch einzig für PKC α , PKC β II sowie PKC ϵ eine PMA-vermittelte Induktion der Enzymaktivität in Rattenhepatozyten nachgewiesen wurde (CROQUET et al. 1996).

Die Ergebnisse der vorliegenden Studien sprechen insgesamt für eine niedrige PKC- bzw. eine hohe basale PPA 1-/2A-Aktivität in HPCT-1E3-Zellen, da die alleinige Vorbehandlung mit dem spezifischen PKC-Inhibitor BIM im Gegensatz zur Inkubation mit dem PPA 1/2A-Inhibitor OA zu keiner Veränderung der Rfc1-Aktivität führte. In nachfolgenden Studien sollte der basale Phosphorylierungsstatus des Rfc1 geprüft und zudem untersucht werden, ob das Transportprotein nach Vorbehandlung mit PKC- sowie PB-artigen Induktoren vermehrt phosphoryliert vorliegt.

In Übereinstimmung mit den Befunden dieser Arbeit korreliert die Ausbildung des sog. „MDR-Phänotyps“ in zahlreichen Tumorzelllinien direkt mit der PKC-Expressionsrate bzw. der PKC-Aktivität (AHMAD u. GLAZER 1993, BECK et al. 1996, GILL et al. 2001, GANESHAGURU et al. 2002). BECK et al. (1996) wiesen bspw. nach, dass in AML-Zellen

die Menge an PKC-mRNA direkt mit einer gesteigerten MDR1- und MRP-Expressionsrate einherging. Ferner wurde ebenso die direkte PKC-vermittelte Phosphorylierung und nachfolgende Induktion des Effluxtransporters P-gp in CLL-Zellen beschrieben (GANESHAGURU et al. 2002). In klinischen Studien werden daher seit einigen Jahren selektive PKC-Inhibitoren wie bspw. Midostaurin (PKC412) in Kombination mit Zytostatika zur Behandlung neoplastischer Erkrankungen wie lymphatischer Leukämien und Non-Hodgkin-Lymphomen getestet (PROPPER et al. 2001, VIRCHIS et al. 2002, HEIDEL et al. 2005). Im Rahmen nachfolgender Regulationsstudien sollte deshalb untersucht werden, ob die hier beobachtete PB-bedingte und PKC-vermittelte MTX-Resistenz durch Reduktion der Rfc1-Aufnahmeaktivität, neben dem spezifischen PKC-Inhibitor BIM, ebenfalls durch Midostaurin umkehrbar ist.

Zahlreiche *in vitro*- bzw. *in vivo*-Studien haben ferner belegt, dass die PKC die schnelle und kurzfristige posttranslationale Regulation von Transportprozessen durch verschiedene Mechanismen vermittelt (TERLOUW et al. 2003). Da der Rfc1 zwei mögliche PK-Bindungsstellen aufweist (s. Abb. 2), ist die posttranslationale Regulation durch eine direkte PKC-vermittelte Phosphorylierung des Proteins denkbar. Diese phosphorylierungsbedingte Änderung der Rfc1-Proteinstruktur könnte zu einer herabgesetzten Substrataffinität ohne veränderte subzelluläre Lokalisation (CONRADT u. STOFFEL 1997) oder einer Internalisierung und nachfolgender Reduktion der Rfc1-vermittelten MTX-Aufnahme durch eine verminderte Transportproteindichte in der HPCT-1E3-Zellmembran führen (VAUGHAN et al. 1997).

WOLFF et al. (2003) konnten zeigen, dass die PKC-bedingte Reduktion der OAT1-vermittelten PAH-Aufnahme von einer Internalisierung des Transportproteins ohne direkte Carrier-Phosphorylierung herrührte. Dies gilt ebenso für die posttranslationale Regulation anderer Transportproteine wie GAT1, NADC-1 oder NaPi-II (COREY et al. 1994, HAYES et al. 1995, PAJOR et al. 1999). Die Reduktion der Rfc1-Aktivität könnte daher zusätzlich auf einer PKC-vermittelten Carrier-Internalisierung beruhen, da im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen nach Vorbehandlung mit PB bzw. TCPOBOP die Rfc1-Gesamtproteinmenge, nicht aber die Transportproteindichte in der HPCT-1E3-Zellmembran, bestimmt wurde (s. 3.6.3). MARCHANT et al. (2002) wiesen nach, dass der humane RFC1 Mikrotubuli-abhängig in der Zelle transportiert wird und innerhalb von 48 h nach Transfektion nahezu vollständig in die Plasmamembran eingebaut wird. Hinsichtlich der Regulation der subzellulären RFC1-Lokalisation liegen bislang jedoch keine Daten vor.

Weiterhin könnte ebenso der Phosphorylierungsstatus von sog. "Ankerproteinen", welche für

die korrekte Membranlokalisation von Transportproteinen wie bspw. dem Na^+/H^+ -Austauscher NHE1 verantwortlich sind (DENKER et al. 2000), eine wichtige Rolle spielen. Die PKC vermittelt die direkte Phosphorylierung und Aktivierung der ERM-Ankerproteinfamilie, welche NHE1 durch Interaktion mit dem Zytoskelettbestandteil F-Aktin in der Plasmamembran stabilisiert (JENSEN u. LARSSON 2004, BAUMGARTNER et al. 2004). Übereinstimmend führt die Vorbehandlung mit dem PKC-Induktor PMA ebenfalls zu einer direkten Induktion der NHE1-Aktivität (MOOLENAAR et al. 1984). Im Hinblick auf die in dieser Arbeit nachgewiesene PKC-vermittelte Reduktion der Rfc1-Aktivität wäre ein entgegengesetzter Regulationsmechanismus denkbar. Dementsprechende Hinweise liegen in der Literatur jedoch bislang nicht vor.

Im Rahmen nachfolgender Untersuchungen ist daher zu klären, ob die in dieser Arbeit beobachtete verminderte Rfc1-vermittelte MTX-Aufnahme in HPCT-1E3-Zellen nach Vorbehandlung mit PB-artigen Induktoren mit einer verstärkten PKC-vermittelte Phosphorylierung und/oder Internalisierung des Rfc1-Transportproteins korreliert.

Die Befunde der vorliegenden Arbeit zeigen erstmalig, dass Cytochrom P450-Induktoren vom PB-Typ unter Beteiligung der Proteinkinase C zu einer Reduktion der Rfc1-vermittelten Aufnahme des Chemotherapeutikums Methotrexat in HPCT-1E3-Zellen führen. Klinische Studien in der Humanmedizin (RELLING et al. 2000, RIVA et al. 2000) liefern darüber hinaus Hinweise, dass die in dem Zellkulturmodell HPCT-1E3 beobachtete indirekte posttranslationale Regulation des Rfc1 entsprechende Regulationsmechanismen in humanen Geweben wie der Leber als auch verschiedenen Tumoren reflektiert. In diesem Zusammenhang ist denkbar, dass eine Arzneimittelinteraktion vom PB-Typ möglicherweise aufgrund der nahezu ubiquitären Expression des Rfc1 eine Veränderung der gesamten MTX-Pharmakokinetik im Organismus zur Folge hat. Ferner bestätigen die Ergebnisse dieser Arbeit die wichtige Bedeutung von Arzneimittelinteraktionen für die hepatobiliäre Disposition und Toxizität von Arzneistoffen (XU et al. 2005).

Die Interaktion des Folatantagonisten mit Antiepileptika, welche zur Gruppe der sog. „Cytochrom P450-Induktoren vom PB-Typ“ gehören (VECHT et al. 2003a), besitzt wichtige klinische Bedeutung, da die Ko-Therapie von Zytostatika wie MTX und Antiepileptika aufgrund des häufigen Auftretens von Krampfanfällen bei Krebspatienten vielfach indiziert ist (VECHT et al. 2003b). Darüber hinaus stellt das Zytostatikum Cyclophosphamid, welches in Kombination mit MTX eingesetzt wird (TESKE 2000, DUDEL et al. 2004), ebenfalls einen Induktor vom PB-Typ dar (CZEKAJ 2000). Arzneimittelinteraktionen, welche im Verlauf

eines entsprechenden polytherapeutischen Regimes auftreten, könnten daher zu der in der Klinik beobachteten verminderten Effizienz einer MTX-Chemotherapie beitragen und hätten eine maßgebliche Verschlechterung der Patientenprognose zur Folge.

Zusammenfassend konnte anhand der Ergebnisse der vorliegenden Rfc1-Regulationsstudien ein Beitrag zur Aufklärung der koordinierten Regulation von Arzneistoffwechselwegen bzw. der Aufklärung von Arzneimittelinteraktionen im Rahmen einer Pharmakotherapie geleistet werden. Die gewonnenen Erkenntnisse könnten nicht nur der Optimierung einer MTX-Chemotherapie bspw. durch den Einsatz von sog. „Antiepileptika der zweiten Generation“ (VECHT et al. 2003b), welche keine Cytochrom P450-Induktoren darstellen, sondern ebenso der Entwicklung neuer Arzneistoffe dienen.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Regulation des Reduced Folate Carrier (Rfc1) in HPCT-1E3-Ratten-Hepatocytoma-Zellen durch Cytochrom P450-Induktoren vom Phenobarbital-Typ

Sandra Halwachs

Institut für Pharmakologie, Pharmazie und Toxikologie der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig, Leipzig, Deutschland

Eingereicht im Februar 2006

Schlüsselworte: Cytochrom P450-Induktoren, HPCT-1E3-Zellen, MTX, Rfc1, Regulation

110 Seiten, 26 Abbildungen, 5 Tabellen, 380 Literaturangaben., 1 Anhang

Arzneimittelinteraktionen gewinnen im Rahmen der heute in der Klinik üblichen polytherapeutischen Regime zunehmend an Bedeutung. So führt bspw. die Interaktion des Chemotherapeutikums Methotrexat (MTX, Amethopterin) mit Antiepileptika, welche zur Gruppe der sog. „Cytochrom P450-Induktoren vom Phenobarbital (PB)-Typ“ gehören, zu einer Reduktion der Chemotherapieeffizienz und damit zur einer maßgeblichen Verschlechterung der Patientenprognose. Das Zytostatikum wird seit vielen Jahren in der Human- sowie in der Veterinärmedizin zur Behandlung neoplastischer und nicht neoplastischer Erkrankungen wie dem malignen Lymphom bzw. der rheumatoiden Arthritis eingesetzt. Im Rahmen einer Hochdosis-MTX-Therapie ist die Ko-Medikation mit Antiepileptika vielfach indiziert, da Krampfanfälle eine häufige Komplikation bei Krebspatienten darstellen.

In niedriger Konzentration wird Methotrexat vornehmlich über den natriumabhängigen Reduced Folate Carrier (Rfc1; Slc19a1) in Leber, Niere und andere Gewebe aufgenommen. Die natriumunabhängige, hepatozelluläre Aufnahme des Zytostatikums wird durch den in der basolateralen Hepatozytenmembran lokalisierten Organischen anionen transporter2 (Oat2, Slc22a8) vermittelt. Die hepato-biliäre MTX-Elimination erfolgt durch Vertreter der Multidrug Resistance-Associated Proteine (MRP, ABCC). Anhand der unter Berücksichtigung der spezifischen Rfc1-Charakteristika gewählten Versuchsbedingungen war es in den vorliegenden Studien jedoch möglich, die Rfc1-Aktivität in HPCT-1E3-Zellen selektiv zu ermitteln. Der hepatozellulär exprimierte Rfc1 der Ratte weist im Promotorbereich Bindungsstellen u.a. für ein durch Induktoren vom PB-Typ regulierbares Element auf. Diese Regulationselemente sind bislang nur bei fremdstoffmetabolisierenden Enzymen, insbesondere der Cytochrom-P450-Familie, bekannt. Klinische sowie *in vitro*-Studien lieferten Hinweise auf eine mögliche Reduktion der Rfc1-vermittelten MTX-Aufnahme bzw. intrazellulären MTX-Akkumulation nach Vorbehandlung mit den Cytochrom P450-Induktoren Phenobarbital (PB) und Carbamazepin (CBZ). Veränderungen in der Pharmakokinetik von Xenobiotika, welche carrier-vermittelt in Zellen transportiert werden, beruhen neben einer direkten Interaktion am Transportprotein vorwiegend auf der Regulation des Carriers auf Ebene der Transkription durch Regulation der Genexpression bspw. über den Kernrezeptor „Constitutive Androstane Receptor (CAR)“ oder auf der schnellen und kurzfristigen Phosphorylierung des Transportproteins im Rahmen einer posttranslationalen Regulation.

Ziel dieser Arbeit war es, die Regulation des Transportproteins Rfc1 durch Induktoren vom PB-Typ und den CAR-Agonisten 1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzen (TCPOBOP) systematisch in dem *in vitro*-Zellkulturmodell HPCT-1E3 auf funktionaler, transkriptioneller und translationaler Ebene zu untersuchen und eine mögliche Beteiligung der postulierten Genregulationselemente bzw. des Kernrezeptors CAR experimentell zu überprüfen. HPCT-1E3-Zellen stellen eine Hybridzelllinie der Ratte dar, welche lebertypische Import- bzw. Effluxtransporter für MTX, einschließlich des Rfc1, exprimiert.

HPCT-1E3-Zellen wurden über 48 bzw. 60 h mit dem CAR-Agonisten TCPOBOP, mit den PB-artigen Induktoren PB, CBZ, Chlorpromazin (CPZ) und Clotrimazol (CTZ) bzw. den jeweiligen Kontrollsubstanzen Diazepam, Haloperidol und Amphotericin B sowie für 2 h mit Modulatoren der Phosphorylierung vorbehandelt. Die gewählte Konzentration der Cytochrom P450-Induktoren und Kontrollen entsprach der des therapeutischen Plasmaspiegels bzw. dem 10fachen, im Falle von CBZ dem 3fachen, dieser Konzentration. Vor Beginn der Transportstudien wurden zytotoxische Effekte der gewählten Substanzen unter Verwendung des WST-1-Proliferationstests ausgeschlossen. Die funktionelle Rfc1-Aktivität wurde als natriumabhängige Akkumulation von fluoreszenzmarkiertem Methotrexat (FMTX) über 30 min und als natrium- und zeitabhängige Aufnahme von ³[H]-MTX über 20 min ermittelt. Die Bestimmung der relativen Rfc1-Genexpression sowie der Rfc1-Proteinmenge erfolgte mittels quantitativer PCR bzw. eines semiquantitativen immunzytochemischen Nachweisverfahrens.

Die Befunde der Transportstudien wiesen zusammenfassend darauf hin, dass 50-70% der ³[H]-MTX-Aufnahme in HPCT-1E3-Zellen Rfc1-vermittelt erfolgt. Die Vorbehandlung mit den jeweiligen PB-artigen Induktoren bzw. 0,1 und 1 ng/ml TCPOBOP führte im Vergleich zu unbehandelten Hepatocytoma-Zellen zu einer stark signifikanten Reduktion der Rfc1-vermittelten, nicht aber der natriumunabhängigen, Aufnahme des Zytostatikums. Dagegen hatte die Inkubation mit den jeweiligen Kontrollsubstanzen Diazepam, Haloperidol und Amphotericin B weder eine verminderte Rfc1-Aktivität noch eine Reduktion der natriumunabhängigen MTX-Aufnahme zur Folge. Nachfolgende mechanistische Untersuchungen ergaben, dass die relative Rfc1-Genexpression nach Vorbehandlung der HPCT-1E3-Zellen mit 100 µg/ml PB bzw. 1 ng/ml TCPOBOP über 12, 24 und 48 h keine signifikante Veränderung aufwies. Weiterhin lag nach Inkubation mit 10 und 100 µg/ml PB, 0,1 und 1 ng/ml TCPOBOP sowie 1,5 und 15 µg/ml Diazepam für 12, 24 und 48 h ebenfalls keine signifikante Abweichung in der Rfc1-Proteinmenge vor. Eine zweistündige Vorbehandlung mit dem Phosphatase 1/2A-Inhibitor Okadainsäure (80,5 ng/ml) und dem Proteinkinase C (PKC)-Induktor PMA (0,62 µg/ml), nicht aber mit dem Proteinkinase A-Induktor cAMP (5,1 µg/ml), führte zu einer signifikanten Abnahme der Rfc1-Aktivität in HPCT-1E3-Zellen. Dagegen wies die natriumunabhängige Aufnahme des Chemotherapeutikums im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle keine signifikanten Veränderungen auf. Die durch PB, TCPOBOP und PMA bedingte Reduktion der Rfc1-vermittelten MTX-Aufnahme wurde durch nachfolgende Inkubation der Hepatocytoma-Zellen mit dem spezifischen PKC-Inhibitor Bisindolylmaleimid (BIM; 21 ng/ml) nahezu vollständig aufgehoben.

Zusammenfassend konnte anhand der vorliegenden Arbeit erstmalig nachgewiesen werden, dass Cytochrom P450-Induktoren vom PB-Typ unter Beteiligung der PKC auf posttranskriptionellem Weg zu einer Reduktion der Rfc1-vermittelten Aufnahme des Chemotherapeutikums Methotrexat in HPCT-1E3-Zellen führen. Die gewonnenen Erkenntnisse liefern einen Beitrag zum Verständnis der koordinierten Regulation von Arzneistoffwechselwegen bzw. zur Aufklärung von Arzneimittelinteraktionen im Rahmen einer Pharmakotherapie. Dies könnte sowohl der Optimierung einer Ko-Therapie mit Zytostatika wie MTX und PB-artigen Induktoren im Rahmen einer MTX-Chemotherapie als auch der Entwicklung neuer Arzneistoffe dienen.

7 SUMMARY

Regulation of the reduced folate carrier (Rfc1) in the rat hepatocytoma fusion cell line HPCT-1E3 by phenobarbital-type cytochrome P450 inducers

Sandra Halwachs

Institute of Pharmacology, Pharmacy und Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig, Leipzig, Germany

Submitted in February 2006

Keywords: cytochrome P450 inducers, HPCT-1E3 cells, MTX, Rfc1, regulation

110 pages, 26 figures, 5 tables, 380 references, 1 appendix

With an increasing percentage of polytherapeutic clinical regimes, drug-drug interactions are gaining significance. The interaction between the chemotherapeutic drug methotrexate (MTX, Amethopterin) and phenobarbital-type cytochrome P450 inducing antiepileptic drugs has been shown to reduce the efficacy of cancer chemotherapy and, accordingly, cause a significantly aggravated prognosis. In human and veterinary medicine the antifolate MTX is widely used for the treatment of malignancies, e.g. ALL or lymphomas, and rheumatoid arthritis. Seizures are a common complication in cancer patients that require ongoing treatment with antiepileptic drugs.

The sodium dependent reduced folate carrier (Rfc1; Slc19a1) provides the major route for cellular uptake of MTX into liver, kidneys, and other tissues. In rat hepatocytes the 5' untranslated region of this carrier exhibits, amongst other regulatory elements, a barbiturate recognition box. Until now, these regulatory elements have only been found in the promotor region of xenobiotic metabolizing enzymes, particularly those of the CYP450 enzyme family. In this context it is interesting that treatment with the phenobarbital-type cytochrome P450 inducers phenobarbital (PB) and carbamazepine (CBZ) may cause a significant reduction in Rfc1 mediated uptake and intracellular accumulation of MTX, respectively. In addition to direct competition, alterations in the pharmacokinetic properties of xenobiotics whose cellular transport is mediated by membrane proteins can be due to regulatory mechanisms on the level of gene expression, e.g. via the nuclear receptor "Constitutive Androstane Receptor (CAR)", or through a quick and short posttranslational phosphorylation of the carrier protein.

Therefore, the aim of this study was to systematically examine the regulation of Rfc1 by phenobarbital-type cytochrome P450 inducers and the CAR agonist ligand 1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene (TCPOBOP) on the functional, transcriptional, and translational level in the rat hepatocytoma fusion cell line HPCT-1E3. Furthermore, the involvement of the postulated regulatory elements and the nuclear receptor CAR should be elucidated. The HPCT-1E3 hybrid cell line provides a suitable model for these studies as it shows the endogenous expression of liver-specific carrier proteins for organic anions, including the Rfc1.

HPCT-1E3 cells were incubated with the CAR agonist ligand TCPOBOP, the phenobarbital-type cytochrome P450 inducers PB, CBZ, chlorpromazine (CPZ) or clotrimazole (CTZ) and the respective control substances diazepam, haloperidol as well as amphotericin B over 48 and 60 h, respectively. All modulators of phosphorylation were added to the culture medium for only 2 h. Selected concentrations of the respective PB-type CYP450 inducers and control substances comply with the therapeutic plasma level in humans and the decuple, in case of CBZ the triple, of this concentration. Cytotoxicity was tested using the WST-1 proliferation test before initiation of the transport studies. Rfc1 activity in HPCT-1E3 cells was measured as the sodium-dependent accumulation of fluoresceinated methotrexate (FMTX) over 30 min and the sodium- and time-dependent uptake of $^3\text{[H]-MTX}$ over 20 min. Relative Rfc1 gene expression as well as the Rfc1 protein level was investigated by quantitative PCR and semiquantitative immunocytochemistry, respectively.

In HPCT-1E3 hepatocytoma cells, approximately 50-70% of the $^3\text{[H]-MTX}$ uptake was mediated by Rfc1. Treatment of the cultures with the respective phenobarbital-type cytochrome P450 inducers or 0.1 and 1 ng/ml TCPOBOP was related to a significant reduction of the Rfc1 mediated MTX uptake, whereas the sodium-independent accumulation of the drug was not influenced. Incubation of HPCT-1E3 cells with the respective control substances diazepam, haloperidol and amphotericin B did not result in changes in Rfc1 mediated and sodium-independent MTX accumulation.

Studies on the regulatory mechanism revealed that relative Rfc1 gene expression was not significantly reduced after treatment of cells with 100 $\mu\text{g/ml}$ PB and 1 ng/ml TCPOBOP over 12, 24 and 48 h. In addition, there was no significant alteration in the Rfc1 protein amount after incubation of HPCT-1E3 cells with 10 and 100 $\mu\text{g/ml}$ PB, 0.1 and 1 ng/ml TCPOBOP as well as 1.5 $\mu\text{g/ml}$ diazepam for 12, 24 and 48 h.

However, short-term (2 h) treatment of hepatocytoma cells with the phosphatase 1/2A inhibitor okadaic acid (80.5 ng/ml) as well as the protein kinase C (PKC) inducer PMA (0.62 $\mu\text{g/ml}$) caused a significant reduction of the Rfc1 mediated MTX uptake. As for PB-type CYP450 inducers, this treatment did not lead to a significant alteration in the sodium-independent MTX accumulation. Incubation of cells with the protein kinase A inducer cAMP (5.1 $\mu\text{g/ml}$) was not related to a decrease in Rfc1 mediated and sodium-independent MTX uptake in HPCT-1E3 cells. Finally, the reduction in Rfc1 uptake activity caused by PB, TCPOBOP or PMA was almost completely reversed by simultaneous treatment of cells (2 h) with the specific PKC inhibitor bisindolylmaleimide (BIM; 21 ng/ml).

This study documented for the first time, that phenobarbital-type cytochrome P450 inducers cause a significant PKC-dependent reduction in the Rfc1 mediated uptake of the chemotherapeutic drug methotrexate in HPCT-1E3 hepatocytoma cells.

The results obtained can contribute to the understanding of the coordinated regulation of drug metabolism and transport pathways and the clarification of drug interactions within a pharmacotherapy. Careful consideration of these findings may help to improve the combined therapy of cancer patients with MTX and PB-type CYP450 inducers and in the development of new drugs.

8 LITERATURVERZEICHNIS

1. Abe T, Kakyo M, Sagakami H, Tokui T, Nishio T, Tanemoto M, et al. Molecular characterization and tissue distribution of a new organic anion transporter subtype (oatp3) that transports thyroid hormones and taurocholate and comparison with oatp2. *J Biol Chem.* 1998; 273:22395-401.
2. Abe T, Kakyo M, Tokui T, Nakagomi R, Nishio T, Nakai D, et al. Identification of a novel gene family encoding human liver-specific organic anion transporter LST-1. *J Biol Chem.* 1999; 274:17159-63.
3. Abe T, Unno M, Onogawa T, Tokui T, Kondo TN, Nakagomi R, et al. LST-2, a human liver-specific organic anion transporter, determines methotrexate sensitivity in gastrointestinal cancers. *Gastroenterology.* 2001; 120:1689-99.
4. Ahmad S, Glazer RI. Expression of the antisense cDNA for protein kinase C alpha attenuates resistance in doxorubicin-resistant MCF-7 breast carcinoma cells. *Mol Pharmacol.* 1993; 43:858-62.
5. Assaraf YG, Schimke RT. Identification of methotrexate transport deficiency in mammalian cells using fluoresceinated methotrexate and flow cytometry. *Proc Natl Acad Sci.* 1987; 84:7154-8.
6. Assem M, Schuetz EG, Leggas M, Sun D, Yasuda K, Reid G, et al. Interactions between hepatic Mrp4 and Sult2a as revealed by the constitutive androstane receptor and Mrp4 knockout mice. *J Biol Chem.* 2004; 279:22250-7.
7. Auerbach SS, Ramsden R, Stoner MA, Verlinde C, Hasset, Omiecinski CJ. Alternatively spliced isoforms of the human constitutive androstane receptor. *Nucleic Acids Res.* 2003; 31:3194-207.
8. Auerbach SS, Stoner MA, Su S, Omiecinski CJ. RXR-dependent transactivation by a naturally occurring structural variant of human CAR (NR1I3). *Mol Pharmacol.* 2005; 68:1239-53.
9. Bae Y, Kemper JK, Kemper B. Repression of CAR-mediated transactivation of CYP2B genes by the orphan nuclear receptor, short heterodimer partner (SHP). *DNA Cell Biol.* 2004; 23:81-91.
10. Bahn A, Pravitt D, Buttler D, Reid G, Enklaar T, Wolff NA, et al. Genomic structure and in vivo expression of the human organic anion transporter 1 (hOAT1) gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 275:623-30.
11. Baker DK, Relling MV, Pui CH, Christensen ML, Evans WE, Rodman JH. Increased teniposide clearance with concomitant anticonvulsant therapy. *J Clin Oncol.* 1992; 10:311-5.
12. Banerjee D, Mayer-Kuckuk P, Capiiaux G, Budak-Alpdogan T, Gorlick R, Bertino R. Novel aspects of resistance to drugs targeted to dihydrofolate reductase and thymidylate synthase. *Biochim Biophys Acta.* 2002; 1587:164-73.

13. Barrredo JC, Synold TW, Laver J, Relling MV, Pui CH, Priest DG, et al. Differences in constitutive and post-methotrexate folylpolyglutamate synthetase activity in B-lineage and T-lineage leukemia. *Blood*. 1994; 84:564-9.
14. Basta-Kaim A, Budziszewska B, Jaworska-Feil L, Tetich M, Leskiewicz M, Kubera M, et al. Chlorpromazine inhibits the glucocorticoid receptor-mediated gene transcription in a calcium-dependent manner. *Neuropharmacology*. 2002; 43:1035-43.
15. Baumgartner M, Patel H, Barber DL. Na⁺/H⁺ exchanger NHE1 as plasma membrane scaffold in the assembly of signaling complexes. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004; 287:844-50.
16. Beck J, Handgretinger R, Klingebiel T, Dopfer R, Schaich M, Ehninger G, et al. Expression of PKC isozyme and MDR-associated genes in primary and relapsed state AML. *Leukemia*. 1996; 10:426-33.
17. Bekersky I, Fielding RM, Dressler DE, Lee JW, Buell DN, Walsh TJ. Pharmacokinetics, excretion, and mass balance of liposomal amphotericin B (AmBisome) and amphotericin B deoxycholate in humans. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002; 46:828-33.
18. Belinsky MG, Kruh GD. MOAT-E (ARA) is a full-length MRP/cMOAT subfamily transporter expressed in kidney and liver. *Br J Cancer*. 1999; 80:1342-9.
19. Benedetti A, Strazzabosco M, Ng OC, Boyer JL. Regulation of activity and apical targeting of the Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger in rat hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci*. 1994; 91:792-6.
20. Berger MR, Oswald H, Schmähl D, Zeller WJ. Krebschemotherapie unter besonderer Berücksichtigung präklinischer Grundlagen. In: Kümmerle HP, Hitzenberger G, Spitzky KH, editors. *Klinische Pharmakologie*. Landsberg: Ecomed; 1996. p. 1-50.
21. Bertino JR. Methotrexate: clinical pharmacology and therapeutic application. In: Crooke ST, Prestayko AW, editors. *Cancer and Chemotherapy*. New York: Academic Press; 1981. p. 359-75.
22. Bertz RJ, Granneman GR. Use of in vitro and in vivo data to estimate the likelihood of metabolic pharmacokinetic interactions. *Clin Pharmacokinet*. 1997; 32:210-58.
23. Binnie CD, van Emde Boas W, Kasteleijn-Nolste-Trenite DG, de Korte RA, Meijer JW, Meinardi H, et al. Acute effects of lamotrigine (BW430C) in persons with epilepsy. *Epilepsia*. 1986; 27:248-54.
24. Biel M, Wascholowski V, Giannis A. Eine verhängnisvolle Affäre: die Ubiquitynylierung von Proteinen. *Angew Chem*. 2004; 116:6574-6.
25. Blumrich M, Zeyen-Blumrich U, Pagels P, Petzinger E. Immortalization of rat hepatocytes by fusion with hepatoma cells. II. Studies on the transport and synthesis of bile acids in hepatocytoma (HPCT) cells. *Eur J Cell Biol*. 1994; 64:339-47.
26. Borst P, Evers R, Kool M, Wijnholds J. A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst*. 2000; 92:1295-302.

27. Bortnowski HB, Rosenthal RC. Preclinical evaluation of L-asparaginase and methotrexate administered at intermediate doses in dogs. *Am J Vet Res.* 1991; 52:1636-8.
28. Boyer JL, Soroka CJ. Vesicle Targeting to the apical domain regulates bile excretory function in isolated rat hepatocytes couplets. *Gastroenterology.* 1995; 109:1600-11.
29. Breen CM, Sykes DB, Baehr C, Fricker G, Miller DS. Fluorescein-methotrexate transport in rat choroid plexus analyzed using confocal microscopy. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2004; 287:562-9.
30. Bronson RT. Variation in age at death of dogs of different sexes and breeds. *Am J Vet Res.* 1982; 43; 2057-9.
31. Brown NO, Calvert C, MacEwen EG. Chemotherapeutic management of transmissible venereal tumors in 30 dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 1980; 176:983-6.
32. Brzezinska A, Winska P, Balinska M. Cellular aspects of folate and antifolate membrane transport. *Acta Biochim Pol.* 2000; 47:735-49.
33. Cai S, Horne DW. Transport of 5-formyltetrahydrofolate into primary cultured rat astrocytes. *Arch Biochem Biophys.* 2003; 410:161-6.
34. Carlile DJ, Zomorodi K, Houston JB. Scaling factors to relate drug metabolic clearance in hepatic microsomes, isolated hepatocytes, and the intact liver: studies with induced livers involving diazepam. *Drug Metab Dispos.* 1997; 25:903-11.
35. Cattori V, van Montfoort JE, Stieger B, Landmann L, Meijer DK, Winterhalter KH, et al. Localization of organic anion transporting polypeptide 4 (Oatp4) in rat liver and comparison of its substrate specificity with Oatp1, Oatp2 and Oatp3. *Pflügers Arch Eur J Physiol.* 2001; 443:188-95.
36. Chabner BA, Allegra CJ, Curt GA, Clendeninn NJ, Baram J, Koizumi S, et al. Polyglutamation of methotrexate. Is methotrexate a prodrug? *J Clin Invest.* 1985; 76:907-12.
37. Chan FP, Williams FM, Rogers KA, Flintoff WF. Chromosomal localization of the reduced folate transporter gene (SLC19A1) in Chinese hamster ovary cells. *Cytogenet Cell Genet.* 1995; 71:148-50.
38. Chan LM, Lowes S, Hirst BH. The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability. *Eur J Pharm Sci.* 2004; 21:25-51.
39. Chang TK, Yu L, Maurel P, Waxman DJ. Enhanced cyclophosphamide and ifosfamide activation in primary human hepatocyte cultures: response to cytochrome P-450 inducers and autoinduction by oxazaphosphorines. *Cancer Res.* 1997; 57:1946-54.
40. Chauvin C, Brilloit-Petit C, Argaud D, Catelloni F, Velours J, Leverve XM. The inhibition of phosphoenolpyruvate carboxykinase following in vivo chronic phenobarbital treatment in the rat is due to a post-translational event. *Eur J Biochem.* 1996; 238:207-13.
41. Chen ZS, Lee K, Walther S, Raftogianis RB, Kuwano M, Zeng H, et al. Analysis of methotrexate and folate transport by multidrug resistance protein 4 (ABCC4): MRP4 is a component of the methotrexate efflux system. *Cancer Res.* 2002; 62:3144-50.

42. Chen C, Klaassen CD. Rat multidrug resistance protein 4 (Mrp4, Abcc4): molecular cloning, organ distribution, postnatal renal expression, and chemical inducibility. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; 317:46-53.
43. Cheng X, Maher JM, Dieter MZ, Klaassen CD. Regulation of mouse organic anion transporting polypeptides (Oatps) in liver by prototypical microsome enzyme inducers that activate distinct transcription factor pathways. *Drug Metab Dispos.* 2005; 33:1276-82.
44. Cherrington NJ, Hartley DP, Li N, Johnson DR, Klaassen CD. Organ distribution of multidrug resistance proteins 1, 2, and 3 (Mrp1, 2, and 3) mRNA and hepatic induction of Mrp3 by constitutive androstane receptor activators in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002; 300:97-104.
45. Cherrington NJ, Slitt AL, Maher JM, Zhang XX, Zhang J, Huang W, et al. Induction of multidrug resistance protein 3 (mrp3) in vivo is independent of constitutive androstane receptor. *Drug Metab Dispos.* 2003; 31:1315-9.
46. Chijiwa T, Mishima A, Hagiwara M, Sano M, Hayashi K, Inoue T, et al. Inhibition of forskolin-induced neurite outgrowth and protein phosphorylation by a newly synthesized selective inhibitor of cyclic AMP dependent protein kinase, N-[2-(p-bromocinnamylamino) ethyl]- 5-isoquinoline sulfonamide (H-89), of PC12D pheochromocytoma cells. *J Biol Chem.* 1990; 65:5267-72.
47. Choi HS, Chung M, Tzamei I, Simha D, Lee YK, Seol W, et al. Differential transactivation by two isoforms of the orphan nuclear hormone receptor CAR. *J Biol Chem.* 1997; 272:23565-71.
48. Code EL, Crespi CL, Penman BW, Gonzales FJ, Chang TK, Waxman DJ. Human cytochrome P4502B6: interindividual hepatic expression, substrate specificity, and role in procarcinogen activation. *Drug Metab Dispos.* 1997; 25:985-93.
49. Cohen P, Holmes CF, Tsukitani Y. Okadaic acid: a new probe for the study of cellular regulation. *Trends Biochem Sci.* 1990; 15:98-102.
50. Conney AH. Pharmacological implications of microsomal enzyme induction. *Pharmacol Rev.* 1967; 19:317-66.
51. Conolly RB, Lutz WK. Nonmonotonic dose-response relationships: mechanistic basis, kinetic modeling, and implications for risk assessment. *Toxicol Sci.* 2004; 77:151-7.
52. Conradt M, Stoffel W. Inhibition of the high-affinity brain glutamate transporter GLAST-1 via direct phosphorylation. *J Neurochem.* 1997; 68:1244-51.
53. Corey JL, Davidson N, Lester HA, Brecha N, Quick MW. Protein kinase C modulates the activity of a cloned gamma-aminobutyric acid transporter expressed in *Xenopus* oocytes via regulated subcellular redistribution of the transporter. *J Biol Chem.* 1994; 269:14759-67.
54. Costet P, Luo Y, Wang N, Tall AR. Sterol-dependent transactivation of the ABC1 promoter by the liver X receptor/retinoid X receptor. *J Biol Chem.* 2000; 275:28240-5.
55. Cotter SM, Parker LM. High-dose methotrexate and leucovorin rescue in dogs with osteogenic sarcoma. *Am J Vet Res.* 1978; 39:1943-5.

56. Court MH, Duan SX, Hesse LM, Venkatakrisnan K, Greenblatt DJ. Cytochrome P-450 2B6 is responsible for interindividual variability of propofol hydroxylation by human liver microsomes. *Anesthesiology*. 2001; 94:110-9.
57. Courtois A, Payen L, Le Ferrec E, Scheffer GL, Trinquart Y, Guillouzo A, et al. Differential regulation of multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) and cytochromes P450 2B1/2 and 3A1/2 in phenobarbital-treated hepatocytes. *Biochem Pharmacol*. 2002; 63:333-41.
58. Croquet F, Brehier A, Gil S, Davy J, Feger J. Five isoenzymes of protein kinase C are expressed in normal and STZ-diabetic rat hepatocytes: effect of phorbol 12-myristate 13-acetate. *Biochim Biophys Acta*. 1996; 1315:163-8.
59. Czekaj P. Phenobarbital- induced expression of cytochrome P450 genes. *Acta Biochem Pol*. 2000; 47:1093-1105.
60. Davis PD, Elliott LH, Harris W, Hill CH, Hurst SA, Keech E, et al. Inhibitors of protein kinase C. 2. Substituted bisindolylmaleimides with improved potency and selectivity. *J Med Chem*. 1992; 35:994-1001.
61. Darbes J, Majzoub M, Hermanns W. Maligne Lymphome bei Hund und Katze: Organverteilung, Morphologie und Linienzugehörigkeit. *Tierärztl Prax*. 1999; 27:22-8.
62. Denison MS, Whitlock JP Jr. Xenobiotic-inducible transcription of cytochrome P450 genes. *J Biol Chem*. 1995; 270:18175-8.
63. De Marco P, Calevo MG, Moroni A, Merello E, Raso A, Finnell RH, et al. Reduced folate carrier polymorphism (80A-->G) and neural tube defects. *Eur J Hum Genet*. 2003; 11:245-52.
64. Denker SP, Huang DC, Orłowski J, Furthmayr H, Barber DL. Direct binding of the Na-H exchanger NHE1 to ERM proteins regulates the cortical cytoskeleton and cell shape independently of H⁺ translocation. *Mol Cell*. 2000; 6:1425-36.
65. Denson LA, Sturm E, Echevarria W, Zimmerman TL, Makishima M, Mangelsdorf DJ, et al. The orphan nuclear receptor, shp, mediates bile acid-induced inhibition of the rat bile acid transporter, ntcp. *Gastroenterology*. 2001; 121:140-7.
66. Dever TE. Gene-specific regulation by general translation factors. *Cell*. 2002; 108:545-56.
67. Dewald B, Thelen M, Wymann MP, Baggiolini M. Staurosporine inhibits the respiratory burst and induces exocytosis in human neutrophils. *Biochem J*. 1989; 264:879-84.
68. Dixon KH, Lampher BC, Chiu J, Kelley K, Cowan KH. A novel cDNA restores reduced folate carrier activity and methotrexate sensitivity to transport deficient cells. *J Biol Chem*. 1994; 269:17-20.
69. Donehower RC, Hande KR, Drake JC. Presence of 2,4-diamino-N¹⁰-methylpterotic acid after high-dose methotrexate. *Clin Pharmacol Ther*. 1979; 26:63-72.
70. Dorn CR. Epidemiology of canine and feline tumors. *Compend Contin Educ Pract Vet*. 1976; 12:307-12.

71. Dudel C, Fischer N, Hiller E. Primäres Lymphom des Zentralnervensystems. In: Tumorzentrum München, editor. *Maligne Lymphome: Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge*. München: Tumorzentrum München und Zuckschwerdt Verlag München; 2004. p. 169-74.
72. Dwivedi Y, Pandey GN. Effects of treatment with haloperidol, chlorpromazine, and clozapine on protein kinase C (PKC) and phosphoinositide-specific phospholipase C (PI-PLC) activity and on mRNA and protein expression of PKC and PLC isozymes in rat brain. *J Pharmacol Exp Ther*. 1999; 291:688-704.
73. Endicott JA, Ling V. The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Annu Rev Biochem*. 1989; 58:137-71.
74. Erickson DA, Mather G, Trager WF, Levy RH, Keirns JJ. Characterization of the in vitro biotransformation of the HIV-1 reverse transcriptase inhibitor nevirapine by human hepatic cytochromes P-450. *Drug Metab Dispos*. 1999; 27:1488-1495.
75. Ertl RP, Winston GW. The microsomal mixed function oxidase system of amphibians and reptiles: components, activities and induction. *Comp Biochem Physiol, C Pharmacol Toxicol Endocrinol*. 1998; 121:85-105.
76. Fabre I, Fabre G, Goldman ID. Polyglutamation, an important element in methotrexate cytotoxicity and selectivity in tumor versus murine granulocytic progenitor cells in vitro. *Cancer Res*. 1984; 44:3190-5.
77. Faucette SR, Wang H, Hamilton GA, Jolley SL, Gilbert D, Lindley C, et al. Regulation of CYP2B6 in primary human hepatocytes by prototypical inducers. *Drug Metab Dispos*. 2004; 32:348-58.
78. Ferguson PL, Flintoff WF. Topological and functional analysis of the human reduced folate carrier by hemagglutinin epitope insertion. *J Biol Chem*. 1999; 274:16269-78.
79. Fitzgerald ML, Moore KJ, Freeman MW. Nuclear hormone receptors and cholesterol trafficking: the orphans find a new home. *J Mol Med*. 2002; 80:271-81.
80. Flintoff WF, Sadlish H, Gorlick R, Yang R, Williams FM. Functional analysis of altered reduced folate carrier sequence changes identified in osteosarcomas. *Biochim Biophys Acta*. 2004; 1690:110-7.
81. Föllmann W, Immenschuh S, Gerbracht E, Eigenbrodt E, Katz N, Petzinger E. Morphology and enzymatic pattern of rat hepatocytoma cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1989b; 340:R71.
82. Föllmann W, Kinne RK, Petzinger E. Alterations of bile acid and bumetanide uptake during culturing of rat hepatocytes. *Am J Physiol*. 1990; 258:700-12.
83. Föllmann W, Schmuck R, Utesch D, Garth I, Eigenbrodt E, Kinne RKH, et al. Immortalized hepatocytes as a model for the study of liver functions in vitro. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1989a; 339:R13.
84. Forman BM, Tzamelis I, Choi HS, Chen J, Simha D, Seol W, et al. Androstane metabolites bind to and deactivate the nuclear receptor CAR-beta. *Nature*. 1998; 395:612-5.

85. Frank C, Makkonen H, Dunlop TW, Matilainen M, Vaisanen S, Carlberg C. Identification of pregnane X receptor binding sites in the regulatory regions of genes involved in bile acid homeostasis. *J Mol Biol.* 2005; 346:505-19.
86. Fraser DJ, Zumsteg A, Meyer UA. Nuclear receptors constitutive androstane receptor and pregnane X receptor activate a drug-responsive enhancer of the murine 5-aminolevulinic acid synthase gene. *J Biol Chem.* 2003; 278:39392-401.
87. Freisheim JH, Price EM, Ratman M. Folate coenzyme and antifolate transport proteins in normal and neoplastic cells. *Adv Enzyme Regul.* 1989; 29:13-26.
88. Fujii-Kuriyama Y, Mizukami Y, Kawajiri K, Sogawa K, Muramatsu M. Primary structure of a cytochrome P-450: coding nucleotide sequence of phenobarbital-inducible cytochrome P-450 cDNA from rat liver. *Proc Natl Acad Sci.* 1982; 79:2793-7.
89. Fulco AJ. P450BM-3 and other inducible bacterial P450 cytochromes: biochemistry and regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1991; 31:177-203.
90. Galivan J, Yao R, Rhee M, Schneider E, Ryan T. Glutamyl hydrolase. In: Pfeleider W, Rokos H, editors. *Chemistry and Biology of Pteridines and Folates.* Berlin: Blackwell Science; 1997. p. 439-442.
91. Ganapathy V, Smith SB, Prasad PD. SLC19: the folate/thiamine transporter family. *Pflügers Arch Eur J Physiol.* 2004; 447:641-6.
92. Ganem LG, Trottier E, Anderson A, Jefcoate CR. Phenobarbital induction of CYP2B1/2 in primary hepatocytes: endocrine regulation and evidence for a single pathway for multiple inducers. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1999; 155:32-42.
93. Ganeshaguru K, Wickremasinghe RG, Jones DT, Gordon M, Hart SM, Virchis AF, et al. Actions of the selective protein kinase C inhibitor PKC412 on B-chronic lymphocytic leukemia cells in vitro. *Haematologica.* 2002; 87:167-76.
94. Gautam A, Ng OC, Boyer JL. Isolated rat hepatocyte couplets in short-term culture: structural characteristics and plasma membrane reorganization. *Hepatology.* 1987; 7:216-23.
95. Geick A, Eichelbaum M, Burk O. Nuclear receptor response elements mediate induction of intestinal MDR1 by rifampin. *J Biol Chem.* 2001; 276:14581-7.
96. Geng J, Strobel HW. Expression, induction and regulation of the cytochrome P450 monooxygenase system in the rat glioma C6 cell line. *Brain Res.* 1998; 784:276-83.
97. Gervot L, Rochat B, Gautier JC, Bohnenstengel F, Kroemer H, deBerardinis V, et al. Human CYP2B6: expression, inducibility and catalytic activities. *Pharmacogenetics.* 1999; 9:295– 306.
98. Gewirtz DA, White JC, Randolph JK, Goldman ID. Transport, binding, and polyglutamation of methotrexate in freshly isolated rat hepatocytes. *Cancer Res.* 1980; 40:573-8.
99. Giessmann T, May K, Modess C, Wegner D, Hecker U, Zschiesche M, et al. Carbamazepine regulates intestinal P-glycoprotein and multidrug resistance protein MRP2 and influences disposition of talinolol in humans. *Clin Pharmacol Ther.* 2004; 76:192-200.

100. Gill PK, Gescher A, Gant TW. Regulation of MDR1 promoter activity in human breast carcinoma cells by protein kinase C isozymes alpha and theta. *Eur J Biochem.* 2001; 268:4151-7.
101. Goker E, Lin JT, Trippett T, Elisseyeff Y, Tong WP, Niedzwiecki D, et al. Decreased polyglutamylation of methotrexate in acute lymphoblastic leukemia blasts in adults compared to children with this disease. *Leukemia.* 1993; 7:1000-4.
102. Goker E, Waltham M, Kheradpour A, Trippett T, Mazumdar M, Elisseyeff Y, et al. Amplification of the dihydrofolate reductase gene is a mechanism of acquired resistance to methotrexate in patients with acute lymphoblastic leukemia and is correlated with p53 gene mutations. *Blood.* 1995; 86:677-84.
103. Goldman ID, Lichtenstein NS, Oliverio VT. Carrier-mediated transport of the folic acid analogue, methotrexate, in the L1210 leukemia cell. *J Biol Chem.* 1968; 243:5007-17.
104. Goldman ID, Matherly LH. The cellular pharmacology of methotrexate. In: Goldman ID, editor. *Membrane Transport of Antineoplastic Agents. International Encyclopedia of Pharmacology and Therapeutics.* Oxford, UK: Pergamon; 1986. p. 283-308.
105. Gonzalez FJ. The molecular biology of cytochrome P-450 system. *Pharmacol Rev.* 1989; 40:243-88.
106. Gonzalez FJ, Nebert DW. Evolution of the P450 gene superfamily: animal-plant 'warfare', molecular drive and human genetic differences in drug oxidation. *Trends Genet.* 1990; 6:182-6.
107. Goodwin B, Jones SA, Price RR, Watson MA, McKee DD, Moore LB, et al. A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LRH-1 represses bile acid biosynthesis. *Mol Cell* 2000; 6:517-26.
108. Goodwin B, Hodgson E, D`Costa DJ, Robertson GR, Liddle C. Transcriptional regulation of the human CYP3A4 gene by the constitutive androstane receptor. *Mol Pharmacol.* 2002; 62:359-65.
109. Gordge PC, Ryves WJ. Inhibitors of protein kinase C. *Cell Signal.* 1994; 6:871-82.
110. Gorlick R, Trippett T, Steinherz P, Elisseyeff Y, Mazumdar M, Flintoff WF, et al. Defective transport is a common mechanism of acquired methotrexate resistance in acute lymphocytic leukemia and is associated with decreased reduced folate carrier expression. *Blood.* 1997; 89:1013-8.
111. Gotoh Y, Suzuki H, Kinoshita S, Hirohashi T, Kato Y, Sugiyama Y. Involvement of an organic anion transporter (canalicular multispecific organic anion transporter/multidrug resistance-associated protein 2) in gastrointestinal secretion of glutathione conjugates in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000; 292:433-9.
112. Graf J, Gautam A, Boyer JL. Isolated rat hepatocyte couplets: a primary secretory unit for electrophysiologic studies of bile secretory function. *Proc Natl Acad Sci.* 1984; 81:6516-20.
113. Gray CH, Borges-Walmsley IM, Evans GJ, Walmsley AR. The *pfr1* gene from the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* encodes a half-ABC transporter that is transcribed in response to treatment with fluconazole. *Yeast.* 2003; 20:865-80.

114. Gregus Z, Klaassen CD. Mechanisms of toxicity. In: Klaassen CD, editor. Casarett & Doull's Toxicology. The basic science of poisons. New York: McGraw-Hill; 1996. p. 35-74.
115. Gromnica-Ihle E. Pharmacotherapy of rheumatoid arthritis. *Z Rheumatol.* 2002; 61:35-8.
116. Grune S, Engelking LR, Anwer MS. Role of intracellular calcium and protein kinases in the activation of hepatic Na⁺/taurocholate cotransport by cyclic AMP. *J Biol Chem.* 1993; 268:17734-41.
117. Guillouzo A, Morel F, Ratanasavanh D, Chesne C, Guguen-Guillouzo C. Long-term culture of functional hepatocytes. *Toxicol In Vitro.* 1990; 4:415-27.
118. Guo GL, Choudhuri S, Klaassen CD. Induction profile of rat organic anion transporting polypeptide 2 (oatp2) by prototypical drug-metabolizing enzyme inducers that activate gene expression through ligand-activated transcription factor pathways. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002a; 300:206-12.
119. Guo GL, Klaassen CD. Protein kinase C suppresses rat organic anion transporting polypeptide 1- and 2-mediated uptake. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001; 299:551-7.
120. Guo GL, Staudinger J, Ogura K, Klaassen CD. Induction of rat organic anion transporting polypeptide 2 by pregnenolone-16alpha-carbonitrile is via interaction with pregnane X receptor. *Mol Pharmacol.* 2002b; 61:832-9.
121. Guo W, Healy JH, Meyers PA, Ladanyi M, Huvos AG, Bertino JR, et al. Mechanisms of methotrexate resistance in osteosarcoma. *Clin Cancer Res.* 1999; 5:621-7.
122. Hagenbuch B, Meier PJ. Organic anion transporting polypeptides of the OATP/ SLC21 family: phylogenetic classification as OATP/ SLCO superfamily, new nomenclature and molecular/functional properties. *Pflügers Arch Eur J Physiol.* 2004; 447:653-65.
123. Halpin PA, Renfro JL. Renal organic anion secretion: evidence for dopaminergic and adrenergic regulation. *Am J Physiol.* 1996; 271:1372-9.
124. Halwachs S, Kneuer C, Honscha W. Endogenous expression of liver-specific drug transporters for organic anions in the rat hepatocytoma fusion cell line HPCT-1E3. *Eur J Cell Biol.* 2005; 84:677-86.
125. Hardwick JP, Gonzalez FJ, Kasper CB. Transcriptional regulation of rat liver epoxide hydratase, NADPH-Cytochrome P-450 oxidoreductase, and cytochrome P-450b genes by phenobarbital. *J Biol Chem.* 1983; 258:8081-5.
126. Hayes G, Busch AE, Lang F, Biber J, Murer H. Protein kinase C consensus sites and the regulation of renal Na/Pi-cotransport (NaPi-2) expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *Pflügers Arch Eur J Physiol.* 1995; 430:819-24.
127. He JS, Fulco AJ. A barbiturate-regulated protein binding to a common sequence in the cytochrome P450 genes of rodents and bacteria. *J Biol Chem.* 1991; 266:7864-9.
128. Hediger MA, Romero MF, Peng JB, Rolfs A, Takanaga H, Bruford EA. The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteins. Introduction. *Pflügers Arch Eur J Physiol.* 2004; 447:465-8.

129. Heidel F, Solem FK, Breutenbuecher F, Lipka DB, Kasper S, Thiede HM, et al. Clinical resistance to the kinase inhibitor PKC412 in acute myeloid leukemia (AML) by mutation of Asn-676 in the FLT3 tyrosine kinase domain. *Blood*. 2006; 107:293-300.
130. Heinemann V, Stemmler J, Schalhorn A. Begleitmaßnahmen bei zytostatischer Therapie. In: Heinemann V, editor. Supportive Maßnahmen und symptomorientierte Therapie in der Hämatologie und Onkologie. München: Tumorzentrum München; 2001. p. 90-9.
131. Henderson GB, Russel A, Whiteley JM. A fluorescent derivative of methotrexate as an intracellular marker for dihydrofolate reductase in L1210 cells. *Arch Biochem Biophys*. 1980; 202:29-34.
132. Hernaez ML, Gil C, Pla J, Nombela C. Induced expression of the *Candida albicans* multidrug resistance gene CDR1 in response to fluconazole and other antifungals. *Yeast*. 1998; 14:517-26.
133. Hill BT, Bailey BD, White JC. Characteristics of transport of 4-amino antifolate and folate compounds by two lines of L5178Y lymphoblasts, one with impaired transport of methotrexate. *Cancer Res*. 1979; 39:2440-6.
134. Hinken M. Gewebeverteilung und Lokalisation des Transportproteins für reduzierte Folate (Rfc) der Ratte [Dissertation med. vet.]. Leipzig: Univ. Leipzig; 2006 [in press]
135. Hirohashi T, Suzuki H, Sugiyama Y. Characterization of the transport properties of cloned rat multidrug resistance-associated protein 3 (MRP3). *J Biol Chem*. 1999; 274:15181-5.
136. Hirsch JR, Loo DF, Wright EM. Regulation of Na⁺/glucose cotransporter expression by protein kinases in *Xenopus laevis* oocytes. *J Biol Chem*. 1996; 271:14740-6.
137. Hirschberger J, Dorsch R, Kaspar A, Link M, Meuser C, Neuerer F, et al. Nebenwirkungen der Chemotherapie beim Hund: Mehrkomponenten-Chemotherapie des kaninen malignen Lymphoms. *Tierärztl Prax*. 2000; 28:164-9.
138. Hoffman SM, Fernandez-Salguero P, Gonzales FJ, Mohrenweiser HW. Organization and evolution of the cytochrome P450 CYP2A-2B-2F subfamily gene cluster on human chromosome 19. *J Mol Evol*. 1995; 41:894-900.
139. Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci*. 1991; 88:7276-80.
140. Honkakoski P, Negishi M. Characterization of a phenobarbital-responsive enhancer module in mouse P450 Cyp2b10 gene. *J Biol Chem*. 1997; 272:14943-9.
141. Honkakoski P, Negishi M. Protein serine/threonine phosphatase inhibitors suppress phenobarbital-induced Cyp2b10 gene transcription in mouse primary hepatocytes. *Biochem J*. 1998; 330:889-95.
142. Honkakoski P, Sueyoshi T, Negishi M. Drug-activated nuclear receptors CAR and PXR. *Ann Med*. 2003; 35:172-82.

143. Honkakoski P, Zelko I, Sueyoshi T, Negishi M. The nuclear orphan receptor CAR-retinoid X receptor heterodimer activates the phenobarbital-responsive enhancer module of the CYP2B gene. *Mol Cell Biol.* 1998; 18:5652-8.
144. Honscha W, Dötsch KU, Thomsen N, Petzinger E. Cloning and functional characterization of the bile acid-sensitive methotrexate carrier from rat liver cells. *Hepatology.* 2000; 31:1296-1304.
145. Honscha W, Petzinger E. Characterization of the bile acid sensitive methotrexate carrier of rat liver cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1999; 359:411-9.
146. Hooijberg JH, Broxterman HJ, Kool M, Assaraf YG, Peters GJ, Noordhuis P, et al. Antifolate resistance mediated by the multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2. *Cancer Res.* 1999; 59:2532-5.
147. Horne DW. Na⁺ and pH dependence of 5-methyltetrahydrofolic acid and methotrexate transport in freshly isolated hepatocytes. *Biochim Biophys Acta.* 1990; 1023:47-55.
148. Horne DW, Briggs WT, Wagner C. A functional, active transport system for methotrexate in freshly isolated hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1976; 68:70-6.
149. Horne DW, Reed KA. Transport of methotrexate into LNCaP human prostate cancer cells. *Biofactors.* 2002; 16:19-27.
150. Hosoyamada M, Sekine T, Kanai Y, Endou H. Molecular cloning and functional expression of a multispecific organic anion transporter from human kidney. *Am J Physiol.* 1999; 276:122-8.
151. Hsiang B, Zhu Y, Wu Y, Sasseville V, Yang WP, Kirchgessner TG. A novel human hepatic organic anion transporting polypeptide (OATP2). Identification of a liver-specific human organic anion transporting polypeptide and identification of rat and human hydroxymethylglutaryl-CoA reductase inhibitor transporters. *J Biol Chem.* 1999; 274:37161-8.
152. Immenschuh S, Petzinger E, Katz N. Secretion of plasma proteins and its insulin-dependent regulation in rat hepatocyte-hepatoma hybrid cells. *Eur J Cell Biol.* 1993; 60:256-60.
153. Jacquemin E, Hagenbuch B, Stieger B, Wolkoff AW, Meier PJ. Expression cloning of a rat liver Na⁺-independent organic anion transporter. *Proc Natl Acad Sci.* 1994; 91:133-7.
154. Jensen PV, Larsson LI. Actin microdomains on endothelial cells: association with CD44, ERM proteins, and signaling molecules during quiescence and wound healing. *Histochem Cell Biol.* 2004; 121:361-9.
155. Jinno H, Tanaka-Kagawa T, Hanioka N, Ishida S, Saeki M, Soyama A, et al. Identification of novel alternative splice variants of human constitutive androstane receptor and characterization of their expression in the liver. *Mol Pharmacol.* 2004; 65:496-502.

156. Johnson DR, Habeebu SS, Klaassen CD. Increase in bile flow and biliary excretion of glutathione-derived sulfhydryls in rats by drug-metabolizing enzyme inducers is mediated by multidrug resistance protein 2. *Toxicol Sci.* 2002; 66:16-26.
157. Jones SA, Moore LB, Shenk JL, Wisely GB, Hamilton GA, McKee DD, et al. The pregnane X receptor: a promiscuous xenobiotic receptor that has diverged during evolution. *Mol Endocrinol.* 2000; 14:27-39.
158. Josting A, Diehl V, Engert A. Methotrexat: Pharmakologie, Toxizität und Rescuemaßnahmen bei hochdosierter Behandlung. *Der Onkologe.* 1998; 4:974-85.
159. Jung D, Podvinec M, Meyer UA, Mangelsdorf DJ, Fried M, Meier PJ, et al. Human organic anion transporting polypeptide 8 promoter is transactivated by the farnesoid X receptor/bile acid receptor. *Gastroenterology.* 2002; 122:1954-66.
160. Kager L, Cheok M, Yang W, Zaza G, Cheng Q, Panetta JC, et al. Folate pathway gene expression differs in subtypes of acute lymphoblastic leukemia and influences methotrexate pharmacodynamics. *J Clin Invest.* 2005; 115:110-7.
161. Kamen B. Folate and antifolate pharmacology. *Semin Oncol.* 1997; 24:30-9.
162. Kapetanovic IM, Kupferberg HJ, Porter RJ, Theodore W, Schulman E, Penry JK. Mechanism of valproate-phenobarbital interaction in epileptic patients. *Clin Pharmacol Ther.* 1981; 29:480-6.
163. Kast HR, Goodwin B, Tarr PT, Jones SA, Anisfeld AM, Stoltz CM, et al. Regulation of multidrug resistance-associated protein 2 (ABCC2) by the nuclear receptors pregnane X receptor, farnesoid X-activated receptor, and constitutive androstane receptor. *J Biol Chem.* 2002; 277:2908-15.
164. Katz N, Immenschuh S, Gerbracht U, Eigenbrodt E, Föllmann W, Petzinger E. Hormone-sensitive carbohydrate metabolism in rat hepatocyte-hepatoma hybrid cells. *Eur J Cell Biol.* 1992; 57:117-23.
165. Kauffmann HM, Schrenk D. Sequence analysis and functional characterization of the 5'-flanking region of the rat multidrug resistance protein 2 (mrp2) gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998; 245:325-31.
166. Kawamoto T, Sueyoshi T, Zelko I, Moore R, Washburn K, Negishi M. Phenobarbital-responsive nuclear translocation of the receptor CAR in induction of the CYP2B gene. *Mol Cell Biol.* 1999; 19:6318-22.
167. Kemper B. Regulation of cytochrome P450 gene transcription by phenobarbital. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 1998; 61:23-64.
168. Kende AS, Ebetino FH, Drendel WB, Sundaralingham M, Glover E, Poland A. Structure-activity relationship of bispyridyloxybenzene for induction of mouse hepatic aminopyrine N-demethylase activity. Chemical, biological, and X-ray crystallographic studies. *Mol Pharmacol.* 1985; 28:445-453.
169. Kessler M. Prinzipien der Chemotherapie. In: Kessler M, editor. *Kleintieronkologie. Diagnose und Therapie von Tumorerkrankungen bei Hunden und Katzen.* Berlin: Parey; 2005. p. 113-19.

170. Kim J, Rivera-Rivera I, Kemper B. Tissue-specific chromatin structure of the phenobarbital-responsive unit and proximal promoter of CYP2B1/2 and modulation by phenobarbital. *Nucleic Acids Res.* 2000; 28:1126-32.
171. Kinoshita A, Kurosawa Y, Kondoh K, Suzuki T, Manabe A, Inukai T, et al. Effects of sodium in hydration solution on plasma methotrexate concentrations following high-dose methotrexate in children with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2003; 51:256-60.
172. Kiuchi Y, Suzuki H, Hirohashi T, Tyson CA, Sugiyama Y. cDNA cloning and inducible expression of human multidrug resistance associated protein 3 (MRP3). *FEBS Lett.* 1998; 433:149-52.
173. Klaassen CD, Slitt AL. Regulation of hepatic transporters by xenobiotic receptors. *Curr Drug Metab.* 2005; 6:309-28.
174. Klokouzas A, Wu CP, van Veen HW, Barrand MA, Hladky SB. cGMP and glutathione-conjugate transport in human erythrocytes. *Eur J Biochem.* 2003; 270:3696-708.
175. Kneuer C, Honscha W. The H⁺-dependent reduced folate carrier 1 (RFC1) of humans and the sodium-dependent methotrexate carrier-1 (MTX-1) of the rat are orthologs. *FEBS Lett.* 2004; 566:83-6.
176. Kneuer C, Honscha KU, Honscha W. Sodium-dependent methotrexate carrier-1 is expressed in rat kidney: cloning and functional characterization. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2004; 286:564-71.
177. Kneuer C, Honscha KU, Honscha W. Rat reduced-folate carrier-1 is localized basolaterally in MDCK kidney epithelial cells and contributes to the secretory transport of methotrexate and fluoresceinated methotrexate. *Cell Tissue Res.* 2005b; 320:517-24.
178. Kneuer C, Schrader S, Honscha W. Alternative transcripts of rat slc19a1: cloning, genomic organisation, tissue specific promoters and alternative splicing. *DNA Seq.* 2005a; 16:1-6.
179. Kobayashi Y, Hirokawa N, Ohshiro N, Sekine T, Sasaki T, Tokuyama S, et al. Differential gene expression of organic anion transporters in male and female rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002; 290:482-7.
180. Kobayashi K, Sueyoshi T, Inoue K, Moore R, Negishi M. Cytoplasmic accumulation of the nuclear receptor CAR by a tetratricopeptide repeat protein in HepG2 cells. *Mol Pharmacol.* 2003; 64:1069-75.
181. Kocarek TA, Schuetz EG, Guzelian PS. Differentiated induction of cytochrome P450b/e and P450p mRNAs by dose of phenobarbital in primary cultures of adult rat hepatocytes. *Mol Pharmacol.* 1990; 38:440-4.
182. Kojima R, Sekine T, Kawachi M, Cha SH, Suzuki Y, Endou H. Immunolocalization of multispecific organic anion transporters, OAT1, OAT2, and OAT3, in rat kidney. *J Am Soc Nephrol.* 2002; 13:848-57.
183. König J, Cui Y, Nies AT, Keppler D. A novel human organic anion transporting polypeptide localized to the basolateral hepatocyte membrane. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2000; 278:156-64.

184. König J, Nies AT, Cui Y, Leier I, Keppler D. Conjugate export pumps of the multidrug resistance protein (MRP) family: localization, substrate specificity, and MRP2-mediated drug resistance. *Biochim Biophys Acta*. 1999; 1461:377-94.
185. Kool M, van der Linden M, de Haas M, Scheffer GL, de Vree JM, Smith AJ, et al. MRP3, an organic anion transporter able to transport anti-cancer drugs. *Proc Natl Acad Sci*. 1999; 96:6914-9.
186. Krauss G. Protein Kinase A. In: Krauss G, editor. *Biochemistry of Signal Transduction and Regulation*. Weinheim: WILEY-VCH; 2003. p. 280-3.
187. Kruh GD, Belinsky MG. The MRP family of drug efflux pumps. *Oncogene*. 2003; 22:7537-52.
188. Kruit JK, Plosch T, Havinga R, Boverhof R, Groot PH, Groen AK, et al. Increased fecal neutral sterol loss upon liver X receptor activation is independent of biliary sterol secretion in mice. *Gastroenterology*. 2005; 128:147-56.
189. Kudo S, Ishizaki T. Pharmacokinetics of haloperidol: an update. *Clin Pharmacokinet*. 1999; 37:435-56.
190. Lederer E, Khundmiri SJ, Weinman EJ. Role of NHERF-1 in regulation of the activity of Na-K ATPase and Sodium-Phosphate co-transport in epithelial cells. *J Am Soc Nephrol*. 2003; 14:1711-9.
191. Lee K, Belinsky MG, Bell DW, Testa JR, Kruh GD. Isolation of MOAT-B, a widely expressed multidrug resistance-associated protein/canalicular multispecific organic anion transporter-related transporter. *Cancer Res*. 1998; 58:2741-7.
192. Lee K, Klein-Szanto AJ, Kruh GD. Analysis of the MRP4 drug resistance profile in transfected NIH3T3 cells. *J Natl Cancer Inst*. 2000; 92:1934-40.
193. Lee LG, Connel CR, Boch W. Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res*. 1993; 21:3761-6.
194. Lee W, Kim RB. Transporters and renal drug elimination. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2004; 44:137-66.
195. Lehmann JM, Kliewer SA, Moore LB, Smith-Oliver TA, Oliver BB, Su JL, et al. Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway. *J Biol Chem*. 1997; 272:3137-40.
196. Lenz HJ, Danenberg K, Schnieders B, Goeker E, Peters GJ, Garrow T, et al. Quantitative analysis of folylpolyglutamate synthetase gene expression in tumor tissues by the polymerase chain reaction: marked variation of expression among leukemia patients. *Oncol Res*. 1994; 6:329-35.
197. Lewis DF. P450 structures and oxidative metabolism of xenobiotics. *Pharmacogenomics*. 2003; 4:387-95.
198. Li T, Ito K, Horie T. Transport of fluorescein methotrexate by multidrug resistance-associated protein 3 in IEC-6 cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2003; 285:602-10.

199. Liang Q, He JS, Fulco AJ. The role of Barbie box sequences as cis-acting elements involved in the barbiturate-mediated induction of cytochromes P450BM-1 and P450BM-3 in *Bacillus megaterium*. *J Biol Chem*. 1995; 270:4438-50.
200. Lin JT, Tong WP, Trippett TM, Niedzwiecki D, Tao Y, Tan C, et al. Basis for natural resistance to methotrexate in human acute non-lymphocytic leukemia. *Leuk Res*. 1991; 15:1191-6.
201. Link M, Hirschberger J. Maligne Lymphome und lymphatische Leukämien. Eine Literaturübersicht. Teil 1: Therapie in der Veterinärmedizin (Hund und Katze) und in Humanmedizin. *Tierärztl Prax*. 1999; 27:29-38.
202. Littlepage LE, Wu H, Andresson T, Deanehan JK, Amundadottir LT, Ruderman JV. Identification of phosphorylated residues that affect the activity of the mitotic kinase Aurora-A. *Proc Natl Acad Sci*. 2002; 99:15440-5.
203. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods*. 2001; 25:402-8.
204. Liu WS, Heckman CA. The sevenfold way of PKC regulation. *Cell Signal*. 1998; 10:529-42.
205. Liu XY, Witt TL, Matherly LH. Restoration of high-level transport activity by human reduced folate carrier/ThTr1 thiamine transporter chimaeras: role of the transmembrane domain 6/7 linker region in reduced folate carrier function. *Biochem J*. 2003; 369:31-7.
206. Lopez-Nieto CE, You G, Bush KT, Barros EJ, Beier DR, Nigam SK. Molecular cloning and characterization of NKT, a gene product related to the organic cation transporter family that is almost exclusively expressed in the kidney. *J Biol Chem*. 1997; 272:6471-8.
207. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951; 193:265-75.
208. Lu R, Chan BS, Schuster VL. Cloning of the human kidney PAH transporter: narrow substrate specificity and regulation by protein kinase C. *Am J Physiol*. 1999; 276:295-303.
209. Lui CY, Lee MG, Chiou WL. Clearance studies of methotrexate in dogs after multiple-rate infusion. *Cancer Res*. 1985; 45:1545-8.
210. Luo G, Cunningham M, Kim S, Burn T, Lin J, Sinz M, et al. CYP3A4 induction by drugs: correlation between a pregnane X receptor reporter gene assay and CYP3A4 expression in human hepatocytes. *Drug Metab Dispos*. 2002; 30:795-804.
211. MacEwen EG, Brown NO, Patnaik AK, Hayes AA, Passe S. Cyclic combination chemotherapy of canine lymphosarcoma. *J Am Vet Med Assoc*. 1981; 178:1178-81.
212. Maher JM, Cheng X, Slitt AL, Dieter MZ, Klaassen CD. Induction of the multidrug resistance-associated protein family of transporters by chemical activators of receptor-mediated pathways in mouse liver. *Drug Metab Dispos*. 2005; 33:956-62.
213. Mangano FT, McBride AE, Schneider SJ. Brain tumors and epilepsy. In: Ettinger AB, Devinsky O, editors. *Managing Epilepsy and Co-Existing Disorders*. Woburn, MA: Butterworth-Heinemann; 2002. p. 175-94.

214. Mani SA, Harish S, Vathsala PG, Rangarajan PN, Padmanaban G. Receptor-mediated gene delivery approach demonstrates the role of 5'-proximal DNA region in conferring phenobarbitone responsiveness to CYP2B2 gene in rat liver in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 268:734-49.
215. Marc N, Galisteo M, Lagadic-Gossmann D, Fautrel A, Joannard F, Guillouzo A, et al. Regulation of phenobarbital induction of the cytochrome P450 2b9/10 genes in primary mouse hepatocyte culture. Involvement of calcium- and cAMP-dependent pathways. *Eur J Biochem.* 2000; 267:963-70.
216. Marchant JS, Subramanian VS, Parker I, Said HM. Intracellular trafficking and membrane targeting mechanisms of the human reduced folate carrier in mammalian epithelial cells. *J Biol Chem.* 2002; 277:33325-33.
217. Masuda M, Iizuka Y, Yamazaki M, Nishigaki R, Kato Y, Niinuma K, et al. Methotrexate is excreted into the bile by canalicular multispecific organic anion transporter in rats. *Cancer Res.* 1997; 57:3506-10.
218. Matherly LH, Goldman ID. Membrane transport of folates. *Vitam Horm.* 2003; 66:403-56.
219. Mattschoss LA, Hobbs AA, Steggle AW, May BK, Elliott WH. Isolation and characterization of genomic clones for two chicken phenobarbital-inducible cytochrome P-450 genes. *J Biol Chem.* 1986; 261:9438-43.
220. Meier PJ, Stieger B. Bile salt transporters. *Annu Rev Physiol.* 2002; 64:635-61.
221. Mejdoubi N, Henriques C, Bui E, Porquet D. NF-kappaB is involved in the induction of the rat hepatic alpha1-acid glycoprotein gene by phenobarbital. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999; 254:93-9.
222. Meyer FP. Indicative therapeutic and toxic drug concentrations in plasma: a tabulation. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 1994; 32:71-81.
223. Meyer UA. Overview of enzymes of drug metabolism. *J Pharmacokinet Biopharm.* 1996; 24:449-59.
224. Mikkaichi T, Suzuki T, Onogawa T, Tanemoto M, Mizutamari H, Okada M, et al. Isolation and characterization of a digoxin transporter and its rat homologue expressed in the kidney. *Proc Natl Acad Sci.* 2004; 101:3569-74.
225. Miyazaki H, Sekine T, Endou H. The multispecific organic anion transporter family: properties and pharmacological significance. *Trends Pharmacol Sci.* 2004; 25:654-62.
226. Moolenaar WH, Tertoolen LG, de Laat SW. Phorbol ester and diacylglycerol mimic growth factors in raising cytoplasmic pH. *Nature.* 1984; 312:371-4.
227. Moore LB, Maglich JM, McKee DD, Wisely B, Willson TM, Kliewer SA, et al. Pregnane X receptor (PXR), constitutive androstane receptor (CAR), and benzoate X receptor (BXR) define three pharmacologically distinct classes of nuclear receptors. *Mol Endocrinol.* 2002; 16:977-86.
228. Moore LB, Parks DJ, Jones SA, Bledsoe RK, Consler TG, Stimmel JB, et al. Orphan nuclear receptors constitutive androstane receptor and pregnane X receptor share xenobiotic and steroid ligands. *J Biol Chem.* 2000; 275:15122-7.

229. Morita N, Kusuhara H, Sekine T, Endou H, Sugiyama Y. Functional characterization of rat organic anion transporter 2 in LLC-PK1 cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001; 298:1179-84.
230. Moscow JA, Gong M, He R, Sgagias MK, Dixon KH, Anzick SL, et al. Isolation of a gene encoding a human reduced folate carrier (RFC1) and analysis of its expression in transport-deficient, methotrexate-resistant human breast cancer cells. *Cancer Res.* 1995; 55:3790-4.
231. Mukhopadhyay S, Webster CR, Anwer MS. Role of protein phosphatases in cyclic AMP-mediated stimulation of hepatic Na⁺/taurocholate cotransport. *J Biol Chem.* 1998; 273:30039-45.
232. Murray RC, Williams FM, Flintoff WF. Structural organization of the reduced folate carrier gene in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem.* 1996; 271:19174-9.
233. Nagakubo J, Tomimatsu T, Kitajima M, Takayama H, Aimi N, Horie T. Characteristics of transport of fluoresceinated methotrexate in rat small intestine. *Life Sci.* 2001; 69:739-47.
234. Nebert DW, Nelson DR, Coon MJ, Estabrook RW, Feyereisen R, Fujii-Kuriyama Y, et al. The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, and recommended nomenclature. *DNA Cell Biol.* 1991; 10:1-14.
235. Negishi M. Nuclear receptor CAR as a phenobarbital induction signal of CYP2B gene. *FASEB J.* 2000; 14:A1306.
236. Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Sregeman JJ, Feyereisen R, Waxman DJ, et al. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics.* 1996; 6:1-42.
237. Neville CF, Ninomiya S, Shimada N, Kamataki T, Imaoka, Funae Y. Characterization of specific cytochrome P450 enzymes responsible for the metabolism of diazepam in hepatic microsomes of adult male rats. *Biochem Pharmacol.* 1993; 45:59-65.
238. Nims R, Prough R, Jones C, Stockus D, Dragnev K, Thomas P, et al. In vivo induction and in vitro inhibition of hepatic cytochrome P450 activity by the benzodiazepine anticonvulsants clonazepam and diazepam. *Drug Metab Dispos.* 1997; 25:751-6.
239. Nims RW, Sinclair PR, Sinclair JF, Dragnev KH, Jones CR, Mellini DW, et al. Dose-response relationships for the induction of P450 2B by 1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene (TCPOBOP) in rat and cultured rat hepatocytes. *Xenobiotica.* 1993; 23:1411-26.
240. Nishizuka Y. Intracellular signalling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase. *Science.* 1992; 258:617-24.
241. Noe B, Hagenbuch B, Meier PJ, St-Pierre MV. Characterization of the mouse bile salt export pump overexpressed in the baculovirus system. *Hepatology.* 2001; 33:1223-31.
242. Noe B, Hagenbuch B, Stieger B, Meier PJ. Isolation of a multispecific organic anion and cardiac glycoside transporter from rat brain. *Proc Natl Acad Sci.* 1997; 94:10346-50.

243. Nozaki Y, Kusuhara H, Endou H, Sugiyama Y. Quantitative evaluation of the drug-drug interactions between methotrexate and nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the renal uptake process based on the contribution of organic anion transporters and reduced folate carrier. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004; 309:226-34.
244. Ogawa K, Suzuki H, Hirohashi T, Ishikawa T, Meier PJ, Hirose K, et al. Characterization of inducible nature of MRP3 in rat liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2000; 278:438-46.
245. Okey AB. Enzyme induction in the cytochrome P-450 system. *Pharmacol Ther.* 1990; 45:241-98.
246. Ogilvie GK. Chemotherapy. In: Withrow SJ, MacEwen EG, editors. *Small Animal Clinical Oncology.* Philadelphia: WB Saunders; 1996. p. 70-86.
247. Ogilvie GK, Moore AS. Chemotherapy: Properties, uses, and patient management. In: MediMedia USA, editor. *Managing the veterinary cancer patient: A practice manual.* Trenton, NJ: Veterinary Learning Systems; 1995. p. 64-86.
248. Omura S, Sasaki Y, Iwai Y, Takeshima H. Staurosporine, a potentially important gift from a microorganism. *J Antibiot (Tokyo).* 1995; 48:535-48.
249. Pajor AM, Sun N. Protein kinase C-mediated regulation of the renal Na⁺/dicarboxylate cotransporter, NaDC-1. *Biochim Biophys Acta.* 1999; 1420:223-30.
250. Panesar SK, Bandiera SM, Abbott FS. Comparative effects of carbamazepine and carbamazepine-10,11-epoxide on hepatic cytochromes P450 in the rat. *Drug Metab Dispos.* 1996; 24:619-27.
251. Park Y, Li H, Kemper B. Phenobarbital induction mediated by a distal CYP2B2 sequence in rat liver transiently transfected in situ. *J Biol Chem.* 1996; 271:23725-8.
252. Pascussi JM, Gerbal-Chaloin S, Drocourt L, Maurel P, Vilarem MJ. The expression of CYP2B6, CYP2C9 and CYP3A4 genes: a tangle of networks of nuclear and steroid receptors. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1619:243-53.
253. Patsalos PN, Froscher W, Pisani F, van Rijn CM. The importance of drug interactions in epilepsy therapy. *Epilepsia.* 2002; 43:365-85.
254. Paulusma CC, Kothe MJ, Bakker CT, Bosma PJ, van Bokhoven I, van Marle J, et al. Zonal down-regulation and redistribution of the multidrug resistance protein 2 during bile duct ligation in rat liver. *Hepatology.* 2000; 31:684-93.
255. Petzinger E, Föllmann W, Blumrich M, Walther P, Hentschel J, Bette P, et al. Immortalization of rat hepatocytes by fusion with hepatoma cells. I. Cloning of a hepatocytoma cell line with bile canaliculi. *Eur J Cell Biol.* 1994; 64:328-38.
256. Pikula S, Hayden JB, Awasthi S, Awasthi YC, Zimniak P. Organic anion-transporting ATPase of rat liver. I. Purification, photoaffinity labeling, and regulation by phosphorylation. *J Biol Chem.* 1994; 269:27566-73.
257. Pinkus R, Bergelson S, Daniel V. Phenobarbital induction of AP-1 binding activity mediates activation of glutathione S-transferase and quinone reductase gene expression. *Biochem J.* 1993; 290:637-40.

258. Poser RG, Sirotnak FM, Chello PL. Different synthesis of methotrexate polyglutamates in normal proliferative and neoplastic mouse tissue in vivo. *Cancer Res.* 1981; 41:4441-6.
259. Prabhu L, Upadhya P, Ram N, Nirodi CS, Sultana S, Vatsala PG, et al. A model for the transcriptional regulation of the CYP2B1/B2 gene in rat liver. *Proc Natl Acad Sci.* 1995; 92:9628-32.
260. Prodanowich S, Ma F, Taylor JR, Pezon C, Fasihi T, Kirsner RS. Methotrexate reduces incidence of vascular diseases in veterans with psoriasis or rheumatoid arthritis. *J Am Acad Dermatol.* 2005; 52:262-7.
261. Propper DJ, McDonald AC, Man A, Thavasu P, Balkwill F, Braybrooke JP, et al. Phase I and pharmacokinetic study of PKC412, an inhibitor of protein kinase C. *J Clin Oncol.* 2001; 19:1485-92.
262. Pustyl'nyak VO, Zakharova LY, Mikhailova ON, Rice RH, Gulyaeva LF, Lyakhovich VV. In vivo effects of protein kinase and phosphatase inhibitors on CYP2B induction in rat liver. *Toxicology.* 2005; 207:315-22.
263. Rajgopal A, Sierra EE, Zhao R, Goldman ID. Expression of the reduced folate carrier SLC19A1 in IEC-6 cells results in two distinct transport activities. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001; 281:1579-86.
264. Ramamoorthy S, Giovanetti E, Qian Y, Blakely RD. Phosphorylation and regulation of antidepressant-sensitive serotonin transporters. *J Biol Chem.* 1998; 273:2458-66.
265. Rampersaud A, Walz FG Jr. At least six forms of extremely homologous cytochromes P-450 in rat liver are encoded at two closely linked genetic loci. *Proc Natl Acad Sci.* 1983; 80:6542-6.
266. Ramsden R, Sommer KM, Omiecinski CJ. Phenobarbital induction and tissue-specific expression of the rat CYP2B2 gene in transgenic mice. *J Biol Chem.* 1993; 268:21722-6.
267. Reilly PE, Thompson DA, Mason SR, Hooper WD. Cytochrome P450III A enzymes in rat liver microsomes: involvement in C3-hydroxylation of diazepam and nordazepam but not N-dealkylation of diazepam and temazepam. *Mol Pharmacol.* 1990; 37:767-74.
268. Relling MV, Pui CH, Sandlund JT, Rivera GK, Hancock ML, Boyett JM, et al. Adverse effect of anticonvulsants on efficacy of chemotherapy for acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet.* 2000; 356:285-90.
269. Rhee MS, Wang Y, Nair MG, Galivan J. Acquisition of resistance to antifolates caused by enhanced gamma-glutamyl hydrolase activity. *Cancer Res.* 1993; 53:2227-30.
270. Riva M, Landonio G, Defanti CA, Siena S. The effect of anticonvulsant drugs on blood levels of methotrexate. *J Neurooncol.* 2000; 48:249-50.
271. Rius M, Nies AT, Hummel-Eisenbeiss J, Jedlitschky G, Keppler D. Cotransport of reduced glutathione with bile salts by MRP4 (ABCC4) localized to the basolateral hepatocyte membrane. *Hepatology.* 2003; 38:374-84.
272. Roelofsen H, Ottenhoff R, Oude Elferink RP, Jansen PL. Hepatocanalicular organic-anion transport is regulated by protein kinase C. *Biochem J.* 1991; 278:637-41.

273. Roelofsen H, Soroka CJ, Keppler D, Boyer JL. Cyclic AMP stimulates sorting of the canalicular organic anion transporter (Mrp2/cMOAT) to the apical domain in hepatocyte couplets. *J Cell Sci.* 1998; 111:1137-45.
274. Roy K, Chiao JH, Spengler BA, Tolner B, Yang CH, Biedler JL, et al. Chromosomal localization of the murine RFC-1 gene encoding a folate transporter and its amplification in an antifolate resistant variant overproducing the transporter. *Cancer Genet Cytogenet.* 1998; 105:29-38.
275. Roy P, Yu LJ, Crespi CL, Waxman DJ. Development of a substrate-activity based approach to identify the major human liver P-450 catalysts of cyclophosphamide and ifosfamide activation based on cDNA-expressed activities and liver microsomal P-450 profiles. *Drug Metab Dispos.* 1999; 27:655-66.
276. Rushmore TH, Kong AN. Pharmacogenomics, regulation and signaling pathways of phase I and II drug metabolizing enzymes. *Curr Drug Metab.* 2002; 3:481-90.
277. Ruslander D. Chemotherapie. Medikamente, Dosierungen, Behandlungsprotokolle. In: Kessler M, editor. *Kleintieronkologie. Diagnose und Therapie von Tumorerkrankungen bei Hunden und Katzen.* Berlin: Parey; 2005. p. 119-34.
278. Sabol SL, Brewer HB Jr, Santamarina-Fojo S. The human ABCG1 gene: identification of LXR response elements that modulate expression in macrophages and liver. *J Lipid Res.* 2005; 46:2151-67.
279. Sadlish H, Murray RC, Williams FM, Flintoff WF. Mutations in the reduced-folate carrier affect protein localization and stability. *Biochem J.* 2000; 346:509-18.
280. Sadlish H, Williams FM, Flintoff WF. Cytoplasmic domains of the reduced folate carrier are essential for trafficking, but not function. *Biochem J.* 2002; 364:777-86.
281. Said HM, Ma TY, Ortiz A, Tapia A, Valerio CK. Intracellular regulation of intestinal folate uptake: studies with cultured IEC-6 epithelial cells. *Am J Physiol.* 1997; 272:729-36.
282. Saito H, Masuda S, Inui K. Cloning, functional characterization of a novel rat organic anion transporter mediating basolateral uptake of methotrexate in the kidney. *J Biol Chem.* 1996; 271:20719-25.
283. Samudre KR, Mani SA, Vathsala PG, Rangarajan PN, Padmanaban G. Phenobarbitone-mediated translocation of the cytosolic proteins interacting with the 5'-proximal region of rat liver CYP2B1/B2 gene into the nucleus. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002; 292:312-7.
284. Sanghani PC, Moran RG. Purification and characteristics of recombinant human folylpoly-gamma-glutamate synthetase expressed at high levels in insect cells. *Protein Expr Purif.* 2000; 18:36-45.
285. Schrenk D, Baus PR, Ermel N, Klein C, Vorderstemann B, Kauffmann HM. Up-regulation of transporters of the MRP family by drugs and toxins. *Toxicol Lett.* 2001; 120:51-7.
286. Schulte-Hermann R. Induction of liver growth by xenobiotic compounds and other stimuli. *CRC Crit Rev Toxicol.* 1974; 3:97-158.

287. Seckin S, Alsancak S, Uysal M. Chronic diazepam administration results in hepatotoxicity due to increased lipid peroxidation and calcium accumulation in rat liver. *Eur J Biochem.* 2003; 1:2-17.
288. Sekine T, Cha SH, Tsuda M, Apiwattanakul N, Nakajima N, Kanai Y, et al. Identification of multispecific organic anion transporter 2 expressed predominantly in the liver. *FEBS Lett.* 1998; 429:179-82.
289. Sekine T, Watanabe N, Hosoyamada M, Kanai Y, Endou H. Expression cloning and characterization of a novel multispecific organic anion transporter. *J Biol Chem.* 1997; 272:18526-9.
290. Selim K, Kaplowitz N. Hepatotoxicity of Psychotropic Drugs. *Hepatology.* 1999; 29:1347-1351.
291. Seol W, Choi HS, Moore DD. An orphan nuclear hormone receptor that lacks a DNA binding domain and heterodimerizes with other receptors. *Science.* 1996; 272:1336-9.
292. Sharina IG, Zhao R, Wang Y, Babani S, Goldman ID. Role of the C-terminus and the long cytoplasmic loop in reduced folate carrier expression and function. *Biochem Pharmacol.* 2002; 63:1717-24.
293. Shaw GC, Fulco AJ. Barbiturate-mediated regulation of expression of the cytochrome P450BM-3 gene of *Bacillus megaterium* by Bm3R1 protein. *J Biol Chem.* 1992; 267:5515-26.
294. Shaw GC, Fulco AJ. Inhibition by barbiturates of the binding of Bm3R1 repressor to its operator site on the barbiturate-inducible cytochrome P450BM-3 gene of *Bacillus megaterium*. *J Biol Chem.* 1993; 268:2997-3004.
295. Shephard EA, Forrest LA, Shervington A, Fernandez LM, Ciaramella G, Phillips IR. Interaction of proteins with a cytochrome P450 2B2 gene promoter: identification of two DNA sequences that bind proteins that are enriched or activated in response to phenobarbital. *DNA Cell Biol.* 1994; 13:793-804.
296. Sidhu JS, Omiecinski CJ. An okadaic acid-sensitive pathway involved in the phenobarbital-mediated induction of CYP2B gene expression in primary rat hepatocyte cultures. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997; 282:1122-9.
297. Sierra EE, Goldman ID. Recent advances in the understanding of the mechanism of membrane transport of folates and antifolates. *Semin Oncol.* 1999; 26:11-23.
298. Simonson GD, Vicent AC, Roberg KJ, Huang Y, Ianij V. Molecular cloning and characterization of a novel liver-specific transport protein. *J Cell Sci.* 1994; 107:1065-72.
299. Simpson AE. The cytochrome P450 4 (CYP4) family. *Gen Pharmacol.* 1997; 28:351-9.
300. Sinal CJ, Tohkin M, Miyata M, Ward JM, Lambert G, Gonzales FJ. Targeted disruption of the nuclear receptor FXR/BAR impairs bile acid and lipid homeostasis. *Cell.* 2000; 102:731-44.
301. Sirotnak FM. Obligate genetic expression in tumor cells of a fetal membrane property mediating "folate" transport: biological significance and implications for improved therapy of human cancer. *Cancer Res.* 1985; 45:3992-4000.

302. Sirotnak FM, Kurita S, Hutchison DJ. On the nature of a transport alteration determining resistance to amethopterin in the L1210 leukemia. *Cancer Res.* 1968; 28:75-80.
303. Spencer HT, Sorrentino BP, Pui CH, Chunduru SK, Sleep SE, Blakley RL. Mutations in the gene for human dihydrofolate reductase: an unlikely cause of clinical relapse in pediatric leukemia after therapy with methotrexate. *Leukemia.* 1996; 10:439-46.
304. Stacher A, Lutz D. Antineoplastische Chemotherapie. In: Kuemmerle HP, Hitzemberger G, Spitzky KH, editors. *Klinische Pharmakologie.* Landsberg: Ecomed; 1996. p. 1-40.
305. Staudinger JL, Madan A, Carol KM, Parkinson A. Regulation of drug transporter gene expression by nuclear receptors. *Drug Metab Dispos.* 2003; 31:523-7.
306. Stoltz C, Vachon MH, Trottier E, Dubois S, Paquet Y, Anderson A. The CYP2B2 phenobarbital response unit contains an accessory factor element and a putative glucocorticoid response element essential for conferring maximal phenobarbital responsiveness. *J Biol Chem.* 1998; 273:8528-36.
307. Strum WB. A pH-dependent, carrier-mediated transport system for the folate analog, amethopterin, in rat jejunum. *J Pharmacol Exp Ther.* 1977; 203:640-5.
308. Sueyoshi T, Negishi M. Phenobarbital response elements of cytochrome P450 genes and nuclear receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2001; 41:123-43.
309. Sueyoshi T, Kawamoto T, Zelko I, Honkakoski P, Negishi M. The repressed nuclear receptor CAR responds to Phenobarbital in Aactivating the human CYP2B6 Gene. *J Biol Chem.* 1999; 274:6043-6.
310. Swanson HI, Bradfield CA. The AH-receptor: genetics, structure and function. *Pharmacogenetics.* 1993; 3:213-30.
311. Sweet DH, Miller DS, Pritchard JB, Fujiwara Y, Beier DR, Nigam SK. Impaired organic anion transport in kidney and choroid plexus of organic anion transporter 3 (Oat3 (Slc22a8)) knockout mice. *J Biol Chem.* 2002; 277:26934-43.
312. Sweet DH, Wolff NA, Pritchard JB. Expression cloning and characterization of ROAT1. The basolateral organic anion transporter in rat kidney. *J Biol Chem.* 1997; 272:30088-95.
313. Synold TW, Relling MV, Boyett JM, Rivera GK, Sandlund JT, Mahmoud H, et al. Blast cell methotrexate-polyglutamate accumulation in vivo differs by lineage, ploidy, and methotrexate dose in acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Invest.* 1994; 94:1996-2001.
314. Takano M, Nagai J, Yasuhara M, Inui K. Regulation of p-aminohippurate transport by protein kinase C in OK kidney epithelial cells. *Am J Physiol.* 1996; 271:469-75.
315. Takeda M, Babu E, Narikawa S, Endou H. Interaction of human organic anion transporters with various cephalosporin antibiotics. *Eur J Pharmacol.* 2002; 438:137-42.
316. Takeda M, Sekine T, Endou H. Regulation by protein kinase C of organic anion transport driven by rat organic anion transporter 3 (rOAT3). *Life Sci.* 2000; 67:1087-93.

317. Tamai I, Nezu J, Uchino H, Sai Y, Oku A, Shimane M, et al. Molecular identification and characterization of novel members of the human organic anion transporter (OATP) family. *Biochem Biophys Res. Commun.* 2000; 273:251-60.
318. Tateishi T, Asoh M, Nakura H, Watanabe M, Tanaka M, Kumai T, et al. Carbamazepine induces multiple cytochrome P450 subfamilies in rats. *Chem Biol Interact.* 1999; 117:257-68.
319. Taylor SS, Buechler JA, Yonemoto W. cAMP-dependent protein kinase: framework for a diverse family of regulatory enzymes. *Annu Rev Biochem.* 1990; 59:971-1005.
320. Teng S, Jekerle V, Piquette-Miller M. Induction of ABCC3 (MRP3) by pregnane X receptor activators. *Drug Metab Dispos.* 2003; 31:1296-9.
321. Terlouw SA, Masereeuw R, Russel FG. Modulatory effects of hormones, drugs, and toxic events on renal organic anion transport. *Biochem Pharmacol.* 2003; 65:1393-405.
322. Teske E. Hämatopoietische Tumoren. In: Kessler M, editor. *Kleintieronkologie*. Berlin: Parey; 2005. p. 477-509.
323. Toffoli G, Corona G, Toluoso B, Sartor F, Sorio R, Mini E, et al. Resistance to methotrexate in SKOV-3 cell lines after chronic exposure to carbamazepine is associated with a decreased expression of folate receptor. *Int J Cancer* 2000; 85:683-90.
324. Tolner B, Roy K, Sirotnak FM. Organization, structure and alternate splicing of the murine RFC-1 gene encoding a folate transporter. *Gene.* 1997; 189:1-7.
325. Tolner B, Singh A, Esaki T, Roy K, Sirotnak FM. Transcription of the mouse RFC-1 gene encoding a folate transporter. Multiplicity and properties of promoters with minimum requirements for their basal activity. *Gene.* 1999; 231:163-72.
326. Trauner M, Arrese M, Soroka CJ, Ananthanarayanan M, Koeppl TA, Schlosser SF, et al. The rat canalicular conjugate export pump (Mrp2) is down-regulated in intrahepatic and obstructive cholestasis. *Gastroenterology.* 1997; 113:255-64.
327. Trippett T, Schlemmer S, Elisseyeff Y, Goker E, Wachter M, Steinherz P, et al. Defective transport as a mechanism of acquired resistance to methotrexate in patients with acute lymphocytic leukemia. *Blood.* 1992; 80:1158-62.
328. Tzamelis I, Pissios P, Schuetz EG, Moore DD. The xenobiotic compound 1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene is an agonist ligand for the nuclear receptor CAR. *Mol Cell Biol.* 2000; 20:2951-8.
329. Utesch D, Arand M, Thomas H, Petzinger E, Oesch F. Xenobiotic-metabolizing enzyme activities in hybrid cell lines established by fusion of primary rat liver parenchymal cells with hepatoma cells. *Xenobiotica.* 1992; 22:1451-7.
330. Uwai Y, Okuda M, Takami K, Hashimoto Y, Inui K. Functional characterization of the rat multispecific organic anion transporter OAT1 mediating basolateral uptake of anionic drugs in the kidney. *FEBS Lett.* 1998; 438:321-4.
331. Vaughan RA, Huff RA, Uhl GR, Kuhar MJ. Protein kinase C-mediated phosphorylation and functional regulation of dopamine transporters in striatal synaptosomes. *J Biol Chem.* 1997; 272:15541-6.
332. Vecht CJ. Clinical management of brain metastasis. *J Neurol.* 1998; 245:127-31.

333. Vecht CJ, Wagner GL, Wilms EB. Interactions between antiepileptic and chemotherapeutic drugs. *Lancet Neurol.* 2003a; 2:404-9.
334. Vecht CJ, Wagner GL, Wilms EB. Treating seizures in patients with brain tumors: Drug interactions between antiepileptic and chemotherapeutic agents. *Semin Oncol.* 2003b; 30:49-52.
335. Vegesna RV, Wu HL, Mong S, Crooke ST. Staurosporine inhibits protein kinase C and prevents phorbol ester-mediated leukotriene D4 receptor desensitization in RBL-1 cells. *Mol Pharmacol.* 1988; 33:537-42.
336. Villemure JG, de Tribolet N. Epilepsy in patients with central nervous system tumors. *Curr Opin Neurol.* 1996; 9:424-8.
337. Virchis A, Ganeshaguru K, Hart S, Jones D, Fletcher L, Wright F. A novel treatment approach for low grade lymphoproliferative disorders using PKC412 (CGP41251), an inhibitor of protein kinase C. *Hematol J.* 2002; 3:131-6.
338. Volk EL, Farley KM, Wu Y, Li F, Robey RW, Schneider E. Overexpression of wild-type breast cancer resistance protein mediates methotrexate resistance. *Cancer Res.* 2002; 62:5035-40.
339. Wang H, Faucette SR, Gilbert D, Jolley S, Sueyoshi T, Negishi M, et al. Glucocorticoid receptor enhancement of pregnane X receptor-mediated CYP2B6 regulation in primary human hepatocytes. *Drug Metab Dispos.* 2003b; 30:620-30.
340. Wang H, Faucette SR, Sueyoshi T, Moore R, Ferguson S, Negishi M, et al. A novel distal enhancer module regulated by pregnane X receptor/constitutive androstane receptor is essential for the maximal induction of CYP2B6 gene expression. *J Biol Chem.* 2003a; 278:14146-52.
341. Wang H, LeCluyse E. Role of orphan nuclear receptors in the regulation of drug-metabolising enzymes. *Clin Pharmacokinet.* 2003; 42:1331-57.
342. Wang Y, Zhao R, Russel RG, Goldman ID. Localization of the murine reduced folate carrier as assessed by immunohistochemical analysis. *Biochim Biophys Acta.* 2001; 1513:49-54.
343. Waxman DJ. P450 gene induction by structurally diverse xenochemicals: central role of nuclear receptors CAR, PXR, and PPAR. *Arch Biochem Biophys.* 1999; 369:11-23.
344. Waxman DJ, Azaroff L. Phenobarbital induction of cytochrome P-450 gene expression. *Biochem J.* 1992; 281:577-92.
345. Wei P, Zhang J, Egan-Hafley M, Liang, Moore DD. The nuclear receptor CAR mediates specific xenobiotic induction of drug metabolism. *Nature.* 2000; 407:920-3.
346. Weiss J, Kerpen CJ, Lindenmaier H, Dormann SM, Haefeli WE. Interaction of antiepileptic drugs with human P-glycoprotein in vitro. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003; 307:262-7.
347. Westerhof GR, Schornagel JH, Kathmann I, Jackman AL, Rosowsky A, Forsch RA, et al. Carrier- and receptor-mediated transport of folate antagonists targeting folate-dependent enzymes: correlates of molecular-structure and biological activity. *Mol Pharmacol.* 1995; 48:459-71.

348. Whetstine JR, Flatley RM, Matherly LH. The human reduced folate carrier gene is ubiquitously and differentially expressed in normal human tissues: identification of seven non-coding exons and characterization of a novel promoter. *Biochem J.* 2002a; 367:629-40.
349. Whetstine JR, Matherly LH. The basal promoters for the human reduced folate carrier gene are regulated by a GC-box and a cAMP-response element/AP-1-like element. Basis for tissue-specific gene expression. *J Biol Chem.* 2001; 276:6350-58.
350. Whetstine JR, Witt T, Matherly LH. The human reduced folate carrier gene is regulated by the AP2 and sp1 transcription factor families and a functional 61-base pair polymorphism. *J Biol Chem.* 2002b; 277:43873-80.
351. Williams FM, Flintoff WF. Isolation of a human cDNA that complements a mutant hamster cell defective in methotrexate uptake. *J Biol Chem.* 1995; 270:2987-92.
352. Williams FM, Flintoff WF. Structural organization of the human reduced folate carrier gene: evidence for 5' heterogeneity in lymphoblast mRNA. *Somat Cell Mol Genet.* 1998; 24:143-56.
353. Williams FM, Murray RC, Underhill TM, Flintoff WF. Isolation of a hamster cDNA clone coding for a function involved in methotrexate uptake. *J Biol Chem.* 1994; 269:5810-6.
354. Withrow SJ. Why worry about cancer in pet animals. In: Withrow SJ, MacEwen EG. *Small Animal Clinical Oncology.* Philadelphia: WB Saunders; 1996. p. 1-3.
355. Wolff NA, Thies K, Kuhnke N, Reid G, Friedrich B, Lang F, et al. Protein kinase C activation downregulates human organic anion transporter 1-mediated transport through carrier internalization. *J Am Soc Nephrol.* 2003; 14:1959-68.
356. Wong SC, Proefke SA, Bushan A, Matherly LH. Isolation of human cDNAs that restore methotrexate sensitivity and reduced folate carrier activity in methotrexate transport-defective Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem.* 1995; 270:17468-75.
357. Wong SC, Zhang L, Proefke SA, Matherly LH. Effects of the loss of capacity for N-glycosylation on the transport activity and cellular localization of the human reduced folate carrier. *Biochim Biophys Acta.* 1998; 1375:6-12.
358. Wong SC, Zhang L, Witt TL, Proefke SA, Matherly LH. Impaired membrane transport in methotrexate-resistant CCRF-CEM cells involves early translation termination and increased turnover of a mutant reduced folate carrier. *J Biol Chem.* 1999; 274:10388-94.
359. Worm J, Kirkin AF, Dzhandzhugazyan KN, Guldberg P. Methylation-dependent silencing of the reduced folate carrier gene in inherently methotrexate-resistant human breast cancer cells. *J Biol Chem.* 2001; 276:39990-40000.
360. Wrighton SA, Stevens JC. The human hepatic cytochromes P450 involved in drug metabolism. *Crit Rev Toxicol.* 1992; 22:1-21.
361. Xie W, Barwick JL, Simon CM, Pierce AM, Safe S, Blumberg B, et al. Reciprocal activation of xenobiotic response genes by nuclear receptors SXR/PXR and CAR. *Genes Dev.* 2000; 14:3014-23.

362. Xie W, Evans RM. Orphan nuclear receptors: the exotics of xenobiotics. *J Biol Chem.* 2001; 276:37739-42.
363. Xiong H, Yoshinari K, Brouwer KL, Negishi M. Role of constitutive androstane receptor in the in vivo induction of Mrp3 and CYP2B1/2 by phenobarbital. *Drug Metab Dispos.* 2002; 30:918-23.
364. Xu C, Li CY, Kong AN. Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Arch Pharm Res.* 2005; 28:249-68.
365. Yang CH, Sirotiak FM, Dembo M. Interaction between anions and the reduced folate/methotrexate transport system in L1210 cell plasma membrane vesicles: directional symmetry and anion specificity for differential mobility of loaded and unloaded carrier. *J Membr Biol.* 1984; 79:285-92.
366. Yoshinari K, Kobayashi K, Moore R, Kawamoto T, Negishi M. Identification of the nuclear receptor CAR:HSP90 complex in mouse liver and recruitment of protein phosphatase 2A in response to phenobarbital. *FEBS Lett.* 2003; 548:17-20.
367. Yoshinari K, Sueyoshi T, Moore R, Negishi M. Nuclear receptor CAR as a regulatory factor for the sexually dimorphic induction of CYB2B1 gene by phenobarbital in rat livers. *Mol Pharmacol.* 2001; 59:278-84.
368. You G. Towards an understanding of organic anion transporters: structure-function relationships. *Med Res Rev.* 2004; 24:762-74.
369. You G, Kuze K, Kohanski RA, Amsler K, Henderson S. Regulation of mOAT-mediated organic anion transport by okadaic acid and protein kinase C in LLC-PK(1) cells. *J Biol Chem.* 2000; 275:10278-84.
370. Zelcer S, Kellik M, Wexler LH, Shi W, Sankaran M, Lo S, et al. Methotrexate levels and outcome in osteosarcoma. *Pediatr Blood Cancer* 2005; 44:638-42.
371. Zelko I, Negishi M. Phenobarbital-elicited activation of nuclear receptor CAR in induction of cytochrome P450 genes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 277:1-6.
372. Zhang M, Chiang JY. Transcriptional regulation of the human sterol 12 α -hydroxylase gene (CYP8B1): roles of hepatocyte nuclear factor 4 α in mediating bile acid repression. *J Biol Chem.* 2001; 276:41690-9.
373. Zhang L, Wong SC, Matherly LH. Structure and organization of the human reduced folate carrier gene. *Biochim Biophys Acta.* 1998; 1442:389-93.
374. Zhao R, Assaraf YG, Goldman ID. A reduced folate carrier mutation produces substrate-dependent alterations in carrier mobility in murine leukemia cells and methotrexate resistance with conservation of growth in 5-formyltetrahydrofolate. *J Biol Chem.* 1998; 273:7873-9.
375. Zhao R, Gao F, Goldman ID. Reduced folate carrier transports thiamine monophosphate: an alternative route for thiamine delivery into mammalian cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2002; 282:1512-7.
376. Zhao R, Gao F, Wang Y, Diaz GA, Gelb BD, Goldman ID. Impact of the reduced folate carrier on the accumulation of active thiamin metabolites in murine leukemia cells. *J Biol Chem.* 2001; 276:1114-8.

377. Zhao R, Goldman ID. Resistance to antifolates. *Oncogene*. 2003; 22:7431-57.
378. Zhao R, Seither R, Brigle KE, Sharina IG, Wang Y, Goldman ID. Impact of overexpression of the reduced folate carrier (RFC1), an anion exchanger, on concentrative transport in murine L1210 leukemia cells. *J Biol Chem*. 1997; 272:21207-12.
379. Zhao R, Sharina IG, Goldman ID. Pattern of mutations that results in loss of reduced folate carrier function under antifolate selective pressure augmented by chemical mutagenesis. *Mol Pharmacol*. 1999; 56:68-76.
380. Zhou JH, Wu DZ. Reversal effect of haloperidol on doxorubicin resistance and chloride channel inhibition in erythroleukemic cell K562/Dox. *Chinese J Oncol*. 2005; 27:81-5.

Internet-Seiten:

Howard JH. Rat Genome Database (RGD) 2002 (zitiert vom 10.06.2002), RGD ID: RGD:70584 <http://rgd.mcw.edu/tools/genes/genes_view.cgi?id=3695>.

9 Anhang

Available online at www.sciencedirect.com

European Journal of Cell Biology 84 (2005) 677–686

European Journal
of Cell Biologywww.elsevier.de/ejcb

Endogenous expression of liver-specific drug transporters for organic anions in the rat hepatocytoma fusion cell line HPCT-1E3

Sandra Halwachs, Carsten Kneuer, Walther Honscha*

Institute of Pharmacology, Pharmacy and Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig, An den Tierkliniken 15, D-04103 Leipzig, Germany

Received 17 November 2004; received in revised form 26 January 2005; accepted 28 January 2005

Abstract

HPCT-1E3 cells, a fusion cell line between primary rat hepatocytes and Fao Reuber hepatoma cells H35, are immortalized hybrid cells with many phenotypic properties of liver parenchyma including phase I and II metabolism and bile acid secretion. Selective elimination of endogenous compounds and drugs by the liver involves transport proteins that complementarily mediate uptake and efflux in co-operation with metabolism, but the study of this function is limited by the unavailability of an integrated in vitro model. Therefore, we investigated the expression of some important liver-specific import and export carrier proteins for organic anions in this cell line. RT-PCR analysis indicated gene expression of Oat2, Oatp1a1, Oatp1a4, Oatp1b2, Rfc-1/MTX-1, FOLR, Mrp1-6, mdr1, and Lrp. Uptake and efflux as well as inhibition studies confirmed the functional activity of Oat, Oatp, Rfc-1, Mrp, and Mdr carriers. In conclusion, the hepatocyte-like HPCT-1E3 cell line shows endogenous expression of all liver-specific carrier proteins for organic anions and may hence represent a valuable in vitro model for the study of transport phenomena and their regulation in hepatocytes.

© 2005 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Keywords: Hepatocytes; Hepatocytoma; HPCT-1E3; Oat; Oatp; Rfc1; Mrp; Mdr1; Drug transporter; Organic anions

Introduction

Elimination of many physiological substances and drugs from the body is achieved by the concerted action of transport proteins at the basolateral membrane, intracellular phase I and phase II metabolism and secretion either into the blood at the basolateral, or the bile at the canalicular membrane of hepatocytes. In the last years, a number of carrier proteins with broad

substrate spectrum have been identified that mediate this import and export.

Uptake of organic anions at the basolateral membrane of rat hepatocytes is achieved by members of the organic anion transporter (Oat) family, organic anion transporting polypeptides (Oatp) and others, including the reduced folate carrier (Rfc-1). Oat2 (Slc22a7) and Oat3 (Slc22a8) are expressed in the liver, where Oat2 is responsible for the uptake of para-aminohippurate (PAH), salicylate and methotrexate (Mtx), while PAH, oestrone sulphate and cimetidine are typical substrates for Oat3 (Kusuhara et al., 1999; Sekine et al., 1998; Simonson et al., 1994). Oat3 expression in rat liver is probably gender specific (Buist et al., 2002; Kobayashi

*Corresponding author. Tel.: +49 341 973 8132;
fax: +49 341 973 8149.

E-mail address: honscha@vetmed.uni-leipzig.de (W. Honscha).

et al., 2002) while Oat1 (Slc22a6) was found in the kidneys (Sekine et al., 1997). Oatps are responsible for the sodium-independent uptake of a large variety of other organic anions including steroids, thyroid hormones and numerous drugs (Cattori et al., 2001; Hagenbuch and Meier, 2004). Rat Oatp1a1 (Slc10a1), Oatp1a4 (Slc10a4) and Oatp1b2 (Slc10b2; LST-1) are predominantly expressed in rat liver (Eckhardt et al., 1999; Cattori et al., 2001; Reichel et al., 1999). In contrast, Oatp1a3 (Slc10a3, OAT-K) is localized in renal proximal tubules (Hagenbuch and Meier, 2004; Saito et al., 1996) and Oatp1a5 (Slc10a5, Oatp3) is found in kidney, small intestine, retina, and brain (Abe et al., 1998; Cattori et al., 2001; Hagenbuch and Meier, 2004). The reduced folate carrier (Slc19a1; Rfc-1), previously also called methotrexate carrier-1 (MTX-1), is responsible for the exchange of reduced folates, antifolates and, with lower affinity, folates (Honscha et al., 2000; Wong et al., 1995). It is expressed at least in liver, kidney and intestine, where it may co-operate with the folate receptor (FOLR; Sierra and Goldman, 1999).

Excretion of conjugated organic anion drugs and lipophilic unconjugated xenobiotics is mediated by members of the multidrug resistance-associated protein family (Mrp) and P-glycoprotein (P-gp) (Litman et al., 2001). The conjugate export pumps rat Mrp1 (Abcc1), Mrp2 (Abcc2) and Mrp3 (Abcc3) belong to the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily, subfamily C. Rat Mrp1 and Mrp3 are located at the basolateral membrane while Mrp2 is found on the canalicular membrane of hepatocytes, but all extrude similar bulky organic anions of endogenous and exogenous origin (Borst et al., 2000). The canalicular efflux transporter P-gp is encoded by the *mdr* gene family, which consists of two members in humans (MDR1 [ABCB1] and MDR3 [ABCB4]) and three members in rodents (Mdr1a [Abcb1a], Mdr1b [Abcb1b] and Mdr2 [Abcb4]; Roninson, 1992), but only Mdr1 confers the MDR phenotype (Devault and Gros, 1990; Roninson, 1992). It is expressed in several tissues including kidney and liver (Brady et al., 2002; Silverman and Schrenk, 1997) and contributes to the broad chemoresistance of hepatocytes known as intrinsic multidrug resistance (MDR; Devault and Gros, 1990; Roninson, 1992). Finally, the intracellular lung resistance protein (Lrp) is involved in removal of organic anions from the cytoplasm of hepatocytes into intracellular vaults, but its level of expression is known to vary interindividually and under pathological conditions (Izquierdo et al., 1996; Raidl et al., 2002).

The investigation of transport phenomena involving the above mentioned hepatic carrier proteins currently rely either on (i) whole animal and isolated tissue models or (ii) transiently and stably transfected cell clones. However, Cui et al. (2001) and others have highlighted, that a tissue-like expression of import as well as export

carriers, possibly in conjunction with adequate metabolic capacity, is required to fully reflect the in vivo situation in an in vitro environment. Unfortunately, such an in vitro model does currently not exist. HepG2 hepatoma cells, although secreting bile-like fluids and expressing high levels of MRP and MDR family members including at least ABCC1, 2, 3, 6, and ABCB1, do not possess the corresponding import carriers like OATs and OATPs (Cui et al., 2003). Some years ago, Petzinger et al. (1994) obtained a hepatocytoma cell line (HPCT-1E3) by fusion of primary rat hepatocytes and Fao Reuber hepatoma H35 cells that exhibits many functional characteristics of differentiated rat hepatocytes, e.g. synthesis, uptake and secretion of bile acids (Blumrich et al., 1994; Utesch et al., 1992), phase I and phase II metabolism (Utesch et al., 1992) and carbohydrate metabolism (Katz et al., 1992) – but information on organic anion transport was not available.

This hybrid cell line might provide a permanent cell culture model for the study of certain liver parenchyma properties in vitro. Therefore, the main objective of this study was to obtain information regarding endogenous expression of rat Oat2, Oat3, Oatp1a1, Oatp1a4, Oatp1b2, Rfc-1, FOLR, Mdr1, Mrp1-3, and Lrp and the functional activity of selected transporters.

Materials and methods

All chemicals including media and supplements were obtained from Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Germany) unless stated otherwise.

Cell culture

The rat hepatocytoma cell line HPCT-1E3 was donated by E. Petzinger (Justus-Liebig-University, Giessen, Germany) and maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% (v/v) serum (Gibco, Karlsruhe, Germany), 2 mM glutamine, 10 µg/ml insulin, 10 µg/ml inosine and 1.5 µM dexamethasone. Cells were sub-cultured using trypsin/EDTA every 3–4 days.

RT-PCR

Liver and kidney tissues were obtained from male Sprague-Dawley (SD) rats of approximately 200 g weight. Total RNA was prepared from liver, kidney and 5×10^6 HPCT-1E3 cells grown to confluence using the RNeasy Mini system (Qiagen, Hilden, Germany). Reverse transcription into cDNA using 1 µg total RNA was performed under standard conditions and PCR amplification was carried out over 40 cycles using 1/20 of the cDNA. Specific primers for Oatp1b2, FOLR,

Table 1. Primers pairs for RT-PCR analysis and size of the expected PCR products

Carrier	Primer pairs (5–3')	Size (bp)	T_m (°C)	Reference
rOat1	ACAAGCAAGGACAACCCGAA AGACATAGCCAATCAAGGTGCC	479	58	Kudo et al. (2002)
rOat2	GCAGCCTCCATCAACTACATCA GCGCACAAGGAAGTAGACCATA	626	58	Kudo et al. (2002)
rOat3	TGGAGGACCTGTGATTGGAGAA ATAGAACCAGCCAGCGTATGGA	391	58	Kudo et al. (2002)
rOatp1a1	CATGAGTGTACTTCTCTCTTGG ATTCTGCTGGGTCTTGCGTTGG	531	58	Kudo et al. (2002)
rOatp1a4	GCCTAAGTATCTGGAACAGCAA CAGCGAGTATATGAAACAGCCA	540	58	Kudo et al. (2002)
rOatp1b2 (rLST 1)	GCCCAACCTTCACGATCAAA GCCAAGGATTGGTCCAATCAT	624	58	
rOatp1a3	TCGCATTCTGCCTATCCTTGTC GCCTTTATTACACAGCCCCAGG	319	58	Kudo et al. (2002)
rMrp1	CTTGCCCTGACAAGCTGAACCAT AGGCTCTGGCTTGCTCTATAAA	735	58	Serrano et al. (2003)
rMrp2	AAGCGCGAGGAGAGCATTAT ACGCACATTCCCAACACAAA	1226	56	Serrano et al. (2003)
rMrp3	CAGCGACAACGGGTGAGTTT TCGGTGTCTGTCTCAGGTCTGTGT	404	58	Serrano et al. (2003)
rMrp4	GGACACTGAACTAGCAG GTCTGCTGTCAATGATGG	229	50	Hirrlinger et al. (2002)
rMrp5	GGAACGGCAGTTGTTAT CTTGACAGCCACCTTG	310	50	Hirrlinger et al. (2002)
rMrp6	ACCAGTGATGACCTTGGAGG CCACAATAGCCAGTGGTGTG	664	60	Hirrlinger et al. (2002)
rmdr1	TCCTGATGGAGTTTGAAGAGG TCGGTCAGAATGCGGGTCT	266	58	
rLRP	TATGTGCCATCTGCCAAAGTGAG TGTGTCCTTCTACCCCGTC	234	58	
Rfc-1	GGCAATGGGCACAAGGAAC GGAGCCTTGCCCTGTGAG	476	54	Honscha et al. (2000)
rFOLR	GGCCAGGACCGAACTTCTCAA ATTATGCCCCGAGGTCCAGTTC	418	58	
G3PDH	ACCACAGTCCATGCCATCAC TCCACCACCCTGTTGCTGTA	441	58	

mdr1, LRP, and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) were designed using PrimerSelect (DNASar Inc., Madison, WI). All gene-specific primer pairs and annealing temperatures are listed in Table 1. The PCR products were analysed by agarose gel electrophoresis with regard to size and presence of the expected fragment. G3PDH was used as positive control and amplification of genomic DNA was excluded by omitting reverse transcriptase.

Transport assays

After 3 days in culture, cells displayed a differentiated phenotype and all transport activities were measured at this point of time. With exception of Oat, 24- or 96-well plates were used to investigate the transport protein activity in Tyrode salt solution (137 mM NaCl, 3 mM

KCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 5.5 mM glucose) buffered with 10 mM Hepes to pH 7.4. Suitable marker substrates and inhibitors of the carrier under investigation were added and the intracellular content was determined 30 min later after two washing steps using ice-cold incubation buffer and cell lysis with 1% SDS. Protein was measured using the bicinchoninic acid (BCA) protein assay (Pierce, Rockford, IL) and uptake was expressed as pmol per well or per mg protein.

The Oatp substrate dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-S) was added at concentrations of 10–300 μM for 30 min. Intracellular DHEA-S content was determined by ELISA (IBL, Hamburg, Germany). Triiodothyronine (T₃, 10 μM) was added for inhibition studies.

Fluoresceinated methotrexate (FMTX, Molecular Probes, Eugene, NL) was used as substrate for Rfc-1 at a concentration of up to 10 μM, and intracellular

content was assayed in a fluorescence microplate reader (485/535 nm). Sodium-free Choline-Tyrode salt solution (137 mM choline chloride, 3 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 5.5 mM glucose) was used to study the effect of sodium depletion.

Mrp activity was investigated using the Calcein AM (CaAM) assay which measures a reduction in cellular accumulation of fluorescent calcein as the result of Mrp export. CaAM (Calbiochem, Bad-Soden, Germany) was added at a concentration of 3 μM in absence or presence of (3-(3-(2-(7-chloro-2-quinidiny)ethenyl-phenyl))-(3-dimethyl amino-3-oxo propyl)thio)methylthio)propanoic acid (MK571, 50 μM, Alexis, Grünberg, Germany) and Cyclosporin A (CsA, 10 μM, Calbiochem, Bad-Soden, Germany) as Mrp inhibitors. Calcein accumulation was followed spectrophotometrically (488/535 nm) in 15 min intervals over 60 min and was quantified as relative fluorescence units (RFU) per well. Mrp-mediated efflux of fluoresceinated methotrexate (10 μM) and [³H]methotrexate (5 μM, 3333 dpm/nmol) was measured indirectly as accumulation in absence or presence of 50 μM MK571 over 30 min.

For measurement of Mdr1 activity, HPCT-1E3 cells were loaded with 50 μM rhodamine 123 (Rh123, Molecular Probes, Eugene, NL) over 30 min. This was followed by an efflux phase for 60 min in absence or presence of 10 and 50 μM of the specific inhibitor verapamil (Fluka, Taufkirchen, Germany). Intracellular content was measured via fluorescence spectrophotometry (488/535 nm).

For determination of Oat2 activity, differentiated HPCT-1E3 cells were harvested, washed and allowed to recover in fresh culture medium. Cell viability was >95% by trypan blue exclusion. Medium was replaced by Tyrode buffer, and salicylate stock solution containing 2×10^5 dpm of [¹⁴C]salicylate (55.5 mCi/mmol, PerkinElmer, Boston, MA) was added to yield final concentrations ranging from 5 to 100 μM. After incubation with [¹⁴C]salicylate for 2 min, the assay was stopped by centrifugation of 100 μl aliquots through a silicon oil cushion. The pelleted cells were dissolved in 4 M KOH overnight and the incorporated radioactivity was measured by liquid scintillation counting. For inhibition studies, 1 mM probenecid and 1 mM taurocholate were added 5 min prior to the incubation with 50 μM [¹⁴C]salicylate.

All transport activities are given as mean ± SD of at least duplicate measurements or as mean ± SEM of six replicates as indicated.

Kinetic and statistical analyses

K_m and V_{max} values were obtained by fitting to the Michaelis-Menten equation using the least square method and confirmed by Lineweaver-Burk plot.

Preliminary experiments were performed to ensure that K_m and V_{max} determinations were performed within the linear range (uptake vs. time). Student's *t*-test was used to evaluate the significance of differences between respective measurements. Statistical significance was assumed at *P* values of ≤0.05. Prior to data analysis, a G-test was applied to eliminate outliers.

Results

Transporter gene expression

To obtain an overview about the endogenous expression of organic anion transporter genes in the HPCT-1E3 cell line, we performed an RT-PCR analysis and compared the expression profile to that of rat liver and kidney. As illustrated in Fig. 1, transcripts for Oat2, Oatp1a1, Oatp1a4, Oatp1b2, Rfc-1, FOLR, Lrp, Mrp1, Mrp2, Mrp3, and mdr1 were detected in the hepatocytoma fusion cell line. This expression profile was almost identical to that found for rat liver, with the exception of Oat3. RNA of the latter was at the limit of detection in hepatic tissue but undetectable in HPCT-1E3 cells. From rat kidney RNA, we additionally obtained cDNA fragments of the expected size for Oat1 and Oat3. Expression of Mrp family members 4, 5 and 6 was detected in all three sources, albeit at low to very low (Mrp6) levels (not shown).

When comparing the apparent level of gene expression for the individual carriers between the RNA sources, FOLR expression can be ranked higher in rat kidney than in HPCT-1E3 cells and rat liver. Conversely, a stronger signal was obtained for Oatp1a4 and

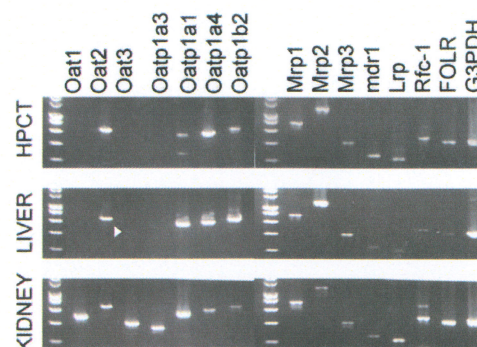


Fig. 1. Expression of transporters for organic anions in HPCT-1E3 cells, rat liver and kidney as assessed by RT-PCR analysis. Total RNA was isolated and used for RT-PCR analysis as described in the Materials and methods section. Sizes of expected PCR products and the specific primers that were used are listed in Table 1. An arrowhead indicates the weak band obtained for Oat3 in liver tissue. RT-PCR of G3PDH was carried out as a positive control.

Mrp2 in rat liver and HPCT-1E3 cells than in rat kidney. Differences in the apparent gene expression levels between HPCT-1E3 cells and rat liver were less pronounced and observed only for Oatp1a1 (lower in HPCT-1E3) and Rfc1 (higher in HPCT-1E3).

Transporter activity – uptake

Salicylic acid is a substrate of all currently known Oat family members. As shown in Fig. 2A, [^{14}C]salicylate uptake by HPCT-1E3 cells over 2 min was saturable with a K_m of $43.8 \pm 15.1 \mu\text{M}$ and a V_{max} of $621.9 \pm 100.2 \text{ pmol/mg protein}$. Presence of 1 mM probenecid and taurocholate inhibited uptake significantly in comparison to control cells treated with $50 \mu\text{M}$ salicylate by 25% and 34%, respectively (Fig. 2B).

To confirm the functional Oatp activity in HPCT-1E3 cells, the transport of DHEA-S, a known substrate of many Oatps including those detected by RT-PCR (Oatp1a1, Oatp1a4, Oatp1b2) (Sekine et al., 1997), was investigated. DHEA-S uptake was concentration

dependent and biphasic (Fig. 3A). High-affinity uptake ($K_m = 17.8 \pm 17.9 \mu\text{M}$, $V_{\text{max}} = 243.6 \pm 89.3 \text{ pmol/mg}$) dominated at concentrations below $50 \mu\text{M}$ DHEA-S, whereas a K_m value between 50 and $300 \mu\text{M}$ was estimated for the low-affinity fraction. Furthermore, addition of $10 \mu\text{M}$ of the competitive inhibitor triiodothyronine (Cattori et al., 2001) resulted in a significant decrease of DHEA-S uptake ($200 \mu\text{M}$) by approximately $250 \text{ pmol/mg protein}$ (Fig. 3B). This amounts to 25% of the total DHEA-S uptake and may correspond to the high-affinity fraction at this concentration.

Rfc-1 represents one major pathway for the uptake of reduced folates as well as many hydrophilic antifolates including Mtx and its fluoresceinated derivative FMTX. FMTX uptake was saturable with a K_m of $3.4 \pm 0.9 \mu\text{M}$ and a V_{max} of $22.2 \pm 2.4 \text{ pmol/mg protein}$, indicating the presence of a high-affinity, but low-capacity transport

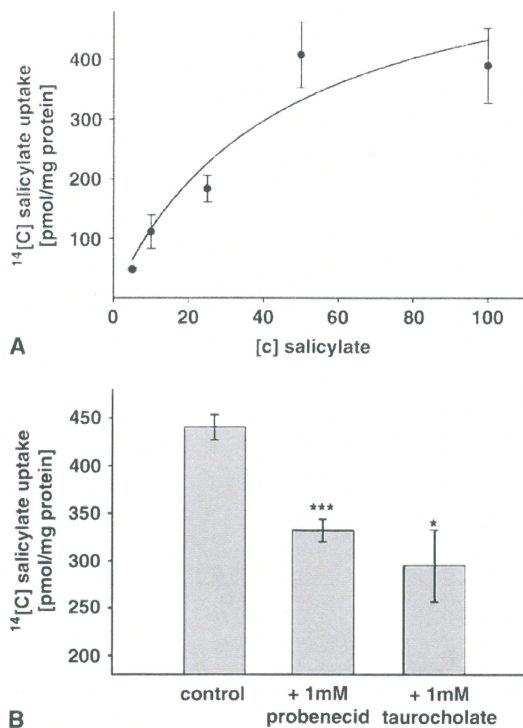


Fig. 2. Oat2 activity in HPCT-1E3 cells measured as [^{14}C]salicylate uptake. For uptake measurements, HPCT-1E3 cells were cultured and harvested as described. (A) Concentration-dependent uptake of [^{14}C]salicylate within 2 min. (B) Inhibition of the uptake ($50 \mu\text{M}$ [^{14}C]salicylate) over 2 min in absence (control) or presence of probenecid (1 mM) and taurocholate (1 mM), respectively (mean \pm SEM, * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$; $n = 6$).

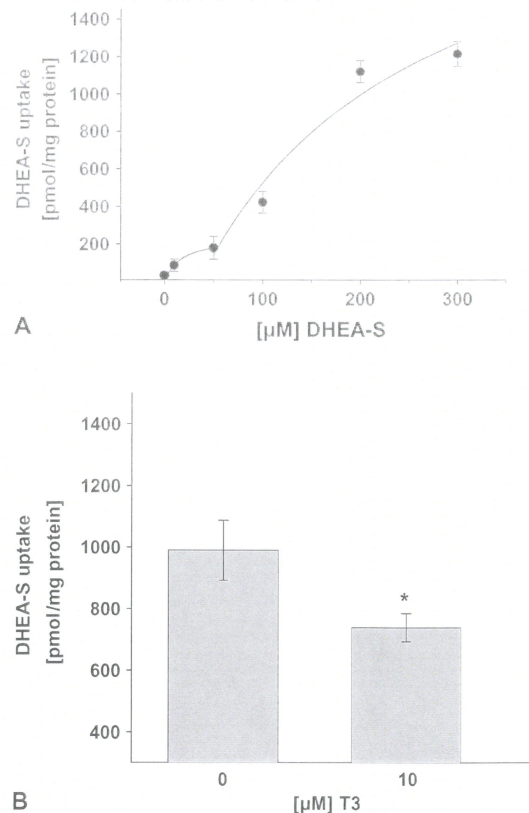
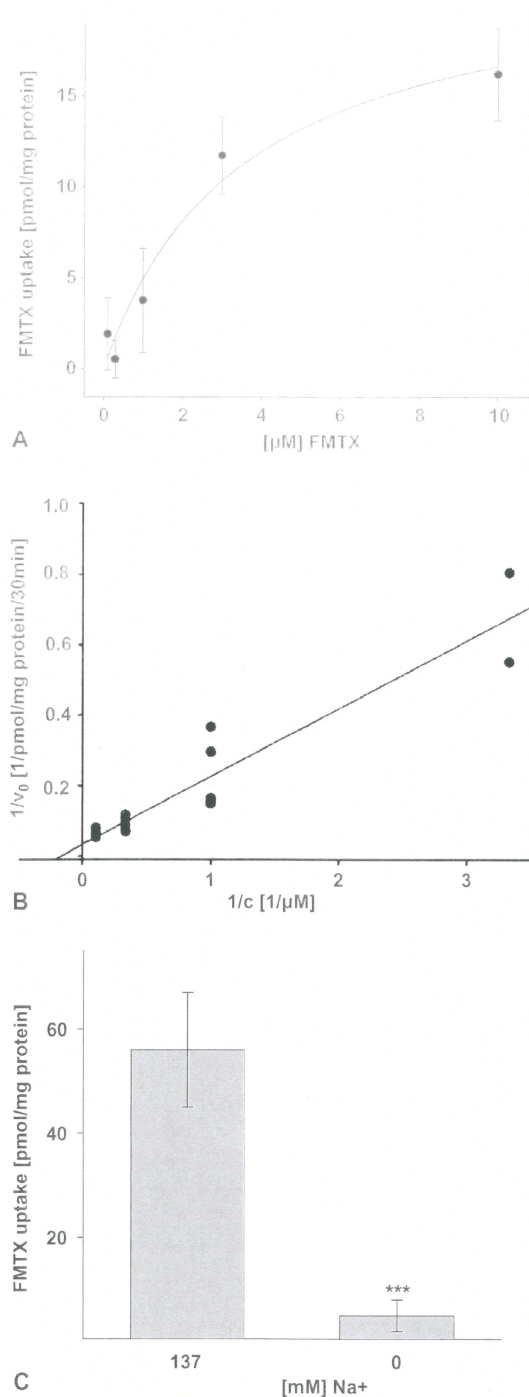


Fig. 3. Oatp activity in HPCT-1E3 cells measured as DHEA-S uptake. HPCT-1E3 were seeded onto 24-well plates at a density of 60,000 per well and grown until they displayed a differentiated phenotype. Cells were exposed to various concentrations of DHEA-S (A; $n = 2$) or to $200 \mu\text{M}$ DHEA-S in absence or presence of the Oatp inhibitor T3 (B; $n = 3$) for 30 min. The Oatp-mediated DHEA-S uptake was determined using a DHEA-S ELISA (* $P < 0.05$).

system in HPCT-1E3 cells (Fig. 4A, B). A distinct property of rat liver Rfc-1 is its requirement for extracellular sodium at neutral pH (Kneuer and Honscha, 2004). As shown in Fig. 4C, FMTX uptake was sodium-dependent to 90% at pH 7.4.



Efflux transporter activity

CaAM and the fluorescent hydrolysis product calcein are extruded by various members of the ABC transporter superfamily, including Mrp1, Mrp2 and Mrp3. Mrp activity can be inhibited by the leukotriene LTD4 receptor antagonist MK571 or CsA. As shown in Fig. 5, addition of either 50 μM MK571 or 10 μM CsA significantly enhanced calcein accumulation in HPCT-1E3 cells. In contrast, substrate efflux was not inhibited by addition of the Mdr-specific inhibitor verapamil.

Furthermore, Mrp activity contributed to the efflux of FMTX and [³H]MTX. Inhibition of Mrp by 50 μM MK571 resulted in a 3-fold increased intracellular accumulation of FMTX. Although the effect on the accumulation of [³H]MTX was not as pronounced, it was still highly significant (Fig. 6). Analysis of the time course further revealed that the initial influx was not affected (not shown).

Rat Mdr1 activity in HPCT-1E3 cells was studied using 50 μM Rh123 as a specific substrate of Mdr1-mediated efflux. Addition of verapamil, a specific Mdr inhibitor, resulted in a concentration-dependent and highly significant reduction of Rh123 efflux from Rh123-loaded HPCT-1E3 cells. In comparison to the untreated control, intracellular Rh123 content after a 60-min efflux period was increased approximately 6-fold in the presence 50 μM verapamil (Fig. 7).

Discussion

Usually, dedifferentiated cell lines are transfected with the respective cDNA in order to study drug transport by specific carrier proteins. This strategy avoids the presence of interfering transporters with overlapping substrate specificities that hamper an isolated characterization of this carrier protein. However, an in vitro model that reflects the in vivo system more closely would be desirable for other investigations such as drug-drug interactions, regulation of carrier expression, or import-metabolism-export coupling. Unfortunately, primary hepatocytes are limited in this context, as they do not

Fig. 4. Rfc-1 activity in HPCT-1E3 cells measured as sodium-dependent uptake of fluoresceinated methotrexate. HPCT cells were grown in 96-well plates until reaching a differentiated phenotype. Medium was replaced by Tyrode salt solution (A–C) or sodium-free Choline-Tyrode salt solution (C). Intracellular FMTX content was measured spectrofluorometrically after incubation with various concentrations of FMTX up to 10 μM for 30 min (A; $n = 8$). (B) Corresponding Lineweaver-Burk plot. (C) Sodium-dependency of FMTX uptake (10 μM) was tested by replacement of sodium with choline (** $P < 0.001$; $n = 8$).

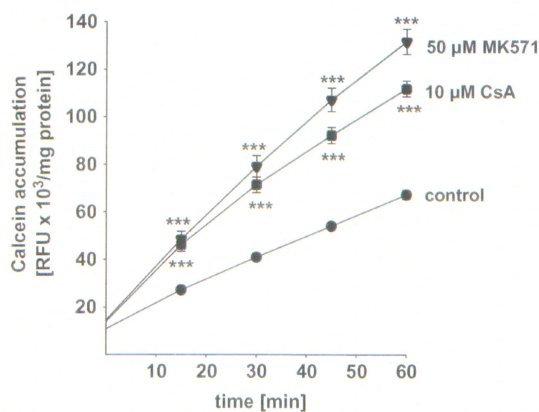


Fig. 5. Mrp1-3 activity in HPCT-1E3 cells measured as calcein efflux inhibition. Cells were seeded at a density of 10,000 per well, grown until they displayed a differentiated phenotype and loaded with 3 μ M CaAM over 60 min in absence or presence of 50 μ M MK571 and 10 μ M CsA as specific Mrp inhibitors. Mrp efflux activity was detected as inhibitor-sensitive reduction of the intracellular accumulation of the fluorescent hydrolysis product calcein over time ($***P < 0.001$; $n = 8$).

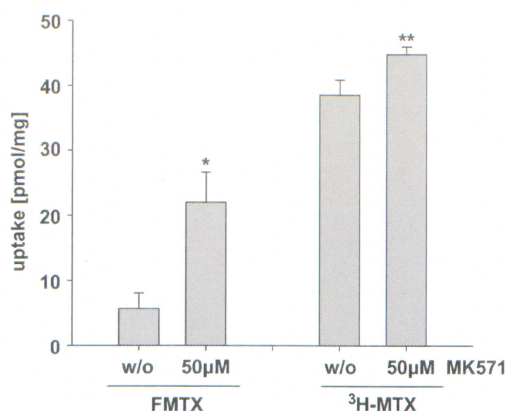


Fig. 6. Increased accumulation of FMTX and [³H]MTX by inhibition of Mrp1-3-mediated export with MK571. Differentiated HPCT-1E3 cells were incubated with 10 μ M FMTX or 5 μ M [³H]MTX in absence or presence of 50 μ M MK571 for 30 min and the intracellular content was measured spectrofluorometrically or by liquid scintillation counting, respectively ($*P < 0.05$, $**P < 0.01$; FMTX: $n = 6$, [³H]MTX: $n = 5$).

proliferate in culture and rapidly lose many phenotypic properties during the first 48 h (Föllmann et al., 1990; Guillouzo et al., 1990). Continuously growing rat and human hepatoma cells like Fao Reuber hepatoma cells, HepG2 and HuH7 show only a restricted endogenous expression of transport proteins while such information about the less established H7721, PLC/PRF/5 and Chang liver cells is limited. For example, MDR1, MRP1-3 and MRP6 export activity was present and

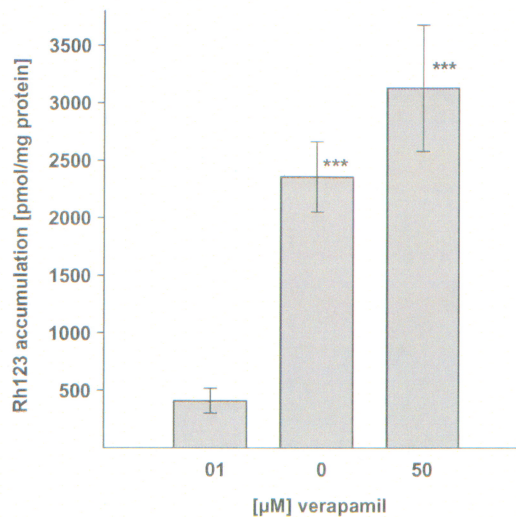


Fig. 7. Mdr1 activity in HPCT-1E3 cells measured as rhodamine 123 efflux inhibition. Mdr1-mediated efflux activity was studied using 50 μ M Rh123 as a specific substrate and 10 and 50 μ M verapamil as specific inhibitor. HPCT-1E3 cells were loaded with 50 μ M Rh123 for 30 min. After 2 washing steps with Tyrode solution, Mdr1-mediated efflux was allowed in presence or absence of the inhibitor. Finally, the intracellular Rh123 retention was measured ($***P < 0.001$; $n = 8$).

inducible in the human hepatoma cell lines HuH7 and HepG2 (Lee and Piquette-Miller, 2003) but import carriers of the OAT and OATP families were missing (Cui et al., 2003). In contrast to hepatocytes, Fao Reuber and human HepG2 exhibited only a weak or undetectable transport of methotrexate (Honscha and Petzinger, 1999). Human hepatocellular carcinoma cells expressed the sodium-dependent bile acid transporter NTCP, but other transport activities were missing (Kullak-Ublick et al., 1997). Finally, WIF-B cells, a clone obtained by fusion of rat Fao hepatoma cells and primary human fibroblasts, is forming bile canaliculi-like vesicles into which fluorescein-diacetate is secreted after intracellular hydrolysis (Ihrke et al., 1993). These cells have been successfully used to study the process of polarisation, but little is known about the expression of metabolic enzymes and drug carriers apart from the documented presence of Mrp2 (Nies et al., 1998). This situation prompted us to investigate the expression and activity of import as well as export carriers for organic anions in the hepatocytoma fusion cell line HPCT-1E3 which was already known to share a number of tissue-specific activities with normal liver cells.

RT-PCR analysis revealed, that the expression profile of organic anion carriers in HPCT-1E3 cell cultures was almost identical to that of rat liver and clearly distinct from that of kidney. More importantly, the functional activity of the import carriers Oat2, Oatp1a1, Oatp1a4,

Oatp1b2, Rfc-1, and the export carriers Mrp and Mdr1 could be confirmed experimentally.

In accordance with earlier results (Buist et al., 2002), Oat1 was detected neither in HPCT-1E3 cells nor in liver, but in kidney. The level of Oat2 expression in liver (Sekine et al., 1998; Kobayashi et al., 2002) and kidneys of adult male SD rats (Buist et al., 2002) is consistent with previous findings. More importantly, HPCT-1E3 cells also showed a strong Oat2 expression. The K_m value of 44 μM for [^{14}C]salicylate was in the same range ($81 \pm 19 \mu\text{M}$) as determined by Morita et al. (2001). Furthermore, this uptake was also sensitive to probenecid and taurocholate. These substances were previously identified as strong Oat2 inhibitors (Morita et al., 2001). Hepatic Oat3 expression must be discussed in the context of gender and hormone dependency as it was observed in male or testosterone-treated castrated Wistar rats, but not in females and castrated males (Kobayashi et al., 2002). Similar observations were made in SD rats, although hepatic expression levels were generally only moderate but high in kidney (Buist et al., 2003). While the hepatocytes used for generation of the HPCT-1E3 cell line were obtained from adult male Wistar rats, its culture is carried out without supplementation of male sex hormones. Hence, it is not surprising that no Oat3 expression was detected in HPCT-1E3 cells and it may be speculated that such Oat3 expression could be sex hormone inducible.

Oatp expression in HPCT-1E3 cells also correlated well with that of rat liver tissue. Oatp1a3 mRNA was found at high levels in kidney but not in HPCT or liver, while Oatp1a1, Oatp1a4 and Oatp1b2 mRNA was detected in all sources, in line with previous reports (Hagenbuch and Meier, 2004). DHEA-S is a common substrate of Oatp1a1, Oatp1a4 and Oatp1b2 with K_m values of 5, 17 and 5 μM , respectively (Cattori et al., 2001). For the uptake of DHEA-S into HPCT-1E3 cells, we observed a high-affinity uptake with a K_m of 18 μM . The low-affinity DHEA-S uptake into HPCT cells (estimated K_m 50–300 μM) might be due to Oatp1a5, for which a K_m of 162 μM was reported (Cattori et al., 2001). Although there are reports about low to moderate levels in the liver, Oatp1a5 expression was not investigated here as this carrier is mainly located in the intestinal tract. Finally, addition of 10 μM triiodothyronin (T3), inhibited DHEA-S uptake by 25% at a substrate concentration of 200 μM . T3 binds to Oatp1a4 with a K_m of 5.9 μM , while its affinity for Oatp1a1 and Oatp1b2 is lower although absolute numbers were not reported (Cattori et al., 2001). According to Michaelis-Menten kinetics, the inhibition of Oatp1a4-mediated DHEA-S uptake by 10 μM T3 should amount to 20% at a substrate concentration of 200 μM as used here. In combination with the data from the RT-PCR analysis, where Oatp1a4 produced the strongest signal, this may suggest that DHEA-S uptake in HPCT-1E3 cells is dominated by Oatp1a4, while a minor

contribution of other family members is likely. Full elucidation of this issue would require evaluation of a palette of subtype-specific substrates such as digoxin (Noc et al., 1997) and others.

The third type of import carrier that we evaluated on the functional level was the reduced folate carrier. Again, a saturable uptake of FMTX was observed and the K_m value of 3.4 μM was in the range that can be expected from the literature (Wong et al., 1995; Rajgopal et al., 2001). Sodium-dependency at neutral pH confirmed the contribution of this transporter to FMTX uptake (Kneuer and Honscha, 2004; Honscha and Petzinger, 1999).

Finally, mRNA expression and functional activity of the efflux transporter families Mrp and Mdr could be unequivocally demonstrated in HPCT-1E3 cultures. RT-PCR analysis showed that the relative expression of Mrp1, 2 and 3 followed the same profile as in normal rat liver tissue with Mrp2, also known as the canalicular multi-specific organic anion transporter (cMOAT), being present at the highest levels (Cherrington et al., 2002). This was confirmed by a pronounced increase in calcein accumulation after treatment with MK 571, an established substrate and inhibitor of rat Mrp2 (Cui et al., 2001). Very likely, Mrp2 is also the prevailing family member in HPCT-1E3 cells. A major contribution of family members 4–6 to the MK 571-sensitive calcein export observed here is unlikely. The human homologues of Mrp 4 and 5 do not reduce cellular fluorescence after treatment with calcein AM (Masereeuw et al., 2003; McAleer et al., 1999), and the concentration of Mrp6 RNA was at the level of detection. Moreover, calcein efflux by Mrp6 was reported to be verapamil sensitive (Boraldi et al., 2003), but an increase in cellular fluorescence of HPCT-1E3 cells treated with 50 μM verapamil could not be detected (not shown). This is in agreement with a comparison of Mrp2 and Mrp6 by Madon et al. (2000), who came to the conclusion that Mrp6 does not play a major role in organic anion excretion by normal rat liver.

Regarding mdr1, a basal mRNA expression and protein activity is well known from liver, but also from kidney (Silverman and Schrenk, 1997; Brady et al., 2002). Although, the RT-PCR signal obtained from HPCT-1E3 RNA was slightly stronger than that for liver tissue, this difference alone would not justify a classification as over-expression. Instead, it may reflect an up-regulation in response to culture conditions as Akazawa et al. (2002) previously reported a reduction in Rh123 accumulation in primary hepatocytes after 3 days of culture to approximately 500 pmol/mg protein – the same level as observed here.

In conclusion, HPCT-1E3 cells possess, in addition to the previously reported phenotypic and functional properties of liver parenchyma, all liver-specific organic anion transport systems that were investigated. This

immortalized hepatocyte-like hybrid cell line may hence represent a suitable in vitro model for the study of more complex liver functions and fill the gap between transfected tumour cells and isolated tissue. Obviously, one could not study all known hepatic carriers, but we aimed to include a set of import and export proteins with broad substrate spectrum that are relevant to drug deposition. Currently, we are successfully employing this model to investigate the regulation of hepatic drug transporters in vitro.

Acknowledgements

We thank E. Petzinger (Justus-Liebig-University, Giessen, Germany) for donating the HPCT-1E3 cell line. This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (HO 2103/1-2).

References

- Abe, T., Kakyo, M., Sakagami, H., Tokui, T., Nishio, T., Tanemoto, M., Nomura, H., Hebert, S.C., Matsuno, S., Kondo, H., Yawo, H., 1998. Molecular characterization and tissue distribution of a new organic anion transporter subtype (oatp3) that transports thyroid hormones and taurocholate and comparison with oatp2. *J. Biol. Chem.* 273, 22395–22401.
- Akazawa, Y., Kawaguchi, H., Funahashi, M., Watanabe, Y., Yamaoka, K., Hashida, M., Takakura, Y., 2002. Effect of interferons on P-glycoprotein-mediated rhodamine-123 efflux in cultured rat hepatocytes. *J. Pharm. Sci.* 91, 2110–2115.
- Blumrich, M., Zeyen-Blumrich, U., Pagels, P., Petzinger, E., 1994. Immortalization of rat hepatocytes by fusion with hepatoma cells. II. Studies on the transport and synthesis of bile acids in hepatocytoma (HPCT) cells. *Eur. J. Cell Biol.* 64, 339–347.
- Boraldi, F., Quaglino, D., Croce, M.A., Garcia Fernandez, M.I., Tiozzo, R., Gheduzzi, D., Bacchelli, B., Pasquali Ronchetti, I., 2003. Multidrug resistance protein-6 (MRP6) in human dermal fibroblasts. Comparison between cells from normal subjects and from pseudoxanthoma elasticum patients. *Matrix Biol.* 22, 491–500.
- Borst, P., Evers, R., Kool, M., Wijnholds, J., 2000. A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J. Natl. Cancer Inst.* 92, 1295–1302.
- Brady, J.M., Cherrington, N.J., Hartley, D.P., Buist, S.C., Li, N., Klaassen, C.D., 2002. Tissue distribution and chemical induction of multiple drug resistance genes in rats. *Drug Metab. Dispos.* 30, 838–844.
- Buist, S.C., Cherrington, N.J., Choudhuri, S., Hartley, D.P., Klaassen, C.D., 2002. Gender-specific and developmental influences on the expression of rat organic anion transporters. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 301, 145–151.
- Buist, S.C., Cherrington, N.J., Klaassen, C.D., 2003. Endocrine regulation of rat organic anion transporters. *Drug Metab. Dispos.* 31, 559–564.
- Cattori, V., van Montfoort, J.E., Stieger, B., Landmann, L., Meijer, D.K., Winterhalter, K.H., Meier, P.J., Hagenbuch, B., 2001. Localization of organic anion transporting polypeptide 4 (Oatp4) in rat liver and comparison of its substrate specificity with Oatp1, Oatp2 and Oatp3. *Pflügers Arch.* 443, 188–195.
- Cherrington, N.J., Hartley, D.P., Li, N., Johnson, D.R., Klaassen, C.D., 2002. Organ distribution of multidrug resistance proteins 1, 2 and 3 (Mrp1, 2 and 3) mRNA and hepatic induction of Mrp3 by constitutive androstane receptor activators in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 300, 97–104.
- Cui, Y., König, J., Keppler, D., 2001. Vectorial transport by double-transfected cells expressing the human uptake transporter SLC21A8 and the apical export pump ABCB2. *Mol. Pharmacol.* 60, 934–943.
- Cui, Y., König, J., Nies, A.T., Pfannschmidt, M., Hergt, M., Franke, W.W., Alt, W., Moll, R., Keppler, D., 2003. Detection of the human organic anion transporters SLC21A6 (OATP2) and SLC21A8 (OATP8) in liver and hepatocellular carcinoma. *Lab. Invest.* 83, 527–538.
- Devault, A., Gros, P., 1990. Two members of the mouse mdr gene family confer multidrug resistance with overlapping but distinct drug specificities. *Mol. Cell. Biol.* 4, 1652–1663.
- Eckhardt, U., Schroeder, A., Stieger, B., Höchli, M., Landmann, L., Tynes, R., Meier, P.J., Hagenbuch, B., 1999. Polyspecific substrate uptake by the hepatic organic anion transporter Oatp1 in stably transfected CHO cells. *Am. J. Physiol.* 276, G1037–G1042.
- Föllmann, W., Petzinger, E., Kinne, R.K., 1990. Alterations of bile acid and bumetanide uptake during culturing of rat hepatocytes. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 258, C700–C712.
- Guillouzo, A., Morel, F., Ratanasavanh, D., Chesne, C., Guguen-Guillouzo, C., 1990. Long-term culture of functional hepatocytes. *Toxicol. In Vitro* 4, 415–427.
- Hagenbuch, B., Meier, P., 2004. Organic anion transporting polypeptides of the OATP/SLC21 family: phylogenetic classification as OATP/SLCO superfamily, new nomenclature and molecular/functional properties. *Pflügers Arch.* 447, 653–665.
- Hirrlinger, J., König, J., Dringen, R., 2002. Expression of mRNAs of multidrug resistance proteins (Mrps) in cultured rat astrocytes, oligodendrocytes, microglial cells and neurones. *J. Neurochem.* 82, 716–719.
- Honscha, W., Petzinger, E., 1999. Characterization of the bile acid sensitive methotrexate carrier of rat liver cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 359, 411–419.
- Honscha, W., Dötsch, K.U., Thomsen, N., Petzinger, E., 2000. Cloning and functional characterization of the bile acid-sensitive methotrexate carrier from rat liver cells. *Hepatology* 31, 1296–1304.
- Ihrke, G., Neufeld, E.B., Meads, T., Shanks, M.R., Cassio, D., Laurent, M., Schroer, T.A., Pagano, R.E., Hubbard, A.L., 1993. WIF-B cells: an in vitro model for studies of hepatocyte polarity. *J. Cell Biol.* 123, 1761–1775.
- Izquierdo, M.A., Scheffer, G.L., Flens, M.J., Giaccone, G., Broxterman, H.J., Meijer, C.J., van der Valk, P., Scheper, R.J., 1996. Broad distribution of the multidrug resistance-related vault lung resistance protein in normal human tissues and tumors. *Am. J. Pathol.* 148, 877–887.

- Katz, N., Immenschuh, S., Gerbracht, U., Eigenbrodt, E., Föllmann, W., Petzinger, E., 1992. Hormone-sensitive carbohydrate metabolism in rat hepatocyte-hepatoma hybrid cells. *Eur. J. Cell Biol.* 57, 117–123.
- Kneuer, C., Honscha, W., 2004. The H⁺-dependent reduced folate carrier 1 (RFC1) of humans and the sodium-dependent methotrexate carrier-1 (MTX-1) of the rat are orthologs. *FEBS Lett.* 566, 83–86.
- Kobayashi, Y., Hirokawa, N., Ohshiro, N., Sekine, T., Sasaki, T., Tokuyama, S., Endou, H., Yamamoto, T., 2002. Differential gene expression of organic anion transporters in male and female rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290, 482–487.
- Kudo, N., Katakura, M., Sato, Y., Kawashima, Y., 2002. Sex hormone-regulated renal transport of perfluorooctanoic acid. *Chem. Biol. Interact.* 139, 301–316.
- Kullak-Ublick, G.A., Glasa, J., Boker, C., Oswald, M., Grutzner, U., Hagenbuch, B., Stieger, B., Meier, P.J., Beuers, U., Kramer, W., Wess, G., Paumgartner, G., 1997. Chlorambucil-taurocholate is transported by bile acid carriers expressed in human hepatocellular carcinomas. *Gastroenterology* 113, 1295–1305.
- Kusuhara, H., Sekine, T., Utsunomiya-Tate, N., Tsuda, M., Kojima, R., Cha, S.H., Sugiyama, Y., Kanai, Y., Endou, H., 1999. Molecular cloning and characterization of a new multispecific organic anion transporter from rat brain. *J. Biol. Chem.* 274, 13675–13680.
- Lee, G., Piquette-Miller, M., 2003. Cytokines alter the expression and activity of the multidrug resistance transporters in human hepatoma cell lines; analysis using RT-PCR and cDNA microarrays. *J. Pharm. Sci.* 92, 2152–2163.
- Litman, T., Druley, T.E., Stein, W.D., Bates, S.E., 2001. From MDR to MXR: new understanding of multidrug resistance systems, their properties and clinical significance. *Cell. Mol. Life Sci.* 58, 931–959.
- Madon, J., Hagenbuch, B., Landmann, L., Meier, P.J., Stieger, B., 2000. Transport function and hepatocellular localization of mrp6 in rat liver. *Mol. Pharmacol.* 57, 634–641.
- Masereeuw, R., Notenboom, S., Smeets, P.H., Wouterse, A.C., Russel, F.G., 2003. Impaired renal secretion of substrates for the multidrug resistance protein 2 in mutant transport-deficient (TR-) rats. *J. Am. Soc. Nephrol.* 14, 2741–2749.
- McAleer, M.A., Breen, M.A., White, N.L., Matthews, N., 1999. pABC11 (also known as MOAT-C and MRP5), a member of the ABC family of proteins, has anion transporter activity but does not confer multidrug resistance when overexpressed in human embryonic kidney 293 cells. *J. Biol. Chem.* 274, 23541–23548.
- Morita, N., Kusuhara, H., Sekine, T., Endou, H., Sugiyama, Y., 2001. Functional characterization of rat organic anion transporter 2 in LLC-PK1 cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 298, 1179–1184.
- Nies, A.T., Cantz, T., Brom, M., Leier, I., Keppler, D., 1998. Expression of the apical conjugate export pump, Mrp2, in the polarized hepatoma cell line, WIF-B. *Hepatology* 28, 1332–1340.
- Noe, B., Hagenbuch, B., Stieger, B., Meier, P.J., 1997. Isolation of a multispecific organic anion and cardiac glycoside transporter from rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 10346–10350.
- Petzinger, E., Föllmann, W., Blumrich, M., Walther, P., Hentschel, J., Bette, P., Maurice, M., Feldmann, G., 1994. immortalization of rat hepatocytes by fusion with hepatoma cells. I. Cloning of a hepatocytoma cell line with bile canaliculi. *Eur. J. Cell Biol.* 64, 328–338.
- Raidl, M., Berger, W., Schulte-Hermann, R., Kandioler-Eckersberger, D., Kappel, S., Wrba, F., Micksche, M., Grasl-Kraupp, B., 2002. Expression of the lung resistance-related protein in human and rat hepatocarcinogenesis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 283, G1117–G1124.
- Rajgopal, A., Sierra, E.E., Zhao, R., Goldman, I.D., 2001. Expression of the reduced folate carrier SLC19A1 in IEC-6 cells results in two distinct transport activities. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 281, C1579–C1586.
- Reichel, C., Gao, B., van Montfort, J., Cattori, V., Rahner, C., Hagenbuch, B., Stieger, B., Kamisako, T., Meier, P.J., 1999. Localization and function of the organic anion-transporting polypeptide Oatp2 in rat liver. *Gastroenterology* 117, 688–695.
- Roninson, I.B., 1992. The role of the MDR1 (p-glycoprotein) gene in multidrug resistance in vitro and in vivo. *Biochem. Pharmacol.* 43, 95–102.
- Saito, H., Masuda, S., Inui, K., 1996. Cloning and functional characterization of a novel rat organic anion transporter mediating basolateral uptake of methotrexate in the kidney. *J. Biol. Chem.* 271, 20719–20725.
- Sekine, T., Watanabe, N., Hosoyamada, M., Kanai, Y., Endou, H., 1997. Expression cloning and characterization of a novel multispecific organic anion transporter. *J. Biol. Chem.* 272, 18526–18529.
- Sekine, T., Cha, S.H., Tsuda, M., Apiwattanakul, N., Nakajima, N., Kanai, Y., Endou, H., 1998. Identification of multispecific organic anion transporter 2 expressed predominantly in the liver. *FEBS Lett.* 429, 179–182.
- Serrano, M.A., Macias, R.I.R., Vallejo, M., Briz, O., Bravo, A., Pascual, M.J., St-Pierre, M.V., Stieger, B., Meier, P.J., Marin, J.J., 2003. Effect of ursodeoxycholic acid on the impairment induced by maternal cholestasis in the rat placenta-maternal liver tandem excretory pathway. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 305, 515–524.
- Sierra, E.E., Goldman, I.D., 1999. Recent advances in the understanding of the mechanism of membrane transport of folates and antifolates. *Semin. Oncol.* 26, 11–23.
- Simonson, G.D., Vincent, A.C., Roberg, K.J., Huang, Y., Iwanij, V., 1994. Molecular cloning and characterization of a novel liver-specific transport protein. *J. Cell Sci.* 107, 1065–1072.
- Silverman, J.A., Schrenk, D., 1997. Hepatic canalicular membrane. 4. Expression of the multidrug resistance genes in the liver. *FASEB J.* 11, 308–313.
- Utesch, D., Arand, M., Thomas, H., Petzinger, E., Oesch, F., 1992. Xenobiotic-metabolizing enzyme activities in hybrid cell lines established by fusion of primary rat liver parenchymal cells with hepatoma cells. *Xenobiotica* 22, 1451–1457.
- Wong, S.C., Proefke, S.A., Bhushan, A., Matherly, L.H., 1995. Isolation of human cDNAs that restore methotrexate sensitivity and reduced folate carrier activity in methotrexate transport-defective Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* 270, 17468–17475.

10 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Walther Honscha danke ich für die Bereitstellung des interessanten Themas und die Möglichkeit, die Doktorarbeit am Institut für Pharmakologie, Pharmazie und Toxikologie der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig anzufertigen sowie für die engagierte und freundliche, wissenschaftliche Betreuung während der Durchführung dieser Arbeit.

Bei Herrn Dr. Carsten Kneuer bedanke ich mich herzlich für die wissenschaftliche Betreuung bei der Durchführung dieser Arbeit und der Korrektur des Manuskripts.

Mein besonderer Dank gilt Frau Cathleen Lakoma für die sehr gute Zusammenarbeit und die große Unterstützung im Labor.

Meinen Kollegen und Kolleginnen am Institut für Pharmakologie, Pharmazie und Toxikologie der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig danke ich herzlich für die gute Arbeitsatmosphäre und die freundschaftliche Zusammenarbeit.

Herrn Prof. Dr. Ernst Petzinger (Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität in Gießen) danke ich für die freundliche Bereitstellung der HPCT-1E3-Hepatocytoma-Zellen.

Ebenso möchte ich Herrn Prof. Dr. Gottfried Alber für die Möglichkeit danken, die quantitative real time PCR im Institut für Immunologie der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig durchführen zu können. In diesem Zusammenhang möchte ich ebenfalls Nicole Schütze und Jens Knauer für ihre Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der Versuche danken.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern, Marianne und Werner Halwachs, für ihre große Unterstützung jeglicher Art nicht nur während des Studiums und dieser Dissertation. Vielen Dank auch an meine Schwester Inga für die kritische Korrektur dieser Arbeit insbesondere in Sachen neue deutsche Rechtschreibung.

Kathrin Rudolph und Anja Gretschel möchte ich ganz herzlich für die vielen Telefonate, für ihre Treue und wunderbare Unterstützung schon während des Studiums und in den letzten drei Jahren danken.

Ich danke der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit (HO 2103/1-2).