

**Funktion und Expression  
gastrointestinal und hepatisch exprimierter  
Organic Anion Transporting Polypeptides (OATP)**

Der Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Friedrich-Alexander-Universität  
Erlangen-Nürnberg

zur

Erlangung des Doktorgrades Dr. rer. nat.

vorgelegt von

Kathrin Veronika Mandery  
aus Schweinfurt

Als Dissertation genehmigt  
von der Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

Tag der mündlichen Prüfung: 29.10.2010

Vorsitzender der  
Promotionskommission: Prof. Dr. Rainer Fink

Erstberichterstatte: Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang Kreis

Zweitberichterstatte: PD Dr. rer. nat. Jörg König

# Inhaltsverzeichnis

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>6</b>
<b>1 ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>9</b>
<b>2 SUMMARY .....</b>	<b>12</b>
<b>3 EINLEITUNG .....</b>	<b>14</b>
<b>3.1 Bedeutung von Transportproteinen für die Pharmakokinetik von Arzneimitteln .....</b>	<b>14</b>
3.1.1 Der intestinale und hepatische Arzneistoffmetabolismus und -transport.....	14
3.1.2 Effluxtransporter .....	17
3.1.3 Aufnahmetransporter.....	19
<b>3.2 Die OATP-Aufnahmetransporter-Familie - Organic Anion Transporting Polypeptides ..</b>	<b>20</b>
3.2.1 1. Teilprojekt .....	22
3.2.1.1 OATP2A1 .....	22
3.2.1.2 Prostaglandine und nicht-steroidale Antiphlogistika.....	23
3.2.2 2. Teilprojekt .....	25
3.2.2.1 OATP1A2 .....	25
3.2.2.2 OATP2B1 .....	26
3.2.2.3 Bedeutung von Flavonoiden für die intestinale Arzneistoffresorption .....	26
3.2.3 3. Teilprojekt .....	29
3.2.3.1 OATP1B3 .....	29
3.2.3.2 Bedeutung konservierter Aminosäurereste in Transmembrandomänen für die Transportaktivität von OATP1B3.....	30
<b>3.3 Verwendete Substrate.....</b>	<b>31</b>
<b>4 ZIELSTELLUNGEN.....</b>	<b>32</b>
<b>5 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>33</b>
<b>5.1 Materialien.....</b>	<b>33</b>
5.1.1 Chemikalien .....	33
5.1.2 <sup>3</sup> [H]-markierte und nicht-markierte Chemikalien für Transportversuche .....	34
5.1.3 Reaktionssysteme (Kit Systeme) .....	35
5.1.4 Zellen .....	35
5.1.5 Antikörper .....	36
5.1.6 Spezifische Oligonucleotid-Primer .....	36
5.1.7 Plasmide.....	37
5.1.8 Geräte und Software .....	38
5.1.9 Verbrauchsmaterialien.....	38
<b>5.2 Zellkultur .....</b>	<b>40</b>
<b>5.3 Klonierung der cDNAs kodierend für OATP1A2 und OATP2A1 sowie Mutagenese von OATP1B3 .....</b>	<b>41</b>
5.3.1 OATP1A2 .....	41
5.3.2 OATP2A1 .....	42
5.3.3 OATP1B3 .....	43
<b>5.4 Analyse von DNA mittels Agarosegelelektrophorese .....</b>	<b>44</b>

<b>5.5</b>	<b>Transfektionen von HEK293-Zellen für die stabile und transiente Expression von OATPs.....</b>	<b>45</b>
5.5.1	Transfektion von HEK293-Zellen zur stabilen Expression von OATP1A2.....	45
5.5.2	Transfektion von HEK293-Zellen zur stabilen Expression von OATP2A1.....	45
5.5.3	Transfektion von HEK293-Zellen zur transienten Expression von OATP1B3-Wildtyp und OATP1B3-Mutanten.....	46
<b>5.6</b>	<b>Probenmaterial.....</b>	<b>47</b>
5.6.1	Analyse der <i>SLCO2A1</i> -mRNA-Expression und OATP2A1-Proteinexpression in humanen gastroduodenalen Biopsien.....	47
5.6.2	Analyse der OATP2A1-Lokalisation in humanen gastroduodenalen Biopsien.....	48
<b>5.7</b>	<b>mRNA-Expressionsanalyse mittels quantitativer <i>Real time</i>-PCR.....</b>	<b>48</b>
<b>5.8</b>	<b>Proteinexpressionsanalyse.....</b>	<b>50</b>
5.8.1	Immunfluoreszenzmikroskopie.....	50
5.8.2	Immunhistochemie von OATP2A1 und semiquantitative Auswertung mittels IRS-Score.....	51
5.8.3	Immunoblotanalyse.....	53
<b>5.9</b>	<b>Transportversuche.....</b>	<b>58</b>
5.9.1	Quantifizierung der zellulären Akkumulation von radioaktiv markierten Substanzen mittels Flüssigkeitsszintillationsmessung.....	58
5.9.2	Quantifizierung der zellulären Akkumulation von Substanzen mittels LC-MS/MS.....	60
<b>5.10</b>	<b>Statistische Analyse.....</b>	<b>61</b>
<b>5.11</b>	<b>Strukturelle Modellierung von OATP1B3.....</b>	<b>62</b>
<b>6</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>64</b>
<b>6.1</b>	<b>Untersuchungen zur Expression und Funktion des Prostaglandintransporters OATP2A1 im Gastrointestinaltrakt.....</b>	<b>64</b>
6.1.1	Expression von OATP2A1 in gastrointestinalen Geweben.....	64
6.1.2	Lokalisation von OATP2A1 in der gastrointestinalen Schleimhaut.....	65
6.1.3	Einfluss von Cyclooxygenaseinhibitoren auf die Funktion von OATP2A1.....	66
6.1.3.1	Etablierung und Charakterisierung einer HEK293-Zelllinie, die stabil OATP2A1 exprimiert.....	66
6.1.3.2	Einfluss verschiedener Cyclooxygenaseinhibitoren auf die OATP2A1-vermittelte PGE <sub>2</sub> -Aufnahme.....	68
6.1.3.3	Konzentrationsabhängige Inhibition der OATP2A1-vermittelten PGE <sub>2</sub> -Aufnahme durch Diclofenac und Lumiracoxib.....	69
6.1.3.4	Konzentrationsabhängige Stimulation der OATP2A1-vermittelten PGE <sub>2</sub> -Aufnahme durch Indomethacin, Ibuprofen, Ketoprofen und Naproxen.....	70
<b>6.2</b>	<b>Untersuchung des Einflusses von Flavonoiden auf die Transportaktivität der intestinal exprimierten Aufnahmetransporter OATP1A2 und OATP2B1.....</b>	<b>71</b>
6.2.1	Etablierung und Charakterisierung einer HEK293-OATP1A2-Zelllinie.....	71
6.2.2	Einfluss verschiedener <i>Ginkgo biloba</i> -Flavonoide auf den OATP1A2- und OATP2B1-vermittelten BSP-Transport.....	71
6.2.3	Einfluss verschiedener <i>Ginkgo biloba</i> -Flavonoide auf die OATP1A2- und OATP2B1-vermittelte Aufnahme von Arzneistoffen.....	73
<b>6.3</b>	<b>Untersuchung des Einflusses konservierter positiv-geladener Lysin- und Arginin-Reste in Transmembranhelices auf die Transportaktivität von OATP1B3.....</b>	<b>77</b>
6.3.1	Identifizierung konservierter positiv-geladener Aminosäuren im OATP1B3-Protein ...	77
6.3.2	Mutagenese von OATP1B3 und Charakterisierung der transient OATP1B3-Wildtyp- oder OATP1B3-Mutanten-exprimierenden HEK293-Zelllinie.....	78
6.3.2.1	Immunfluoreszenzanalyse der OATP1B3-Mutanten an Position Lys28, Lys41 und Arg580.....	78

6.3.2.2	Immunoblotanalyse der OATP1B3-Mutanten an Position Lys28, Lys41 und Arg580 .	80
6.3.3	Einfluss der Mutationen auf den OATP1B3-vermittelten BSP- und Pravastatin-Transport	82
6.3.4	Transportkinetische Analyse nach Michaelis-Menten von OATP1B3-Wildtyp und ausgewählten OATP1B3-Mutanten	83
6.3.5	Strukturelle Modellierung des OATP1B3-Wildtyps und der OATP1B3-Mutanten	85
6.3.6	Etablierung und Charakterisierung von Glu74- und Asn77-Mutanten	87
<b>7</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>89</b>
7.1	Expression des Prostaglandintransporters OATP2A1 im Gastrointestinaltrakt und Beeinflussung der Funktion von OATP2A1 durch Cyclooxygenaseinhibitoren	89
7.2	Untersuchung des Einflusses von Flavonoiden auf die Funktion der Transporter OATP1A2 und OATP2B1	93
7.3	Untersuchung des Einflusses konservierter positiv-geladener Lysin- und Arginin-Reste in Transmembranhelices auf die Transportaktivität von OATP1B3	97
	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>101</b>
	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>109</b>
	<b>VERÖFFENTLICHUNGEN</b>	<b>110</b>
	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>113</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ABC	<i>ATP binding cassette</i>
AEC	3-Amino-9-ethylcarbazol
AMPGD	3-(4-methospiro)-1,2-dioxetane-3,2'-tricyclo[3.3.1.1]decan-(4-yl)phenyl- $\beta$ -D-galactopyranoiside; Galakton
ANOVA	<i>one-way analysis of variance</i>
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ASS	Acetylsalicylsäure
AUC	<i>area under the plasma concentration time curve</i>
BCA	<i>bicinchoninic acid</i>
Bid	bis in die (zweimal am Tag)
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
BSP	Sulphobromophthalein
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
cDNA	<i>complementary DNA</i>
C <sub>max</sub>	maximale Plasmakonzentration
CMV	Cytomegalievirus
COX	Cyclooxygenase
Cpm	<i>counts per minute</i>
Cu <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Kupfersulfat
CX-1-Zellen	Kolon-Adenokarzinom-Zelllinie
CYP	Cytochrom P-450
DAB	Diaminobenzidin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DANN	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EC <sub>50</sub>	halbmaximale Stimulationskonzentration
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat
G418	Geneticin
GI-Trakt	Gastrointestinaltrakt
HCl	Salzsäure

HDCA	Histondeacetylase
HEK293-Zellen	<i>human embryonic kidney-Zelllinie</i>
HeLa-Zellen	Henrietta Lacks (Helen Lane); Zervixkarzinomzelllinie
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HepG2-Zellen	Hepatozelluläre Karzinom-Zelllinie
HMG-CoA	Hydroxymethylglutaryl-Coenzym A
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HUSAR	<i>Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources</i>
H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Di-Kaliumhydrogenphosphat
IC <sub>50</sub>	halbmaximale Hemmkonzentration
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
IRS	<i>immunohistochemical rating scores</i>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Di-Kaliumhydrogenphosphat
Kb	Kilobase
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
K <sub>i</sub>	inhibitorische Konstante
K <sub>m</sub>	Michaelis-Menten-Konstante
LB	<i>lysogenic broth</i>
LC	<i>liquid chromatography</i>
MDR	<i>multidrug resistance</i>
MEM	<i>minimal essential medium</i>
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MRP	<i>multidrug resistance protein</i>
MS	<i>mass spectrometry</i>
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NSAID	nicht-steroidale Antiphlogistika
OATP	<i>organic anion transporting polypeptide</i>

P	p-Wert; Irrtumswahrscheinlichkeit
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PG	Prostaglandin
PGT	<i>prostaglandin transporter</i>
RNA	Ribonukleinsäure
Rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	<i>sodium dodecylsulfate</i>
S.E.M.	<i>standard error of the mean</i>
SLCO	Genbezeichnung für die OATP-Familie
T3	Trijodthyronin, Schilddrüsenhormon
T4	Thyroxin, Schilddrüsenhormon
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TMH	Transmembranhelix
VK	Vektorkontrolle
$V_{\max}$	maximale Transportgeschwindigkeit
v/v	<i>volume in volume</i>
w/v	<i>weight in volume</i>
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid

# 1 Zusammenfassung

Damit ein Arzneistoff wirken kann, muss er in einer ausreichenden Konzentration am Wirkort vorliegen. Bis vor einigen Jahren wurde angenommen, dass vor allem die physikochemischen Moleküleigenschaften (Größe, Lipidlöslichkeit und Ladung) die Permeabilität durch Membranen beeinflussen (Lipinski et al. 2001) und die Substanzen überwiegend aufgrund passiver Diffusion in die Zellen gelangen.

In den letzten Jahren wurde nun zunehmend die Bedeutung von Aufnahme- und Efflux-Transportproteinen für die Pharmakokinetik von Arzneistoffen erkannt. Mithilfe dieser Transporter können Substanzen Membranbarrieren überwinden oder Gewebe vor toxischen Substanzen geschützt werden. Um die Funktion dieser Transportproteine besser verstehen zu können, werden Untersuchungen zur Expression, Lokalisation, Regulation und Funktion dieser Transporter durchgeführt. Eine wichtige Transportproteinfamilie für die intrazelluläre Aufnahme von Arzneistoffen bilden die *Organic Anion Transporting Polypeptides* (OATPs), von denen einige humane Vertreter in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden. Thema des ersten Teilprojekts dieser Arbeit war es, Erkenntnisse über die Lokalisation und Funktion des im Magen des Menschen exprimierten Prostaglandintransporters OATP2A1 zu erlangen. Neben der erstmaligen Untersuchung der Lokalisation in der Magenschleimhaut wurde auch der Einfluss von Cyclooxygenaseinhibitoren auf die Funktion dieses Prostaglandintransporters untersucht, da bislang über die Bedeutung dieses Aufnahmetransporters für pathophysiologische Vorgänge im Gastrointestinaltrakt des Menschen wenig Daten vorhanden waren. So war bisher lediglich bekannt, dass Cyclooxygenaseinhibitoren die PGE<sub>2</sub>-synthetisierenden Enzyme COX-1 und COX-2 hemmen und somit die zellulären PGE<sub>2</sub>-vermittelten Effekte modifizieren können. Möglicherweise können Cyclooxygenaseinhibitoren aber auch über die Hemmung des OATP2A1-vermittelten Transports, welcher wahrscheinlich für die Wiederaufnahme von PGE<sub>2</sub> in die Zelle verantwortlich ist, die PGE<sub>2</sub>-vermittelten zellulären Effekte beeinflussen.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass OATP2A1 in der Schleimhaut des humanen Magens in den säureproduzierenden Magendrüsen

sowohl im Zytosol als auch luminal (apikal) lokalisiert ist. Des Weiteren konnte mittels einer OATP2A1-exprimierenden Zelllinie gezeigt werden, dass bestimmte Cyclooxygenaseinhibitoren den OATP2A1-vermittelten Transport inhibieren, andere aber auch stimulieren können. Zusätzlich zur Cyclooxygenasehemmung durch die NSAIDs ist diese Modifikation der Transportfunktion möglicherweise für die unterschiedliche Häufigkeit von gastrointestinalen Nebenwirkungen wie Ulzerationen und Blutungen verantwortlich.

Das zweite Teilprojekt der Arbeit beschäftigte sich mit dem Einfluss von Flavonoiden auf die intestinale Arzneistoffaufnahme durch die Hemmung der OATP-Transporter OATP1A2 und OATP2B1. Flavonoide zählen neben den Anthocyanen zu den am häufigsten vorkommenden Polyphenolen in Gemüse, Obst und in Lebensmittelzubereitungen wie Tee, Wein und Säften. Sie sind ebenso Bestandteile zahlreicher Nahrungsergänzungsmittel und pflanzlicher Arzneimittel. Der Einfluss von Flavonoiden auf intestinale arzneistoff-metabolisierende Enzyme und Arzneistofftransporter spielt möglicherweise eine große Rolle, da die intraluminale Flavonoid-Konzentration von z.B. Apigenin, Kaempferol und Quercetin im Darm ausreichend hoch sein kann, um den intestinalen Arzneistoff-Metabolismus und -Transport im Darm zu beeinflussen. So konnte bereits gezeigt werden, dass das Flavonoid Naringin, das im Grapefruitsaft enthalten ist, die intestinale Aufnahme des Antihistaminikums Fexofenadin durch die Inhibition des Aufnahmetransporters OATP1A2 beeinflusst (Glaeser et al. 2007). Dies führt zu einer verringerten Fläche unter der Plasmakonzentrations-Zeit-Kurve (AUC) des OATP1A2-Substrats Fexofenadin, wenn Grapefruitsaft gleichzeitig mit Fexofenadin eingenommen wird.

Die vorliegenden Daten zeigen, dass die Flavonoide Apigenin, Kaempferol und Quercetin, die alle Bestandteile verschiedener Nahrungsmittel und Nahrungsergänzungsmittel, wie z.B. *Ginkgo biloba*-Zubereitungen, Zwiebeln, Erdbeeren und Äpfeln sind, den OATP1A2- und OATP2B1-vermittelten Transport von Substraten in die Zelle durch einen kompetitiven Mechanismus inhibieren können. Das weist darauf hin, dass Lebensmittel und pflanzliche Arzneimittel, die diese Flavonoide enthalten, für Lebensmittel- oder Arzneimittelinteraktionen verantwortlich sein könnten.

Im dritten Teil der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, welchen Einfluss konservierte positiv-geladene Lysin- und Arginin-Reste in Transmembranhelices

auf die Transportaktivität des hepatisch exprimierten Aufnahmetransporters OATP1B3 haben. Mittels zielgerichteter Mutagenese wurden in der humanen OATP-Familie konserviert vorkommende, positiv-geladene Aminosäuren ausgetauscht und die Veränderungen in der Transportaktivität von OATP1B3 untersucht. Die transportkinetischen Daten wurden durch eine strukturelle Modellierung des OATP1B3-Proteins unterstützt. Dabei zeigte sich, dass die positiven Ladungen an den Positionen 41 und 580 wichtig für den Transport von Substraten durch OATP1B3 sind. Jedoch zeigte sich durch die strukturelle Modellierung auch, dass ebenso wie die Ladung auch die Orientierung der Aminosäuren Lysin 41 und Arginin 580 eine wichtige Rolle für die funktionelle Transportaktivität des OATP1B3-Aufnahmetransporters spielt.

Insgesamt belegen diese *in vitro*-Arbeiten die Bedeutung der Aufnahme-Transportproteine der OATP-Familie für Arzneimittel-Wechselwirkungen. Diese Erkenntnisse können zum Verständnis über die Resorption von Arzneimitteln im Dünndarm und in der Leber und zur Vermeidung von Nebenwirkungen von Arzneimitteln beitragen.

## 2 Summary

It has been shown that drugs have to reach sufficient concentrations at the site of pharmacological action to be pharmacologically effective. Just a few years ago it was assumed that the physicochemical characteristics of a molecule alone are relevant for the ability of substances to cross cell membranes. Several studies in recent years have now demonstrated that specific transport proteins in plasma membranes are important for the uptake, distribution, and elimination of drugs. Such transport proteins mediate the transport of substances across membrane barriers or tissues. For a better understanding of the function of these transporters, the expression, localization, regulation, and function of these transporters is currently under intensive investigation. One important transporter family for cellular drug uptake is the OATP family (organic anion transporting polypeptides).

In the first part of this thesis it was investigated, in which cells OATP2A1, formerly termed prostaglandin transporter (PGT), is expressed in the upper gastrointestinal tract. Furthermore, the potential impact of cyclooxygenase inhibitors on OATP2A1-mediated transport was investigated. Until today the relevance of this transporter for drug transport and for physiological and pathophysiological processes in the human gastrointestinal tract has hardly been discussed. In this study it could be demonstrated that OATP2A1 is expressed in the neck region and deep pyloric glands of the antrum and in parietal cells of the gastric corpus. Furthermore, it was shown that various cyclooxygenase inhibitors are also inhibitors or stimulators of the OATP2A1-mediated uptake. These results suggest that these effects may contribute to differences in the gastrointestinal side effects of cyclooxygenase inhibitors, such as ulcerations and bleedings.

In the second part of this thesis the impact of flavonoids on the intestinal uptake of drugs mediated by OATP1A2 and OATP2B1 was investigated. Flavonoids represent the most abundant polyphenoles in vegetables, fruits, tea, wine, and juices. They are also constituents of various dietary supplements or herbal drugs. The impact of flavonoids on intestinal drug metabolizing enzymes and transporters is of special interest because the intraluminal concentrations of flavonoids such as apigenin, kaempferol, and quercetin can reach sufficient concentrations to modify the intestinal drug metabolism and transport. The presented data show that the

flavonoids apigenin, kaempferol, and quercetin can inhibit the OATP1A2- and OATP2B1-mediated uptake of substrates into cells by a competitive mechanism. The inhibition of these transporters indicates that the modification of the transport activity may be a mechanism for food-drug or drug-drug interactions.

In the third part of this thesis the role of conserved positively charged lysine and arginine amino acids in transmembrane helices for the OATP1B3-mediated uptake was investigated. Using site-directed mutagenesis, lysine and arginine residues were replaced by other amino acids to investigate their impact on OATP1B3 transport activity. Data of kinetic studies were supported by a structural modeling of OATP1B3. Here it was shown that the positive charges at positions 41 and 580 in OATP1B3 are important for transport activity of OATP1B3. In addition the structural modeling indicated that also the orientation of the amino acids lysine 41 and arginine 580 is important for the functional activity of the OATP1B3 uptake transporter.

Taken together these *in vitro*-studies show the importance of organic anion transporting polypeptides for drug-drug interactions. These findings may contribute to a better understanding of drug absorption in the small intestine and the liver and of the prevention of side effects of drugs.

### 3 Einleitung

#### 3.1 Bedeutung von Transportproteinen für die Pharmakokinetik von Arzneimitteln

##### 3.1.1 Der intestinale und hepatische Arzneistoffmetabolismus und -transport

Die Wirkung eines Arzneistoffs ist das Ergebnis zahlreicher, komplexer Vorgänge in einem Organismus. Zur Pharmakokinetik, also der Konzentrationsveränderung von Arzneistoffen im Organismus über die Zeit, gehören drei Teilprozesse: die Resorption, also die Aufnahme eines Arzneistoffs in den Organismus, der Stoffwechsel und die Ausscheidung eines Arzneistoffs oder dessen Stoffwechselprodukte aus der Leber in die Galle oder der Niere in den Urin (Abbildung 1).

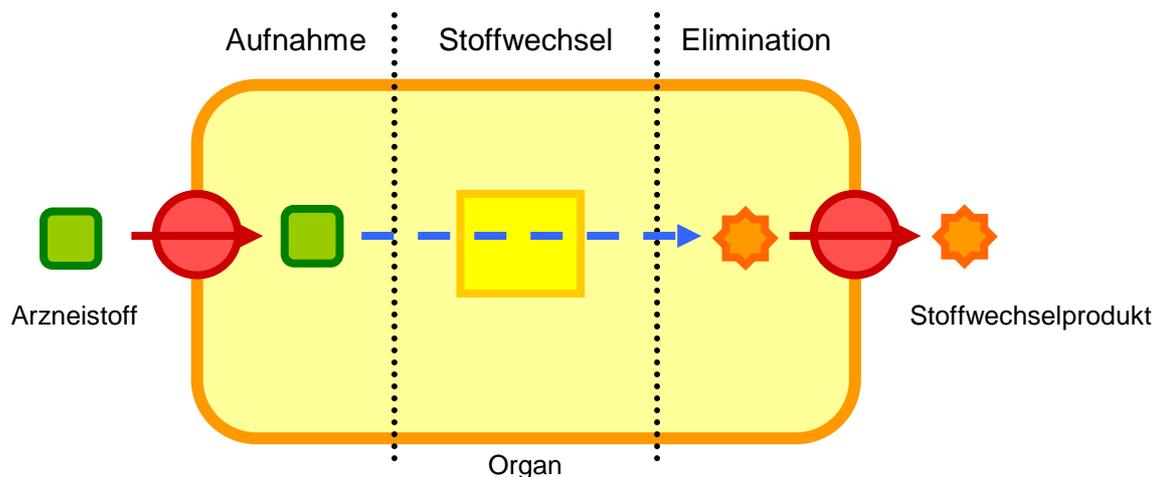


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Teilprozesse der Pharmakokinetik.

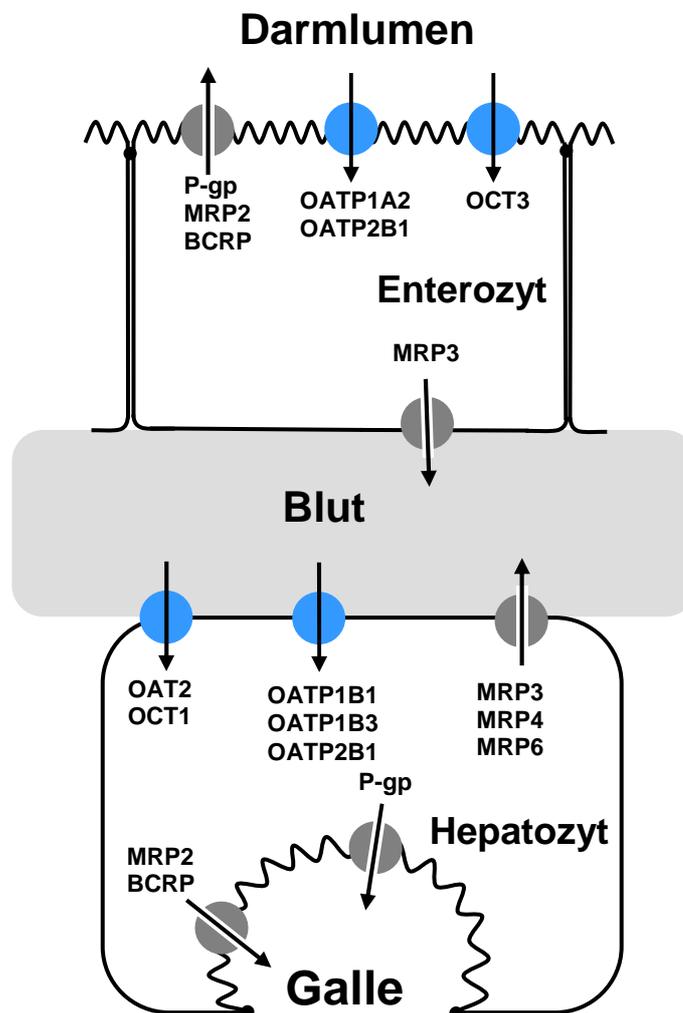
Damit der Organismus lipophile Substanzen leichter wieder ausscheiden kann, werden diese in einem Stoffwechselschritt in hydrophilere, leichter renal ausscheidbare Substanzen umgewandelt. Die Umwandlungsprozesse erfolgen vor allem in der Leber, aber auch in anderen Organen (z.B. im Darm, in der Niere, der Lunge). Die für den Metabolismus verantwortlichen Enzyme sind nicht nur an der Biotransformation von Xenobiotika, sondern auch an Stoffwechselprozessen körpereigener Stoffe (z.B. von Steroidhormonen und Gallensäuren) beteiligt. Man unterteilt die Stoffwechselprozesse in zwei Reaktionstypen. In Phase-I-Reaktionen

werden Substanzen oxidativ, reduktiv oder hydrolytisch verändert, während in den Phase-II-Reaktionen eine Konjugation der Substanz oder ihres Metaboliten mit einer hydrophilen Gruppe, wie z.B. Glucuronsäure oder einem Sulfat-Rest, erfolgt. Von besonderer Bedeutung für die Biotransformation sind Oxidationsreaktionen, die durch Monooxygenasen, die Hämproteine vom Typ des Cytochrom P-450 enthalten, vermittelt werden (Hasler 1999). Diese Cytochrom P-450-Enzyme (CYPs), z.B. CYP3A4, kommen vor allem in der Leber vor, konnten aber auch in anderen Organen, z.B. dem Dün- und Dickdarm, nachgewiesen werden (Watkins et al. 1987). So können Cytochrom P-450-Enzyme in Epithelzellen des Dünndarms (Enterozyten) die Bioverfügbarkeit von oral verabreichten Substanzen wesentlich beeinflussen.

Oral applizierte Arzneistoffe gelangen nach der Aufnahme aus dem Darmlumen in die Enterozyten, wo sie einer ersten Metabolisierungsreaktion unterzogen werden können. Danach gelangen die Substanzen oder ihre Metabolite über das Pfortaderblut in die Leber, wo sie in die Hepatozyten aufgenommen werden. Bevor also ein über die Dünndarmschleimhaut resorbierter Arzneistoff das Herz und von dort aus den systemischen Blutkreislauf erreicht, muss er die Leber passieren. Für die Wirkung des Arzneistoffes im Körper ist ausschlaggebend, welcher Anteil des Arzneistoffes bei der ersten Passage durch den Dünndarm und die Leber metabolisiert und danach z.B. über die Galle ausgeschieden wird. Diesen Vorgang nennt man *First-pass-Effekt*.

Die orale Bioverfügbarkeit wird aber nicht nur durch die Verstoffwechslung der Arzneistoffe limitiert, sondern auch durch die proteinvermittelte Aufnahme in die Zelle und die abschließende proteinvermittelte Elimination aus der Zelle. Bis vor einigen Jahren wurde noch angenommen, dass vor allem die physikochemischen Eigenschaften (Molekülgröße, Lipidlöslichkeit und Ladung) die Permeabilität eines Moleküls durch Membranen beeinflussen (Lipinski et al. 2001) und die Substanzen überwiegend durch passive Diffusion in die Zellen gelangen. Erst in den letzten Jahren wurde zunehmend die Bedeutung von Aufnahme- und Efflux-Transportproteinen für die Pharmakokinetik von Arzneistoffen erkannt. Diese Transporter spielen für die Aufnahme, Verteilung und Elimination von Arzneistoffen und auch von körpereigenen Substanzen eine große Rolle (Hagenbuch et al. 2004; König et al. 2006; Glaeser et al. 2008).

In den Geweben des menschlichen Körpers wird eine Vielzahl verschiedener Transportproteinen exprimiert. Für den gerichteten Transport von Arzneistoffen durch zelluläre Barrieren sind vor allem zwei Transporter-Superfamilien verantwortlich: die ATP-Binding-Cassette-Superfamilie (ABC-Transporter) und die Solute-Carrier-Superfamilie (SLC-Transporter) (Giacomini et al. 2010). In Abbildung 2 sind einige für den Arzneistofftransport relevante Transportproteine der ABC-Familie (siehe 3.1.2 Effluxtransporter) und der SLC-Familie (siehe 3.1.3) sowie deren zelluläre Lokalisation in den Membranen eines Enterozyten und Hepatozyten gezeigt. Die einzelnen Transporter werden weiter unten beschrieben.



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung der Lokalisation von Aufnahmetransportern (blau: OATPs, OATs und OCTs) und Effluxtransportern (grau: P-gp: P-Glykoprotein, MRP2: Multidrug Resistance Protein 2) im Enterozyt und Hepatozyt.

So können Substanzen aus dem Darmlumen entweder über passive Diffusion oder über apikal lokalisierte Aufnahmetransporter, wie z.B. OATP1A2 und OATP2B1, in den Enterozyten aufgenommen werden. Anschließend können diese

Substanzen oder ihre Metabolite aus den Enterozyten über basolateral exprimierte Effluxtransporter, wie z.B. MRP3, in das Pfortaderblut abgegeben werden. Nach Erreichen der Leber über die Pfortader werden sie häufig über verschiedene, basolateral lokalisierte Aufnahmetransporter, wie z.B. OATP1B1 oder OATP1B3, in den Hepatozyten aufgenommen. Nachfolgend können die aufgenommenen Substanzen und deren Metabolite über apikal lokalisierte Effluxtransporter (z.B. MRP2 oder P-Glykoprotein) in die Galle eliminiert werden oder über basolateral lokalisierte Effluxtransporter (MRP3, 4, 6) zurück in den systemischen Blutkreislauf gelangen.

### 3.1.2 Effluxtransporter

Die Transportproteine der ABC-Superfamilie nutzen Energie aus der ATP-Hydrolyse und sind daher primär-aktive Transporter. Sie können damit Substrate gegen einen Konzentrationsgradienten aus der Zelle transportieren. Inzwischen wurden 49 humane ABC-Transportproteine identifiziert, die in 7 Familien gruppiert wurden (ABCA-ABCG) (<http://nutrigene.4t.com/humanabc.htm>). ABC-Transporter sind in der Lage zahlreiche endogene Substrate, viele Arzneistoffe und deren Metabolite zu transportieren (Schinkel et al. 2003). Die Lokalisation und Substrate einiger für die Pharmakokinetik wichtiger ABC-Transporter findet sich in Tabelle 1 und Abbildung 2.

**Tabelle 1: Für den Arzneistofftransport wichtige ABC-Transporter, ihre Lokalisation und ausgewählte Substrate (GI-Trakt: Gastrointestinaltrakt).**

Protein-bezeichnung	Gen-bezeichnung	Lokalisation	Substrate
<b>P-Glykoprotein (P-gp, MDR1)</b>	<i>ABCB1</i>	GI-Trakt, Leber, Niere, Blut-Hirn-Schranke	$\beta$ -Adrenozeptorenblocker, Zytostatika, HIV-Protease-Inhibitoren, u.v.m.
<b>MRP2</b>	<i>ABCC2</i>	GI-Trakt, Leber, Niere	Leukotrien-C <sub>4</sub> , Glukuronide, Glutathionkonjugate, Sulfate, Indinavir, Ritonavir, Pravastatin
<b>MRP3</b>	<i>ABCC3</i>	GI-Trakt, Leber, Niere	wie ABCC2
<b>MRP4</b>	<i>ABCC4</i>	ubiquitär	Nukleosid-Analoga, cGMP, cAMP, ADP, 6-Mercaptopurin, Methotrexat
<b>BCRP</b>	<i>ABCG2</i>	GI-Trakt, Leber, Blut-Hirnschranke	Camptothecin, Methotrexat, Mitoxantron, Topotecan, Imatinib

Aus der Gruppe der Effluxtransporter ist P-Glykoprotein besonders gut untersucht, das im Rahmen von Untersuchungen über die Resistenzentwicklung von Tumoren gegen Zytostatika entdeckt wurde. Die Überexpression von P-Glykoprotein in Tumorzellen ist eine wichtige Ursache für das verminderte Ansprechen auf Zytostatika, die sogenannte Mehrfach-Resistenz (*multidrug resistance*; MDR). Nach ihr wurde auch das MDR-1-Gen (neue Nomenklatur: *ABCB1*), das für P-Glykoprotein kodiert, benannt. Die tumorbedingte, erhöhte Expression von P-Glykoprotein im Tumorgewebe führt dazu, dass Zytostatika aus der Tumorzelle vermehrt eliminiert werden und diese dann keine ausreichende intrazelluläre Wirkkonzentration mehr im Tumorgewebe erreichen. Weiterhin ist P-Glykoprotein auch an der Elimination von zahlreichen Xenobiotika aus Hepatozyten und proximalen Tubuluszellen in die Galle und den Urin beteiligt.

Ebenso schützt P-Glykoprotein durch seine luminale Expression viele Organe vor dem Eindringen schädlicher Fremdstoffe. So wird das Gehirn durch die Expression von P-Glykoprotein in der Blut-Hirn-Schranke geschützt. Aber auch der gesamte Körper wird durch die Expression von P-Glykoprotein im Darm vor dem Eindringen potentiell toxischer Substanzen bewahrt.

Die Modifikation der P-Glykoprotein-Funktion ist ein wichtiger, neu entdeckter Mechanismus von Arzneimittel-Wechselwirkungen. Diese Wechselwirkungen können auftreten, wenn zwei gleichzeitig verabreichte Arzneistoffe vom selben Transporter transportiert werden oder mit diesen interagieren. So weist z.B. das Herzglykosid Digoxin, das beim Menschen nicht verstoffwechselt wird, klinisch relevante Interaktionen mit anderen Arzneistoffen (z.B. dem Antiarrhythmikum Chinidin) auf (Fromm et al. 1999). Chinidin inhibiert den P-Glykoprotein-vermittelten Digoxin-Efflux und vermindert so die renale und die biliäre Elimination von Digoxin, das normalerweise über P-Glykoprotein eliminiert wird. Die Digoxin-Plasmakonzentration kann somit um mehr als das Doppelte ansteigen.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass genetische Varianten in bestimmten Transportproteinen zu Erkrankungen beim Menschen führen. So verursachen z.B. Mutationen im *ABCC2*-Gen, das für den Effluxtransporter MRP2 kodiert, das Dubin-Johnson-Syndrom, bei der das konjugierte Bilirubin aufgrund eines funktionsunfähigen MRP2 nicht mehr aus den Hepatozyten in die Galle eliminiert werden kann und es zu einer Gegenregulation (Hochregulation des basolateral

exprimierten MRP3) und nachfolgend zu einer Hyperbilirubinämie kommt (Kartenbeck et al. 1996).

### 3.1.3 Aufnahmetransporter

Die Transportproteine der SLC-Superfamilie vermitteln den Transport von Substanzen durch eine Membranbarriere. Dieser Vorgang läuft als erleichterte Diffusion ohne ATP-Verbrauch ab. SLC-Transporter sind am Transport zahlreicher kationischer, anionischer oder ungeladener, endogener Substrate und Xenobiotika beteiligt. In Abhängigkeit von Transportprotein und Substrat kann der Transport auch bidirektional erfolgen. So sind SLC-Transporter z.B. für die Aufnahme von Substanzen aus dem Darmlumen in die Enterozyten oder für die Aufnahme von Substanzen aus dem Pfortaderblut in die Hepatozyten verantwortlich [(Schuster 2002; König et al. 2006; Glaeser et al. 2008), siehe Abbildung 2].

Bisher wurden 368 humane SLC-Transporter identifiziert, die in 48 Familien eingeteilt sind [(Hediger et al. 2004) <http://www.bioparadigms.org/slc/menu.asp>].

**Tabelle 2: Für den Arzneistofftransport wichtige SLC-Transporter, ihre Lokalisation und ausgewählte Substrate.**

Proteinbezeichnung	Genbezeichnung	endogene Substrate	Arzneistoffe
<b>OATP1A2</b>	<i>SLCO1A2</i>	Gallensäuren	Fexofenadin
<b>OATP1B1</b>	<i>SLCO1B1</i>	Gallensäuren, Östrogenmetabolite, Bilirubin	HMG-CoA-Reduktaseinhibitoren, ACE-Inhibitoren, Cyclosporin A
<b>OATP1B3</b>	<i>SLCO1B3</i>	Gallensäuren, Östrogenmetabolite	HMG-CoA-Reduktaseinhibitoren, Herzglykoside, AT <sub>1</sub> -Antagonisten
<b>OATP2A1</b>	<i>SLCO2A1</i>	Prostaglandine	-
<b>OATP2B1</b>	<i>SLCO2B1</i>	Gallensäuren, Steroidmetabolite	HMG-CoA-Reduktaseinhibitoren
<b>OAT2</b>	<i>SLC22A7</i>	cGMP	Tetracyclin
<b>OCT1</b>	<i>SLC22A1</i>	Prostaglandin E <sub>2</sub>	Nukleosidanaloga

Von besonderem Interesse für den Arzneistofftransport sind die SLC21 (SLCO)-Familie und die SLC22-Familie. In der SLC21-Familie sind u.a. die 11 humanen *Organic Anion Transporting Polypeptide*-Transporter (OATPs) zusammengefasst (siehe 3.2). Die SLC22-Familie (*organic cation/ anion/ zwitterion transporter*)

umfasst u.a. Mitglieder der organischen Kationentransporter (*organic cation transporter*, OCTs) und der organischen Anionentransporter (*organic anion transporter*, OATs).

Eine Auswahl der für den Arzneistofftransport wichtigen SLC-Transporter, ihre Lokalisation und ausgewählte Substrate finden sich in Tabelle 2 und Abbildung 2.

### 3.2 Die OATP-Aufnahmetransporter-Familie - Organic Anion Transporting Polypeptides

Die Familie der OATP-Aufnahmetransporter (*organic anion transporting polypeptides*) zählt zu Natrium-unabhängigen Transportproteinen, welche die transmembranäre Aufnahme vieler verschiedener amphipathischer, endogener und exogener organischer Verbindungen, wie zum Beispiel Gallensalze, Steroidkonjugate, Thyroidhormone, Arzneistoffe und andere Xenobiotika vermitteln (König et al. 2006).

Tabelle 3: *SLCO*-Transporter, ihre Lokalisation und Substrate (<http://www.bioparadigms.org/slc/menu.asp>).

Protein-bezeichnung	Gen-bezeichnung	Lokalisation	Substrate
OATP1A2	<i>SLCO1A2</i>	Gehirn, Niere, Leber, Ziliarkörper, Darm	Gallensalze, organische Anionen, Arzneistoffe
OATP1B1	<i>SLCO1B1</i>	Leber	Gallensalze, organische Anionen, Arzneistoffe
OATP1B3	<i>SLCO1B3</i>	Leber, Krebszelllinien	Gallensalze, organische Anionen
OATP1C1	<i>SLCO1C1</i>	Gehirn, Hoden, Darm, Niere	T4, T3, rT3, BSP
OATP2A1	<i>SLCO2A1</i>	ubiquitär	Prostaglandine
OATP2B1	<i>SLCO2B1</i>	Leber, Plazenta, Ziliarkörper, Darm	Estron-3-Sulfat, DHEAS, BSP, Arzneistoffe
OATP3A1	<i>SLCO3A1</i>	Hoden, Herz, Gehirn, Ovar	Estron-3-Sulfat, Prostaglandin
OATP4A1	<i>SLCO4A1</i>	ubiquitär	Taurocholat, T3, Prostaglandin E <sub>2</sub>
OATP4C1	<i>SLCO4C1</i>	Niere	Digoxin, Ouabain, Schilddrüsenhormone, Methotrexat
OATP5A1	<i>SLCO5A1</i>	-	-
OATP6A1	<i>SLCO6A1</i>	Hoden	-

Die humane OATP-Familie besteht aus elf Mitgliedern, die in sechs Unterfamilien eingeteilt werden (OATP1-OATP6). Das Gensymbol wird mit „*SLCO*“ abgekürzt,

die Proteine tragen das Präfix „OATP“ (Tabelle 3). Die humanen OATPs bestehen aus 643 (OATP2A1) bis 722 (OATP4A1) Aminosäuren (Lu et al. 1996; Tamai et al. 2000). Die Gene befinden sich auf Chromosom 3 (*SLCO2A1*), 5 (*SLCO4C1*, *SLCO6A1*), 8 (*SLCO5A1*), 11 (*SLCO2B1*), 12 (*SLCO1A2*, *SLCO1B1*, *SLCO1B3*, *SLCO1C1*), 15 (*SLCO3A1*) und 20 (*SLCO4A1*).

Alle OATPs besitzen eine Grundstruktur aus 12 Transmembrandomänen, wobei sowohl das C- als auch das N-terminale Ende intrazellulär lokalisiert sind. Darüber hinaus befindet sich zwischen den Transmembrandomänen 9 und 10 die große extrazelluläre Domäne 5 (Hagenbuch et al. 2003; Hänggi et al. 2006), die zehn konservierte Cystein-Reste enthält. Am Übergang der extrazellulären Schleife 3 zur Transmembrandomäne 6 befindet sich außerdem eine Konsensus-Sequenz, eine Abfolge von Aminosäuren, die in allen OATPs in ähnlicher Form vorhanden ist. Konservierte, geladene Aminosäuren finden sich innerhalb vor allem in den Transmembrandomänen 2, 11 und 12 (Hagenbuch et al. 2003). Aufgrund von computergenerierten, dreidimensionalen Proteinmodellen postulierten Meier-Abt und Kollegen eine zentrale, positiv-geladene Pore, durch die negativ-geladene Substrate mittels eines Kippmechanismus transportiert werden (Meier-Abt et al. 2005).

Der Transport der Substrate erfolgt Natrium-unabhängig (Jacquemin et al. 1994; Kullak-Ublick et al. 1997; Noe et al. 1997; Walters et al. 2000). Als möglicher Transportmechanismus wird ein Anionenaustausch diskutiert. Der Transport erfolgt zum Teil pH-abhängig (Leuthold et al. 2009) und elektroneutral (Satlin et al. 1997). Bei den Substraten handelt es sich in der Regel um anionische, amphipathische Moleküle mit einem relativ hohen Molekulargewicht (>450 Da). Viele Substrate sind im Blut an Albumin gebunden (Hagenbuch et al. 2004).

Obwohl OATP1B1 und OATP1B3 hauptsächlich in der Leber vorkommen, sind die meisten anderen OATPs in verschiedenen Geweben des Körpers exprimiert. So finden sich diese Transporter zum Beispiel auch im Gehirn, in der Lunge, im Herzen, im Darm, in der Niere, in der Plazenta und in den Hoden (Tamai et al. 2000; Hagenbuch et al. 2004).

Einige OATPs sind aber nicht nur für die Aufnahme verschiedener exogener und endogener Substanzen verantwortlich, sondern spielen auch beim Auftreten von Arzneimittelnebenwirkungen eine Rolle. So ist zum Beispiel der natürlich vorkommende genetische Polymorphismus 521T>C im *SLCO1B1* Gen, das für

den hepatischen OATP1B1-Transporter kodiert, mit einem erhöhten Risiko für das Auftreten von Nebenwirkungen (Myopathien) bei der Therapie mit lipidsenkenden Arzneimitteln (HMG-CoA-Reduktaseinhibitoren) assoziiert (Link et al. 2008). HMG-CoA-Reduktaseinhibitoren werden normalerweise über OATP1B1 in den Hepatozyten, ihren Wirkort, aufgenommen sowie ihrer Metabolisierung und Elimination zugeführt. Ein mutiertes OATP1B1-Transportprotein kann die HMG-CoA-Reduktaseinhibitoren nicht mehr effizient in die Hepatozyten aufnehmen und sie reichern sich im Plasma und im Skelettmuskel an, wo sie zu Myopathien und Rhabdomyolyse führen können.

Weiterhin können OATPs an Wechselwirkungen zwischen gleichzeitig verabreichten Arzneistoffen und Nahrungsmitteln beteiligt sein. So ist zum Beispiel im Dünndarm des Menschen der in der apikalen Membran der Enterozyten exprimierte Aufnahmetransporter OATP1A2 für eine Interaktion zwischen dem Arzneistoff Fexofenadin und Grapefruitsaft verantwortlich (Glaeser et al. 2007). Das im Grapefruitsaft vorkommende Flavonoid Naringin führt dabei zu einer verringerten OATP1A2-vermittelten Aufnahme von Fexofenadin in den Körper (siehe 3.2.2.3).

Jedoch kann die Funktion von Aufnahmetransportern nicht nur durch Hemmung, z.B. durch Grapefruitsaft, modifiziert werden. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass 10 µM Rosiglitazon zu einer Stimulation der OATP1B1- und OATP1B3-vermittelte Pravastatinaufnahme führt. Bei höheren Rosiglitazon-Konzentrationen (100 µM) zeigte sich dagegen eine Hemmung der Transportaktivität (Bachmakov et al. 2008).

### **3.2.1 1. Teilprojekt**

#### **3.2.1.1 OATP2A1**

Das humane OATP2A1-Protein (*organic anion transporting polypeptide*), auch Prostaglandintransporter PGT genannt, besteht aus 643 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von 70 kDa. Oatp2a1 wurde erstmals 1995 in Ratten identifiziert (Kanai et al. 1995). Obwohl das humane OATP2A1 ursprünglich 1996 aus einer Nieren-cDNA-Bank kloniert wurde (Lu et al. 1996), ist es ubiquitär exprimiert (Tamai et al. 2000). Die höchste mRNA-Expression ist im Herzen, im

Skelettmuskel und Pankreas nachweisbar. Topper und Kollegen (Topper et al. 1998) zeigten eine endotheliale Expression von OATP2A1.

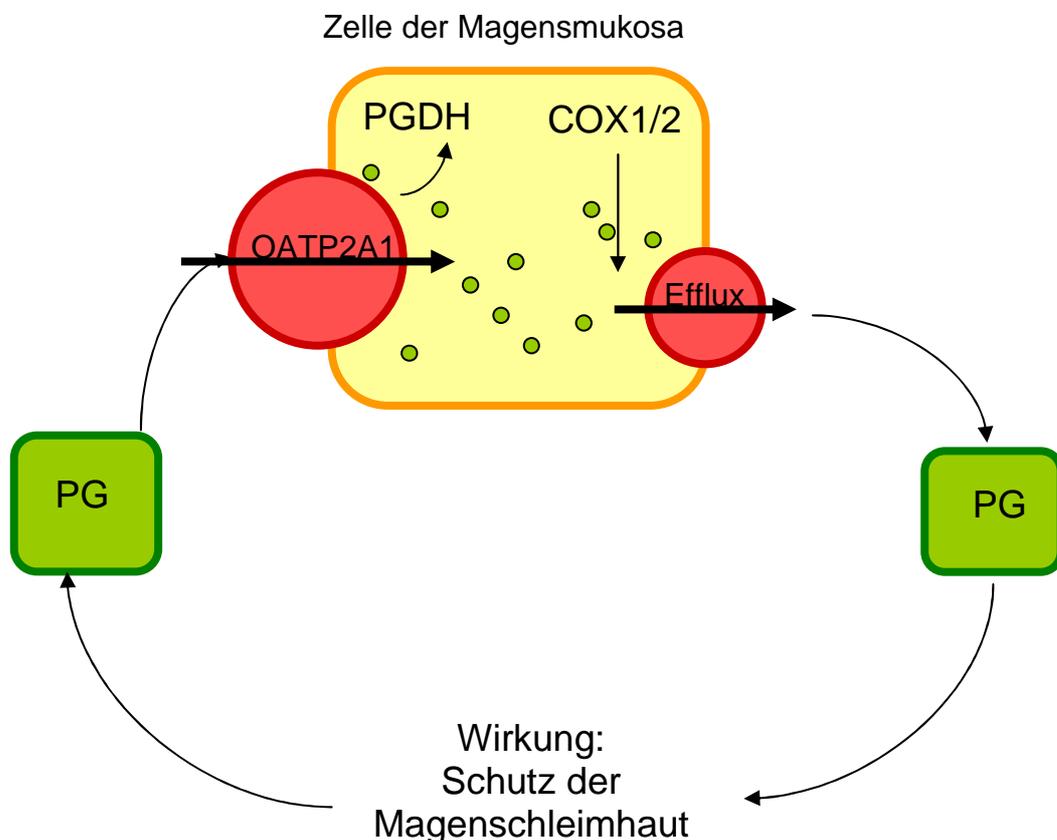
Die Funktion von OATP2A1 wurde hauptsächlich in transient transfizierte HeLa-Zellen untersucht. Dort wurde gezeigt, dass es verschiedene Prostaglandine (Prostaglandin D<sub>2</sub>, Prostaglandin E<sub>1</sub>, Prostaglandin E<sub>2</sub>, Prostaglandin F<sub>2α</sub>) und Thromboxan B<sub>2</sub> mit unterschiedlichen Affinitäten (Lu et al. 1996) transportiert. Die Michaelis-Menten-Konstante (K<sub>m</sub>) liegt dabei für die meisten Substrate im Bereich von 50 bis 500 nM (Schuster 1998; Schuster 2002).

Man nimmt an, dass OATP2A1 für die Termination der Prostaglandinwirkungen verantwortlich ist (Abbildung 3), indem es die zelluläre Wiederaufnahme der Prostaglandine in die Zellen und somit deren nachfolgende Oxidation im Cytoplasma ermöglicht (Pitt et al. 1983; Schuster 1998; Nomura et al. 2004). Eine Studie von Nomura und Kollegen zeigte, dass die zelluläre Wiederaufnahme von Prostaglandinen einen entscheidenden Schritt in der metabolischen Inaktivierung darstellt, da dadurch die Prostaglandine den abbauenden Enzymen, wie z.B. der Prostaglandin-15-dehydrogenase (PGDH), zugeführt werden (Abbildung 3) (Schuster 1998; Schuster 2002; Nomura et al. 2004; Nomura et al. 2005). Weiterhin postulierten die Autoren ein Modell, in dem die Synthese, die Freisetzung, die Wiederaufnahme und die Oxidation der Prostaglandine in denselben Tubuluszellen der Niere stattfinden - jedoch in verschiedenen Kompartimenten (Nomura et al. 2005). Möglicherweise ist OATP2A1 auch an der Verteilung der Prostaglandine innerhalb einer Zelle beteiligt. Die genaue physiologische und pathophysiologische Bedeutung von OATP2A1 ist noch nicht abschließend geklärt.

### **3.2.1.2 Prostaglandine und nicht-steroidale Antiphlogistika**

Nicht-steroidale Antiphlogistika (NSAIDs), wie z.B. Acetylsalicylsäure, haben eine entzündungshemmende Wirkung. Sie verringern Symptome von Entzündungsprozessen wie Schmerz und Schwellung, senken in unterschiedlichem Ausmaß Fieber und hemmen die Thrombozytenaggregation. Sie wirken über die Blockade der Enzyme Cyclooxygenase (COX) 1 und 2 und verhindern dadurch die Synthese von Eicosanoiden. Die am häufigsten zu beobachtenden Nebenwirkungen der NSAIDs sind Magenschleimhaut-

Schädigungen mit Ulkusbildung durch die Hemmung des Enzyms Cyclooxygenase 1, das eine zentrale Rolle bei der Bildung des Magenschleimhaut-schützenden Prostaglandins E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) spielt. Während die Bedeutung der Cyclooxygenasen für die Integrität der Magenschleimhaut sowie für die Entstehung NSAID-induzierter Ulzerationen und Blutungen im Magen klar erkannt wurde, ist über die Funktion und Bedeutung des humanen Prostaglandintransporters OATP2A1 für physiologische und pathophysiologische Prozesse im Magen kaum etwas bekannt. Aufgrund der Bedeutung der Prostaglandine für die Integrität der gastroduodenalen Schleimhaut (Gudis et al. 2005) stellt sich die Frage, ob der Prostaglandintransporter OATP2A1 auch in Zellen der Schleimhaut des Magens und des Dünndarms exprimiert ist.



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung zur Arbeitshypothese der OATP2A1 Funktion in der humanen Magenschleimhaut. Prostaglandine wie z.B. PGE<sub>2</sub> werden in den Zellen der Magenschleimhaut durch die COX-1 und COX-2 synthetisiert. Die Wirkung entfaltet PGE<sub>2</sub> von extrazellulär über die EP-Rezeptoren. Zur Beendigung der Wirkung von PGE<sub>2</sub> transportiert OATP2A1 dieses ins Cytosol, um es den Prostaglandin-abbauenden Enzymen, wie z.B. der Prostaglandin-15-dehydrogenase (PGDH) zuzuführen.

Prostaglandine, z.B. PGE<sub>2</sub>, werden in den Zellen der Magenschleimhaut durch die COX-1 und COX-2 synthetisiert. Die Wirkung, z.B. den Schutz der Magenschleimhaut, entfaltet PGE<sub>2</sub> von extrazellulär über die Prostaglandin E-

Rezeptoren (EP-Rezeptoren). So reduziert PGE<sub>2</sub> die Sekretion der Magensäure durch die Belegzellen des Magens. Weiterhin steigert PGE<sub>2</sub> die Durchblutung der Magenschleimhaut, stimuliert die Freisetzung von viskösem Schleim und neutralisierendem Bikarbonat, was die Magenschleimhaut vor ihrer eigenen Säure schützt.

Nach der Arbeitshypothese (siehe Abbildung 3) transportiert der Aufnahmetransporter OATP2A1 PGE<sub>2</sub> zur Beendigung der Wirkung ins Cytosol, um es den Prostaglandin-abbauenden Enzymen wie z.B. der Prostaglandin-15-dehydrogenase zuzuführen. Es ist zu untersuchen, ob verschiedene, zum Teil klinisch genutzte, NSAIDs einen Einfluss auf die Transportaktivität des humanen Prostaglandintransporters OATP2A1 haben und ob dieser Einfluss möglicherweise das Auftreten gastrointestinaler Nebenwirkungen durch Cyclooxygenase-inhibitoren modifiziert.

### **3.2.2 2. Teilprojekt**

#### **3.2.2.1 OATP1A2**

OATP1A2 ist das erste beschriebene humane OATP-Familienmitglied, das basierend auf seiner Homologie zum Ratten-Oatp1a1 (Jacquemin et al. 1994) aus der Leber kloniert und als ein Natrium-unabhängiger Transporter für Gallensalze und Sulfobromophthalein (BSP) charakterisiert wurde (Kullak-Ublick et al. 1995). Das *SLCO1A2*-Gen kodiert für ein Glykoprotein mit 670 Aminosäuren.

Die höchste Expression von OATP1A2 konnte im Gehirn und in den Hoden nachgewiesen werden (Kullak-Ublick et al. 1995). Weiterhin ist OATP1A2 in Cholangiozyten der Leber (siehe Abbildung 2), in Kolonkarzinomzellen und in der Hepatom-Zelllinie HepG2 exprimiert (Kullak-Ublick et al. 1997; Tamai et al. 2000; Lee et al. 2001). Auch im Kapillarendothelium des Gehirns konnte OATP1A2 nachgewiesen werden (Lee et al. 2005), wo es einen Bestandteil der Blut-Hirn-Schranke darstellt. OATP1A2 besitzt in der Leber eine molare Masse von ungefähr 85 kDa (Kullak-Ublick et al. 1997), wohingegen es in den Kapillarendothelzellen des Gehirns wahrscheinlich aufgrund einer unvollständigen Glykosylierung nur eine molare Masse von ungefähr 60 kDa zeigt (Gao et al. 2000). Ebenso konnten OATP1A2 in der apikalen Membran humaner Enterozyten detektiert werden (Kobayashi et al. 2003; Glaeser et al. 2007).

OATP1A2 besitzt das größte Substratspektrum aller humaner OATPs (Kullak-Ublick et al. 2001). Es vermittelt unter anderem die intrazelluläre Aufnahme endogener Substanzen, wie z.B. von Gallensalzen (Kullak-Ublick et al. 1995; Meier et al. 1997), Thyroidhormonen (Friesema et al. 1999), Steroidhormonen und deren Konjugate (Bossuyt et al. 1996), aber auch die Aufnahme organischer Kationen, wie z.B. von N-Methyl-Quinidin (van Montfoort et al. 1999). Ebenfalls transportiert OATP1A2 Arzneistoffe, wie z.B. Fexofenadin (Cvetkovic et al. 1999).

### **3.2.2.2 OATP2B1**

Der Aufnahmetransporter OATP2B1 wurde erstmals 1998 aus humanem GehirncDNA kloniert und besteht aus 709 Aminosäuren (Nagase et al. 1998). OATP2B1 ist ubiquitär exprimiert (Hagenbuch et al. 2003). Die höchste Expression zeigt sich in der Leber. Dort ist es in der basolateralen Membran humaner Hepatozyten (Kullak-Ublick et al. 2001) lokalisiert (Abbildung 2). OATP2B1 besitzt eine molekulare Masse von 85 kDa (Kullak-Ublick et al. 2001). Weiterhin konnte OATP2B1 in der basolateralen Membran der Synzytiotrophoblasten (St-Pierre et al. 2002) und in verschiedenen fetalen Geweben und in der Kolonkarzinom-Zelllinie CX-1 (Tamai et al. 2000) nachgewiesen werden. Ebenso konnten OATP2B1 in der apikalen Membran humaner Enterozyten detektiert werden (Kobayashi et al. 2003; Glaeser et al. 2007).

Verglichen mit anderen OATPs hat OATP2B1 ein vergleichsweise enges Substratspektrum. Es transportiert Sulfobromophthalein (BSP), Dehydroepiandrosteron-3-Sulfat und Estron-3-Sulfat (Tamai et al. 2000; Kullak-Ublick et al. 2001). Weiterhin kann OATP2B1 den Transport der häufig eingesetzten Arzneistoffe Fluvastatin (Kopplow et al. 2005) und Atorvastatin (Grube et al. 2006) vermitteln.

### **3.2.2.3 Bedeutung von Flavonoiden für die intestinale Arzneistoffresorption**

Flavonoide zählen neben den Anthocyanen zu den am häufigsten vorkommenden Polyphenolen in Gemüse, Obst und Lebensmittelzubereitungen wie Tee, Wein und Säften, sowie in zahlreichen Nahrungsergänzungsmitteln und pflanzlichen Arzneimitteln (z.B. in *Ginkgo biloba*-Zubereitungen). *In vitro*- und *in vivo*-Studien

weisen auf eine Korrelation zwischen der Zufuhr von Flavonoiden und der Abnahme des Risikos, an bestimmten Krankheiten zu erkranken hin (Hertog et al. 1993; Boots et al. 2008; Jagtap et al. 2009). *In vitro*-Studien lassen vermuten, dass manche Flavonoide wie zum Beispiel Quercetin als Antioxidantien wirken. Einige Studien sprechen für eine protektive Wirkung der Flavonoide für Herz-Kreislauf-Erkrankungen, in anderen Studien sollen Flavonoide das Krebsrisiko senken (Hertog et al. 1993; Boots et al. 2008; Jagtap et al. 2009).

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass einige dieser Flavonoide arzneistoff-metabolisierende Enzyme und Arzneistofftransporter, wie z.B. das Cytochrom P-450 3A4 oder die Arzneistoff-Efflux-Pumpe P-Glykoprotein, hemmen können (Pal et al. 2006; Alvarez et al. 2010). Diese Interaktionen deuten bereits auf die Möglichkeit einer Arzneistoff-Flavonoid-Interaktion hin. So wurden für die Flavonoide Kaempferol und Quercetin, die Inhaltsstoffe von *Ginkgo biloba*-Zubereitungen, Zwiebeln, Erdbeeren und Äpfeln sind (Hertog et al. 1993), eine Inhibition von CYP3A4 und P-Glykoprotein gezeigt. Zusätzlich dazu wurden in weiteren *in vitro*-Studien aber auch eine Induktion der Expression von CYP3A4 und P-Glykoprotein durch Kaempferol und Quercetin nachgewiesen (Pal et al. 2006; Alvarez et al. 2010). Der Einfluss von Flavonoiden auf intestinale arzneistoffmetabolisierende Enzyme und Arzneistofftransporter ist von großem Interesse, da Flavonoide, wie z.B. Apigenin, Kaempferol und Quercetin, im Darmlumen in hohen Konzentrationen vorliegen können. Die Inhibition einer OATP-vermittelten Arzneistoffaufnahme im Darm durch Flavonoide kann möglicherweise die Plasmakonzentration eines OATP-Substrats verringern, da durch die Inhibition der Transporter weniger Substrat in den Körper aufgenommen werden kann.

*In vitro*-Untersuchungen mit HeLa-Zellen und *in vivo*-Studien konnten zeigen, dass das Flavonoid Naringin, ein Bestandteil des Grapefruitsafts, die intestinale Aufnahme von Fexofenadin durch OATP1A2 hemmt (Dresser et al. 2002; Bailey et al. 2007; Glaeser et al. 2007). Diese Hemmung führt beim Menschen zu einer verringerten Fläche unter der Plasmakonzentrations-Zeit-Kurve (AUC) des OATP1A2-Substrats Fexofenadin, wenn man Grapefruitsaft gleichzeitig mit oral eingenommen Fexofenadin verabreicht (Abbildung 4).

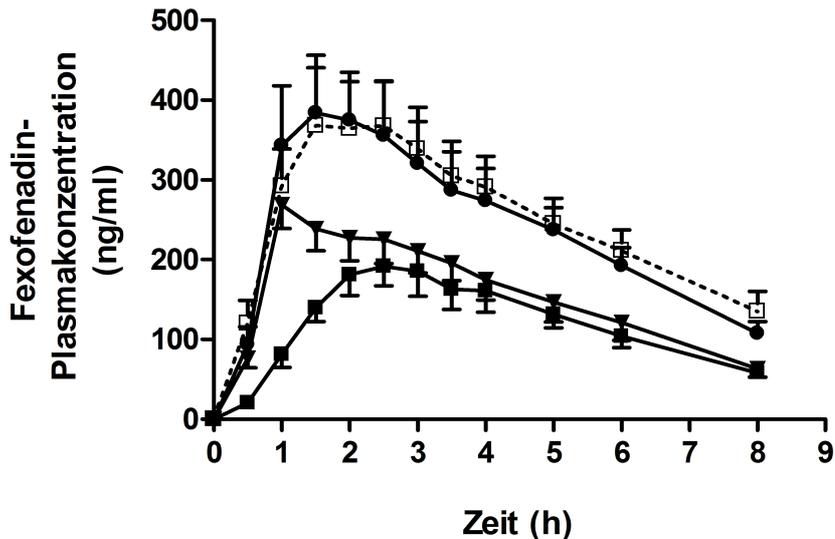


Abbildung 4: Fexofenadin-Plasmakonzentrations-Zeit-Kurve (AUC) bei gesunden Freiwilligen (n=12) nach Einnahme von Fexofenadin mit Wasser oder Grapefruitsaft. Verabreichung von 300 ml Wasser (offene Quadrate) oder 300 ml Grapefruitsaft gleichzeitig mit (gefüllte Quadrate), 2 Stunden vor (gefüllte Dreiecke) oder 4 vor (gefüllte Kreise) der Einnahme von 120 mg Fexofenadin (Glaeser et al. 2007).

Grapefruitsaft und Orangensaft in einer Konzentration von 5 % verringern durch die Hemmung des Aufnahmetransporters OATP2B1 signifikant um 82% bzw. 53% die Aufnahme von Estron-3-Sulfat in HEK293-OATP2B1-Zellen (Satoh et al. 2005). Weiterhin konnte in einer *in vitro*-Studie gezeigt werden, dass auch pflanzliche Extrakte, wie z.B. der *Ginkgo biloba*-Extrakt, die OATP2B1-vermittelte Aufnahme von Estron-3-Sulfat in HEK293-OATP2B1-Zellen verringern kann. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die gleichzeitige Gabe von Nahrungsergänzungsmitteln die Aufnahme oral eingenommener OATP2B1-Substrate im Darm verringern können (Fuchikami et al. 2006).

Zurzeit gibt es jedoch noch keine Daten, die zeigen, inwieweit die chemisch mit dem Grapefruitsaft-Flavonoid Naringin verwandten Flavonoide Apigenin, Kaempferol und Quercetin einen Einfluss auf die Funktion der humanen, intestinal exprimierten OATPs OATP1A2 und OATP2B1 haben. Daher soll in der vorliegenden Arbeit der mögliche Einfluss dieser Flavonoide auf die Funktion der intestinal exprimierten Aufnahme-Transporter OATP1A2 und OATP2B1 untersucht werden, um potentielle Mechanismen von Flavonoid-Arzneistoff-Interaktionen aufzuklären. Veränderungen der OATP1A2- und OATP2B1-Funktion durch die Flavonoide Apigenin, Kaempferol und Quercetin können möglicherweise die Aufnahme und systemische Verfügbarkeit von OATP-Substraten beeinflussen.

Zieht man die häufige Einnahme von pflanzlichen Zubereitungen, wie z.B. aus *Ginkgo biloba*, oder aber auch den Verzehr von Gemüse und Obst, die diese Flavonoide enthalten, in Betracht, so zeigt sich, dass die Interaktion mit den intestinalen Aufnahmetransportern OATP1A2 und OATP2B1 möglicherweise eine wichtige Komponente in der intraindividuellen Variabilität der Pharmakokinetik von Arzneistoffen darstellen kann.

### **3.2.3 3. Teilprojekt**

#### **3.2.3.1 OATP1B3**

Der humane OATP1B3-Aufnahmetransporter wurde im Jahr 2000 identifiziert (König et al. 2000). Er weist eine 80%ige Identität der Aminosäuren mit dem kurz zuvor entdeckten OATP1B1-Protein auf. OATP1B3 wurde aus humaner Leber kloniert. Das *SLCO1B3*-Gen kodiert für ein Glykoprotein aus 702 Aminosäuren (König et al. 2000). OATP1B3 besitzt ein Proteingewicht von 120 kDa, das nach der Deglykosylierung noch 65 kDa beträgt (König et al. 2000). OATP1B3 ist neben OATP1B1 als leberspezifisches Transportprotein bekannt und ist in der basolateralen Plasmamembran der Hepatozyten lokalisiert (König et al. 2000; Abe et al. 2001) (Abbildung 2). Weiterhin konnte *SLCO1B3*-mRNA auch in verschiedenen humanen Krebsgeweben und Tumorzelllinien aus Magen-, Kolon-, Pankreas-, Gallenblasen-, Lungen- und Gehirntumoren nachgewiesen werden (Abe et al. 2001).

OATP1B3 trägt zur Aufnahme verschiedener endogener und exogener Substrate aus dem Pfortaderblut in die Hepatozyten bei. Nach hepatischer Biotransformation können diese Substanzen dann in die Galle eliminiert werden (König et al. 2000; Abe et al. 2001; Ho et al. 2005; Briz et al. 2006). Das Substratspektrum von OATP1B3 wurde mit *Xenopus laevis*-Oozyten und in mit OATP1B3 stabil transfizierten HEK293-Zellen untersucht. Estron-3-sulfat, Estradiol-17 $\beta$ -glucuronid und Taurocholat konnten als endogene Substrate für OATP1B3 identifiziert werden (König et al. 2000). Weiterhin transportiert OATP1B3 auch exogene Substanzen [z.B. die Herzglykoside Digoxin und Ouabain, das antineoplastische organische Anion Methotrexat, das Antibiotikum Rifampicin und die natürlichen Toxine Microcystin und Phalloidin (Hagenbuch et al. 2004; König et al. 2006)].

OATP1B3 vermittelt auch den Transport der HMG-CoA-Reduktaseinhibitoren Pravastatin und Rosuvastatin (Ho et al. 2006).

### **3.2.3.2 Bedeutung konservierter Aminosäurereste in Transmembrandomänen für die Transportaktivität von OATP1B3**

Wie unter Abschnitt 3.2 beschrieben, sind einige strukturelle Merkmale der OATPs identifiziert worden, die unter allen OATP-Familienmitgliedern stark konserviert und daher möglicherweise wichtig für die Funktion der Aufnahmetransporter sind. So konnte bereits gezeigt werden, dass Cystein-Reste in der fünften extrazellulären Schleife zwischen den Transmembrandomänen IX und X wichtig für die Transportaktivität von OATP2B1 sind (Hänggi et al. 2006). Aufbauend auf einer Struktur-basierten Modellierung aller OATPs konnten Einblicke in die Funktionsweise der Transporter gewonnen werden. So wurde z.B. eine zentrale, positiv-geladene Pore, durch die negativ-geladene Substrate mittels eines Kippmechanismus hindurch gelangen, postuliert (Meier-Abt et al. 2005). Jedoch ist das Wissen über weitere Strukturen, die zum Transport beitragen, noch limitiert. Eine Möglichkeit, Strukturen zu identifizieren, welche essentiell für die Transportaktivität von OATPs sind, ist die zielgerichtete Mutagenese einzelner Nukleotide der kodierenden cDNAs und der daraus resultierende Austausch bestimmter Aminosäuren. So kann man herausfinden, ob einzelne Aminosäuren einen Einfluss auf die Transporteraktivität haben. Bisher wurden die natürlich vorkommenden Polymorphismen T334G (Ser112>Ala), G699A (Met233>Ile) und C1564T (Gly522>Cys), sowie die artifizielle Mutation G1748A (Gly583>Glu) durch Letschert und Kollegen (Letschert et al. 2004) funktionell charakterisiert. Die Varianten Ser112>Ala und Met233>Ile zeigten gegenüber dem Wildtyp vergleichbare Transporteigenschaften, wohingegen die Variante Gly522>Cys das Substrat Taurocholat nicht mehr transportierte. Für die Substrate Estradiol-17 $\beta$ -glucuronid und Estron-3-sulfat konnten keine Unterschiede gezeigt werden. Aufgrund der vorliegenden Datenlage stellt sich die Frage, inwieweit konservierte positiv-geladene Aminosäurereste in den Transmembrandomänen, die zur Pore hin gerichtet sind, einen Einfluss auf den OATP1B3-vermittelten Transport verschiedener Substrate, wie z.B. Sulfobromophthalein oder Pravastatin, haben. Durch den Austausch dieser positiv-geladenen Aminosäurereste in andere positiv-

geladene oder neutrale Reste mittels zielgerichteter Mutagenese kann der Einfluss der positiven Aminosäuren auf die Transportaktivität von OATP1B3 untersucht werden. Ebenso können die positiven Reste durch Aminosäuren ausgetauscht werden, die bei anderen OATPs an korrespondierender Position liegen.

### **3.3 Verwendete Substrate**

Für die vorliegende Arbeit wurden folgende Substrate für OATPs verwendet: Sulfobromophthalein (BSP), das Antihistaminikum Fexofenadin und die HMG-CoA-Reduktaseinhibitoren Atorvastatin und Pravastatin.

Sulfobromophthalein wird zu 48-75 % über die Leber eliminiert (Brauer et al. 1955). Es wurde im Rahmen dieser Arbeit als Modellsubstrat zur Bestimmung der Transportfunktion von OATP1A2, OATP1B3 und OATP2B1 eingesetzt.

Fexofenadin (Telfast<sup>®</sup>) ist ein Antihistaminikum der dritten Generation und wird vor allem bei allergischer Rhinitis eingesetzt. Es hebt kompetitiv die Wirkung von Histamin an peripheren Histamin-H<sub>1</sub>-Rezeptoren auf (Simons et al. 1997). Fexofenadin ist ein Substrat von OATP1A2 (Cvetkovic et al. 1999; Glaeser et al. 2007). Nozawa und Shimizu beschreiben, dass Fexofenadin auch von OATP1B3 und OATP2B1 transportiert wird (Nozawa et al. 2003; Shimizu et al. 2005), was jedoch durch Glaeser und Kollegen nicht gezeigt werden konnte.

Die HMG-CoA-Reduktaseinhibitoren Atorvastatin (Sortis<sup>®</sup>) und Pravastatin (Mevalotin<sup>®</sup>/ Pravasin<sup>®</sup>/ Pravachol<sup>®</sup> + Generika) sind Mittel der 1. Wahl bei Erkrankungen wie z.B. der Hypercholesterinämie. Die HMG-CoA-Reduktase katalysiert einen Geschwindigkeits-bestimmenden Schritt in der Cholesterinbiosynthese. Durch die Inhibition der Cholesterinbiosynthese und der dadurch bedingten Verringerung der Cholesterinkonzentration wird die Expression der LDL-Rezeptoren auf den Hepatozyten erhöht, so dass die LDL-Aufnahme in die Leberzelle gesteigert und dadurch die LDL-Konzentration im Blut verringert wird. Atorvastatin wird von OATP1A2 (Knauer et al. 2010) und OATP2B1 (Grube et al. 2006) transportiert.

## 4 Zielstellungen

Zur Thematik der Funktion und Expression gastrointestinal und hepatisch exprimierter OATPs untersuchte die vorliegende Dissertation folgende Fragestellungen:

- In welchen Zellen des Gastrointestinaltrakts ist der Prostaglandintransporter OATP2A1 exprimiert und wo ist er in der Zelle lokalisiert?
- Welchen Einfluss haben Cyclooxygenaseinhibitoren auf die Transportfunktion des Prostaglandintransporters OATP2A1?
- Welchen Einfluss haben Flavonoide auf die Transportfunktion der intestinal exprimierten Transporter OATP1A2 und OATP2B1?
- Welchen Einfluss haben konservierte positiv-geladene Lysin- und Arginin-Reste in Transmembranhelices auf die Transportaktivität von OATP1B3?

## 5 Material und Methoden

### 5.1 Materialien

#### 5.1.1 Chemikalien

<b>Chemikalien</b>	<b>Bezugsquelle</b>
<i>2-Log DNA Ladder</i>	New England Biolabs, Ipswich, UK
30% Acrylamid/Bis 37,5:1 (2,6% C)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Albumin Fraktion V	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Albumin Standard	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Ammoniumacetat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ampicillin-Natriumsalz	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
<i>BenchMark Prestained Protein Ladder</i>	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Calciumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Citrat-Puffer (10x), pH 6,0	DCS GmbH & Co. KG, Hamburg
<i>Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets</i>	ROCHE Diagnostics - Applied Science, Mannheim
Di-Kaliumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
D-PBS Pulver für 50 l	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
D-PBS, -CaCl <sub>2</sub> - MgCl <sub>2</sub> , steril	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Eisessig	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
<i>Emerald Enhancer</i>	Tropix, Bedford, MA, USA
Ethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure-di-Natriumsalz (EDTA)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Fetales Kälberserum	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
<i>Galacton</i>	Tropix, Bedford, MA, USA
Geneticin (G-418)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Glukose	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Glycerol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Glycin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Lösung 30%	Riedel-de Haën AG, Seelze
Hämatoxylin Solution, Gill No. 2	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
HEPES	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
<i>Immu-Mount</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
IPTG	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Isopropanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
<i>Label Peroxidase-konjugiertes Streptavidin</i>	BioGenex, San Ramon, CA, USA
LB-Agar	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
LB-Medium	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Magermilchpulver	Merck KGaA, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Magnesiumsulfat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Methanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
<i>Minimum Essential Medium (MEM)</i>	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Natriumbutyrat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

Natriumphosphat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
<i>Non-essential amino acids (NEAA)</i>	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
<i>One Step AEC Solution</i>	BioGenex, San Ramon, CA, USA
Orange G	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Poly-D-Lysinhydrobromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
<i>Ponceau S</i>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Powerblock Universal Blocking Reagent (10x)	BioGenex, San Ramon, CA, USA
<i>Restore Western Blot Stripping Buffer</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Restriktionsendonucleasen	New England Biolabs, Ipswich, UK
RNA-Panel <i>Human Total RNA Master Panel II</i>	Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA, USA
S.O.C.-Medium	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Szintillationsflüssigkeit <i>Ultima Gold XR</i>	PerkinElmer LAS GmbH, Rodgau-Jügesheim
T4 DNA Ligase	New England Biolabs, Ipswich, UK
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Trichloressigsäure	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Tris-Base	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Tris-HCl	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Triton X-100	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Trypsin-EDTA	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Tween 20	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
X-Gal	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Xylencyanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Xylol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

### 5.1.2 <sup>3</sup>[H]-markierte und nicht-markierte Chemikalien für Transportversuche

Chemikalien	Spezifische Aktivität	Bezugsquelle
<sup>3</sup> [H]Atorvastatin	10 Ci/mmol	BioTrend Chemikalien GmbH, Köln
<sup>3</sup> [H]PGE <sub>2</sub>	185,6 Ci/mmol	PerkinElmer Life Sciences GmbH, Rodgau-Jügesheim
<sup>3</sup> [H]Sulfobromophthalein (BSP)	14 Ci/mmol	Hartmann Analytic, Braunschweig
Acetylsalicylsäure		Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Apigenin (> 95% Reinheit, HPLC)		Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Atorvastatin-Calciumsalz		Toronto Research Chemicals Inc., North York, ON, Kanada
Diclofenac		Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Fexofenadin Hydrochlorid		Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Ibuprofen		Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Indomethacin		Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Kaempferol (> 96% Reinheit, HPLC)		Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Ketoprofen		Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Lumiracoxib		Novartis, Nürnberg und Chemos GmbH, Regenstauf
Naproxen		Sigma-Aldrich Chemie GmbH,

		München
PGE <sub>2</sub>		Cayman Chemicals, Tallinn, Estland
Pravastatin-Natriumsalz		BioTrend Chemikalien GmbH, Köln
Quercetin (> 98% Reinheit, HPLC)		Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Salicylsäure		Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Sulfobromophthalein-Dinatriumsalz		AppliChem GmbH, Darmstadt

### 5.1.3 Reaktionssysteme (Kit Systeme)

Chemikalien	Bezugsquelle
<i>Advantage cDNA Polymerase Mix</i>	Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA, USA
<i>Amersham ECL Western Blotting Detection Reagents</i>	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
<i>BCA Protein Assay Kit</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
<i>Effectene Transfection Reagent Kit</i>	QIAGEN GmbH, Hilden
<i>iScript cDNA Synthesis Kit</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
<i>iTaq DNA Polymerase</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
<i>Light Cycler FastStart DNA Master<sup>PLUS</sup> SYBR Green I Kit</i>	ROCHE Diagnostics - Applied Science, Mannheim
<i>Lipofectamine 2000 Transfection Reagent</i>	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
<i>Liquid DAB Substrate Pack</i>	BioGenex, San Ramon, CA, USA
<i>Pierce Cell Surface Protein Isolation Kit</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
<i>PureYield Plasmid Miniprep/Maxoprep System</i>	Promega GmbH, Mannheim
<i>QIAquick Gel Extraction Kit</i>	QIAGEN GmbH, Hilden
<i>QIAquick PCR Purification Kit</i>	QIAGEN GmbH, Hilden
<i>Quick Ligation Kit</i>	New England Biolabs, Ipswich, UK
<i>QuikChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit</i>	Stratagene Europe, Amsterdam, Niederlande
<i>RNAse-free DNase-Set</i>	QIAGEN GmbH, Hilden
<i>RNeasy Mini Kit</i>	QIAGEN GmbH, Hilden

### 5.1.4 Zellen

Zellen	Bezugsquelle
HEK293	DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig
HEK293-OATP1A2 G418	Abteilung Klinische Pharmakologie, Institut für Pharmakologie, Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald, Greifswald
HEK293-OATP2A1 G418	Vorliegende Dissertation
HEK293-OATP2B1 G418	Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Erlangen
HEK293-PQCXIN G418	Abteilung Klinische Pharmakologie, Institut für Pharmakologie, Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald, Greifswald
HEK293-VK G418	Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Erlangen

HEK293-VK Hygro	Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Erlangen
<i>Top10 chemically competent cells</i>	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
<i>XL10-Gold® Ultracompetent Cells</i>	Stratagene Europe, Amsterdam, Niederlande

### 5.1.5 Antikörper

<b>Antikörper (AK)</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Polyklonales Maus anti-humanes OATP2A1 Antiserum (FFFPRAMPIGAKRAPATADEARKLEEAKSRGSLVDFIKRFPCIFLRLLMN)	Abnova GmbH, Heidelberg
Rekombinantes Protein OATP2A1	Abnova GmbH, Heidelberg
Polyklonales Kaninchen anti-humanes OATP-A (OATP1A2) 67320 Antiserum	Prof. R. B. Kim, MD University of London, Ontario, Kanada
Polyklonales Kaninchen anti-humanes OATP1B3 Antiserum (SKT3fr2) (SKTCNLDMQDNAAAN)	Peptide Speciality Laboratories GmbH, Heidelberg
Monoklonaler Maus anti-humaner $\beta$ -Aktin Antikörper (Ac-Asp-Asp-Asp-Ile-Ala-Ala-Leu-Val-Ile-Asp-Asn-Gly-Ser-Gly-Lys)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
HRPO-konjugierter AffiniPure Ziege anti-Maus Antikörper IgG, Gesamtmolekül, Ziege, Maus, IgG (H+L), HRPO	Dianova GmbH, Hamburg
HRPO-konjugierter AffiniPure Ziege anti-Kaninchen Antikörper IgG, F(ab)2-Fragment, Ziege, Kaninchen, IgG (H+L), HRPO	Dianova GmbH, Hamburg
Cy2-konjugierter AffiniPure Ziege anti-Maus IgG Antikörper IgG, Gesamtmolekül, Ziege, Maus, IgG (H+L), Cy2	Dianova GmbH, Hamburg
Cy3-konjugierter AffiniPure Ziege anti-Kaninchen Antikörper IgG, Gesamtmolekül, Ziege, Kaninchen, IgG (H+L), Cy3	Dianova GmbH, Hamburg
<i>Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (H+L)*highly cross-adsorbed*</i>	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
<i>Alexa Fluor 555 goat anti-mouse IgM (<math>\mu</math> chain)</i>	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
<i>Alexa Fluor 568 goat anti-rabbit IgG (H+L) *highly cross-adsorbed*</i>	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
<i>SS Link</i> biotinylierter Ziege anti-Maus Sekundärantikörper	BioGenex, San Ramon, CA, USA
<i>SS Link</i> biotinylierter Ziege anti-Kaninchen Sekundärantikörper	BioGenex, San Ramon, CA, USA
SYTOX Green	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
SYTOX Orange	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

### 5.1.6 Spezifische Oligonucleotid-Primer

Bezugsquelle: Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

<b>Bezeichnung des Oligonucleotid-Primers</b>	<b>Sequenz</b>
oPGT-RT.for	GTGGTGAACCAGGAGGAAAAG
oPGT-RT.rev	GTATAGGCAGGTGTGGAAGAG
oOATP2A1.940	CAAAGAGGGCTCCTGCCACA
oOATP2A1-seq2	TGGCATCGGGACAGTGCCTA
oOATP2A1-g1233a	GCGCTTTGTTTTCTCTCTACAAACCATTCCCCGCA
oOATP1B3-RT.for	TCATAAACTCTTTGTTCTCTGCAA

oOATP1B3-RT.rev	GTTGGCAGCAGCATTGTCTTG
oOATP1A2-RT.for	AAGACCAACGCAGGATCCAT
oOATP1A2-RT.rev	GAGTTTCACCCATTCCACGTACA
oOATP1A2-direct.for	CACCATGGGAGAAACTGAGAAAAGAATT
oOATP1A2.seq1	TATGTTGACACTGGATTTGTGAAC
oOATP1A2-seq2.rev	GCAAGACAAGCTGACAGATATGA
oβ-Actin.for	TGACGGGGTACCCACACTGTGCCCATCTA
oβ-Actin.rev	CTAGAAGCATTTCGCGGTGGACGATGGAGGG

### Mutagenese-Primer für OATP1B3

Bezugsquelle: Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

Position und Aminosäureaustausch	Sequenz
Gly522>Cys	5'-gaaattactcagcacactgtgtgaatgcccaagagataat-3'
Lys28>Ala	5'-gacgctgcaatggattcgcgatgttcttggcagccc-3'
Lys28>Arg	5'-gacgctgcaatggattccggatgttcttggcagccc-3'
Lys28>Gly	5'-gacgctgcaatggattcgggatgttcttggcagccc-3'
Lys41>Ala	5'-agccctgtcattcagctatattgctgcagcactaggtgga-3'
Lys41>Arg	5'-agccctgtcattcagctatattgctgcagcactaggtgga-3'
Lys41>Gln	5'-ctgtcattcagctatattgctcaagcactaggtggaatcatta-3'
Lys41>Gly	5'-agccctgtcattcagctatattgctggagcactaggtgga-3'
Arg580>Ala	5'-tgcaatgggttccagtcagtcaatggttatagcaacactaggaggaat-3'
Arg580>Gly	5'-gggttccagtcagtcaatggttataggaacactaggaggaat-3'
Arg580>Lys	5'-tgggttccagtcagtcaatggtataaaaacactaggaggaattc-3'
Glu74>Ala	5'-tggtttaattgatggaagcttggcaattggaaattgctgtgattg-3'
Asn77>Ala	5'-gtttaattgatggaagcttggcaattggagcttggctgtgattgtattgtaagtact-3'
Glu74>Ala + Asn77>Ala	5'-cttgctggtttaattgatggaagcttggcaattggagcttggctgtgattgtattgtaagtac-3'

### 5.1.7 Plasmide

Plasmide	Bezugsquelle
pcDNA3.1(+)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
pcDNA3.1(+)-OATP1A2	vorliegende Dissertation
pcDNA3.1(+)-OATP2A1	vorliegende Dissertation
pcDNA3.1/Hygro(-)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
pcDNA3.1/Hygro(-)-OATP1B3 (=pOATP1B3.31)	Prof. Dr. D. Keppler, DKFZ, Abteilung für Tumorbiochemie, Heidelberg
pcDNA3.1D/V5-His-TOPO	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
pcDNA3.1D/V5-His-TOPO-OATP1A2	Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Erlangen
pCMV-SPORT6-OATP2A1	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
pCMVβ	Clontech, Mountain View, CA, USA
pCR2.1-TOPO-ACTB.RT	vorliegende Dissertation
pCR2.1-TOPO-OATP1A2.RT (=pOATP1A2-RT)	Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Erlangen
pCR2.1-TOPO-OATP1B3.RT (=pOATP1B3-RT)	Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Erlangen
pCR2.1-TOPO-OATP2A1.RT	vorliegende Dissertation

## 5.1.8 Geräte und Software

Geräte und Software	Bezugsquelle
<i>CryoBox</i>	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Einfrigerbox <i>Cryo 1°C Freezing Container</i>	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Elektrophorese-Kammer <i>Mini-PROTEAN 3 Cell</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Filmentwickler <i>X-Omat 1000</i>	Kodak, Stuttgart
Geldokumentationsimager <i>Gel Jet Imager</i>	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen
Gelelektrophorese-Kammer ( <i>Mini-</i> ) <i>Sub Cell GT</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Konfokales Lasermikroskop <i>Axiovert 100M</i>	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena
<i>LightCycler 2.0 System</i>	ROCHE Diagnostics - Applied Science, Mannheim
Luminometer Lumat 9501	Berthold, Bad Wildbad
<i>Molecular Imager ChemiDoc XRS Systems</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Software <i>Adobe Photoshop CS 3</i>	Adobe Systems GmbH, München
Software <i>GelCapture</i>	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen
Software <i>Gel-Pro Analyzer Version 4.5</i>	Media Cybernetics Europe, Marlow, UK
Software <i>GraphPad Prism Version 4.01</i>	GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA
Software <i>HUSAR (Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources)</i>	HUSAR Bioinformatics Lab, Abteilung Molekulare Biophysik, DKFZ/Steinbeis-Transferzentrum Genominformation, Heidelberg
Software <i>LightCycler Version 3.5</i>	ROCHE Diagnostics - Applied Science, Mannheim
Software <i>LSM Image Browser Version 4.2.0.121</i>	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena
Software <i>Quantity One 1-D Analysis Software</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Software <i>Vector NTI Advance 10 Version 10.3.0</i>	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Spektrophotometer <i>SmartSpec Plus</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Szintillationszähler <i>Tri-Carb 2800 TR</i>	PerkinElmer LAS GmbH, Rodgau-Jügesheim
Tankblotkammer <i>Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Thermocycler <i>MyCycler</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Triple-Quadrupol-Massenspektrometer <i>API 4000 LC-MS/MS System</i>	Applied Biosystems, Toronto, Kanada

## 5.1.9 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Bezugsquelle
<i>Amersham Hyperfilm ECL</i>	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
<i>CELLSTAR</i> Zellkultur Schale, 94x16 mm	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
<i>CELLSTAR</i> 6/12 Well Zellkultur Multiwell Platte	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Deckgläser, rund, 15 mm	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Einfrierröhrchen <i>Cryogenic Vials</i>	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Färbegefäß <i>Coplin Jar</i>	Glaswerk Wertheim, Wertheim
Gel Blotting Paper	Schleicher & Schuell BioScience GmbH, Whatman Group, Dassel
Kanülen (20-Gauge, Sterican)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Küvetten	Sarstedt, Nümbrecht
<i>Liquid Blocker Super PAP Pen</i>	Daido Sangyo Co., Ltd., Tokyo, Japan
Nitrocellulosemembran Whatman PROTRAN BA83, 0,2 µm	Schleicher & Schuell BioScience GmbH, Whatman Group, Dassel
Objektträger <i>SuperFrost Ultra Plus</i>	Gerhard Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co KG, Braunschweig

ReagiergefäÙe (0,1/0,5/1/2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Röhre (5/13/15/50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Sterilfilter <i>Filtropur S 0,2</i>	Sarstedt, Nümbrecht
SzintillationsgefäÙe <i>Pony Vial</i>	PerkinElmer LAS GmbH, Rodgau-Jügesheim
Zellkulturflaschen (25/75 cm <sup>2</sup> )	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturpetrischalen <i>CELLSTAR</i> (9,3 cm, unbeschichtet)	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Zellschaber, 25 cm Länge	Sarstedt, Nümbrecht

## 5.2 Zellkultur

Alle Arbeiten mit Zelllinien erfolgten unter keimfreien Bedingungen an einer Arbeitsbank mit laminarer Luftströmung (*laminar air flow*). Alle Medien und Zusätze wurden von der Firma Invitrogen GmbH bezogen und vor der Verwendung im Wasserbad auf 37°C vorgewärmt.

Die *human embryonic kidney* 293-Zelllinie (HEK293) ist eine Ende der 1970er Jahre etablierte, humane Zelllinie, die als Transformationsprodukt einer humanen, embryonalen Nierenzelle mit DNA-Teilen des humanen Adenovirus 5 hergestellt wurde. Diese hypotriploiden Epithelzellen wachsen adhärent, nicht polarisiert und bilden einen einschichtigen Zellrasen aus. Die HEK293-Zellen wurden in einem Kulturmedium aus *Minimal Essential Medium* (MEM, Invitrogen GmbH) mit 10% hitzeinaktiviertem (56°C, 30 Minuten) fetalen Kälberserum, 100 Einheiten/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

**Tabelle 4: Zusammensetzung der Kulturmedien**

HEK293-OATP2A1-Zellen + HEK293-VK G-418-Zellen: Kulturmedium + 800 µg/ml G418
HEK293-OATP1A2-Zellen + HEK293-VK G-418-Zellen: Kulturmedium + 500 µg/ml G418 + 2 mM nicht-essentielle Aminosäuren (NEAA)
HEK293-OATP2B1-Zellen: Kulturmedium + 800 µg/ml G418
parentale HEK293-Zellen: Kulturmedium

Die Zellen wurden routinemäßig zur Weiterkultur in Kulturflaschen mit 25 cm<sup>2</sup>- oder 75 cm<sup>2</sup>-Kulturfläche (Sarstedt) zweimal wöchentlich passagiert. Dafür wurden die adhärent und konfluent gewachsenen Zellen mit sterilem magnesium- und calciumfreiem PBS-Puffer (D-PBS, -CaCl<sub>2</sub>, -MgCl<sub>2</sub>; Invitrogen GmbH) gewaschen, um eine Komplexbildung und Inaktivierung des Enzyms Trypsin mit Mediumbestandteilen zu verhindern. Anschließend wurde eine Trypsinlösung (0,05% Trypsin, 0,02% EDTA in PBS; Invitrogen GmbH) auf den Zellrasen gegeben und dieser wurde bis zum vollständigen Ablösen der Zellen bei 37°C inkubiert. Sobald sich die Zellen von der Kulturfläche gelöst hatten, wurde das doppelte Volumen an Kulturmedium zugegeben. Dieses inaktiviert das Enzym Trypsin und führt zur Adsorption des zelltoxischen EDTA. Die Zellsuspension

wurde in ein 15 ml-Röhrchen (Sarstedt) überführt und für fünf Minuten bei 500 rpm (*revolutions per minute*) in einem Ausschwingrotor (221.08.V01; Hermle Z400 Zentrifuge) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in Kulturmedium resuspendiert. Zur Passage wurden die Zellen im Verhältnis 1:5 oder 1:10 expandiert. Für nachfolgende Versuche wurde die Zellzahl mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und nach entsprechender Verdünnung die gewünschte Zellzahl ausgesät.

Von allen in dieser Dissertation verwendeten und etablierten Zelllinien wurden für spätere Anwendungen gefrorene Zellproben („Dauerkulturen“) mit jeweils  $2 \times 10^6$  Zellen angelegt. Das benötigte Volumen an Zellsuspension wurde in ein 15 ml-Röhrchen überführt, nochmals für fünf Minuten bei 500 rpm zentrifugiert und mit Kulturmedium auf eine Konzentration von  $4 \times 10^6$  Zellen/ml resuspendiert. Um Zellschäden zu vermeiden, wurde das gleiche Volumen an Einfriermedium (4 ml Kulturmedium + 4 ml hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum + 2 ml DMSO, Roth) zugegeben, gemischt und in ein Einfrierröhrchen (Fisher Scientific GmbH) gefüllt. Die Einfrierröhrchen wurden in einer Einfrierbox bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren und nach 24 Stunden bei  $-196^\circ\text{C}$  in flüssigem Stickstoff gelagert. Um die Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurde die Zellsuspension in einem  $37^\circ\text{C}$ -warmen Wasserbad angetaut und zu 10 ml kaltem Kulturmedium zugegeben. Nach einer fünfminütigen Zentrifugation bei 500 rpm wurden die Zellen in 7 ml  $37^\circ\text{C}$ -warmem Kulturmedium resuspendiert und in eine  $25\text{ cm}^2$ -Kulturflasche ausgesät.

### **5.3 Klonierung der cDNAs kodierend für OATP1A2 und OATP2A1 sowie Mutagenese von OATP1B3**

#### **5.3.1 OATP1A2**

Das OATP1A2-Expressionsplasmid wurde hergestellt, indem die *SLCO1A2*-Referenzsequenz NM\_134431.3 aus Gehirn-RNA (*Human Total RNA Master Panel II*, Clontech Laboratories, Inc.) mittels der Oligonucleotide oOATP1A2-direct.for und oOATP1A2-RT.rev amplifiziert wurde und anschließend in den pcDNA3.1D/V5-His-TOPO-Vektor (Invitrogen GmbH) kloniert wurde. Die Klone wurden anschließend mit *Bam*HI und *Hind*III hydrolytisch gespalten, um die Klonierung zu überprüfen. Das pcDNA3.1D/V5-His-TOPO-OATP1A2-Plasmid wurde ebenfalls mittels Sequenzierung mit den Oligonucleotiden oOATP1A2-

RT.for, oOATP1A2.seq1 und oOATP1A2-seq2.rev überprüft. In einem weiteren Schritt wurde die kodierende Sequenz der *SLCO1A2*-Referenzsequenz in den pcDNA3.1(+)-Vektor (Invitrogen GmbH) umkloniert. Dazu wurde die kodierende Sequenz aus dem pcDNA3.1D/V5-His-TOPO-Vektor mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRV* und *KpnI* ausgeschnitten und in den ebenfalls mit diesen Enzymen linearisierten pcDNA3.1(+)-Vektor mithilfe der *Quick Ligation Kit* (New England Biolabs) ligiert. Die Umklonierung wurde wiederum mit einer hydrolytischen Spaltung mit *EcoRV* und *KpnI* und durch eine Sequenzierung bestätigt. Anschließend wurde das OATP1A2-Fragment in den pQCXIN-Vektor (Takara Bio Europe/Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) durch die Kooperationspartner (Dr. med. vet. Markus Keiser, Prof. Werner Siegmund) am Institut für Pharmakologie der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald umkloniert.

### 5.3.2 OATP2A1

Das OATP2A1-Expressionsplasmid wurde durch Klonierung der kodierenden Sequenz der *SLCO2A1*-Referenzsequenz NM\_0005630 aus dem pCMV-SPORT6-OATP2A1-Plasmid (Invitrogen GmbH) in den pcDNA3.1(+)-Vektor (Invitrogen GmbH) hergestellt.

Dazu wurde das pCMV-SPORT6-OATP2A1 zuerst mit *SapI* linearisiert und anschließend mit *EcoRI* und *NotI* hydrolytisch gespalten. Ebenso wurde mit dem pcDNA3.1(+)-Vektor verfahren. Das 4115 Basenpaare große OATP2A1-Fragment wurde im Folgenden mit der T4 DNA-Ligase (New England Biolabs) über Nacht bei 16°C in den linearisierten pcDNA3.1(+)-Vektor ligiert. Am nächsten Tag wurde der ligierte pcDNA3.1(+)-OATP2A1-Vektor in kompetente *E.coli*-Zellen transformiert. Zur Unterscheidung von rekombinanten und nicht rekombinanten Klonen wurde X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactosid) und IPTG (Isopropyl-1-thio-β-D-galactosid) auf LB-Ampicillin-Agarplatten und im Anschluss daran die transformierten *E. coli*-Zellen ausplattiert. Kolonien, die Plasmid ohne Insert enthalten, ließen sich mit dem α-Komplementationstest aufgrund der Blaufärbung von den rekombinanten Klonen unterscheiden. Wenn kein rekombinantes Plasmid enthalten war, konnte aus dem N-terminalen α-Peptid zusammen mit dem C-terminalen ω-Peptid eine funktionsfähige β-Galactosidase

gebildet werden, die aus X-Gal durch Spaltung 5-Brom-4-chlor-indoxyl freisetzt. Das enzymatisch abgespaltene Indoxyl wird zum unlöslichen tiefblauen Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo oxidiert. IPTG wurde als Induktor des *lac*-Promotors eingesetzt, der die Transkription der  $\beta$ -Galactosidase induziert. Aus den weißen Kolonien, die über Nacht in *lysogeny broth* Medium (LB; Roth), das mit 50  $\mu$ g/ml Ampicillin versetzt war, kultiviert wurden, konnte die doppelsträngige Plasmid-DNA mit dem *PureYield Plasmid System* (Promega) isoliert und nach einer hydrolytischen Spaltung durch das Enzym MscI gelelektrophoretisch analysiert werden. Nach erfolgreicher Identifikation eines rekombinanten Klons wurde die Nucleotidsequenz der Plasmid-DNA durch Sequenzierung (Agowa, Berlin) auf ihre Richtigkeit überprüft.

### 5.3.3 OATP1B3

Zur Identifizierung konservierter Lysin- und Arginin-Reste innerhalb der humanen OATPs wurde ein Sequenzvergleich aller elf humanen OATP-Familienmitglieder (OATP1A2, -1B1, -1B3, -1C1, -2A1, -2B1, -3A1, -4A1, -4C1, -5A1, -6A1) durchgeführt. Dieses wurde mit Hilfe des *Heidelberg UNIX Sequences Analysis Resource* (HUSAR)-Programms (Senger et al. 1995) erstellt, das auf dem *Wisconsin Genetics Computer Group Program Package* (Devereux et al. 1984) basiert.

Das Wildtyp-Expressionsplasmid pcDNA3.1/Hygro(-)-OATP1B3, das die Referenzsequenz NM\_019844 (Cui et al. 2001) enthält, wurde freundlicherweise von Professor Dietrich Keppler vom DKFZ Heidelberg zur Verfügung gestellt.

Anschließend wurden folgende OATP1B3-Mutanten generiert: Gly522>Cys, Lys28>Ala, Lys28>Arg, Lys28>Gly, Lys41>Ala, Lys41>Arg, Lys41>Gln, Lys41>Gly, Arg580>Ala, Arg580>Gly, Arg580>Lys, Glu74>Ala, Asn77>Ala und Glu74>Ala\_Asn77>Ala. Die Mutagenese wurde mit dem QuikChange *Multi Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die spezifischen Oligonucleotide sind unter Abschnitt 5.1.6 aufgelistet. Im ersten Schritt wurden die Mutagenese-Primer an die DNA hybridisiert, damit die *PfuTurbo DNA Polymerase* anschließend Doppelstrang-Moleküle mit den entsprechenden Nucleotiden generieren kann. Im zweiten Schritt wurden die PCR-Produkte mit der Restriktionsendonuklease *DpnI* hydrolytisch

gespalten, um die parentalen methylierten DNA-Templates zu zerstören. Im dritten Schritt wurde die durch die Mutagenese veränderte Plasmid-DNA, die als Einzelstrang vorliegt, in *XL 10-Gold* ultrakompetente Zellen transformiert, in denen die veränderte zirkuläre Einzelstrang-DNA *in vivo* verdoppelt wird. Rekombinante Klone wurden mithilfe der Blau-Weiß-Selektion (siehe 5.3.1) untersucht und in *lysogeny broth*-Medium (LB; Roth) (Bertani 1951), das mit 50 µg/ml Ampicillin versetzt war, kultiviert. Die doppelsträngige Plasmid-DNA wurde anschließend mit dem *PureYield Plasmid System* (Promega) isoliert und sequenziert (QIAGEN GmbH und Agowa), um Klone zu identifizieren, welche die gewünschte Mutation tragen.

Die Gly522>Cys-Mutante wurde als Kontrollmutante genutzt, da deren Einfluss auf die Membranlokalisation, Proteinexpression und Transportaktivität bereits beschrieben wurde (Letschert et al. 2004).

#### **5.4 Analyse von DNA mittels Agarosegelelektrophorese**

Für die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden Agarosegele unter nativen Bedingungen verwendet. DNA-Moleküle trennen sich bei der Elektrophorese der Größe nach auf. Zur Größenbestimmung und zur Zuordnung von Nucleinsäurefragmenten wurden Größenstandards (*2-Log DNA Ladder*, New England Biolabs) mit aufgetrennt. Es wurden Gele mit Agarosekonzentrationen von 0,8% bis 2% in 1x TAE-Puffer [50x TAE-Puffer (1 l): 242 g Tris, 57,1 ml Eisessig, 100 ml 0,5 M EDTA; pH 8,0] hergestellt, die lineare DNA-Fragmente im Bereich von 0,1 bis 8 kb gut auftrennen. Durch Zugabe der Farbstoffe Bromphenolblau (Roth), Xylencyanol (Roth) und *Orange G* (Roth) konnte die elektrophoretische Auftrennung kontrolliert werden. Nach der Auftrennung wurde das Gel in einer 0,05%igen Lösung des DNA-interkalierenden Farbstoffs Ethidiumbromid (Roth) für zehn Minuten angefärbt. Anschließend konnten die DNA-Fragmente durch Anregung mit ultraviolettem Licht der Wellenlänge 312 nm als fluoreszierende Komplexe visualisiert und digitalisiert werden. Dies erfolgte unter Verwendung eines Geldokumentationsimagers mit Aufnahmesoftware (*Gel Jet Imager, Software Gel Capture*, Intas Science Imaging Instruments GmbH).

## 5.5 Transfektionen von HEK293-Zellen für die stabile und transiente Expression von OATPs

### 5.5.1 Transfektion von HEK293-Zellen zur stabilen Expression von OATP1A2

Die stabile Transfektion der HEK293-Zellen wurde freundlicherweise durch die Kooperationspartner an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald (Dr. med. vet. Markus Keiser; Prof. Dr. med. Werner Siegmund) mittels adenoviralem Gentransfer und durch Verwendung des Expressionsplasmids pQCXIN-OATP1A2 durchgeführt. Die HEK293-OATP1A2-Zellen wurden mit Geneticin selektiert und mittels quantitativer *Real time*-PCR, Immunfluoreszenzanalysen und Immunoblotanalysen auf ihre *SLCO1A2*-mRNA-Expression und OATP2A1-Proteinexpression hin untersucht. Die HEK293-Vektorkontrollzellen (HEK293-VK) wurden mit dem Plasmid pQCXIN, dem das OATP1A2-Insert fehlt, auf die gleiche Weise hergestellt.

### 5.5.2 Transfektion von HEK293-Zellen zur stabilen Expression von OATP2A1

Die Transfektion zur stabilen Expression von OATP2A1 erfolgte mittels Lipofektion mit dem *Effectene Transfection Reagent Kit* (QIAGEN GmbH) und wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Am Tag vor der Transfektion wurden HEK293-Zellen ( $1 \times 10^6$  Zellen) in eine 9,6 mm-Petrischale (Greiner bio-one) mit 10 ml Kulturmedium ausgesät und unter normalen Wachstumsbedingungen (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) kultiviert. Bei 40-80% Konfluenz der Zellen wurde am folgenden Tag 2,0 µg der zu transfizierenden Plasmid-DNA pcDNA3.1(+)-OATP2A1 mit dem DNA-kondensierenden *EC-Buffer* verdünnt. Anschließend wurde *Enhancer* zugegeben und bei Raumtemperatur (RT) für fünf Minuten inkubiert. Danach wurde zu dieser DNA/Puffer-Mischung das *Effectene* Reagenz zugefügt und die Mischung für zehn Minuten bei Raumtemperatur (15-25°C) inkubiert, damit sich der DNA-Lipid-Transfektionskomplex bilden kann. Der *Enhancer* kondensiert die DNA-Moleküle und das *Effectene* Reagenz umhüllt die DNA anschließend mit kationischen Lipiden. Währenddessen wurden die Zellen in der Petrischale mit PBS gewaschen und anschließend 37°C-warmes Kulturmedium zugegeben. Der

DNA-Transfektionskomplex wurde in einem 15 ml-Röhrchen mit 37°C-warmen Kulturmedium gemischt und anschließend tröpfchenweise auf die Petrischale gegeben. Die Zellen wurden nachfolgend unter normalen Wachstumsbedingungen kultiviert. 24-48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen 1:5 und 1:10 in das G418-haltige Selektionsmedium (siehe Abschnitt 5.2) passagiert und solange kultiviert, bis sich einzelne Kolonien bildeten.

Die Selektion der stabil transfizierten Zellen erfolgte über das *neo*-Resistenzgen unter Einsatz des Aminoglycosidantibiotikums Geneticin (G418). Das Neomycin-Resistenzgen befindet sich auf dem Plasmid pcDNA3.1(+) (Invitrogen GmbH) und kodiert für die Aminoglykosid-Phosphotransferase. Erfolgreich transfizierte Zellen können durch dieses Enzym das toxisch wirkende G418 abbauen. Nicht-transfizierte Zellen sterben ab, da G418 an die 80S-Ribosomen bindet und die Translation hemmt. Das Kulturmedium wurde dazu mit 800 µg/ml G418 versetzt. Nach drei bis vier Wochen wurde mit der Selektion der makroskopisch sichtbaren Zellklone begonnen. Mittels autoklaviertem, gelochtem Filterpapier (Bio-Rad Laboratories GmbH), das in Trypsin getaucht wurde, wurden einzelne Zellhaufen bei einer Größe von etwa 1000 Zellen abgelöst und in eine Kavität einer Platte mit 24 Kavitäten (BD Bioscience) mit 1 ml G418-versetzten Kulturmedium überführt. Bei Subkonfluenz wurden die Kulturen sukzessive in größere Kulturflaschen passagiert. Die Zellklone wurden auf ihre *SLCO2A1*-mRNA-Expression und OATP2A1-Proteinexpression mittels quantitativer *Real time*-PCR, Immunfluoreszenzanalysen und Immunoblotanalysen überprüft. Die HEK293-Vektorkontrollzellen (HEK293-VK) wurden mit dem Plasmid pcDNA3.1(+) auf die gleiche Weise hergestellt.

### **5.5.3 Transfektion von HEK293-Zellen zur transienten Expression von OATP1B3-Wildtyp und OATP1B3-Mutanten**

Um den Einfluss der unter 5.3.3 beschriebenen OATP1B3-Mutanten auf die Proteinmenge, die Membranlokalisation und auf die Transportaktivität des OATP1B3-Proteins untersuchen zu können, wurden parentale HEK293-Zellen in Poly-D-Lysin-beschichtete Zellkulturplatten ausgesät. Die Aussaat erfolgte in einer Konzentration von 300000 Zellen pro Kavität in eine Platte mit 12 Kavitäten für die Immunfluoreszenz und die Transportaktivitäts-Versuche sowie in einer

Konzentration von 750000 Zellen pro Kavität in eine Platte mit sechs Kavitäten für Immunoblotanalysen. 24 Stunden nach der Aussaat wurden die Zellen mit 1500 ng/Kavität (Immunfluoreszenz, Transportaktivitäts-Versuche) oder 4000 ng/Kavität (Immunoblot) des jeweiligen Expressionsplasmids (Vektorkontrolle, Wildtyp, Mutanten) mit Hilfe des *Lipofectamine 2000*-Reagenz (Invitrogen GmbH) nach Angaben des Herstellers transfiziert. Nach einer 24-stündigen Inkubation der Zellen mit dem Transfektionsreagenz wurden die Zellen für weitere 24 Stunden mit 10 mM Natriumbutyrat inkubiert (Cui et al. 1999), das in Kulturmedium gelöst war, um die Menge des rekombinanten Proteins zu erhöhen. Natriumbutyrat wirkt inhibierend auf die Histondeacetylase (HDAC), die normalerweise die Transkription von Proteinen hemmt (Boffa et al. 1978).

Um einen Einfluss der Variabilität der Transfektionseffizienz auszuschließen, wurde eine Kotransfektion des pcDNA3.1/Hygro(-)-OATP1B3-Wildtypplasmid oder der Mutantenplasmide mit 25 ng eines  $\beta$ -Galactosidase-Referenzplasmid pCMV $\beta$  (Clontech) durchgeführt (Gradhand et al. 2007). Dabei wird vorausgesetzt, dass das kotransfizierte Plasmid in gleichem Maße transfiziert wird wie die OATP1B3-Plasmide. Das Enzym  $\beta$ -Galactosidase spaltet vom Substrat Galakton (AMPGD) den Galaktosid-Anteil ab. Das aus dieser Reaktion resultierende AMPD-Anion zerfällt bei pH>9 unter Lichtemission. Die Bestimmung der Aktivität der  $\beta$ -Galactosidase wurde modifiziert nach Jain und Magrath (Jain et al. 1991) durchgeführt, mit einem Luminometer (Lumat 9501; Berthold Detection Systems) detektiert und in relativen Einheiten ausgedrückt. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Mutanten und dem Wildtyp bezüglich der Transfektionseffizienz innerhalb eines und zwischen verschiedenen Kotransfektions-Experimenten beobachtet.

## **5.6 Probenmaterial**

### **5.6.1 Analyse der *SLCO2A1*-mRNA-Expression und OATP2A1-Proteinexpression in humanen gastroduodenalen Biopsien**

Für die Analyse der OATP2A1-Expression in humanen gastroduodenalen Biopsien standen Proben aus einer bereits publizierten Studie der Kooperationspartner Prof. Dr. med. Peter Malfertheiner, PD Dr. rer. nat. Thomas Wex (Klinik für Gastroenterologie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg)

und PD Dr. med. Gerhard Treiber (jetzt Klinik für Innere Medizin, Zollernalb-Klinikum gGmbH, Balingen) zur Verfügung (Venerito et al. 2006; Wex et al. 2006). In dieser Studie unterzogen sich gesunde *Helicobacter pylori*-negative Freiwillige (n=9), die keine Medikamente einnahmen, einer Gastroduodenoskopie. Die Biopsien aus dem Antrum, Corpus und Duodenum wurden verwendet, um die *SLCO2A1*-mRNA-Expression und OATP2A1-Proteinexpression zu untersuchen. Alle Probanden hatten ihre schriftliche Einverständniserklärung zur Teilnahme gegeben. Die lokalen Ethikkomitees der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg und der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg gaben ihre zustimmende Bewertung für diese Untersuchungen. Für die Bestimmung der *SLCO2A1*-mRNA-Expression und OATP2A1-Proteinexpression in den humanen gastroduodenalen Biopsien wurden die cDNA und die Proteinproben von den Kooperationspartnern der Universität Magdeburg zur Verfügung gestellt.

#### **5.6.2 Analyse der OATP2A1-Lokalisation in humanen gastroduodenalen Biopsien**

Sowohl Paraffin-eingebettete Biopsien von gesunden Personen als auch makroskopisch und mikroskopisch für gesund befundene Magen/Darm-Sektionen aus dem Antrum, Corpus und Duodenum wurden von Prof. Dr. med. Kerstin U. Amann und Dr. med. Tilman R. Rau aus dem Gewebearchiv des Pathologischen Instituts (Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg) zur Verfügung gestellt. Die Verwendung der Proben erfolgte nach zustimmender Bewertung der Ethikkommission. Zehn verschiedene Biopsien jeder Magen/Darm-Region wurden untersucht.

#### **5.7 mRNA-Expressionsanalyse mittels quantitativer *Real time*-PCR**

Die mRNA-Expression transient oder stabil transfizierter Zellen wurde mittels quantitativer *Real time*-PCR in einem LightCycler 2 System (ROCHE Diagnostics - Applied Science) durchgeführt. Dazu wurden  $1 \times 10^6$  HEK293-Zellen in einer 9,6 mm-Petrischale (CELLSTAR; Greiner bio-one) ausgesät und unter normalen Wachstumsbedingungen kultiviert. 24 Stunden vor der mRNA-Isolierung wurden

die Zellen mit Natriumbutyrat-haltigem Kulturmedium induziert. Am darauffolgenden Tag wurde zur Isolierung der total RNA aus den Zellklonen das *RNeasy Mini Kit* (QIAGEN GmbH) eingesetzt und nach Angaben des Herstellers verwendet.

Zuerst wurde das Kulturmedium abgenommen und der mit  $\beta$ -Mercaptoethanol versetzte Puffer *RLT* zugegeben. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber (Sarstedt) abgekratzt und das Lysat in ein Mikrozentrifugenröhrchen überführt. Zum Homogenisieren wurde das Lysat mindestens fünfmal durch eine 20-Gauge-Kanüle (0,9 mm Durchmesser; Sterican, B. Braun Melsungen AG) auf- und abgezogen. Darauffolgend wurde 70%iges Ethanol dem homogenisierten Lysat zugegeben und das Gemisch, das die gefällten Nucleinsäuren enthält, auf eine *RNeasy-Zentrifugationssäule* aufgetragen. Nach einem Waschschrift mit *RW1*-Puffer wurde auf der Säule ein DNase-Verdau durchgeführt. Hierzu wurden *DNase I*-Stocklösung mit dem Puffer *RDD* versetzt und dieser Mix auf die Zentrifugationssäule des Kits gegeben und bei Raumtemperatur für 15 Minuten inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschriften mit *RW1*- und *RPE*-Puffer wurde die RNA anschließend mit 50  $\mu$ l RNase-freiem Wasser von der Säule eluiert. Alternativ wurde die RNA mit dem *High Pure RNA Isolation Kit* (ROCHE Diagnostics - Applied Science) isoliert, das nach dem gleichen Prinzip funktioniert. Die Konzentration der isolierten RNA wurde mit Hilfe eines Spektrometers (*SmartSpec Plus*, Bio-Rad Laboratories GmbH) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt.

Die RNA wurde mit dem *iScript cDNA Synthesis Kit* (Bio-Rad Laboratories GmbH) nach Angaben des Herstellers in cDNA umgeschrieben. Die Erststrangsynthese erfolgte mit einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase (Reverse Transkriptase). Hierbei wurde die Gesamt-RNA mit deionisiertem Wasser verdünnt und mit *5x-iScript-Reaktionsmix* und *iScript-Reverse Transkriptase* versetzt. Die Erststrangsynthese erfolgte in einem Thermocycler (*MyCycler Thermocycler*, Bio-Rad Laboratories GmbH) nach Herstellerangaben.

Die quantitative *Real time*-PCR wurde mit dem LightCycler FastStart DNA Master<sup>PLUS</sup> SYBR Green I Kit (ROCHE Diagnostics - Applied Science) nach Angaben des Herstellers in einem *Real time*-Kapillar-Cycler (LightCycler 2.0 System, ROCHE Diagnostics - Applied Science) durchgeführt. Hierbei wurde der DNA-bindende Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I verwendet, der sich in die

kleine Furche doppelsträngiger DNA einlagert. Dazu wurden der fünffach konzentrierte Master Mix, die zehnfach konzentrierten PCR Oligonucleotid-Primer (forward und reverse; 0,5 µM Endkonzentration) und das cDNA Template gemischt. Kalibrierproben, die aus Plasmid-DNA mit einem *Real time*-PCR-Fragment des zu untersuchenden Gens bestanden, wurden über einen Konzentrationsbereich von 0,1 ng/µl bis 0,0001 ng/µl mitgeführt. Die spezifischen Oligonucleotid-Primer sind unter 5.1.6 aufgeführt. Die PCR-Fragmente wurden durch eine initiale Denaturierung von zehn Minuten bei 95°C, gefolgt von 40 Zyklen einer Denaturierung von zehn Sekunden bei 95°C, einer Primer-Hybridisierung von zehn Sekunden bei der Primer-abhängigen Schmelztemperatur ( $T_m$ ) und einer Polymerisation für 30 Sekunden bei 72°C amplifiziert. Die Spezifität des amplifizierten PCR-Produkts wurde mit einer Schmelzkurvenanalyse bestimmt. Hierbei wurden die PCR-Fragmente bei steigender Temperatur von 0,1°C/s bis 95°C aufgeschmolzen. Die resultierenden Schmelzkurven erlaubten die Unterscheidung zwischen Primer-Dimeren und dem spezifischen Produkt, welches bei höheren Temperaturen schmilzt als die Primer-Dimere. Anschließend wurde für die Quantifizierung ein externer Standard, hier eine Verdünnungsreihe von Plasmid-DNA des untersuchten Gens verwendet. Die Ergebnisse der quantitativen Analyse wurden als prozentuale Expression relativ zum Haushalts-Gen  $\beta$ -Aktin als *arbitrary units* (a.u.) angegeben.

## 5.8 Proteinexpressionsanalyse

### 5.8.1 Immunfluoreszenzmikroskopie

Um die Proteinexpression in Zellen nachweisen zu können, wurden die Zellen für Immunfluoreszenzversuche auf runden Deckgläsern mit einem Durchmesser von 15 mm (Roth), die in die 12 Kavitäten einer Gewebekulturplatte (CELLSTAR Cell Culture Multiwell Plate, Greiner Bio-one) gelegt wurden, kultiviert. Um das Anhaften der Zellen zu ermöglichen, wurden die Deckgläser vor dem Aussäen mit Poly-D-Lysin (0,1 mg/ml, sterilfiltriert) beschichtet. Die ausgesäte Zellzahl betrug  $5,5 \times 10^5$  Zellen/Kavität. Die Zellen wurden unter normalen Kulturbedingungen kultiviert. Ein Tag vor Versuchsdurchführung wurden die Zellen mit 10 mM Natriumbutyrat-haltigem Kulturmedium induziert. Die Immunfluoreszenzfärbung wurde nach bereits publizierten Protokollen (Lee et al. 2005; Glaeser et

al. 2007; Mandery et al. 2010) durchgeführt. Zuerst wurden am Versuchstag das Medium abgesaugt und die Zellen mit 1 ml *tris-buffered-saline* (TBS) gewaschen. Die Zellen wurden anschließend zehn Minuten in 70%igem Methanol fixiert und durch eine zehnmütige Inkubation mit 0,4% TBS-Triton X-100 permeabilisiert, damit der Antikörper an intrazelluläre Strukturen binden kann. Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, erfolgte eine 45-minütige Inkubation mit einer 2%igen bovinen Serumalbuminlösung (BSA). Die eigentliche Immunreaktion wurde durch eine 1,5-stündige Inkubation oder eine Inkubation über Nacht mit dem Primärantikörper gestartet. Vor Zugabe des Sekundärantikörpers wurde überschüssiger und unspezifisch gebundener Primärantikörper durch dreimaliges Waschen mit 0,05% TBS-Tween 20 entfernt. Die Inkubation mit dem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Sekundärantikörper wurde für 30 Minuten bei 37°C im Inkubator durchgeführt. Nachfolgend wurden die Zellen bei den Inkubationen lichtgeschützt aufbewahrt. Es folgten zwei Waschschrte mit 0,05% TBS-Tween 20. Bei Bedarf wurden die Zellen mit *SYTOX Green* oder *SYTOX Orange* (Invitrogen GmbH) inkubiert, um die Zellkerne zu färben. Es folgten wiederum zwei Waschschrte mit 0,05%igem Tween 20/TBS. Zur Entfernung der Salzlösung wurde der Zellrasen kurz mit deionisiertem Wasser abgespült. Die Deckgläser wurden anschließend aus den Kavitäten gehoben und mit dem Zellrasen nach unten mit *Immun-Mount*-Einbettmedium (Thermo Electron Corporation) auf Objektträgern (Roth) platziert. Die rote und grüne Fluoreszenz der sekundären Antikörper und der *SYTOX*-Färbungen wurde mithilfe konfokaler Lasermikroskopie (Axiovert 100M, Carl Zeiss MicroImaging GmbH) detektiert. Dadurch konnten die beiden spezifisch färbenden Fluoreszenzfarben gleichzeitig detektiert werden. Eine Kolokalisation der detektierten Proteine wurde durch Überlagerung der Fluoreszenzfarben und der daraus resultierenden Gelbfärbung mittels der Software *LSM Image Browser Version 4.2.0.121* dargestellt.

### **5.8.2 Immunhistochemie von OATP2A1 und semiquantitative Auswertung mittels IRS-Score**

Um Proteine, wie z.B. OATP2A1, in Paraffin-eingebetteten Gewebeschnitten zu lokalisieren, wurden immunhistochemische Analysen nach bereits publizierten Protokollen durchgeführt (Glaeser et al. 2007; Mandery et al. 2010). Die folgenden

Inkubationsschritte wurden in Glasküvetten durchgeführt. Zuerst wurden Paraffinschnitte mit Xylol (Merck KGaA) und Ethanol deparaffinisiert. Dazu wurden die Schnitte dreimal fünf Minuten in Xylol, zweimal fünf Minuten in Ethanol (absolut), einmal zehn Minuten in Ethanol (absolut) und jeweils eine Minute in 90%, 80% und 70% (v/v) Ethanol inkubiert. Danach wurden die Schnitte einmal fünf Minuten in PBS gewaschen und währenddessen Citratpuffer pH 6,0 (DCS GmbH und Co. KG) in der Mikrowelle erhitzt. Anschließend wurde der Objektträger zur Antigendemaskierung im heißen Citratpuffer inkubiert bis die Flüssigkeit Raumtemperatur erreicht hatte. Nach einem weiteren Waschschrift in PBS wurden die Schnitte für 20 Minuten in 10% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 100 mM Tris (pH 7,4) bei Raumtemperatur inkubiert, um die endogene Peroxidaseaktivität zu unterdrücken. Anschließend wurden die Objektträger dreimal mit PBS gewaschen. Um unspezifische Antikörper-Antigen-Wechselwirkungen zu vermeiden, wurden die Schnitte zuerst für 15 Minuten in 1xPBS/0,1% Triton X-100-Lösung gewaschen und danach für 60 Minuten in dem Blockierungspuffer *PowerBlock Universal Blocking Reagent* (BioGenex) inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte über Nacht bei 4°C mit dem polyklonalen Maus anti-humane n OATP2A1-Primärintiserum (verdünnt in Blockierungspuffer) inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte dreimal für zehn Minuten in 1xPBS/0,1% Triton X-100-Lösung gewaschen und danach für 20 Minuten bei Raumtemperatur mit einem biotinylierten Ziege anti-Maus Sekundärintikörper (*Mouse Link*, BioGenex) und anschließend für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit einem Meerrettich-Peroxidase-konjugiertem Streptavidin (*Label*, BioGenex) inkubiert. Nach diesen Schritten wurden die Objektträger dreimal für zehn Minuten in 0,1% (v/v) Triton X-100-Lösung und einmal für fünf Minuten in PBS gewaschen. Die Proteine wurden mit Hilfe einer Farbreaktion durch die Umsetzung der Substrate 3-Amino-9-ethylcarbazole oder Diaminobenzidin (*AEC One Step Solution* und *Liquid DAB Substrate Pack*, BioGenex) visualisiert. Die Zellkerne wurden in den Gewebeschnitten mit *Hämatoxylin Solution, Gill No. 2* (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) gegengefärbt. Anschließend wurden die Schnitte mit *Immun-Mount*-Einbettmedium (Thermo Electron Corporation) und einem Deckgläschen eingebettet. Die Auswertung erfolgte am Lichtmikroskop.

Die Expression von OATP2A1 in Antrum, Corpus und Duodenum wurde mit Hilfe eines immunhistochemischen Punkte-Bewertungs-System (*immunohistochemical*

*rating scores*, IRS) (Remmele et al. 1987) quantifiziert. Die Intensität der Färbung wurde wie folgt eingeteilt: 0 - keine Färbung; 1 - schwache Färbung; 2 - mittlere Färbung und 3 - starke Färbung. Die Anzahl an gefärbten Zellen wurde wie folgt eingeteilt: 0 - keine Zellen; 1 - <10% Zellen; 2 - 10-50% Zellen; 3 - 50-80% Zellen und 4 - >80% Zellen. Für die Berechnung des IRS wurden die Werte der Intensität und der Anzahl der gefärbten Zellen multipliziert. Sporadisches Auftreten von positiv gefärbten Schnitträndern wurde als artifizieller Effekt bewertet und von der IRS Analyse ausgeschlossen.

Die Spezifität des immunreaktiven Signals von OATP2A1 wurde durch Negativkontrollen bestätigt. Dabei wurden die Gewebeschnitte mit Blockierungspuffer oder einem polyklonalen Antiserum, das durch eine einstündige Präinkubation bei 37°C mit dem antigene n Peptid (Abnova) neutralisiert wurde, inkubiert.

### **5.8.3 Immunoblotanalyse**

Beim Protein-Blotting werden Proteine auf eine Membran überführt und dort einer Nachweisreaktion unterzogen, die für ein Protein spezifisch ist. Die Proteine werden dazu gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend aus dem Gel auf die Membran transferiert. Die Immunoblotanalyse wurde nach einem bereits publizierten Protokoll (Glaeser et al. 2010) durchgeführt.

Für die Isolierung der Gesamtmembranfraktion aus kultivierten Zellen wurden  $4,5 \times 10^6$  Zellen in eine Poly-D-Lysin beschichtete Petrischale (10 cm Durchmesser) ausgesät und einen Tag vor der Isolation mit 10 mM Natriumbutyrat-haltigem Medium induziert. Für die Analyse der OATP1B3-Mutanten wurden  $7,5 \times 10^5$  Zellen in Poly-D-Lysin beschichtete Zellkulturplatten mit sechs Kavitäten ausgesät und die Zellen nach 24 Stunden mit 4000 ng pro Kavität des jeweiligen Expressionsplasmids mittels Lipofectamine 2000 (Invitrogen GmbH) transfiziert (siehe 5.5.3). Am Versuchstag wurde das Medium aspiriert und die Zellen mit PBS (Invitrogen GmbH) gewaschen. Durch Zugabe von PBS und mit Hilfe eines Zellschabers (Sarstedt) wurden die Zellen von der Petrischale gelöst und anschließend in ein 15 ml-Zentrifugationsröhrchen überführt. Es folgte eine fünfminütige Zentrifugation bei 750 rpm (Hermle Z400; Hermle AG). Das gebildete Zellpellet wurde in Proteinlagerungspuffer pH 7,4 [eine *Complete Mini Protease*

*Inhibitor Cocktail* Tablette (Proteaseinhibitorenmischung, ROCHE Diagnostics-Applied Science) + 100 mM Tris-HCl + 1 mM EDTA] resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und mittels Ultraschall zweimal für 15 Sekunden behandelt. Das Zellhomogenat wurde bei -20°C gelagert.

Die Quantifizierung des Proteingehaltes erfolgte nach der BCA-Methode unter Verwendung des *BCA Protein Assay Kits* (Fisher Scientific GmbH). Von jedem Zellysate wurden 50 µl in Reaktionsgefäße überführt und 1 ml Arbeitslösung [50 Volumenanteile Lösung A (BCA/0,1 M NaOH) und ein Volumenanteil Lösung B (4% Cu<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>); *BCA™ Protein Assay Kit*] dazu gegeben, gemischt und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Lösungen in Halbmikroküvetten aus Polystyrol (Sarstedt) überführt und die Extinktion bei 562 nm mit dem Spektrometer (*SmartSpec Plus*, Biorad) gemessen. Zur Quantifizierung des Proteingehaltes wurden in gleicher Weise Kalibrierproben aus Rinderserumalbumin (*BCA Protein Assay Kit*, Pierce) in Proteinlagerungspuffer für die Konzentrationen 100, 200, 250 und 500 µg/ml angesetzt. Die Quantifizierung erfolgte mittels linearer Regressionsanalyse der Kalibrierproben. Falls notwendig, wurden die Proben vor der Messung verdünnt.

Vor dem Auftragen auf das Polyacrylamidgel wurden die Proben mit Lämmli-Puffer behandelt. Hierzu wurde die gewünschte Menge an Gesamtprotein mit Lämmli-Puffer (62 mM Tris-HCl pH 6,8, 2% SDS, 10% Glycerol, 0,01% Bromphenolblau, 0,4 mM Dithiothreitol) verdünnt. Anschließend wurden die Proben für fünf Minuten bei 95°C in einem Heizblock (Thermoleader, UniEquip GmbH) denaturiert. Durch die Zugabe des anionischen Detergenz SDS wurden die Proteine im Verhältnis zu ihrem Molekulargewicht anionisiert, sodass sie nach ihrer molekularen Größe im Polyacrylamidgel aufgetrennt werden konnten. Das Dithiothreitol bewirkte eine Reduzierung der Disulfidbrücken zwischen den Polypeptidketten.

Die Proteine werden bei einer diskontinuierlichen Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen nach Laemmli in Gegenwart von 0,1% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS) nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Dazu wurde ein 10%iges Trenngel und darauf anschließend ein 4%iges Sammelgel gegossen, wodurch man eine Konzentrierung der Probe zu einer schmalen Startbande erhält. Ein 10%iges

Trenngel eignet sich besonders für die Auftrennung von Proteinen mit der Molekularmasse zwischen 16kDa und 120 kDa.

**Tabelle 5: Herstellung von SDS-Polyacrylamidgelen für Mini-PROTEAN 3 Elektrophorese Set (Volumenangabe für ein Gel)**

<b>Chemikalien</b>	<b>Sammelgel (4%)</b>	<b>Trenngel (10%)</b>
30% (w/v) Acrylamid	325 µl	1,65 ml
1,5 M Tris-HCl pH 8,8		1,25 ml
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	625 µl	
10% (w/v) Sodiumdodecylsulfat (SDS)	25 µl	50 µl
10% (w/v) Ammoniumperoxidsulfatlösung (APS)	12,5 µl	25 µl
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	1,25 µl	2,5 µl
H <sub>2</sub> O	1,53 ml	2,05 ml

Die vorbereiteten Proben wurden ebenso wie der Proteinstandard (*Benchmark PreStained Protein Ladder*, Invitrogen GmbH) in die Kammtaschen des Gels pipettiert. Das Gel wurde für 15 Minuten bei 100 V gestartet. Anschließend wurden die Proben bei 130 V für eine Stunde aufgetrennt. Hierfür wurde eine vertikale Elektrophoresekammer (*Mini-PROTEAN 3*, Bio-Rad Laboratories GmbH), die mit Laufpuffer gefüllt war, verwendet. Der Laufpuffer (pH 8,9) bestand aus 25 mM Tris-Base, 200 mM Glycin und 3,5 mM SDS (alles Roth) in H<sub>2</sub>O. Nach Beendigung des Laufes wurde das Sammelgel vom Trenngel abgetrennt.

Unmittelbar nach Abschluss der Gelelektrophorese erfolgte der Transfer der getrennten Proteine auf eine proteinbindende Membran. Mittels *Wet-Blot*-Verfahren (Towbin et al. 1979) wurden die Proteine durch Anlegen einer Spannung aus dem Gel elektrophoretisch auf eine Nitrocellulosemembran (Whatman PROTRAN 0,2 µm, Schleicher & Schuell BioScience GmbH, Whatman Group) transferiert. Das Trenngel wurde zusammen mit der Nitrocellulosemembran, den Filterkartons und den Schwammtüchern für 15 Minuten in Transferpuffer äquilibriert. Der Transferpuffer pH 8,3 (Towbin-Puffer) setzte sich aus 25 mM Tris-Base, 192 mM Glycin und 20% (v/v) Methanol (alles Roth) in H<sub>2</sub>O zusammen. Dieser wurde jeweils frisch angesetzt und im Kühlschrank vorgekühlt. Das Methanol erleichterte die Bindung der Proteine an

die Nitrocellulosemembran. Der Proteintransfer erfolgte in einer Tankblotkammer (*Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell*, Bio-Rad Laboratories GmbH), die mit Transferpuffer aufgefüllt wurde, für 90 Minuten bei 100 V. Der Eisakku wurde nach 45 Minuten gewechselt. Nach Beendigung des Proteintransfers wurde die Membran in PBS (*Dulbecco's phosphate-buffered saline*) aufbewahrt.

Zur Kontrolle der Transfereffizienz wurde die Membran anschließend für zehn Minuten mit *Ponceau-S*-Lösung [0,5% (v/v) *Ponceau S*, Sigma-Aldrich Chemie GmbH in 3% (v/v) Trichloressigsäure, Roth] gefärbt, um alle Proteine unspezifisch anzufärben. Nach Aufnahme eines Bildes mittels eines Kopierers oder Scanners wurde die Membran mit dem Waschpuffer PBST [*phosphate-buffered saline tween*, 0,05% (v/v) Tween 20 (Roth) in PBS] wieder entfärbt.

Zur Absättigung von unspezifischen Bindungsstellen wurde die Membran eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem Blockierungspuffer [5% (w/v) Magermilchpulver (Merck KGaA) in PBST] auf dem Wippschüttler inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation der Membran mit der Primärantikörperlösung (Primärantikörper verdünnt in Blockierungspuffer) über Nacht bei 4°C auf dem Wippschüttler. Nicht-gebundener Primärantikörper wurde danach durch drei zehnmütige Waschschrirte mit PBST wieder entfernt. Darauf folgte eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur auf dem Wippschüttler mit einem in Blockierungspuffer verdünnten, Meerrettich-Peroxidase konjugierten Sekundärantikörper, der gegen die Spezies, in welcher der Primärantikörper generiert wurde, gerichtet war. Um die Sekundärantikörperlösung zu entfernen, wurde die Membran dreimal für zehn Minuten mit PBST gewaschen.

Um die an das Protein gebundenen Reagenzien sichtbar zu machen, wurde die Membran für fünf Minuten bei Raumtemperatur mit dem *Amersham ECL Western Blotting Detection Reagents* (GE Healthcare Europe GmbH) inkubiert. Durch die indirekte Markierung des Proteins mit Meerrettichperoxidase (HRP) konnte nach Zugabe des entsprechenden Substrats (Luminol/4-Jodphenol) die Chemilumineszenz nachgewiesen werden. Die Chemilumineszenz wurde mithilfe autoradiographischer Filme (*Amersham Hyperfilm ECL*, GE Healthcare Europe GmbH) oder mit einer CCD-Kamera (*Molecular Imager ChemiDoc XRS System*, Bio-Rad Laboratories GmbH) digital visualisiert. Die Entwicklung der autoradiographischen Filme erfolgte in einem Filmentwickler (*X-Omat 1000*, Kodak). Nach erfolgreicher Detektion der Proteine auf der Membran konnte der

Immunkomplex mittels einer 20-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur mit dem *Restore Western Blot Stripping Buffer* (Fisher Scientific GmbH) entfernt werden. Nach dem Waschen der Membran mit Waschpuffer konnte die Membran mit weiteren Antikörpern (z.B. gegen  $\beta$ -Aktin) inkubiert werden.

Die densitometrische Auswertung der eingescannten autoradiographischen Filme erfolgte mit Hilfe der Software *Gel-Pro Analyzer Version 4.5.00.0* (Media Cybernetics, Inc). Die digitalen Aufnahmen des *Molecular Imager ChemiDoc XRS Systems* konnten direkt mit dem Programm *Quantity One 1-D Analysis Software* (Bio-Rad Laboratories GmbH) ausgewertet werden. Die Proteinexpression wurde auf die  $\beta$ -Aktin-Expression normalisiert.

Die Spezifität des OATP2A1-Antikörpers gegenüber anderen humanen OATPs wurde mit Hilfe eines Immunoblots überprüft. Dazu wurden Zellhomogenate von Zelllinien, die stabil OATP1A2, OATP1B1, OATP1B3, OATP2B1, OATP4A1 und OATP4C1 exprimieren, verwendet. Es konnte keine Kreuzreaktivität beobachtet werden.

Für den OATP1B3-Wildtyp und einige OATP1B3-Mutanten (Lys41>Ala, Lys41>Gly, Arg580>Gly, Arg580>Lys und Glu77>Ala) wurde die Proteinexpression in der Zelloberfläche genauer mit Hilfe einer Zelloberflächen-Biotinylierung untersucht. Die Biotinylierung und Isolation der Zelloberflächenproteine wurde mit dem *EZ-Link Sulfo NHS-SS Biotin Kit* (Fisher Scientific GmbH) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dafür wurden die Zellen wie oben beschrieben mit den jeweiligen OATP1B3-Expressionsplasmiden transfiziert und nach 24-stündiger Inkubation mit Natriumbutyrat-haltigem Kulturmedium mit dem Biotinylierungs-Reagenz *EZ-Link Sulfo NHS-SS Biotin* (Fisher Scientific GmbH) behandelt. Nach der Zellyse und der Solubilisierung der Zellmembranen wurde die Proteinmenge mit Hilfe des *BCA Protein Assay Kit* (Fisher Scientific GmbH) bestimmt. Zur Isolierung des biotinylierten Zelloberflächen-Proteins wurde *NeutrAvidin Agarose Resin* (Fisher Scientific GmbH) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die isolierten Zelloberflächenproteine wurden wie oben beschrieben mittels Immunoblot analysiert.

## 5.9 Transportversuche

### 5.9.1 Quantifizierung der zellulären Akkumulation von radioaktiv markierten Substanzen mittels Flüssigkeitsszintillationsmessung

Um die Aufnahme eines Substrats in die transfizierten Zellen untersuchen zu können, wurden Transportversuche mit radioaktiv markierten Substanzen nach bereits publizierten Protokollen durchgeführt (Seithel et al. 2007; Bachmakov et al. 2008; Mandery et al. 2010). Dazu wurden die Zellen in Poly-D-Lysin-beschichteten (0,1 mg/ml, sterilfiltriert; Sigma-Aldrich Chemie GmbH) Platten mit zwölf Kavitäten in einer Konzentration von  $3 \times 10^5$  Zellen/1 ml/Kavität für transient transfizierte Zellen und  $7,5 \times 10^5$  Zellen/800  $\mu$ l/Kavität für stabil transfizierte Zelllinien ausgesät und 24 Stunden vor dem Versuch mit 10 mM Natriumbutyrat-haltigem Kulturmedium inkubiert, um die Proteinexpression zu steigern.

Am folgenden Tag wurden die Transport-Versuche mit radioaktiven  $^3\text{[H]}$ -markierten Substanzen durchgeführt. Zuerst wurden die Zellen mit auf 37°C vorgewärmtem Transportpuffer (142 nM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1,2 mM  $\text{MgSO}_4$ , 1,5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 5 mM Glukose und 12,5 mM HEPES, pH 7,3; sterilfiltriert) gewaschen, um restliches Medium zu entfernen. Nachfolgend wurden die Zellen mit Donorlösung (radioaktiv markierte Substanz und nicht radioaktiv markierte Substanz in Transportpuffer) für die gewünschte Zeit bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Inkubationszeit sollte innerhalb des linearen Anstiegs der Transportaktivität liegen; sie ist somit abhängig von Zelllinie und Substrat. Nach der Inkubation wurden die Zellen dreimal mit eiskaltem Transportpuffer gewaschen und anschließend durch Zugabe von 0,2% Natriumdodecylsulfat (SDS) lysiert. Die Proben wurden in Szintillationsgefäßen (*Pony Vial* 6ml, Perkin Elmer) mit Szintillationsflüssigkeit *Ultima Gold XR* (PerkinElmer) versetzt. Die intrazelluläre Akkumulation der radioaktiv markierten Substanz wurde mit Hilfe des Tricarb 2800 (PerkinElmer) über drei Minuten gemessen und in Zählereignissen pro Minute (cpm; *counts per minute*) angegeben.

Die entsprechende Gesamtproteinkonzentration jeder Kavität wurde mit dem *BCA™ Protein Assay Kit* (Fisher Scientific GmbH) nach Angaben des Herstellers bestimmt (siehe 5.8.3). Die Transportraten wurden auf das Gesamtprotein normalisiert und in pmol/mg Protein/min angegeben.

Zur Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstanten  $K_m$ , der Konzentration, bei der ein halbmaximaler Transport zu beobachten ist, und der maximalen Transportgeschwindigkeit  $v_{max}$  wurden Transportversuche mit steigenden Konzentrationen des Substrats durchgeführt und mittels nicht-linearer Kurvenanpassung ermittelt. Die Michaelis-Menten-Konstante ( $K_m$ ) wird in  $\mu\text{M}$  angegeben, die maximale Transportgeschwindigkeit ( $v_{max}$ ) in  $\text{pmol}/\text{mg Protein}/\text{min}$ . Um die Inhibition des OATP2A1-vermittelten  $\text{PGE}_2$ -Transports ( $0,5 \mu\text{M}$ ) durch verschiedene Substanzen zu untersuchen, wurden die Zellen während des Versuchs mit verschiedenen Konzentrationen der unselektiven COX-Inhibitoren Acetylsalicylsäure, Salicylsäure, Diclofenac, Ibuprofen, Indomethacin, Ketoprofen, Naproxen und des selektiven COX-2-Inhibitors Lumiracoxib inkubiert. Danach wurden die Zellen wie oben beschrieben weiterbehandelt. Die Expositionszeit lag bei 5 Minuten, da die Aufnahme-Kinetik von Prostaglandin  $\text{E}_2$  in die HEK293-OATP2A1-Zellen zu diesem Zeitpunkt in einem linearen Bereich liegt. Alle Untersuchungen wurden mindestens in zwei unabhängigen Experimenten mit mindestens je drei Kavitäten pro Konzentration pro Experiment untersucht.

Zur Bestimmung der  $K_i$ -Werte (inhibitorische Konstante) der *Ginkgo biloba*-Flavonoide Apigenin, Kaempferol und Quercetin in den HEK293-OATP1A2- und HEK293-OATP2B1-Zellen wurden jeweils Transportexperimente bei drei verschiedenen BSP-Konzentrationen und vier verschiedenen Flavonoid-Konzentrationen für fünf Minuten (OATP1A2) und zehn Minuten (OATP2B1) durchgeführt. Diese Zeiten wurden gewählt, da die Aufnahme von BSP in die HEK293-OATP1A2-Zellen und HEK293-OATP2B1-Zellen (Bachmakov et al. 2008) zu diesem Zeitpunkt linear ist. Der OATP1A2-vermittelte BSP-Netto-Transport wurde bei den Konzentrationen  $2,5 \mu\text{M}$ ,  $5 \mu\text{M}$  und  $10 \mu\text{M}$  bestimmt. Der OATP2B1-vermittelte BSP-Netto-Transport wurde bei den Konzentrationen  $0,5 \mu\text{M}$ ,  $1 \mu\text{M}$  und  $2,5 \mu\text{M}$  bestimmt. Die Flavonoid-Konzentrationen lagen für Apigenin bei  $1 \mu\text{M}$ ,  $10 \mu\text{M}$  und  $100 \mu\text{M}$ , für Kaempferol bei  $10 \mu\text{M}$ ,  $50 \mu\text{M}$  und  $100 \mu\text{M}$  und für Quercetin bei  $25 \mu\text{M}$ ,  $50 \mu\text{M}$  und  $100 \mu\text{M}$ . Die Messungen wurden für jede Konzentration 3-6-mal wiederholt. Der Transport von Fexofenadin wurde für OATP1A2 für 5 Minuten durchgeführt, da die Aufnahme von Fexofenadin in die HEK293-OATP1A2-Zellen zu diesem Zeitpunkt linear ist. Die Aufnahme von Atorvastatin in HEK293-OATP1A2-Zellen und HEK293-OATP2B1-Zellen (Grube et al. 2006) wurde für 10 Minuten durchgeführt.

Die Transportversuche für OATP1B3 wurden mit 1  $\mu\text{M}$  BSP und 50  $\mu\text{M}$  Pravastatin für 10 Minuten durchgeführt. Diese Zeiten wurden gewählt, da die Aufnahme von BSP und Pravastatin in die HEK293-OATP1B3-Zellen zu diesem Zeitpunkt linear ist.

### **5.9.2 Quantifizierung der zellulären Akkumulation von Substanzen mittels LC-MS/MS**

Die intrazelluläre Quantifizierung von Fexofenadin wurde mit Hilfe der Flüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS; *liquid chromatography, mass spectrometry*) gemessen (Hofmann et al. 2002). Dazu wurden die Transportversuche wie unter 5.9.1 beschrieben durchgeführt. Nach der Zellyse wurde die Menge der Substanz in den Zellen mit LC-MS/MS bestimmt. Dazu wurden 10  $\mu\text{l}$  der Proben mit 90  $\mu\text{l}$  des internen Standards (MDL 026042, Aventis Pharma Deutschland GmbH, Frankfurt a.M., Germany) versetzt. Die Analyse wurde mittels des Triple Quadrupol API 4000™ LC/MS/MS Systems (Applied Biosystems, Toronto, ON, Canada) durchgeführt. Die verwendete HPLC-Säule war eine Luna 3u CN 100A, New Column 100x2,0 mm mit SecurityGuard Cartridges, CN 4x2,0 mm von Phenomenex (Aschaffenburg). Eine Mischung aus 12 mM Ammoniumacetat und Acetonitril (50:50, v/v) wurde als Fließmittel für Fexofenadin eingesetzt. Die Flussrate wurde auf 0,25 ml/min eingestellt. Das untere Quantifikationslimit (*lower limit of quantification*) lag bei 0,5 ng/ml. Das Verhältnis von Peak zur Fläche von Fexofenadin zu dem des internen Standards wurde mittels Analyst Software v1.4.2 (Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland) berechnet. Die Laufzeiten von Fexofenadin und dem internen Standard lagen bei 2 Minuten. Die Kalibriergerade war mit einem mittleren Korrelationskoeffizienten von 0,9992 über einen Bereich von 0,5 bis 100 ng/ml linear. Das Massenspektrometer arbeitete im ausgewählten Ionen-Monitoring Modus mit den entsprechenden  $\text{MH}^+$  Ionen, m/z 502,3 für Fexofenadin und m/z 530,3 für den internen Standard. Der Variationskoeffizient der *intraday* Variabilität (n = 15; Qualitätskontrollen beinhalteten 2,5, 25 und 100 ng/ml Fexofenadin) lag zwischen 4,0% und 6,6%. Der Variationskoeffizient der *intraassay* Variabilität (n = 5) lag zwischen 3,9% und 7,4%.

Für die intrazelluläre Quantifizierung von Pravastatin wurde das System, wie bei Seithel und Kollegen (Seithel et al. 2007) beschrieben, verwendet. 100 µl des internen Standards (200 ng/ml Ibuprofen in Fließmittel) wurden mit 100 µl der Proben versetzt. Als Vorsäule wurde eine VS Cyano, 4x2 mm (Phenomenex, Aschaffenburg) eingesetzt. Als Fließmittel wurde eine Mischung aus 12 mM Ammoniumacetat und Methanol (50:50, v/v) verwendet. Die Flussrate wurde auf 0,2 ml/min eingestellt. Die Laufzeiten lagen bei 1,2 Minuten für Pravastatin und 1,4 Minuten für den internen Standard. Die Kalibriergerade war mit einem mittleren Korrelationskoeffizienten von 0,997 über einen Bereich von 0,5 bis 30 ng/ml linear. Der Variationskoeffizient der *intraday* Variabilität lag zwischen 1,6% und 6,9%.

## 5.10 Statistische Analyse

Aufbauend auf den Ergebnissen der Transportversuche wurden nicht-lineare Kurvenanpassungen nach Michaelis-Menten mit Hilfe der Software Prism 4 (GraphPad Software, Inc.) durchgeführt. Alle Daten wurden als Mittelwerte  $\pm$  *standard error of the mean* (S.E.M.) angegeben.

Der Prozentsatz der Inhibition oder Stimulation des Transportes durch Substanzen wurde bezogen auf Kontrollexperimente, in denen der Transport bei Abwesenheit von Inhibitoren oder Stimulatoren untersucht wurde (100% Transport), berechnet. Die entsprechenden IC<sub>50</sub>- oder EC<sub>50</sub>-Werte für die Inhibition oder Stimulation des Transportes wurden mit sigmoidaler Kurvenanpassung bei halblogarithmischer Auftragung der Inhibitor-/Stimulator-Konzentration gegen die Transportaktivität berechnet (Prism 4; GraphPad Software, Inc.). Die IC<sub>50</sub>- oder EC<sub>50</sub>-Werte sind die Konzentration, bei der 50% Inhibition oder Stimulation des Substrattransports auftraten.

Die mRNA-Expression und Substrat-Aufnahme der jeweiligen Zelllinien wurde mit einem ungepaarten t-Test im Vergleich zu den Vektorkontrollzelllinien analysiert. Die statistische Auswertung der *SLCO2A1*-mRNA-Expression und OATP2A1-Proteinexpression in Antrum, Corpus und Duodenum wurde mittels *one-way analysis of variance* (ANOVA) und einem *Bonferroni's multiple comparison test* untersucht. Der Einfluss der COX-Inhibitoren, die mit einer Konzentration von 100 µM eingesetzt wurden, auf den OATP2A1-vermittelten Transport und der

Einfluss der Flavonoide auf den OATP1A2- und OATP2B1-vermittelten Atorvastatin-Transport wurde mit Hilfe des ANOVA Tests mit einem *Dunnett's multiple comparison test* analysiert. Ein p-Wert  $\leq 0,05$  wurde als statistisch signifikant angesehen. Der Einfluss der *Ginkgo biloba*-Flavonoide auf den OATP1A2-vermittelten Transport von BSP und Atorvastatin wurde zusätzlich mithilfe eines Dixon-Plots (Dixon 1972) analysiert. Durch die reziproke Auftragung der Transportgeschwindigkeit  $v$  bei verschiedenen Substratkonzentrationen (y-Achse) über die Flavonoid-Konzentration  $c$  (x-Achse) erhält man einen Schnittpunkt der Geraden, über den man die inhibitorische Konstante  $K_i$  der jeweiligen Substanzen ermitteln kann.

Der Einfluss der OATP1B3-Mutanten auf die Proteinexpression, die Transportaktivität,  $K_m$  und  $v_{max}$  wurde mit *one-way ANOVA* mit *Dunnett's multiple comparison test* analysiert. Ein p-Wert  $\leq 0,05$  wurde für eine statistische Signifikanz benötigt.

## 5.11 Strukturelle Modellierung von OATP1B3

Durch eine Kooperation mit Prof. Dr. rer. nat. Heinrich Sticht aus der Abteilung für Bioinformatik des Instituts für Biochemie der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg wurde eine strukturelle Modellierung des Aufnahmetransporters OATP1B3 durchgeführt.

Für die OATP1B3-Homologie-Modellierung geeignete Schablonen wurde mit Hilfe des Proteinstruktur-Vorhersage-Servers des BioInfoBank Instituts (Ginalski et al. 2003) gefunden. Die individuellen Vorhersagemethoden, kombiniert durch den Server, sagten übereinstimmend voraus, dass der Glycerol-3-Phosphat-Transporter [(PDB code 1pw4 (Huang et al. 2003))] und die Lactose-Permease-Struktur [PDB code 1pv6 (Abramson et al. 2003)] eine signifikante Struktur-Ähnlichkeit mit OATP1B3 haben. Basierend auf diesen Schablonen wurde die Modellierung mit Hilfe des Modeller 6.2 (Sanchez et al. 2000) durchgeführt. Aufgrund der begrenzten Sequenz-Homologie der Schleifen-Regionen wurde die Modellierung auf die Transmembranhelices beschränkt. Nach 100 Schritten der Konjugat-Gradienten-Minimierung mit Sybyl 7.3 (Tripos Inc.) wurden Wasserstoff-Atome dem endgültigen Modell hinzugefügt. Die Qualität der Struktur wurde mit Procheck (Laskowski et al. 1993) und Whatcheck (Hooft et al. 1996) bewertet.

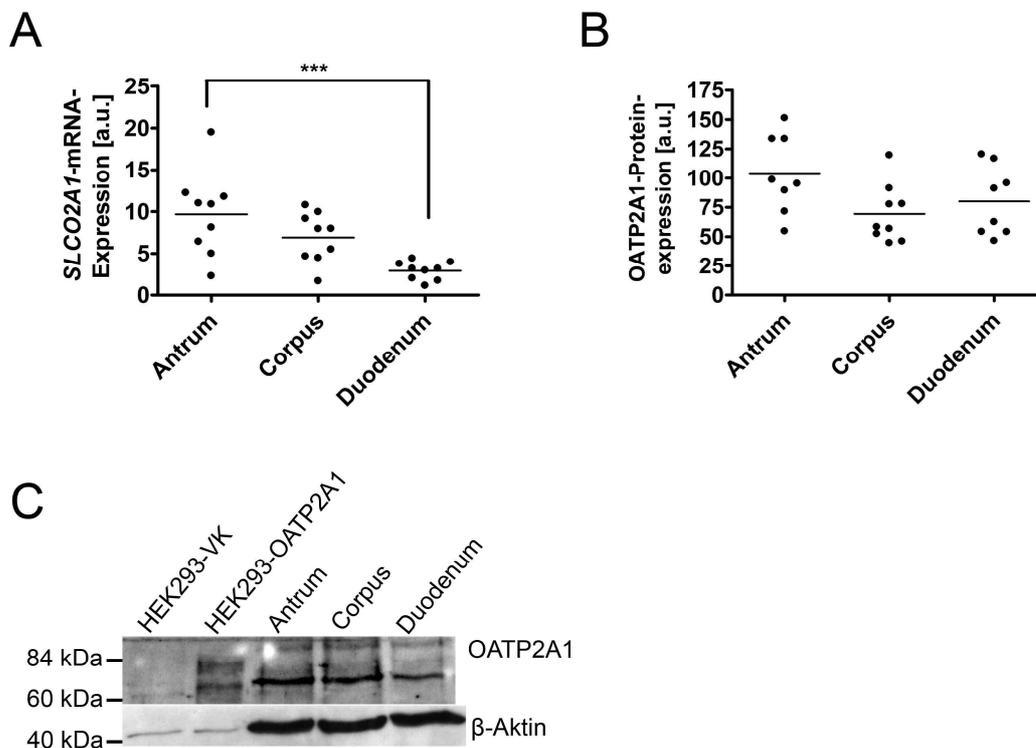
Zum Schluss wurden die OATP1B3-Mutationen mit Hilfe der Sybyl 7.3 Software (Tripos Inc.) und Swiss-PdbViewer (Guex et al. 1997) eingefügt, indem das niedrigst-energetische Seitenketten-Konformer für jeden mutierten Aminosäure-Rest ausgewählt wurde.

## 6 Ergebnisse

### 6.1 Untersuchungen zur Expression und Funktion des Prostaglandintransporters OATP2A1 im Gastrointestinaltrakt

#### 6.1.1 Expression von OATP2A1 in gastrointestinalen Geweben

Um die Expression von OATP2A1 in gastrointestinalen Geweben untersuchen zu können, wurde die *SLCO2A1*-mRNA-Expression und OATP2A1-Proteinexpression in verschiedenen Magen- und Dünndarmabschnitten (Antrum, Corpus und Duodenum) von neun gesunden Freiwilligen, die keine Medikamente einnahmen, untersucht. Die *SLCO2A1*-mRNA-Expression wurde auf die Expression des Haushaltsgens  $\beta$ -Aktin normalisiert.



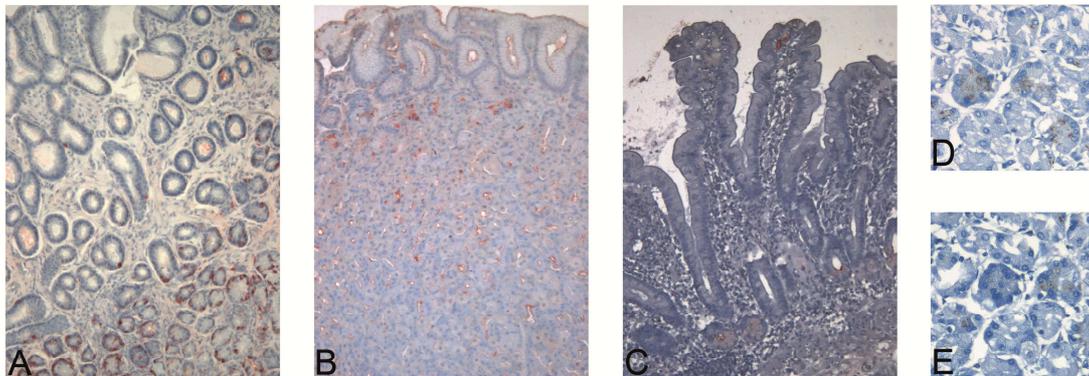
**Abbildung 5:** *SLCO2A1*-mRNA-Expression und OATP2A1-Proteinexpression im humanen Magen und Dünndarm (n=9). **A)** *SLCO2A1*-mRNA-Expression in humanen Biopsie-Proben aus verschiedenen Magen- und Darmregionen gesunder Probanden. Die mRNA-Expression wurde mittels *Real time*-PCR bestimmt, auf die Expression des Haushaltsgens  $\beta$ -Aktin normalisiert und in *arbitrary units* (a.u.) angegeben. Zwischen dem Antrum und dem Duodenum zeigten sich signifikante Unterschiede in der mRNA-Expression (\*\*\*)  $p < 0,001$ , *one-way ANOVA*, *Bonferroni's multiple comparison test*). **B)** OATP2A1-Proteinexpression im humanen Magen und Dünndarm. Die Expression wurde mittels Immunoblotanalyse und densitometrischer Auswertung quantifiziert und ist in *arbitrary units* (a.u.) angegeben. Zwischen Antrum, Corpus und Duodenum konnten keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden. Die Expressionsdaten sind als Einzelwerte (Punkte) und Mittelwerte (horizontale Linie) angegeben. **C)** Repräsentativer OATP2A1-Immunoblot von humanen Biopsieproben aus Antrum, Corpus und Duodenum. Für den Immunoblot wurden 5  $\mu$ g der Zellhomogenate und 20  $\mu$ g der humanen Biopsieproben eingesetzt.

Die höchste *SLCO2A1*-mRNA-Expression zeigte sich im Antrum, gefolgt von Corpus und Duodenum. Ein mittlerer 3,3-facher Expressionsunterschied zwischen Antrum und Duodenum war statistisch signifikant ( $p < 0,001$ ; *one-way ANOVA*, *Bonferroni's multiple comparison test*, Abbildung 5A). Die interindividuelle Variabilität der *SLCO2A1*-mRNA-Expression innerhalb der neun Probanden war am höchsten im Antrum (8,5-fach) verglichen mit Corpus (6,4-fach) und Duodenum (3,9-fach). Die OATP2A1-Proteinexpression zeigte keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Antrum, Corpus und Duodenum ( $p > 0,05$ , *one-way ANOVA*, *Bonferroni's multiple comparison test*, Abbildung 5B). Abbildung 5C zeigt einen repräsentativen Immunoblot von Biopsieproben, die aus humanem Antrum, Corpus und Duodenum gewonnen wurden. Für den Immunoblot wurden 5  $\mu\text{g}$  der Zellhomogenate und 20  $\mu\text{g}$  der humanen Biopsieproben aufgetragen.

### **6.1.2 Lokalisation von OATP2A1 in der gastrointestinalen Schleimhaut**

Die immunhistochemische Analyse der Gewebeschnitte, welche in Kooperation mit dem Pathologischen Institut der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg angefertigt wurde, zeigte die stärkste Expression von OATP2A1 in der Antrum-Schleimhaut (n=10 verschiedene Biopsien). Eine cytoplasmatische und granuläre Färbung konnte in der Halsregion und den tiefen Pylorusdrüsen des Antrums detektiert werden (Abbildung 6A). Die Schleimhaut des Corpus (n=10 verschiedene Biopsien) zeigte ebenso eine cytoplasmatische, granuläre Färbung in der Halsregion der Drüsen, überwiegend in den Belegzellen. In Antrum und Corpus konnte eine luminale Färbung entlang der tiefen Drüsen detektiert werden (Abbildung 6B). Im Duodenum (n=10 verschiedene Biopsien) zeigten einige verstreute Zellen von der Oberfläche bis hin zu den Krypten und den Brunnerschen Drüsen eine positive Färbung für OATP2A1 (Abbildung 6C). Mithilfe eines immunhistochemischen Punkte-Bewertungssystems (*immuno-histochemical rating score*; IRS) wurden Werte von  $6,7 \pm 3,2$  für das Antrum,  $4,3 \pm 2,6$  für den Corpus und  $1,9 \pm 1,8$  für das Duodenum ermittelt. Die positive Färbung der Belegzellen konnte durch eine Präinkubation des OATP2A1-Antikörpers mit dem antigenen Peptid fast komplett unterdrückt werden, was für eine spezifische

Bindung des Antikörpers an OATP2A1 in den Gewebeschnitten spricht (Abbildung 6D+E).

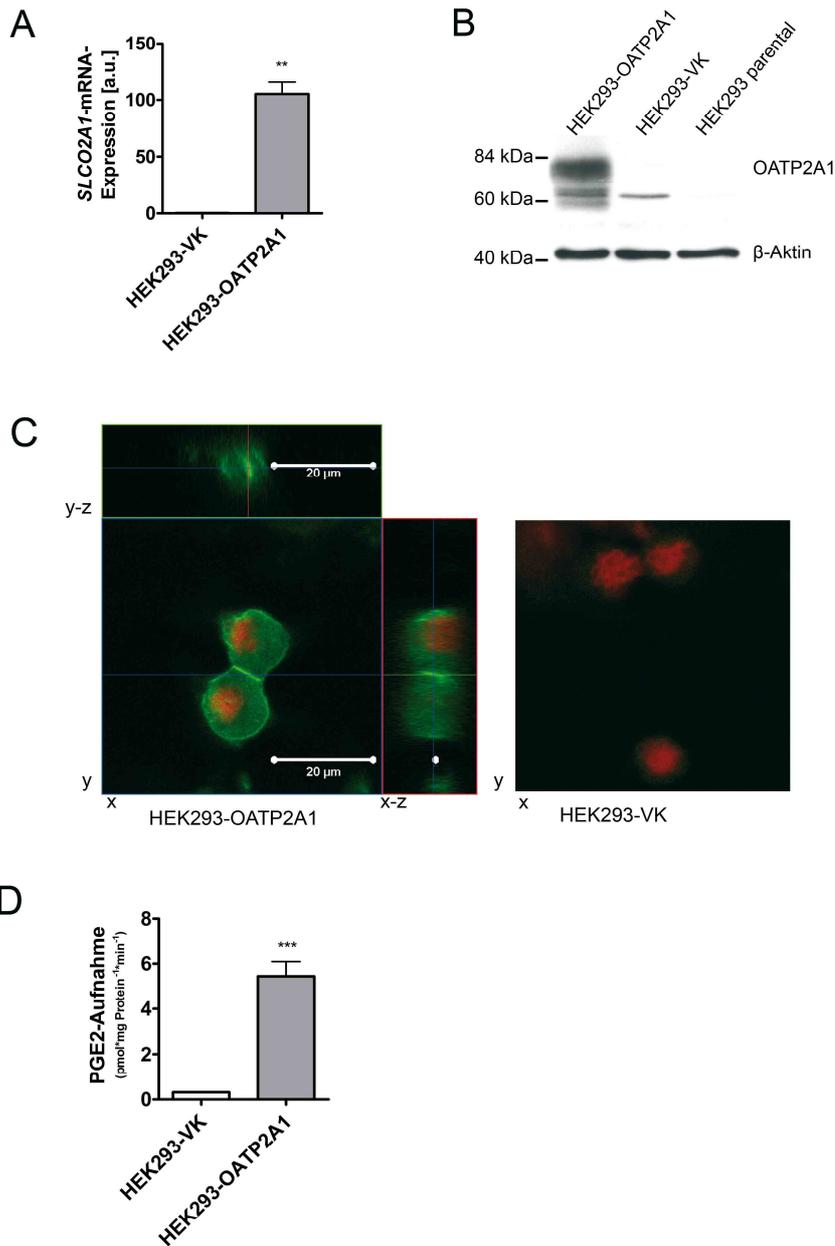


**Abbildung 6: Lokalisation von OATP2A1 in humanem gastrointestinales Gewebe. A) Es konnte eine intensive Färbung der Schleimhaut im Antrum einschließlich der Pylorusdrüsen nachgewiesen werden. B) Weiterhin sind auch die Belegzellen in der Corpus-Schleimhaut positiv gefärbt. Dabei konnte in einigen tiefen Drüsenzellen eine luminal Färbung detektiert werden. C) Im Duodenum waren verschiedene Zellen im Bereich von der Villusspitze bis hin zu den Krypten gefärbt. D, E) Spezifität des Antiserums: Vorinkubation ohne oder mit dem antigenen Peptid, das zur Herstellung des eingesetzten Antiserums verwendet wurde. E) Das Signal wurde durch die Vorinkubation mit dem Peptid fast vollständig unterdrückt. A, B und C: 100-fache Vergrößerung und Färbung mit AEC. D und E: 200-fache Vergrößerung und Färbung mit DAB.**

### **6.1.3 Einfluss von Cyclooxygenaseinhibitoren auf die Funktion von OATP2A1**

#### **6.1.3.1 Etablierung und Charakterisierung einer HEK293-Zelllinie, die stabil OATP2A1 exprimiert**

Um den Einfluss von nichtselektiven und selektiven Cyclooxygenaseinhibitoren auf die OATP2A1-Funktion untersuchen zu können, wurde eine stabil OATP2A1-exprimierende HEK293-Zelllinie etabliert. Mittels *Real time*-PCR und Immunoblotanalysen konnte gezeigt werden, dass der ausgewählte HEK293-OATP2A1-Klon im Vergleich mit HEK293-Vektorkontrollzellen eine signifikant höhere Expression an *SLCO2A1*-mRNA ( $p < 0,01$ , ungepaarter t-Test) und eine erhöhte Expression an OATP2A1-Protein besitzt (Abbildung 7A+B). Die HEK293-OATP2A1-Zellen zeigten im Immunoblot ein spezifisches Signal zwischen 60 und 80 kDa, welches in den HEK293-VK-Zellen und den parentalen HEK293-Zellen nicht detektiert werden konnte. Es wurden jeweils 5  $\mu$ g Zellhomogenat aufgetragen.



**Abbildung 7: Charakterisierung der stabil OATP2A1-exprimierenden HEK293-OATP2A1-Zelllinie.** A) Die generierte HEK293-OATP2A1-Zelllinie zeigte eine signifikant erhöhte Expression von *SLCO2A1*-mRNA im Vergleich zu HEK293-VK-Zellen, die mit dem leeren Vektor transfiziert wurden (\*\*  $p < 0,01$ , ungepaarter t-Test). B) OATP2A1-Immunoblot von HEK293-OATP2A1-, HEK293-VK- und parentalen HEK293-Zellen. Ein spezifisches Signal für OATP2A1 konnte bei 60 und 80 kDa in den HEK293-OATP2A1-Zellen detektiert werden, welches in den HEK293-VK- und parentalen HEK293-Zellen nicht detektiert werden konnte. Es wurden jeweils 5  $\mu$ g Zellhomogenat aufgetragen. C) Immunofluoreszenzanalyse der HEK293-OATP2A1- (links) und HEK293-VK-Zellen (rechts) mittels konfokaler Lasermikroskopie. OATP2A1 wurde mittels eines Cy2-konjugierten Sekundärantikörpers (grüne Fluoreszenz) visualisiert. Die OATP2A1-Lokalisation ist in den x-y, x-z und y-z Ebenen gezeigt. OATP2A1 konnte im Cytoplasma und in der Plasmamembran der HEK293-OATP2A1-Zellen nachgewiesen werden, wohingegen in den HEK293-VK-Zellen keine Färbung nachzuweisen war. Die Zellkerne wurden rot gefärbt (originale Vergrößerung, 400x mit 4-fachem Zoom). D) Aufnahme von 0,5  $\mu$ M PGE<sub>2</sub> in HEK293-OATP2A1- und HEK293-VK-Zellen. Die HEK293-OATP2A1-Zellen zeigten eine signifikant höhere Aufnahme (17,4-fach) von PGE<sub>2</sub> als die HEK293-VK-Zellen (\*\*\*)  $p < 0,0001$ , ungepaarter t-Test). Daten aus A) und C) sind als Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. angegeben.

Weiterhin wurde die zelluläre Lokalisation des OATP2A1-Proteins mittels konfokaler Lasermikroskopie untersucht. Die Lokalisation von OATP2A1 konnte im Cytoplasma und vor allem aber in der Plasmamembran der HEK293-OATP2A1-Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 7C). Mit Transportversuchen konnte gezeigt werden, dass das in den HEK293-OATP2A1-Zellen exprimierte OATP2A1-Protein funktionell als Aufnahmetransporter für Prostaglandin E<sub>2</sub> aktiv war. Die HEK293-OATP2A1-Zellen zeigten eine 17,4-fach höhere Aufnahme von PGE<sub>2</sub> (0,5 µM) im Vergleich zu HEK293-VK-Zellen (p < 0,0001, ungepaarter t-Test, Abbildung 7D).

### 6.1.3.2 Einfluss verschiedener Cyclooxygenaseinhibitoren auf die OATP2A1-vermittelte PGE<sub>2</sub>-Aufnahme

Um den potenziellen Einfluss von Cyclooxygenaseinhibitoren auf die Transportfunktion von OATP2A1 untersuchen zu können, wurden die nicht-steroidalen Antiphlogistika (NSAID) Acetylsalicylsäure (ASS), Salicylsäure, Indomethacin, Diclofenac, Ibuprofen, Ketoprofen und Naproxen sowie der selektive COX-2-Inhibitor Lumiracoxib getestet (Abbildung 8).

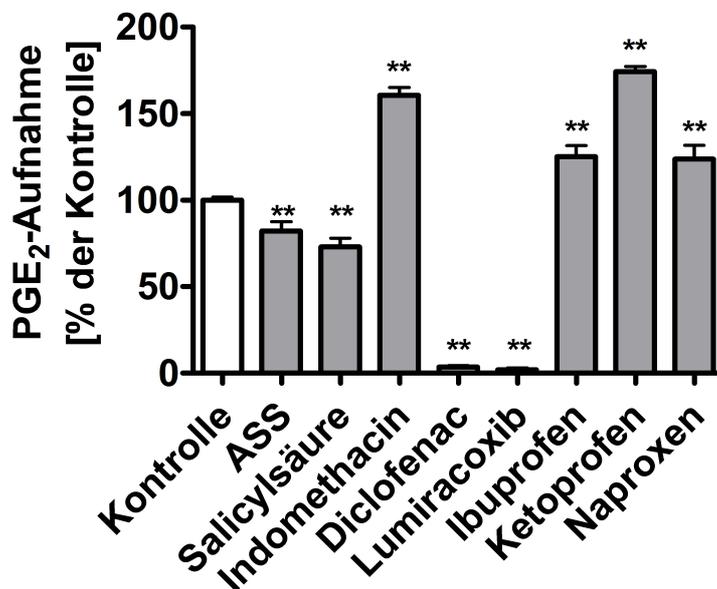


Abbildung 8: Einfluss verschiedener COX-Inhibitoren auf die OATP2A1-vermittelten PGE<sub>2</sub>-Aufnahme (0,5 µM). Die COX-Inhibitoren wurden in einer Konzentration von 100 µM eingesetzt. Die Daten sind als Prozent der Kontrolle (□ PGE<sub>2</sub>-Aufnahme ohne Zugabe von COX-Inhibitoren) angegeben. Acetylsalicylsäure (ASS) und Salicylsäure zeigten eine moderate Inhibition der PGE<sub>2</sub>-Aufnahme, wohingegen Diclofenac und Lumiracoxib eine sehr starke Inhibition verursachten. Indomethacin, Ibuprofen, Ketoprofen und Naproxen zeigten eine signifikante Stimulation der PGE<sub>2</sub>-Aufnahme. Alle Daten sind als Mittelwerte ± S.E.M. angegeben (\*\* p < 0,01, *one-way ANOVA*, *Dunnnett's multiple comparison test*).

Acetylsalicylsäure (ASS) und Salicylsäure zeigten bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  eine signifikante Inhibition der  $\text{PGE}_2$ -Aufnahme um 18 bzw. 27% ( $p < 0,01$ , *one-way ANOVA*, *Dunnett's multiple comparison test*). Diclofenac und Lumiracoxib erwiesen sich bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  als potente Inhibitoren, welche die Aufnahme von  $\text{PGE}_2$  um mehr als 95% ( $p < 0,01$ , *one-way ANOVA*, *Dunnett's multiple comparison test*) reduzierten. Im Gegensatz dazu zeigten Indomethacin, Ibuprofen, Ketoprofen und Naproxen in einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  eine statistisch signifikante Stimulation der OATP2A1-vermittelten  $\text{PGE}_2$ -Aufnahme ( $p < 0,01$ , *one-way ANOVA*, *Dunnett's multiple comparison test*).

### 6.1.3.3 Konzentrationsabhängige Inhibition der OATP2A1-vermittelten $\text{PGE}_2$ -Aufnahme durch Diclofenac und Lumiracoxib

Im Anschluss an das initiale Screening der verschiedenen COX-Inhibitoren (siehe 6.1.3.2) wurde der Einfluss verschiedener Konzentrationen der chemisch sehr ähnlichen Substanzen Diclofenac und Lumiracoxib auf die OATP2A1-vermittelte  $\text{PGE}_2$ -Aufnahme untersucht (Abbildung 9). Hierbei konnten  $\text{IC}_{50}$ -Werte von  $6,2 \pm 1,2 \mu\text{M}$  bzw.  $3,1 \pm 1,2 \mu\text{M}$  für Diclofenac und Lumiracoxib ermittelt werden.

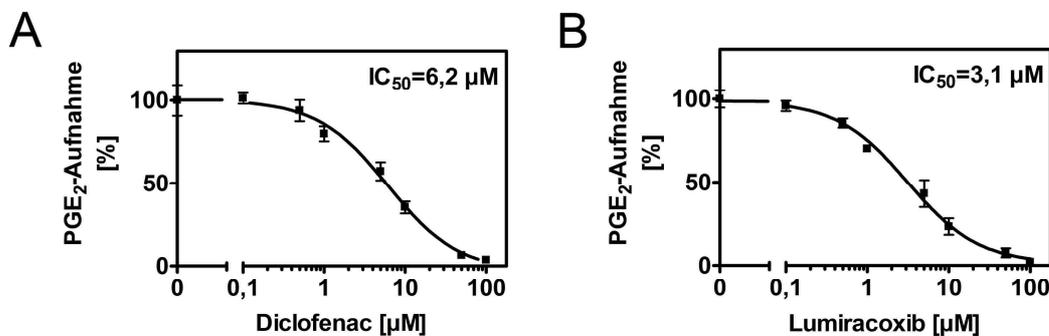


Abbildung 9: Konzentrationsabhängige Inhibition von Diclofenac (A) und Lumiracoxib (B) auf die OATP2A1-vermittelte  $\text{PGE}_2$ -Aufnahme (0,5  $\mu\text{M}$ ; 5 min). Die  $\text{PGE}_2$ -Aufnahme ist in Prozent der Kontrolle angegeben (100%:  $\text{PGE}_2$ -Aufnahme ohne COX-Inhibitoren). Alle Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. angegeben.

#### 6.1.3.4 Konzentrationsabhängige Stimulation der OATP2A1-vermittelten PGE<sub>2</sub>-Aufnahme durch Indomethacin, Ibuprofen, Ketoprofen und Naproxen

Basierend auf den Ergebnissen des initialen Screenings (siehe 6.1.3.2) wurden auch für die potentiellen Stimulatoren der OATP2A1-vermittelten PGE<sub>2</sub>-Aufnahme Indomethacin, Ibuprofen, Ketoprofen und Naproxen weitere Untersuchungen durchgeführt. Hierbei zeigte sich für die drei untersuchten Substanzen eine konzentrationsabhängige Stimulation der PGE<sub>2</sub>-Aufnahme um  $162,7 \pm 13,9\%$ ,  $77,2 \pm 3,6\%$  und  $32,3 \pm 4,9\%$  (Abbildung 10). Der EC<sub>50</sub>-Wert für Indomethacin lag bei  $1,1 \pm 1,4 \mu\text{M}$ . Ibuprofen zeigte hier keine konzentrationsabhängige Stimulation oder Inhibition der OATP2A1-vermittelten PGE<sub>2</sub>-Aufnahme.

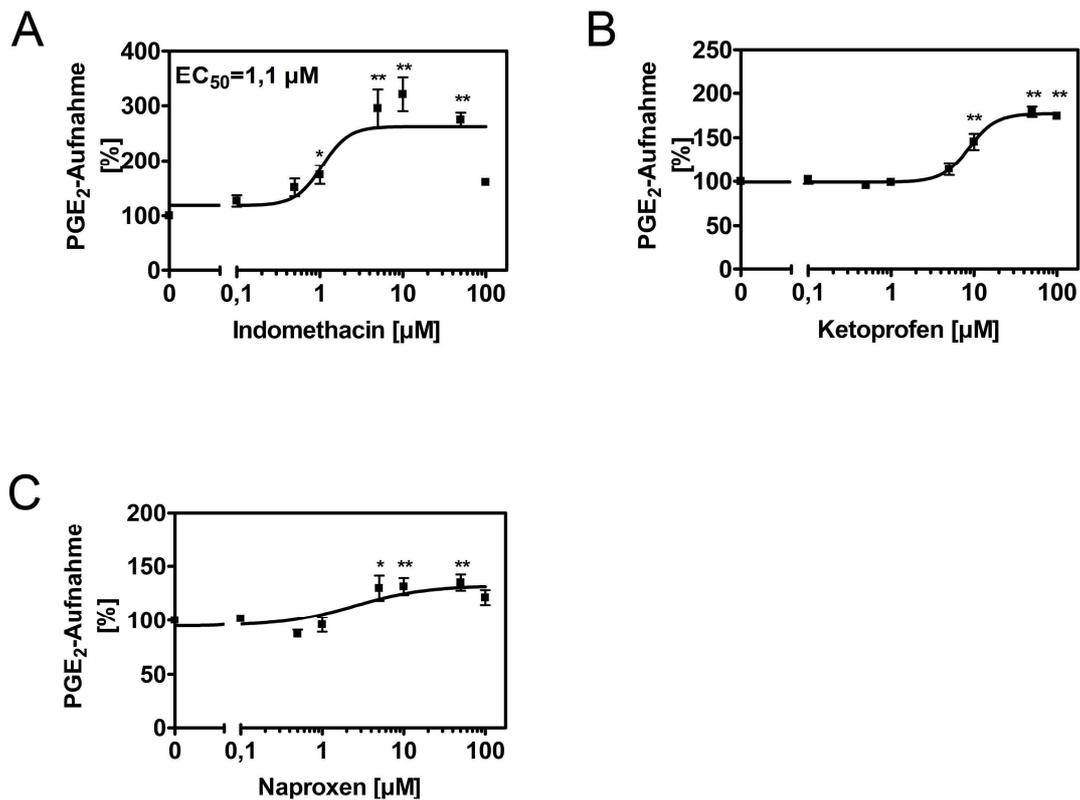


Abbildung 10: Konzentrationsabhängige Stimulation von Indomethacin (A), Ketoprofen (B) und Naproxen (C) auf die OATP2A1-vermittelte PGE<sub>2</sub>-Aufnahme (0,5 µM; 5 min). Die PGE<sub>2</sub>-Aufnahme ist in Prozent der Kontrolle angegeben (100%: PGE<sub>2</sub>-Aufnahme ohne COX-Inhibitoren). Alle Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. angegeben (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01; one-way ANOVA, Dunnett's multiple comparison test).

## **6.2 Untersuchung des Einflusses von Flavonoiden auf die Transportaktivität der intestinal exprimierten Aufnahmetransporter OATP1A2 und OATP2B1**

### **6.2.1 Etablierung und Charakterisierung einer HEK293-OATP1A2-Zelllinie**

Zur Untersuchung des Einflusses von Flavonoiden auf die im humanen Dünndarm exprimierten Transporter OATP1A2 und OATP2B1 wurde in Zusammenarbeit mit der Universität Greifswald mittels einer adenoviralen Transfektionsmethode eine stabil OATP1A2-exprimierende HEK293-Zelllinie etabliert. Die durch Geneticin-Selektion ausgewählten Klone wurden hinsichtlich ihrer mRNA- und Proteinexpression getestet sowie auf die OATP1A2-Lokalisation und -Funktion hin untersucht. Die HEK293-OATP1A2-Zellen waren durch eine signifikant höhere Expression an *SLCO1A2*-mRNA ( $p < 0,05$ , ungepaarter t-Test, Abbildung 11A) und eine erhöhte OATP1A2-Proteinexpression (Abbildung 11B) im Vergleich zu den HEK293-Vektorkontrollzellen (HEK293-VK) gekennzeichnet. Die Immunfluoreszenzanalyse zeigte eine Lokalisation von OATP1A2 in der Plasmamembran sowie im Cytosol der HEK293-OATP1A2-Zellen. Keine Fluoreszenz konnte dagegen in den HEK293-VK detektiert werden (Abbildung 11C). Die funktionelle Charakterisierung zeigte eine signifikant höhere Aufnahme von Sulfobromophthalein (BSP; Abbildung 11D) und Atorvastatin (Abbildung 11E) in die HEK293-OATP1A2-Zellen im Vergleich zu den HEK293-VK-Zellen. Die Aufnahme in die HEK293-OATP1A2-Zellen war für BSP (5  $\mu\text{M}$ ) und Atorvastatin (5  $\mu\text{M}$ ) 2,4-fach und 6,9-fach höher als in die HEK293-VK-Zellen ( $p < 0,0001$ , ungepaarter t-Test). Beide Substanzen konnten somit als Substrate für OATP1A2 bestätigt werden.

### **6.2.2 Einfluss verschiedener *Ginkgo biloba*-Flavonoide auf den OATP1A2- und OATP2B1-vermittelten BSP-Transport**

Um die inhibitorischen Effekte der *Ginkgo biloba*-Flavonoide Apigenin, Kaempferol und Quercetin auf die Transportaktivität von OATP1A2 und OATP2B1 ermitteln zu können, wurden die  $K_i$ -Werte dieser Flavonoide für die Hemmung des OATP1A2- und OATP2B1-vermittelten BSP-Transports bestimmt.

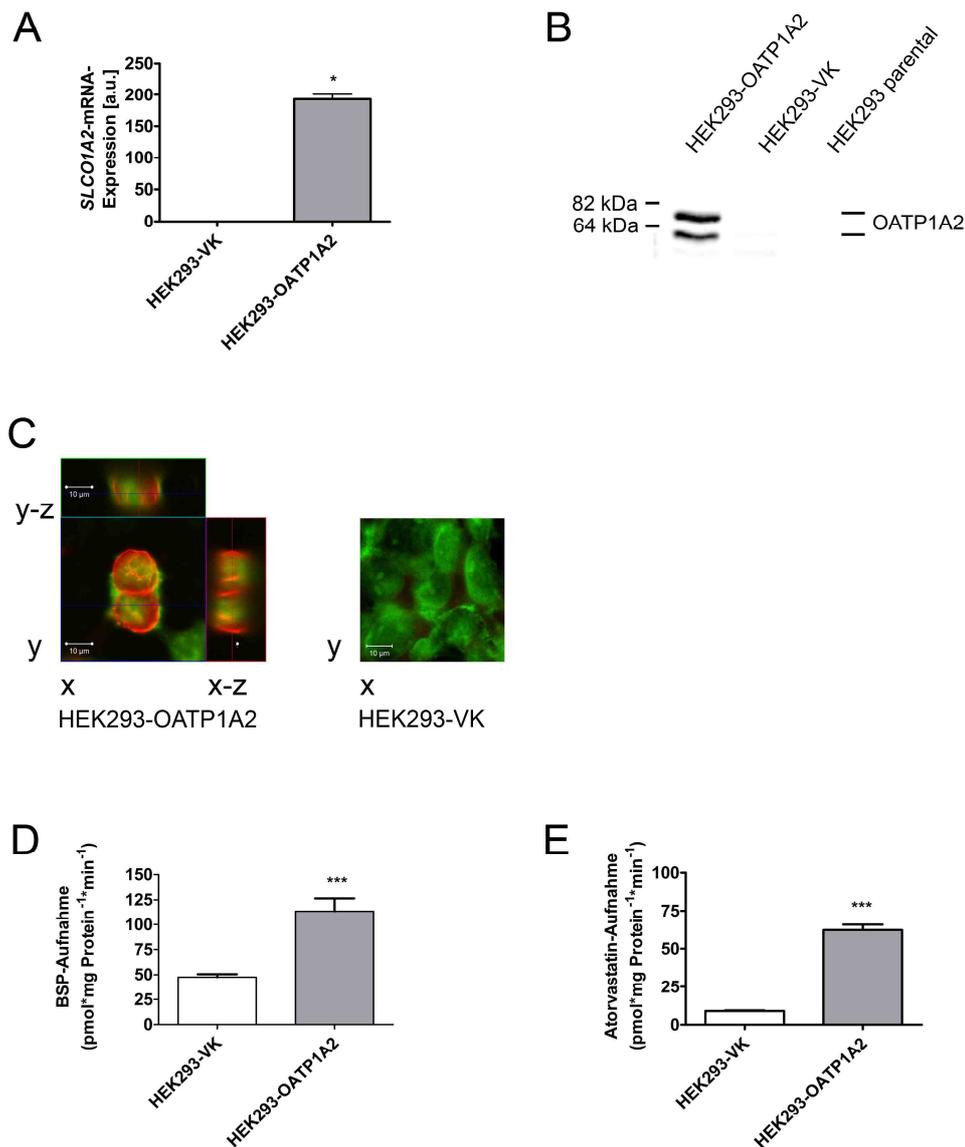


Abbildung 11: Charakterisierung der stabil OATP1A2-exprimierenden HEK293-OATP1A2-Zelllinie. A) Die generierte HEK293-OATP1A2-Zelllinie zeigte eine signifikant erhöhte Expression von *SLCO1A2*-mRNA im Vergleich zu HEK293-VK-Zellen, die mit dem Vektor ohne cDNA-Insert transfiziert wurden (\*  $p < 0,05$ , ungepaarter t-Test). B) OATP1A2-Immunoblot von HEK293-OATP1A2-, HEK293-VK- und parentalen HEK293-Zellen. Ein spezifisches Signal für OATP1A2 konnte bei 60 und 80 kDa in den HEK293-OATP1A2-Zellen detektiert werden, welches in den HEK293-VK- und parentalen HEK293-Zellen nicht detektiert werden konnte. C) Immunfluoreszenzanalyse der HEK293-OATP1A2- (links) und HEK293-VK-Zellen (rechts) mittels konfokaler Lasermikroskopie. OATP1A2 wurde mittels eines Cy3-konjugierten Sekundäntikörpers (rote Fluoreszenz) visualisiert. Die OATP1A2-Lokalisation ist in den x-y, x-z und y-z Ebenen gezeigt. OATP1A2 konnte im Cytoplasma und in der Plasmamembran der HEK293-OATP1A2-Zellen nachgewiesen werden, wohingegen keine Färbung in den HEK293-VK-Zellen nachzuweisen war. Die Zellkerne wurden grün gefärbt (originale Vergrößerung, 400x mit 4-fachem Zoom). D) Aufnahme von 5  $\mu\text{M}$  BSP in HEK293-OATP1A2- und HEK293-VK-Zellen. Die HEK293-OATP1A2-Zellen zeigten eine signifikant höhere Aufnahme (2,4-fach) von BSP als die HEK293-VK-Zellen (\*\*\*)  $p < 0,0001$ , ungepaarter t-Test). E) Aufnahme von 5  $\mu\text{M}$  Atorvastatin in HEK-OATP1A2- und HEK293-VK-Zellen. Die HEK293-OATP1A2-Zellen zeigten eine signifikant höhere Aufnahme (6,9-fach) von Atorvastatin als die HEK293-VK-Zellen (\*\*\*)  $p < 0,0001$ , ungepaarter t-Test). Alle Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. angegeben.

Der Mechanismus der Interaktion der Flavonoide mit OATP1A2 und OATP2B1 wurde mit Dixon-Plot-Analysen klassifiziert. Die Trendlinien, die für jede BSP-Konzentration gezogen werden können, schneiden sich an einem Punkt oberhalb der x-Achse, was auf eine kompetitive Inhibition des OATP-vermittelten BSP-Transports durch alle Flavonoide hinweist (Abbildung 12). Die  $K_i$ -Werte aller Flavonoide für OATP2B1 waren niedriger als die  $K_i$ -Werte für OATP1A2. Der OATP2B1-vermittelte BSP-Transport wird also effektiver durch die Flavonoide inhibiert als der OATP1A2-vermittelte Transport. Quercetin hatte den größten inhibitorischen Effekt auf den OATP1A2-vermittelten BSP-Transport; gefolgt von Kaempferol und Apigenin ( $22,0 \pm 5,9 \mu\text{M}$ ,  $25,2 \pm 13,0 \mu\text{M}$ , und  $32,4 \pm 12,2 \mu\text{M}$ ). Für OATP2B1 war ebenfalls Quercetin der potenteste Inhibitor; gefolgt von Kaempferol und Apigenin ( $8,7 \pm 0,1 \mu\text{M}$ ,  $15,1 \pm 7,8 \mu\text{M}$ , und  $20,8 \pm 8,0 \mu\text{M}$ ).

### **6.2.3 Einfluss verschiedener *Ginkgo biloba*-Flavonoide auf die OATP1A2- und OATP2B1-vermittelte Aufnahme von Arzneistoffen**

Um zu bestimmen, inwieweit Apigenin, Kaempferol und Quercetin in der Lage sind, die OATP1A2-vermittelte Aufnahme von Fexofenadin zu beeinflussen, wurden Inhibitionsstudien bei einer Fexofenadin-Konzentration von  $5 \mu\text{M}$  und einer Transportzeit von 5 Minuten durchgeführt. Die eingesetzten Flavonoid-Konzentrationen wurden aufgrund der  $K_i$ -Werte der Hemmung des BSP-Transports ausgewählt. Da Fexofenadin kein Substrat für OATP2B1 ist, wurde nur der Einfluss von Flavonoiden auf die OATP1A2-vermittelte Fexofenadin-Aufnahme untersucht. Apigenin war der potenteste Inhibitor der OATP1A2-vermittelten Fexofenadin-Aufnahme mit dem niedrigsten  $\text{IC}_{50}$ -Wert ( $3,7 \pm 0,2 \mu\text{M}$ ), gefolgt von Quercetin ( $\text{IC}_{50}=11,3 \pm 0,1 \mu\text{M}$ ) und Kaempferol ( $\text{IC}_{50}=11,5 \pm 0,1 \mu\text{M}$ ) (Abbildung 13).

Weiterhin wurde der Einfluss von Apigenin, Kaempferol und Quercetin auf die OATP1A2- und OATP2B1-vermittelte Atorvastatin-Aufnahme untersucht (Abbildung 14). Alle untersuchten Flavonoide konnten die OATP1A2- und OATP2B1-vermittelte Atorvastatin-Aufnahme signifikant hemmen ( $p < 0,01$ , *one-way ANOVA, Dunnett's multiple comparison test*). Apigenin ( $50 \mu\text{M}$ ) und Quercetin ( $50 \mu\text{M}$ ) waren die stärksten Inhibitoren, welche die OATP1A2-vermittelte

Aufnahme von Atorvastatin auf 11,0% bis 11,9% hemmen konnten ( $p < 0,001$ ). Kaempferol (50  $\mu\text{M}$ ) reduzierte die OATP1A2-vermittelte Atorvastatin-Aufnahme auf 22,0% der Kontrollaufnahme ( $p < 0,001$ ).

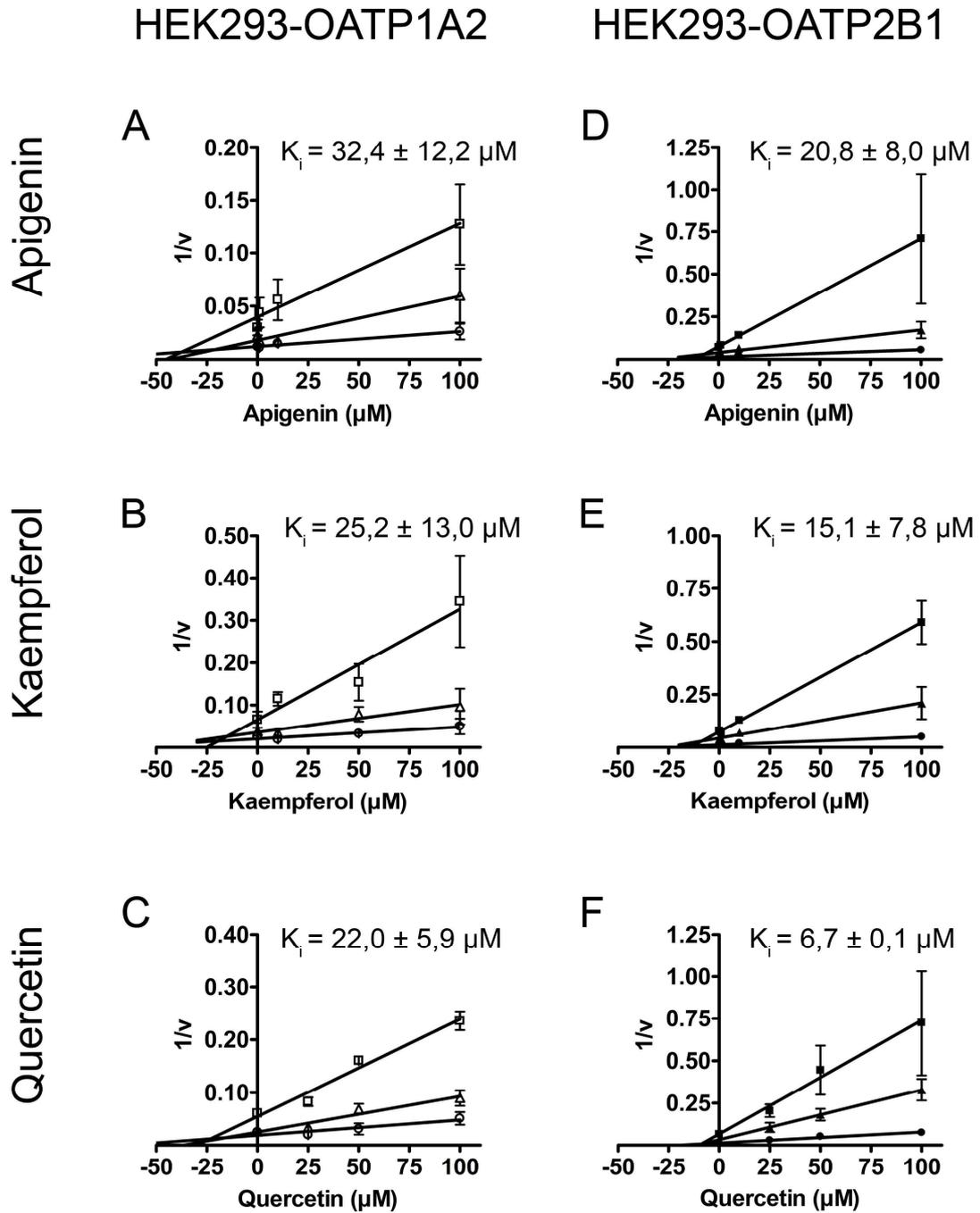


Abbildung 12: Dixon-Plots der Hemmung des OATP1A2- und OATP2B1-vermittelten BSP-Transports (5 Minuten für OATP1A2, 10 Minuten für OATP2B1) durch Apigenin (A, D), Kaempferol (B, E) und Quercetin (C, F). Der Transport wurde bei drei verschiedenen Konzentrationen von BSP ohne Flavonoide sowie mit steigenden Konzentrationen an Flavonoiden bestimmt. Die reziproke Transportgeschwindigkeit wurde gegen die Flavonoid-Konzentrationen aufgetragen. Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. angegeben.  $\square$  2,5  $\mu\text{M}$  BSP;  $\triangle$  5  $\mu\text{M}$  BSP;  $\circ$  10  $\mu\text{M}$  BSP;  $\blacksquare$  0,5  $\mu\text{M}$  BSP;  $\blacktriangle$  1  $\mu\text{M}$  BSP;  $\bullet$  5  $\mu\text{M}$  BSP.

## HEK293-OATP1A2

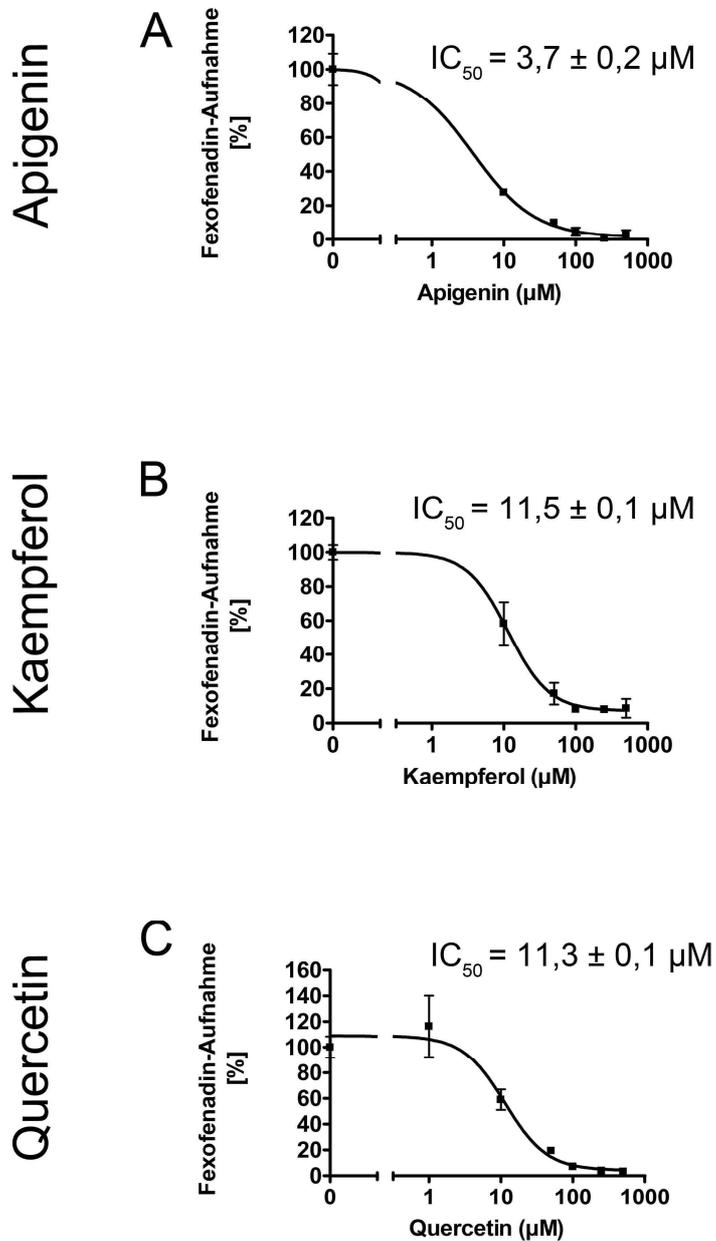


Abbildung 13: Konzentrationsabhängige Inhibition von Apigenin (A), Kaempferol (B) und Quercetin (C) auf die OATP1A2-vermittelte Fexofenadin-Aufnahme (5 µM, 5 min). Die Daten sind als Prozent der Kontrolle (100%: Aufnahme ohne Flavonoide) und als Mittelwerte ± S.E.M. angegeben.

Die Flavonoide Apigenin, Kaempferol und Quercetin zeigten einen ähnlichen Effekt auf die OATP2B1-vermittelte Aufnahme von Atorvastatin. Apigenin und Quercetin verringerten die Aufnahme auf 46,4% bzw. 45,9% ( $p < 0,001$ ). Kaempferol senkte die OATP2B1-vermittelten Atorvastatin-Aufnahme auf 52,6% ( $p < 0,001$ ).

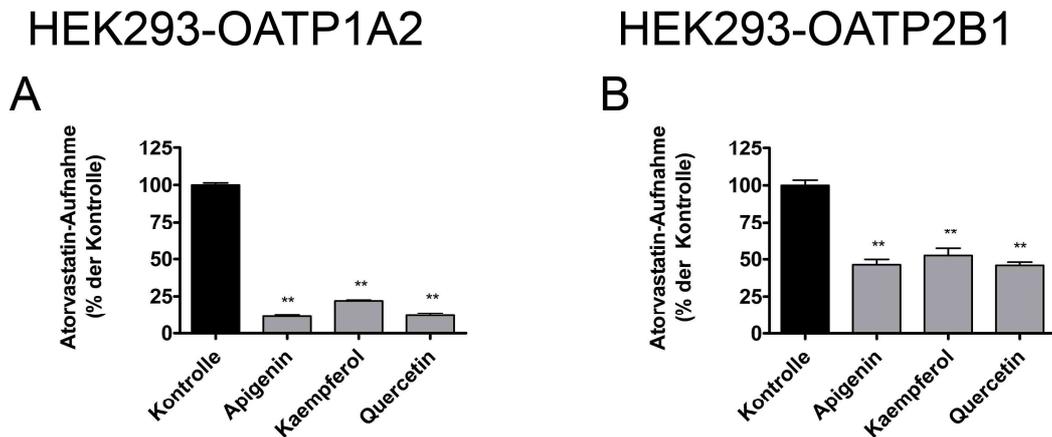


Abbildung 14: Einfluss verschiedener Flavonoide auf die OATP1A2- und OATP2B1-vermittelte Atorvastatin-Aufnahme. A) Aufnahme von 5  $\mu\text{M}$  Atorvastatin für 5 Minuten in HEK293-OATP1A2-Zellen. B) Aufnahme von 0,5  $\mu\text{M}$  Atorvastatin für 10 Minuten in HEK293-OATP2B1-Zellen. Die Flavonoide wurden in einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Alle Daten sind als Prozent der Kontrolle ( $\blacksquare$  Atorvastatin-Aufnahme ohne Flavonoide) angegeben. Apigenin, Kaempferol und Quercetin zeigten eine signifikante Inhibition der OATP1A2- und OATP2B1-vermittelten Atorvastatin-Aufnahme. Alle Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. angegeben. \*\*  $p < 0,01$ , *one-way ANOVA, Dunnett's multiple comparison test*.

## 6.3 Untersuchung des Einflusses konservierter positiv-geladener Lysin- und Arginin-Reste in Transmembranhelices auf die Transportaktivität von OATP1B3

### 6.3.1 Identifizierung konservierter positiv-geladener Aminosäuren im OATP1B3-Protein

Um konservierte positiv-geladene Lysin- und Arginin-Reste in Transmembranhelices zu identifizieren, wurde zunächst ein Sequenzvergleich der Aminosäuresequenzen aller humanen OATP-Familienmitglieder durchgeführt (Abbildung 15). Aufgrund dieser Analyse wurden die positiv-geladenen Lysin-Reste an Position 28 und 41 und der positiv-geladene Arginin-Rest an Position 580 in OATP1B3 für weitere Experimente ausgewählt. Lysin 28 und Lysin 41 befinden sich in der Transmembranhelix I, die zu der von Meier-Abt und Kollegen (Meier-Abt et al. 2005) vorhergesagten Pore des Transporters gerichtet ist. Lysin 28 kommt konserviert in weiteren sieben OATPs vor. Lysin 41 ist ebenfalls konserviert und kommt in drei weiteren humanen OATPs der OATP1-Unterfamilie vor.

	TMH I		TMH XI
	28	41	580
OATP1A2	-SKL <b>K</b> MFLLAITCAFVSK	<b>K</b> TLSG	.....FCT <b>R</b> VFAGIPAP
OATP1B1	-NGL <b>K</b> MFLAALSLSFIA <b>K</b>	<b>K</b> TLGA	.....MVIR <b>R</b> ALGGILAP
OATP1B3	-NGF <b>K</b> MFLAALSFSYIA <b>K</b>	<b>K</b> ALGG	.....MVI <b>R</b> TLGGILAP
OATP1C1	-GEL <b>K</b> VFLCALSFVYFA <b>K</b>	<b>K</b> ALAE	.....LAI <b>R</b> VLAGIPAP
OATP2A1	-GNI <b>K</b> VFVLCQGLLQLCQLLYS		.....LLM <b>R</b> LLAWLPSP
OATP2B1	-HNI <b>K</b> LFVLCHSLLQLAQLMIS		.....MFL <b>R</b> ILAWMPSP
OATP3A1	-SNI <b>K</b> IFLVSECALMLAQGTVG		.....LLL <b>R</b> LLGFIPPP
OATP4A1	-NTP <b>K</b> GILFFLCAAFLQGMTV		.....IVV <b>R</b> ILGGIPGP
OATP4C1	-NTPGGFLLHYCLLAVTQGIVV		.....MVL <b>R</b> LLGTIPGP
OATP5A1	-TDSRCFLVCMCFLTFIQALMV		.....VLL <b>R</b> TLAYIPTP
OATP6A1	-NNIRCFMIFYCILLICQGVVF		.....VIL <b>R</b> IFGTIPGP

Abbildung 15: Sequenzvergleich der Aminosäuren zweier Teilbereiche der elf humanen OATPs. Der Sequenzvergleich wurde mit den Heidelberg UNIX Sequences Analysis Resources durchgeführt. Die hervorgehobenen Aminosäuren Lysin an den Positionen 28 und 41 und Arginin an der Position 580 in OATP1B3 kommen konserviert in der humanen OATP-Familie vor. Sie sind in den vorhergesagten, der Pore zugewandten, Transmembranhelices I (TMH I) und XI (TMH XI) lokalisiert.

Arginin 580 ist innerhalb der humanen OATP-Familie sehr stark konserviert und kommt in allen weiteren humanen OATPs vor. Arginin 580 liegt nach der Strukturvorhersage in der Transmembranhelix XI, die ebenfalls zur Pore des Transporters gerichtet ist.

### **6.3.2 Mutagenese von OATP1B3 und Charakterisierung der transient OATP1B3-Wildtyp- oder OATP1B3-Mutanten-exprimierenden HEK293-Zelllinie**

Basierend auf dem unter 6.3.1 beschriebenen Sequenzvergleich wurden verschiedene OATP1B3-Mutanten generiert. So wurde die positiv-geladene Aminosäure Lysin 28 durch Alanin (Lys28>Ala), Arginin (Lys28>Arg) und Glycin (Lys28>Gly) ausgetauscht. Alanin steht hierbei für einen Austausch zu einer nicht geladenen Aminosäure, wohingegen das ebenfalls positiv-geladene Arginin an der zu Lys28 korrespondierenden Position in OATP5A1 und OATP6A1 vorkommt und Glycin in OATP4C1. Die positiv-geladene Aminosäure Lysin 41 wurde ebenfalls zur nicht geladenen Aminosäure Alanin (Lys41>Ala) und weiter zum positiv-geladenen Arginin (Lys41>Arg), zu Glutamin (Lys41>Gln) und Glycin (Lys41>Gly) mutiert. Die Aminosäure Glutamin kommt bei allen anderen OATPs an der zu Lys41 korrespondierenden Position vor. Die positiv-geladene Aminosäure Arginin an Position 580 wurde durch das nicht geladene Alanin (Arg580>Ala), Glycin (Arg580>Gly) und Lysin (Arg580>Lys) ausgetauscht. In allen anderen OATPs steht ebenfalls immer Arginin an Position 580. Weiterhin wurde eine Kontrollmutante hergestellt, bei der Glycin an Position 522 zu Cystein (Gly522>Cys) ausgetauscht wurde. Diese Mutante wurde bereits vorher durch Letschert et al. (Letschert et al. 2004) beschrieben. Sie zeigt einen reduzierten Transport des Modellsubstrats BSP im Vergleich zum OATP1B3-Wildtyp.

#### **6.3.2.1 Immunfluoreszenzanalyse der OATP1B3-Mutanten an Position Lys28, Lys41 und Arg580**

Um den möglichen Einfluss der jeweiligen Mutationen auf die Membranlokalisierung des OATP1B3-Proteins zu untersuchen, wurden Immunfluoreszenzanalysen mit einem konfokalen Lasermikroskop durchgeführt (Abbildung 16). Für die Mutanten

Lys28>Ala, Lys28>Arg, Lys28>Gly, Lys41>Ala, Lys41>Arg, Lys41>Gln, Lys41>Gly und Arg580>Gly konnte keine Veränderung in der Membranlokalisation im Vergleich zum OATP1B3-Wildtyp-Protein beobachtet werden. Ebenso führte auch die Kontrollmutante Gly522>Cys nicht zu einer Veränderung der Membranlokalisation, was mit den bereits publizierten Daten von

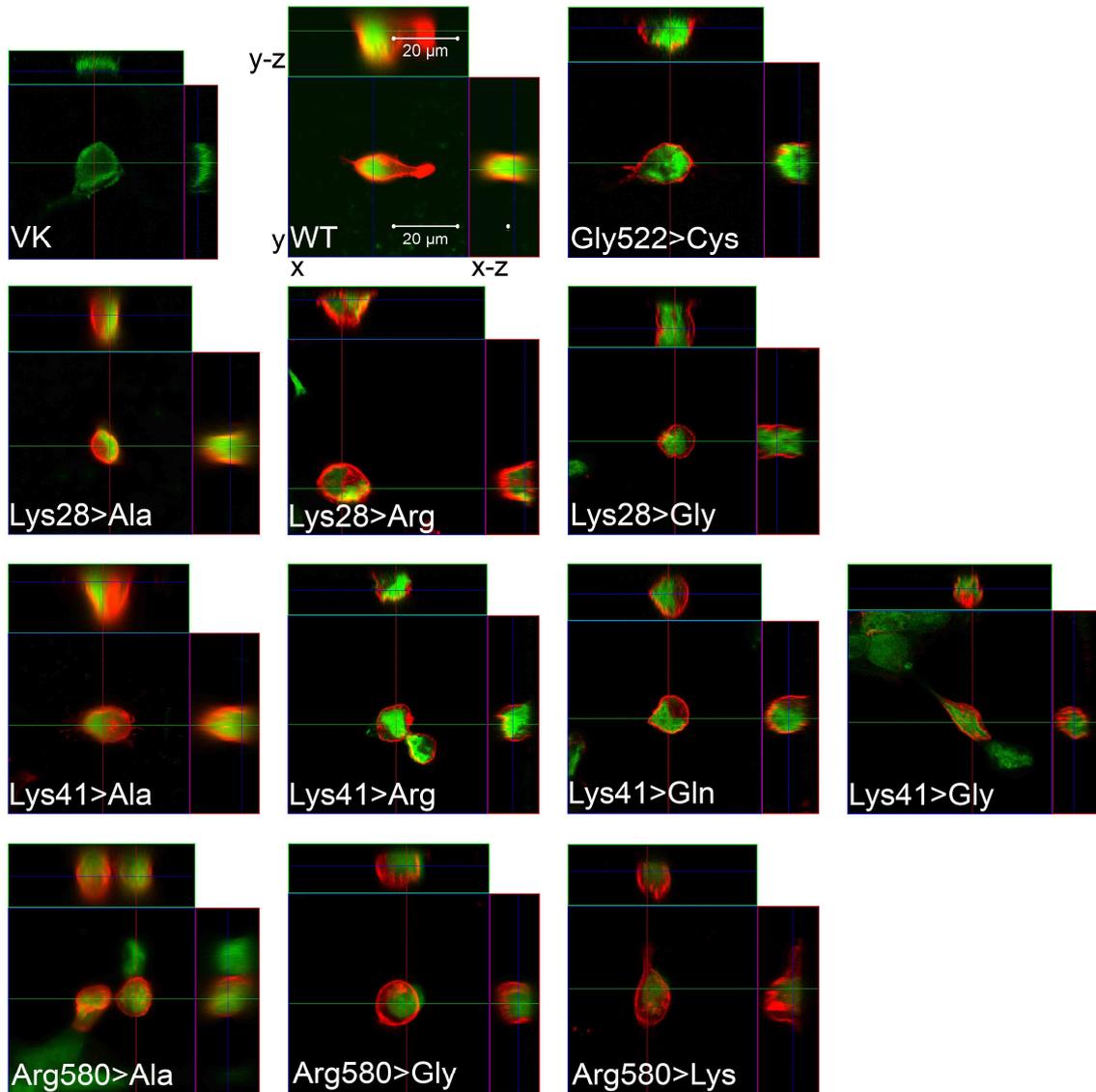


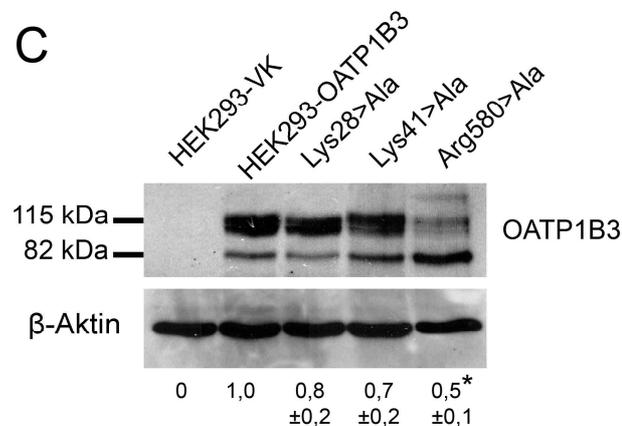
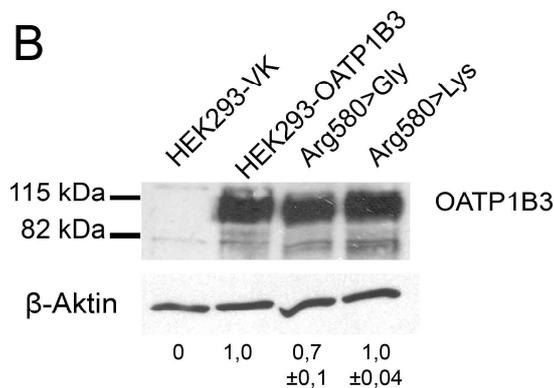
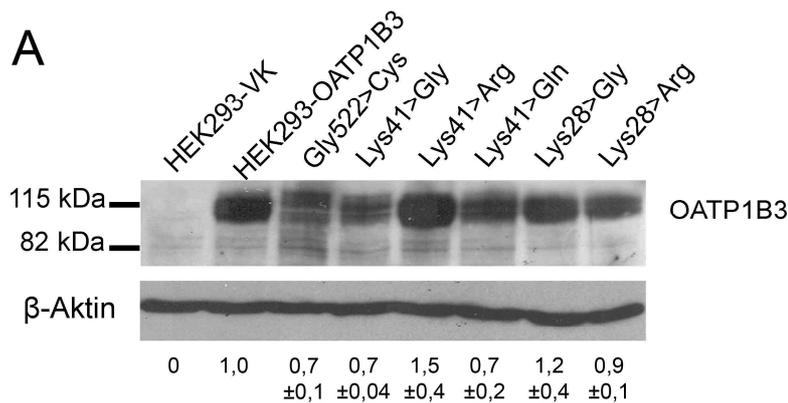
Abbildung 16: Immunfluoreszenzanalyse mittels konfokaler Lasermikroskopie transient transfizierter HEK293-Zellen, die das Wildtyp-OATP1B3 oder mutiertes OATP1B3 exprimieren. VK: HEK293-Zellen, die nur mit dem leeren Vektor transfiziert wurden; WT: HEK293-Zellen, die transient mit dem Wildtyp-OATP1B3 transfiziert wurden. Die anderen Bilder zeigen die verschiedenen Mutanten. Alle untersuchten Mutanten zeigten eine deutliche Lokalisation des OATP1B3-Proteins in der Plasmamembran. Nur die Arg580>Lys- und Arg580>Ala-Mutanten zeigten eine partielle Retention des Proteins im Cytoplasma. Für jede Mutante sind die x-y-, x-z- und y-z-Ebenen gezeigt. Rote Fluoreszenz: Lokalisation des OATP1B3-Proteins; grüne Fluoreszenz: Kernfärbung.

Letschert und Kollegen (Letschert et al. 2004) übereinstimmt. Lediglich bei den Mutanten Arg580>Ala und Arg580>Lys wurde eine geringfügige intrazelluläre Retention des OATP1B3-Proteins im Cytoplasma und/oder in intrazellulären Kompartimenten festgestellt. Der größere Anteil des Proteins war jedoch auch hier in der Plasmamembran nachweisbar. HEK293-Vektorkontrollzellen (VK), die nur mit dem Leervektor transfiziert waren, zeigten keine positive Färbung. Mit Hilfe von Laser-Scan-Aufnahmen in der z-Dimension konnte die Lokalisation des OATP1B3-Proteins in der kompletten Zellmembran untersucht werden. Diese Aufnahmen bestätigten die oben genannten Ergebnisse.

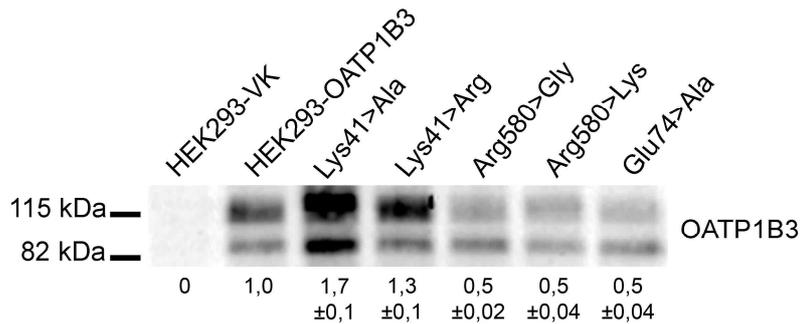
### **6.3.2.2 Immunoblotanalyse der OATP1B3-Mutanten an Position Lys28, Lys41 und Arg580**

Um die OATP1B3-Gesamtproteinexpression und die OATP1B3-Proteinmenge in der Zellmembran zu untersuchen, wurden Immunoblotanalysen der OATP1B3-Mutanten, des HEK293-OATP1B3-Wildtyps, der Kontrollmutante Gly522>Cys und der HEK293-Vektorkontrolle (HEK293-VK) durchgeführt (Abbildung 17). Die semiquantitative densitometrische Auswertung zeigte eine signifikante Reduktion des OATP1B3-Gesamtproteins in der Arg580>Ala-Mutante ( $0,5 \pm 0,1$  a.u. bezogen auf den Wildtyp,  $p < 0,05$ , *one-way ANOVA*, *Dunnett's multiple comparison test*). Alle anderen Lys28-, Lys41- und Arg580-Mutanten waren durch statistisch nicht-signifikante Unterschiede in der OATP1B3-Gesamtproteinexpression bezogen auf den OATP1B3-Wildtyp gekennzeichnet.

Im Folgenden wurden der OATP1B3-Wildtyp und die OATP1B3-Mutanten Lys41>Ala, Lys41>Gly, Arg580>Gly, Arg580>Lys und Glu74>Ala (siehe 6.3.6) auf ihre OATP1B3-Proteinexpression in der Zellmembran untersucht, um die in den folgenden Transportexperimenten generierten  $v_{\max}$ -Werte auf die Proteinexpression auf der Zelloberfläche normalisieren zu können (Abbildung 18). Bei diesen Untersuchungen zeigte sich, dass die Mutanten Lys41>Ala und Lys41>Arg durch einen nicht signifikanten 1,7- und 1,3-fachen Anstieg der Zelloberflächenproteinexpression gekennzeichnet waren. Die Mutanten Arg580>Gly, Arg580>Lys und Glu74>Ala zeigten hingegen eine verminderte nicht signifikante Proteinexpression auf der Zelloberfläche im Vergleich zum OATP1B3-Wildtyp (0,5-fach).



**Abbildung 17: Repräsentative Immunoblotanalysen der Gesamtproteinexpression der OATP1B3-Mutanten an den Positionen Lys28, Lys41 und Arg580.** Die OATP1B3-Gesamtproteinexpression der Mutanten Lys28, Lys41 und Arg580 und der Kontrollmutante Gly522>Cys ist im Vergleich zur OATP1B3-Gesamtproteinexpression des OATP1B3-Wildtyps (HEK293-OATP1B3) und der Vektorkontrolle (HEK293-VK) gezeigt. Die Ergebnisse der densitometrischen Auswertung sind jeweils als Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. in *arbitrary units* (a.u.) angegeben. Zwischen der Kontrollmutante (Gly522>Cys) und den anderen Mutanten konnten im Vergleich zum Wildtyp (HEK293-OATP1B3) keine signifikanten Unterschiede in der Expression ( $p > 0,05$ ) festgestellt werden. Lediglich Arg580>Ala unterschied sich signifikant ( $* p < 0,05$ ) von dem HEK293-OATP1B3-Wildtyp (*one-way ANOVA, Dunnett's multiple comparison test*). A) Mutanten von Lys28 und Lys41. B) Mutanten von Arg580. C) Alanin-Mutanten von Lys28, Lys41 und Arg580.

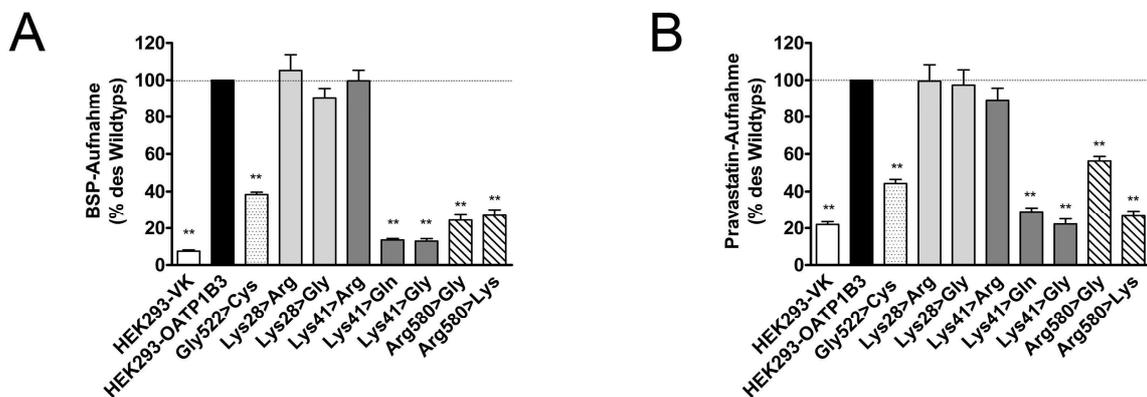


**Abbildung 18:** Repräsentative Immunoblotanalyse der Zelloberflächenproteinexpression der OATP1B3-Mutanten an den Positionen Lys41, Arg580 und Glu74. Die Ergebnisse der densitometrischen Auswertung sind jeweils unterhalb als Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. in *arbitrary units* (a.u.) angegeben.

### 6.3.3 Einfluss der Mutationen auf den OATP1B3-vermittelten BSP- und Pravastatin-Transport

Um den Einfluss der generierten Mutationen auf den OATP1B3-vermittelten BSP- (Abbildung 19A) und Pravastatin- (Abbildung 19B) Transport zu untersuchen, wurden Transportversuche, wie unter 5.9 beschrieben, durchgeführt. In allen Experimenten zeigte die Kontrollmutante Gly522>Cys eine deutliche Verringerung der Transportaktivität in der OATP1B3-vermittelten BSP- und Pravastatin-Aufnahme verglichen zum OATP1B3-Wildtyp. Diese Beobachtung stimmt mit den bereits publizierten Daten von Letschert und Kollegen (Letschert et al. 2004) überein. Der Austausch der Aminosäure Lysin an Position 28 (Lys28>Arg, Lys28>Gly) hatte keinen Einfluss auf die zelluläre Aufnahme von BSP oder Pravastatin im Vergleich zum OATP1B3-Wildtyp. Die Mutante Lys41>Arg, bei der die positive Ladung erhalten blieb, zeigte keine Verringerung der BSP-Aufnahme und eine statistisch nicht-signifikante Verringerung der Pravastatinaufnahme. Der Austausch zu einer neutralen Aminosäure bei den Mutanten Lys41>Gln und Lys41>Gly führte hingegen zu einer signifikant reduzierten Aufnahme von BSP und Pravastatin im Vergleich zum OATP1B3-Wildtyp ( $p < 0,01$ , *one-way ANOVA*, *Dunnett's multiple comparison test*). Die Mutante Arg580>Gly zeigte eine signifikant reduzierte Aufnahme von BSP und Pravastatin im Vergleich zum OATP1B3-Wildtyp ( $p < 0,01$ , *one-way ANOVA*, *Dunnett's multiple comparison test*). Der Austausch zu Lysin (Arg580>Lys) führte ebenfalls zu einer signifikanten Verringerung der BSP- und Pravastatin-Aufnahme ( $p < 0,01$ , *one-way ANOVA*, *Dunnett's multiple comparison test*). Die HEK293-Vektorkontrollzellen (HEK293-

VK) waren im Vergleich zum HEK293-OATP1B3-Wildtyp durch eine sehr geringe Aufnahme von BSP und Pravastatin gekennzeichnet. Um die Ergebnisse des Austauschs einer positiv-geladenen Aminosäure zu einer neutralen Aminosäure bestätigen zu können, wurden auch die Mutanten Lys28>Ala und Lys41>Ala bezüglich ihrer BSP-Aufnahme untersucht. Die Ergebnisse aus diesen Versuchen (Transportraten  $96 \pm 2\%$  und  $15 \pm 1\%$  relativ zum OATP1B3-Wildtyp,  $p < 0,01$ , *one-way ANOVA, Dunnett's multiple comparison test*) waren sehr ähnlich zu denen der jeweiligen Glycin-Mutanten. Daher wurden keine weiteren Analysen zur Pravastatin-Aufnahme der Mutanten Lys28>Ala und Lys41>Ala durchgeführt. Die Mutante Arg580>Ala wurde von allen Transportanalysen aufgrund der verringerten Proteinexpression ausgeschlossen.



**Abbildung 19:** A) OATP1B3-vermittelte BSP- (1  $\mu\text{M}$ ) und (B) Pravastatin- (50  $\mu\text{M}$ ) Aufnahme (10 min) in transient transfizierte HEK293-OATP1B3-Wildtyp-Zellen (HEK293-OATP1B3), HEK293-Vektorkontroll-Zellen (HEK293-VK) und OATP1B3-Mutanten-Zellen. Die Transportaktivität ist in Prozent der Aufnahme in die Wildtyp-Zellen (100%) angegeben. Die Daten wurden im Vergleich zur Aufnahme durch den OATP1B3-Wildtyp mittels *one-way ANOVA, Dunnett's multiple comparison test* analysiert (\*\*  $p < 0,01$ ). Die Mutationen an Position 28 haben keinen Einfluss auf die Transportaktivität des OATP1B3-Proteins. Die Lys>Gln und Lys>Gly-Mutanten an der Position 41 zeigten reduzierte Transportaktivitäten für Pravastatin und BSP, wohingegen Lys41>Arg die Transportaktivität aufrecht erhält. Die Arg580>Gly und Arg580>Lys-Mutanten sind durch eine reduzierte Transportaktivität gekennzeichnet. Die Kontrollmutante Gly522>Cys zeigte für beide Substrate eine signifikant reduzierte Transportaktivität (\*\*  $p < 0,01$ , *one-way ANOVA, Dunnett's multiple comparison test*).

### 6.3.4 Transportkinetische Analyse nach Michaelis-Menten von OATP1B3-Wildtyp und ausgewählten OATP1B3-Mutanten

In weiteren Experimenten wurde der Einfluss der positiven Ladungen an den Positionen 41 und 580 auf die kinetischen Parameter des BSP-Transports einiger ausgewählter OATP1B3-Mutanten untersucht. Dafür wurden konzentrations-

abhängige Transportversuche mit OATP1B3-Wildtyp, Lys41>Ala, Lys41>Arg, Arg580>Gly und Arg580>Lys durchgeführt. Die Mutante Lys41>Ala war gekennzeichnet durch nicht-signifikante Veränderungen in der Michaelis-Menten-Konstante  $K_m$  ( $p > 0,05$ , *one-way ANOVA*, *Bonferroni's multiple comparison test*).

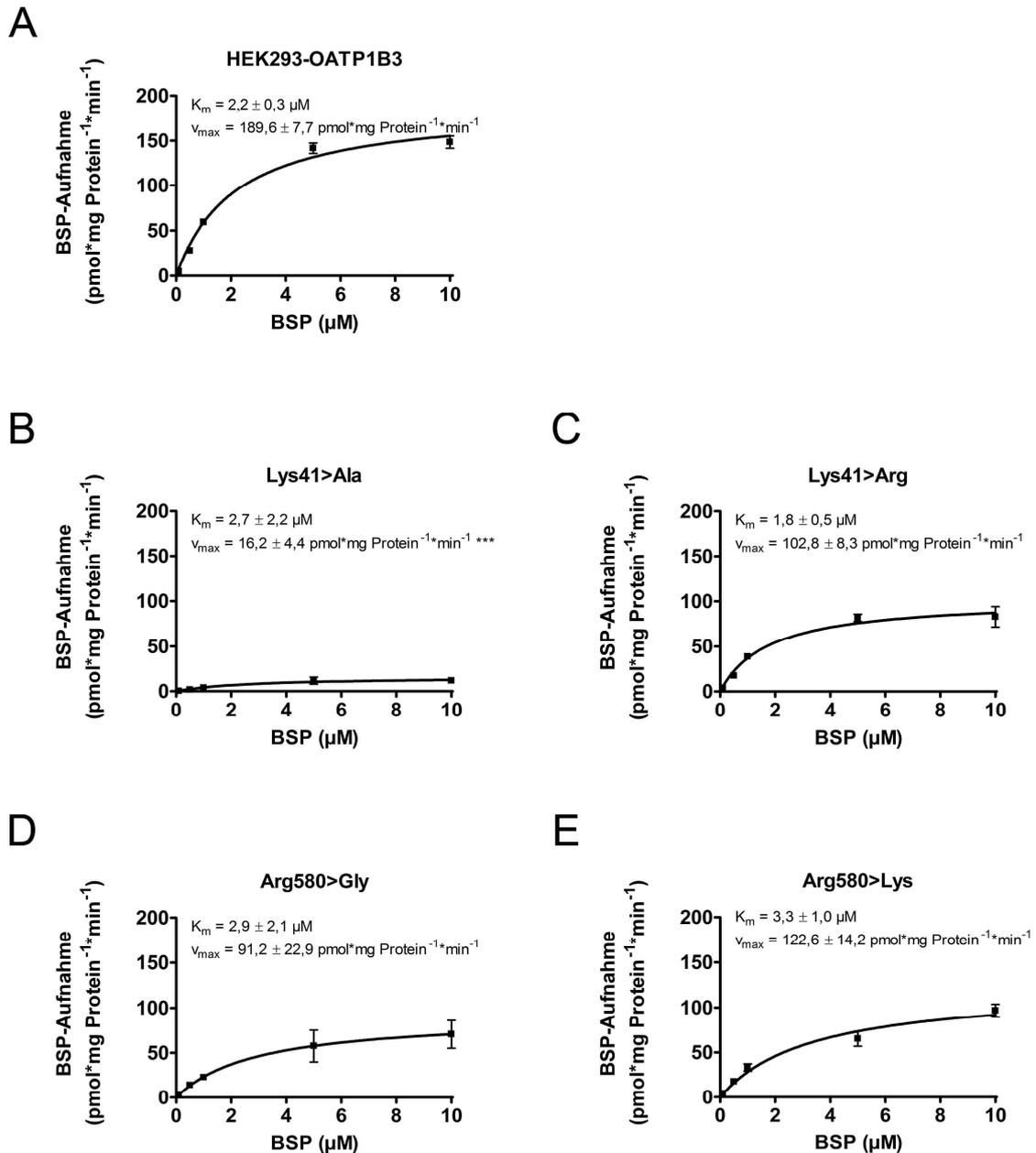


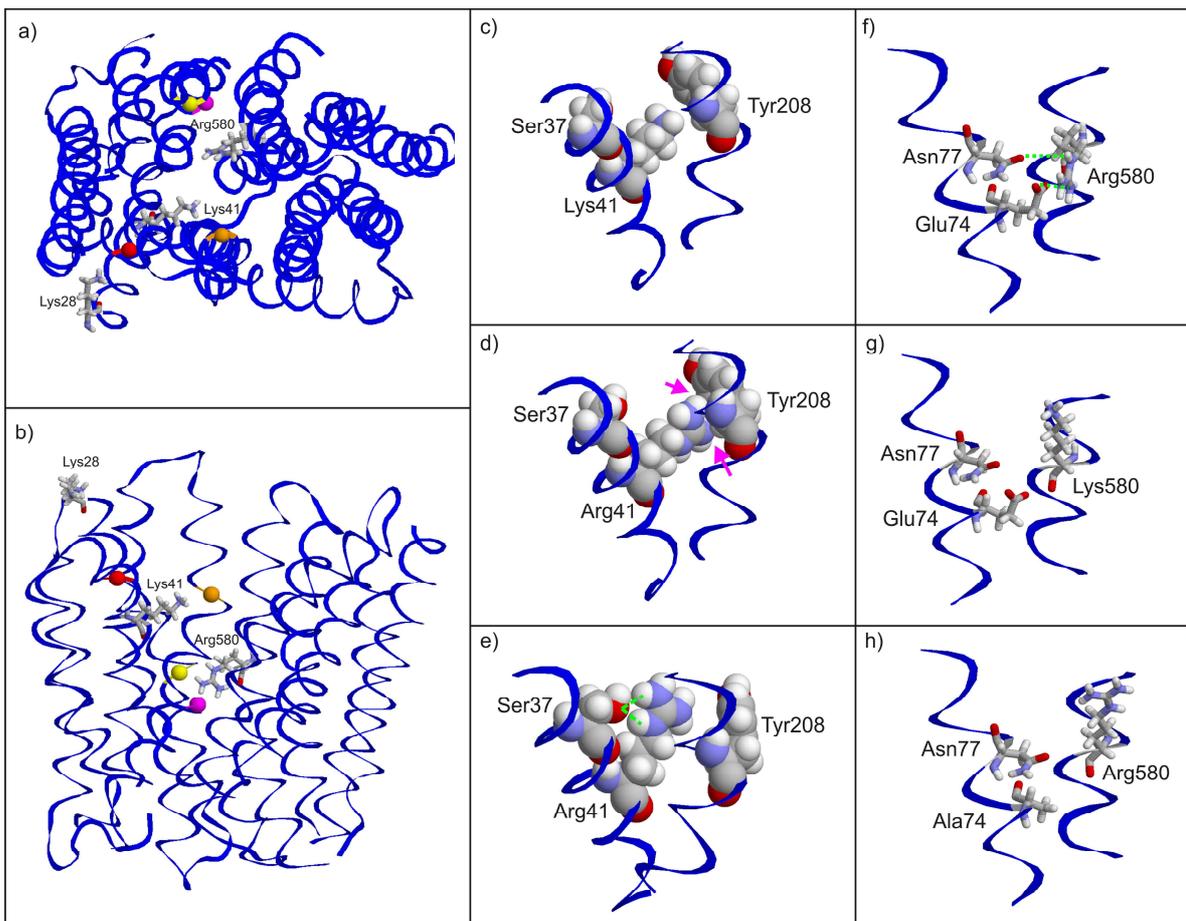
Abbildung 20: Michaelis-Menten-Kinetiken der OATP1B3-vermittelten BSP-Nettoaufnahme des Wildtyps und der Mutanten Lys41>Ala, Lys41>Arg, Arg580>Gly und Arg580>Lys. Die BSP-Aufnahme wurde über 10 min gemessen. Die  $v_{\text{max}}$ -Werte sind auf die Zelloberflächenproteinexpression normalisiert. Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. angegeben. (\*\*\*)  $p < 0,001$ , signifikant unterschiedlich zu Wildtyp, *one-way ANOVA*, *Bonferroni's multiple comparison test*).

Die maximale Transportgeschwindigkeit  $v_{\max}$  bezogen auf die Proteinexpression der Zelloberfläche war verglichen mit der  $v_{\max}$  des OATP1B3-Wildtyp (Abbildung 20A) signifikant reduziert (*one-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparison test*,  $p < 0,001$ ; Abbildung 20B). Die Mutante Lys41>Arg zeigte hingegen keine signifikanten Unterschiede bezüglich  $K_m$  oder  $v_{\max}$  im Vergleich mit dem OATP1B3-Wildtyp ( $p > 0,05$ ; *one-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparison test*, Abbildung 20C). Die Mutante Arg580>Gly zeigte einen reduzierte  $v_{\max}$ -Wert und einen nicht-signifikant veränderte  $K_m$ -Wert (Abbildung 20D), während der Austausch zu Lysin zu keiner Veränderung von  $K_m$ , jedoch aber zu einer moderaten Abnahme des  $v_{\max}$ -Werts um 35% bezogen auf die Proteinmenge in der Zellmembran im Vergleich mit dem OATP1B3-Wildtyp führte ( $p > 0,05$ ; *one-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparison test*, Abbildung 20E).

### **6.3.5 Strukturelle Modellierung des OATP1B3-Wildtyps und der OATP1B3-Mutanten**

Um die räumliche Anordnung der untersuchten Aminosäuren besser einschätzen zu können, wurde in Kooperation mit Professor Dr. Heinrich Sticht (Abteilung für Bioinformatik, Institut für Biochemie der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg) eine strukturelle Modellierung des OATP1B3-Wildtyps und der OATP1B3-Mutanten durchgeführt (Abbildung 21a+b). Das Struktur-Modell zeigt, dass Lysin 28, welches sich am Ende der Transmembranhelix I befindet, nicht der Pore zugewandt ist, da die Helix an dieser Stelle zur Membran hin geneigt ist. Lysin 41 ist in Richtung Innenseite der Pore orientiert und ist flexibel, da es keine stabilisierenden Interaktionen mit benachbarten Aminosäuren ausbilden kann (Abbildung 21c). Wenn das Lysin an Position 41 gegen Arginin ausgetauscht wird, sind geringe Interaktionen mit der benachbarten Aminosäure Tyrosin 208 in der Transmembranhelix V wahrscheinlich. Diese Interaktionen kommen durch die längere Seitenkette des Arginin im Vergleich zum Lysin zustande. Sie reduzieren die Flexibilität des Arginin an Position 41, was eine alternative Seitenkettenkonformation unterstützt. Diese alternative Konformation ist weiterhin durch eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem Serin an Position 37 stabilisiert, die zusätzlich die Flexibilität des Arginin 41 reduziert (Abbildung 21d+e). Die Seitenkette des Arginin 580 ist wahrscheinlich zur Innenseite der Pore hin

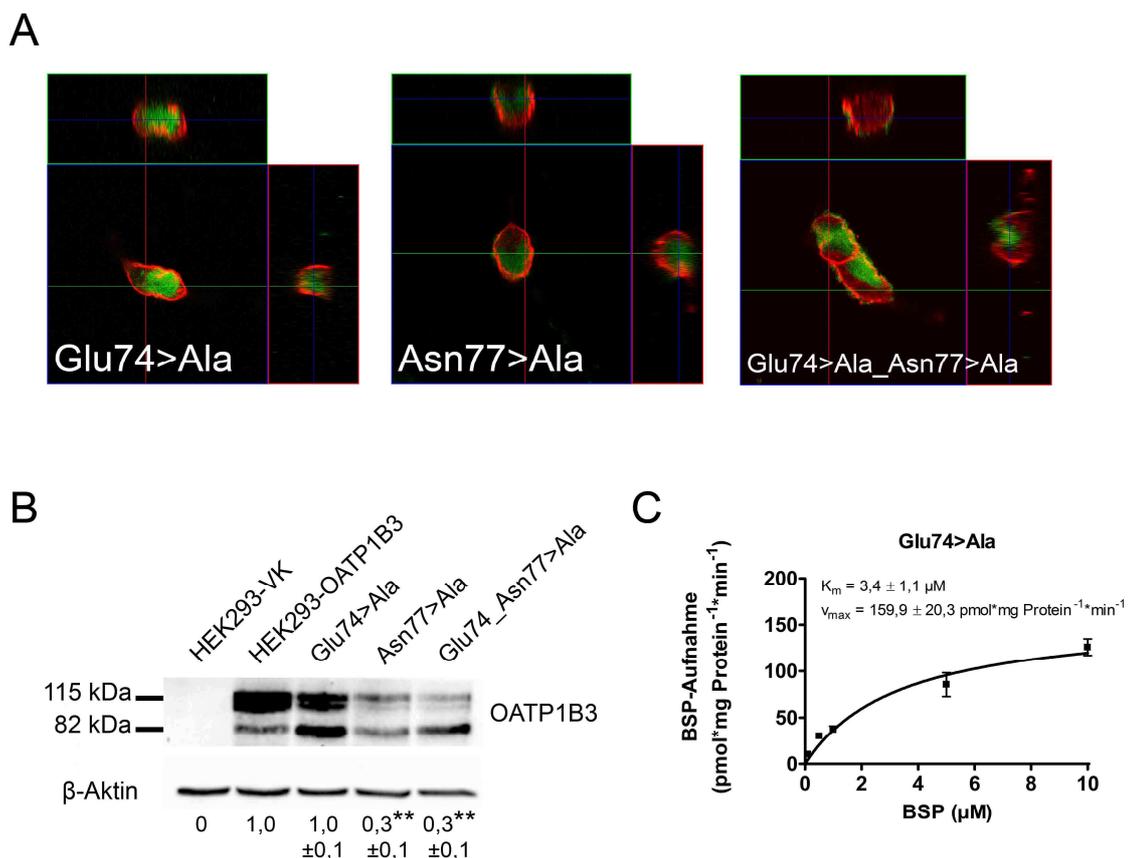
orientiert (Abbildung 21f). Diese Orientierung wird durch polare Wechselwirkungen mit den Seitenketten der Aminosäuren Glutamat 74 und Asparagin 77 verstärkt. Diese Wechselwirkungen können nicht durch die kürzere Seitenkette des Lysin gebildet werden, was zu einer alternativen Orientierung und/oder erhöhten Flexibilität der Lysin-Seitenkette führt (Abbildung 21g). Für Arginin 580 wird ein entsprechender Verlust an Interaktion auch für die Glu74>Ala-Mutante vorhergesagt (Abbildung 21h).



**Abbildung 21: Struktur-Modell von OATP1B3.** Die Modell-Ansicht von oben (a) und der Seite (b) zeigen die Positionen der untersuchten Aminosäurereste. Die positiv-geladenen Aminosäuren sind als Stäbchen dargestellt. Benachbarte Aminosäuren, die im Text diskutiert werden, sind als Kugeln dargestellt und durch Farben wie folgt kodiert: Ser37 (rot), Tyr208 (orange), Glu74 (magenta) und Asn77 (gelb). c-e: Effekte der Lys41>Arg-Mutation: Während die Lys41-Seitenkette keine Interaktionen mit benachbarten Aminosäuren eingeht (c), zeigt Arg41 kleinere Interaktionen (d, magenta-farbene Pfeile), die möglicherweise zu einer alternativen Seitenkettenkonformation führen (e, grüne Linien markieren eine Interaktion mit Ser37). f-h: Effekte der Arg580>Lys- und Glu74>Ala-Mutationen: Die Orientierung von Arg580 ist durch Interaktionen mit Glu74 und Asn77 stabilisiert (f), welche hingegen nicht durch Lysin aufrechterhalten werden können (g). Das führt zu einer alternativen Seitenkettenorientierung. Für Arginin 580 wird ein entsprechender Verlust an Interaktion auch durch die Mutation Glu74>Ala vorhergesagt (h).

### 6.3.6 Etablierung und Charakterisierung von Glu74- und Asn77-Mutanten

Da das Struktur-Modell (beschrieben unter 6.3.5) nahelegte, dass der Aminosäurerest Arginin an Position 580 mit den benachbarten Resten Glutamat 74 und Asparagin 77 interagiert, wurden zur experimentellen Kontrolle dieser Vermutung die zusätzlichen Einzelmutanten Glu74>Ala und Asn77>Ala und die Doppelmutante Glu74>Ala \_Asn77>Ala generiert. Hierbei wurden die Aminosäuren jeweils zur nicht geladenen Aminosäure Alanin ausgetauscht. Die Membranlokalisation dieser Mutanten zeigte keine Unterschiede zum OATP1B3-Wildtyp (Abbildung 22A). Auch die Proteinexpression der Mutante Glu74>Ala unterschied sich nicht signifikant vom OATP1B3-Wildtyp, wohingegen die Mutanten Asn77>Ala und Glu74>Ala\_Asn77>Ala eine signifikante Verringerung in



**Abbildung 22: Charakterisierung der Glu74>Ala-Mutante, der Asn77>Ala-Mutante und der Glu74>Ala\_Asn77>Ala-Doppelmutante. A) Immunfluoreszenz und (B) Immunoblotanalysen aller Mutanten (\*\*  $p < 0,01$  im Vergleich zum OATP1B3-Wildtypprotein, *one-way ANOVA*, *Dunnnett's multiple comparison test*). C) Michaelis-Menten-Kinetik der BSP-Aufnahme (10 min) der Glu74>Ala-Mutante. Der  $v_{max}$ -Wert ist auf die Zelloberflächenproteinexpression von Glu74>Ala normalisiert. B) Die Asn77>Ala- und Glu74>Ala\_Asn77>Ala-Mutanten zeigten eine verminderte Gesamtproteinexpression und wurden nachfolgend von der kinetischen Analyse ausgeschlossen. Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. angegeben.**

der Proteinexpression zeigten (\*\*  $p < 0,01$ ; *one-way ANOVA, Dunnett's multiple comparison test*, Abbildung 22B). Die kinetische Analyse der Mutante Glu74>Ala zeigte einen moderaten Abfall im  $v_{\max}$ -Wert bezogen auf die Proteinmenge in der Zellmembran und einen leichten, nicht signifikanten Anstieg in der  $K_m$  (Abbildung 22C). Die Mutanten Asn77>Ala und Glu74>Ala\_Asn77>Ala wurden aufgrund der verringerten OATP1B3-Proteinexpression von der kinetischen Analyse ausgeschlossen.

## 7 Diskussion

### 7.1 Expression des Prostaglandintransporters OATP2A1 im Gastrointestinaltrakt und Beeinflussung der Funktion von OATP2A1 durch Cyclooxygenaseinhibitoren

Während die Bedeutung der Cyclooxygenase (COX-1 und COX-2) für die Integrität sowie für die Entstehung NSAID-induzierter Ulzerationen und Blutungen der Magenschleimhaut klar erkannt wurde, existieren über die Funktion und Bedeutung des humanen Prostaglandintransporters OATP2A1 für den Arzneimitteltransport, sowie für physiologische und pathophysiologische Vorgänge im Gastrointestinaltrakt des Menschen bislang kaum Daten. Möglicherweise ist OATP2A1 an der zellulären Wiederaufnahme von Prostaglandin E<sub>2</sub> und anderen Prostaglandinen in der Magenschleimhaut beteiligt. Daher befasste sich ein Projekt der vorliegenden Arbeit mit der Expression des Prostaglandintransporters OATP2A1 im Gastrointestinaltrakt sowie dessen funktioneller Modifikation durch COX-Inhibitoren.

Im ersten Teilprojekt konnte gezeigt werden, dass OATP2A1 in verschiedenen gastrointestinalen Geweben exprimiert ist. Die OATP2A1-Expression auf mRNA- und Proteinebene wurde in humanen Biopsieproben untersucht. Die *Real time*-PCR-Analyse zeigte die höchste mRNA-Expression im Antrum des Magen, gefolgt von Corpus und Duodenum. Die immunhistochemische Färbung und die semiquantitative IRS (*immunohistochemical rating score*)-Analyse zeigten ähnliche Ergebnisse für die Proteinexpression von OATP2A1. Im Immunoblot konnte ebenso die höchste Proteinexpression im Antrum nachgewiesen werden. Obwohl die mit verschiedenen Methoden ermittelten Daten übereinstimmende Ergebnisse zeigen, ist in der Immunoblotanalyse der Biopsien die Expressionshöhe von OATP2A1 im Duodenum höher, als man aufgrund der immunhistochemischen Analysen vermuten würde, in denen nur vereinzelt Zellen angefärbt waren. Diese Unterschiede sind möglicherweise auf eine Variabilität der OATP2A1-Expression in der duodenalen Schleimhaut zwischen verschiedenen Probanden zurückzuführen. Jedoch könnten auch regionale Expressionsunterschiede innerhalb der gastroduodenalen Schleimhaut oder Unterschiede während der Biopsieentnahme für die variablen OATP2A1-Expressionsdaten verantwortlich sein.

Mittels Immunhistochemie konnte die Expression von OATP2A1 in den Belegzellen des Corpus und in den tiefen Drüsenzellen des Antrums nachgewiesen werden. Die Färbung zeigte eine granuläre cytoplasmatische Expression, was auf eine Expression von OATP2A1 in cytoplasmatischen Vesikeln hinweist. Es wurde bereits publiziert, dass die COX-1- und COX-2-Enzyme im endoplasmatischen Retikulum und in den kanalikulären Membranen der Belegzellen und Magendrüsen unter normalen und bestimmten pathologischen Bedingungen lokalisiert sind (Jackson et al. 2000; Bhandari et al. 2005). Diese Ergebnisse stimmen mit Daten früherer Studien überein, die zeigen, dass OATP2A1/Oatp2a1 oft in den gleichen Zellen exprimiert ist, in denen auch die Prostaglandinsynthese und -oxidation stattfindet (Bao et al. 2002; Nomura et al. 2005). Nomura und Kollegen postulierten außerdem ein Modell des Prostaglandinmetabolismus, in welchem die Prostaglandinsynthese, der Transport und der Abbau der Prostaglandine in verschiedenen Kompartimenten einer Zelle stattfinden. Weiterhin konnten Bao und Kollegen (Bao et al. 2002) zeigen, dass Oatp2a1 in der Rattenniere in cytoplasmatischen Vesikeln entlang verschiedener Regionen des Sammelrohrs und in Epithel- und interstitiellen Zellen der inneren und äußeren Medulla exprimiert ist.

Aufgrund des Nachweises der OATP2A1-Expression in der gastroduodenalen Schleimhaut wurde in der vorliegenden Arbeit weiter untersucht, ob COX-Inhibitoren die OATP2A1-Funktion beeinflussen können. Hierfür wurde eine HEK293-Zelllinie etabliert, die stabil OATP2A1 exprimiert. Diese HEK293-OATP2A1-Zelllinie zeigte eine signifikant höhere Aufnahme von PGE<sub>2</sub> verglichen mit den Kontrollzellen. In einem ersten Auswahlverfahren wurden verschiedene häufig verwendete nicht selektive COX-Inhibitoren und der selektive COX-2-Inhibitor Lumiracoxib in einer Konzentration von 100 µM bezüglich ihres Einflusses auf die OATP2A1-Funktion hin untersucht. Diese Konzentration entspricht den therapeutischen Plasmakonzentrationen beim Menschen, außer für Indomethacin (1-3 µM), Diclofenac (2-10 µM) und Lumiracoxib (4-20 µM).

Darauf aufbauend konnte gezeigt werden, dass Diclofenac und Lumiracoxib potente Inhibitoren des OATP2A1-vermittelten Transports mit vergleichbaren IC<sub>50</sub>-Werten sind. Dieses Ergebnis ist insofern nicht überraschend, als dass die chemischen Strukturen der beiden Substanzen sehr ähnlich sind. An dieser Stelle ist darauf hinzuweisen, dass Diclofenac ein relativ niedriges Risiko für

gastrointestinale Nebenwirkungen aufweist (Henry et al. 1996). Das reduzierte Risiko für Diclofenac wurde auf eine präferenzielle oder komplette Inhibition der COX-2 in therapeutischen Dosen zurückgeführt (Tegeder et al. 1999; Brune 2007). Es bleibt zu untersuchen, ob das niedrige Risiko dieser COX-Inhibitoren für gastrointestinale Nebenwirkungen möglicherweise auch zum Teil auf ihre inhibitorischen Effekte auf die OATP2A1-Funktion zurückzuführen ist.

Andererseits konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Indomethacin, Ketoprofen und Naproxen die OATP2A1-vermittelte Aufnahme von PGE<sub>2</sub> konzentrationsabhängig stimulieren. Obwohl der molekulare Mechanismus, der diesen stimulierenden Effekten zugrunde liegt, noch nicht bekannt ist, konnten ähnliche stimulierende Effekte auf andere Aufnahmetransporter durch verschiedene Medikamente und endogene Substrate bereits gezeigt werden (Grube et al. 2006; Bachmakov et al. 2008). Möglicherweise liegt eine allosterische Interaktion zugrunde (persönliche Mitteilung PD Dr. rer. nat. Jörg König). Bezogen auf OATP2A1 zeigten schon Lu und Kollegen (Lu et al. 1996), dass 10 µM Indomethacin den OATP2A1-vermittelten Transport von PGE<sub>2</sub> (0,2 nM) um 14% stimuliert, wohingegen Indomethacin in einer Konzentration von 100 µM eine Abnahme der PGE<sub>2</sub>-Aufnahme auf 82,5% der Kontrolle bewirkte. Die Differenz zu den in dieser Arbeit vorliegenden Daten kann möglicherweise durch Unterschiede in den eingesetzten Substratkonzentrationen an PGE<sub>2</sub> erklärt werden.

Bisher ist jedoch noch nicht bekannt, ob die unterschiedlichen Effekte verschiedener Cyclooxygenaseinhibitoren auf die OATP2A1-Funktion einen Einfluss auf die Häufigkeit gastrointestinaler Nebenwirkungen haben. NSAID-induzierte gastroduodenale Komplikationen kommen am häufigsten im Antrum vor, gefolgt vom Corpus (Kamada et al. 2006). Die vorliegenden Daten zeigen das gleiche Verteilungsmuster der OATP2A1-Expression in den verschiedenen Gewebe-Abschnitten. Möglicherweise korreliert also die Expressionshöhe von OATP2A1 mit dem Auftreten gastroduodenaler Komplikationen.

Bisher ist bekannt, dass eine Blockade der Cyclooxygenasen durch COX-Inhibitoren eine der häufigsten Ursachen für NSAID-induzierte gastrointestinale Ulzerationen darstellt. Möglicherweise stellt auch die Modulation der OATP2A1-Funktion durch COX-Inhibitoren, neben der bereits gut bekannten Cyclooxygenaseninhibition, einen weiteren Faktor für NSAID-induzierte

gastrointestinale Nebenwirkungen dar, da durch die Modulation der OATP2A1-Funktion die Prostaglandin-Konzentration in der gastroduodenalen Schleimhaut beeinflusst werden könnte. Die Rolle von OATP2A1 für NSAID-induzierten Ulzerationen und Blutungen bleibt daher noch weiter zu erforschen.

Bereits Brune und Kollegen (Brune et al. 1977) zeigten, dass Belegzellen des Magens in der Lage sind, Salicylate zu akkumulieren. Diese Erkenntnis ist insofern interessant, als dass OATP2A1 ebenfalls in den Belegzellen nachgewiesen werden konnte, denn Salicylate stellen als Anionen potentielle Substrate für OATPs dar. Ob jedoch Transportproteine, wie die OATPs, für diese Akkumulation verantwortlich sind, bleibt zu untersuchen.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit die Expression des Prostaglandintransporters OATP2A1 in der humanen gastroduodenalen Schleimhaut charakterisiert werden, wo OATP2A1 am stärksten im Antrum und im Corpus exprimiert ist. Weiterhin konnte mittels einer OATP2A1-exprimierenden Zelllinie gezeigt werden, dass die Aktivität von OATP2A1 durch verschiedene therapeutisch genutzte, unselektive und selektive COX-Inhibitoren beeinflusst werden kann, was eine pathophysiologische Rolle von OATP2A1 bei der Entstehung von gastrointestinalen Nebenwirkungen von COX-Inhibitoren nahelegt.

## **7.2 Untersuchung des Einflusses von Flavonoiden auf die Funktion der Transporter OATP1A2 und OATP2B1**

OATP1A2 und OATP2B1 sind Mitglieder der humanen OATP-Familie und in der apikalen Membran humaner Enterozyten lokalisiert (Kobayashi et al. 2003; Glaeser et al. 2007). Im zweiten Teilprojekt konnte gezeigt werden, dass die Flavonoide Apigenin, Kaempferol und Quercetin in der Lage sind, den OATP1A2- und OATP2B1-vermittelten Transport von BSP und den Arzneistoffen Fexofenadin und Atorvastatin in unterschiedlichem Ausmaß zu hemmen (siehe Abschnitt 6.2.3).

Da die meisten Arzneistoffe, die in der Pharmakotherapie eingesetzt werden, oral eingenommen werden, wird die Bioverfügbarkeit dieser Arzneistoffe bereits durch den intestinalen Arzneistoffmetabolismus und Arzneistofftransport beeinflusst. Arzneistoff-Aufnahmetransporter, wie z.B. OATP1A2, scheinen die intestinale Aufnahme von Arzneistoffen, wie z.B. Fexofenadin, zu beeinflussen (Cvetkovic et al. 1999; Dresser et al. 2003; Glaeser et al. 2007). Die Aufnahme des Antihistaminikums Fexofenadin, das im Menschen nicht verstoffwechselt wird, wird verringert, wenn man gesunden Freiwilligen Fexofenadin gleichzeitig mit Grapefruitsaft verabreicht. Dabei wird OATP1A2 durch das im Grapefruitsaft enthaltene Flavonoid Naringin inhibiert und somit die Aufnahme von Fexofenadin aus dem Dünndarm gehemmt (Bailey et al. 2007).

Da Gemüse, Obst und pflanzlichen Arzneimitteln reich an Flavonoiden sind, wurde in dieser Arbeit der Einfluss der Flavonoide Apigenin, Kaempferol und Quercetin auf die Transportaktivität der intestinalen Transporter OATP1A2 und OATP2B1 untersucht.

Die Menge an Apigenin, Kaempferol und Quercetin variiert in verschiedenen pflanzlichen Nahrungsmitteln und pflanzlichen Arzneimitteln. So zeigt z.B. eine Studie, dass Quercetin zu den wichtigsten Flavonoiden in Zwiebeln, Salat, Bohnen und Äpfeln zählt (Hertog et al. 1992). Große Mengen an Quercetin sind vor allem in Zwiebeln und Äpfeln enthalten. In Zwiebeln sind 347 mg/kg des frischen, essbaren Anteils Quercetin, in Äpfeln 36 mg/kg (Hertog et al. 1992). Kaempferol kommt in Lauch und Endiviensalat mit 30 mg/kg und 46 mg/kg des frischen, essbaren Anteils vor. Weitere Untersuchungen verschiedener Getränke zeigten, dass Quercetin mit einer Konzentration von 16 mg/l in Rotwein und mit 13 mg/l in

Tomatensaft und mit 10-25 mg/l in verschiedenen Teesorten vorkommt (Hertog et al. 1993).

Wenn man den hohen Verzehr und regelmäßigen Genuss einiger dieser Gemüsesorten, Obstsorten und Getränke in Betracht zieht, dann scheint es verständlich, dass die gleichzeitige Einnahme solcher Lebensmittel mit Arzneimitteln, wie z.B. den OATP1A2-Substraten Fexofenadin (Antihistaminikum) oder Atorvastatin (HMG-CoA-Reduktaseinhibitor), zu einer verringerten Aufnahme dieser Substanzen führen könnte. Daher könnte die Hemmung intestinaler OATP-Aufnahmetransporter durch Flavonoide - zusätzlich zur Modifikation der Cytochrom P-450-Enzyme - zu einer veränderten Pharmakokinetik und Pharmakodynamik einiger Arzneistoffe führen.

Die Flavonoide Apigenin, Kaempferol und Quercetin und deren Glykoside sind auch die Hauptbestandteile pflanzlicher Arzneimittelzubereitungen von *Ginkgo biloba*. Eine Studie, die verschiedene käuflich erwerbliche *Ginkgo biloba*-Extrakte verglich, zeigte, dass ungefähr 30% der aktiven Substanzen in den analysierten Extrakten aus Flavon-Glykosiden bestanden (Kressmann et al. 2002). Die meisten dieser Glykoside werden durch eine  $\beta$ -Glykosidase, die in der apikalen Membran von Enterozyten lokalisiert ist, deglykosyliert (Nemeth et al. 2003). Dieses Enzym kann möglicherweise die Zugänglichkeit der deglykosylierten Flavonoide Apigenin, Kaempferol und Quercetin zu OATP1A2 und OATP2B1 noch erhöhen. Momentan gibt es Zubereitungen mit 500 mg Quercetin als Nahrungsergänzungsmittel auf dem Markt, das dann im Darm in Konzentrationen vorliegt, die hoch genug sind, um die Transportaktivität von OATP1A2 und OATP2B1 beeinflussen zu können.

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten zeigen, dass die Flavonoide Apigenin, Kaempferol und Quercetin den OATP1A2- und OATP2B1-vermittelten Substrat-Transport in HEK293-Zellen durch einen kompetitiven Mechanismus hemmen. Daher sind diese Flavonoide möglicherweise selbst Substrate von OATP1A2 und/oder OATP2B1. Eine Studie mit Caco-2-Zellen zeigte bereits, dass OATP2B1 möglicherweise an der Translokation von Quercetin von der apikalen zur basalen Seite der Zellen beteiligt ist (Nait Chabane et al. 2009). Quercetin scheint ein potenter Inhibitor des OATP1A2- und OATP2B1-vermittelten Transports zu sein, was man an den ermittelten  $K_i$ -Werten erkennen kann, die im mikromolaren Bereich liegen. Interessanterweise ist Quercetin auch ein potenter Inhibitor von

CYP3A4 und P-Glykoprotein (Patel et al. 2004). Da Quercetin aber auch eines der am häufigsten vorkommenden Flavonoide ist, können Lebensmittel und Nahrungsergänzungsmittel, die Quercetin enthalten, möglicherweise mit einem erhöhten Risiko für Lebensmittel- oder Arzneimittelinteraktionen assoziiert sein, indem sie die intestinale Arzneistoffaufnahme, den Arzneistoffmetabolismus und die Arzneistoffelimination beeinflussen.

Einige *in vivo*-Studien zeigten bereits, dass Interaktionen zwischen pflanzlichen Arzneistoffen und der Transporter-vermittelten Aufnahme von Arzneistoffen im Dünndarm auftreten können. So untersuchte eine Studie den Einfluss von *Ginkgo biloba*-Extrakten auf die Pharmakokinetik von Fexofenadin (Robertson et al. 2008). Nach einer zweiwöchigen Einnahme von *Ginkgo biloba*-Extrakten (120 mg bid) zeigte sich eine nicht-signifikante Reduktion der Fexofenadin-AUC (*area under the curve*) um 20%. Da Fexofenadin beim Menschen nicht metabolisiert wird, ist die Verringerung der Plasmakonzentration wahrscheinlich auf eine Hemmung der Transporter-vermittelten Fexofenadinaufnahme zurückzuführen. Wie bei Gläser und Kollegen (Glaeser et al. 2007) gezeigt wurde, ist vor allem die nahezu gleichzeitige Gabe von Grapefruitsaft und Fexofenadin für die signifikant verringerte AUC von Fexofenadin verantwortlich, da nur die zeitnahe Einnahme von Grapefruitsaft die Transportaktivität von OATP1A2 signifikant verringern kann. In der oben genannten Studie von Robertson und Kollegen wurde jedoch nicht erklärt, ob die Einnahme von Fexofenadin (120 mg) und dem *Ginkgo biloba*-Extrakt (120 mg) zeitgleich erfolgte. Aus diesem Grund lässt sich spekulieren, ob bei einer gleichzeitigen Einnahme der beiden Präparate, die AUC von Fexofenadin in einem größeren Ausmaß vermindert worden wäre.

Die vorliegenden Daten sind in Übereinstimmung mit einer Studie von Fuchikami und Kollegen, die zeigt, dass *Ginkgo-biloba*-Extrakte und die Glykoside und Rutinoside der hier untersuchten Flavonoide Quercetin und Kaempferol den OATP2B1-vermittelten Transport von Estron-3-Sulfat in HEK293-OATP2B1-Zellen hemmen können (Fuchikami et al. 2006).

In bisherigen Studien wurde die Funktion von OATP1A2 meist in *Xenopus laevis*-Oozyten oder HeLa-Zellen untersucht, die OATP1A2 transient exprimierten (Kullak-Ublick et al. 1995; Cvetkovic et al. 1999). In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals HEK293-Zellen verwendet, die OATP1A2 stabil exprimieren. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Atorvastatin ein Substrat für OATP1A2 ist,

was kürzlich von einer anderen Gruppe bestätigt wurde (Knauer et al. 2010). Da Atorvastatin ein sehr häufig eingesetztes Arzneimittel ist, stellt die Hemmung des OATP1A2-vermittelten Atorvastatintransports durch verschiedene Flavonoide möglicherweise einen weiteren Mechanismus für Lebensmittel- oder Arzneimittelinteraktionen dar. Atorvastatin ist außerdem ein Substrat sowohl für CYP3A4, P-Glykoprotein und OATP2B1. Aufgrund der möglichen Veränderungen in der Pharmakokinetik von Atorvastatin durch die Modulation von CYP3A4, P-Glykoprotein, OATP1A2 und OATP2B1, zeigt sich, dass *in vivo*-Studien notwendig sind, um die klinische Bedeutung der Flavonoid-vermittelten Arzneimittelinteraktionen mit Atorvastatin zu untersuchen. Eine *in vivo*-Studie von Lilja und Kollegen zeigte bereits, dass die zeitgleiche Einnahme von Grapefruitsaft die  $t_{max}$  (Zeit zwischen Applikation eines Arzneimittels und Erreichen der maximalen Plasmakonzentration) der HMG-CoA-Reduktaseinhibitoren Atorvastatin und Pravastatin erhöht. Möglicherweise führt die Inhibition der OATP1A2- und OATP2B1-vermittelten Aufnahme von Atorvastatin und Pravastatin durch den Grapefruitsaft zu den beobachteten Effekten (Lilja et al. 1999).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieses Teilprojekts, dass die Inhibition von OATP1A2 und OATP2B1, die im humanen Dünndarm exprimiert sind, durch die Flavonoide Apigenin, Kaempferol und Quercetin einen möglichen weiteren Mechanismus für Lebensmittel- oder Arzneimittelinteraktionen darstellt. Die klinische Relevanz der beobachteten Interaktionen sollte in weiteren klinischen Interaktionsstudien untersucht werden.

### **7.3 Untersuchung des Einflusses konservierter positiv-geladener Lysin- und Arginin-Reste in Transmembranhelices auf die Transportaktivität von OATP1B3**

Der humane Aufnahmetransporter OATP1B3 ist in der basolateralen Membran humaner Hepatozyten lokalisiert. OATP1B3 transportiert verschiedene endogene Substanzen und Arzneistoffe. Bisher war wenig über die molekularen Mechanismen und über die am Transport beteiligten Aminosäuren bekannt.

Im dritten Teilprojekt wurde daher die Rolle der in der humanen OATP-Familie konservierten, positiv-geladenen Aminosäuren Lysin 28 und 41 und Arginin 580 untersucht, deren Lokalisation in den zur Pore zugewandten Membranhelices (Meier-Abt et al. 2005) von OATP1B3 vorhergesagt wird. Es konnte gezeigt werden, dass die positiven Ladungen von Lys41 und Arg580 wichtig für die OATP1B3-Transportaktivität der Substrate BSP und Pravastatin ist.

Die Grundlage der vorliegenden Untersuchung war eine Struktur-basierte Modellierung des Transportproteins OATP1B3 durch Meier-Abt und Kollegen (Meier-Abt et al. 2005). In diesem Modell wurde postuliert, dass OATP1B3 eine zentrale, positiv-geladene Pore besitzt. Durch einen Sequenzvergleich aller humanen OATP-Familienmitglieder konnten die Lysinreste an den Positionen 28 und 41 und das Arginin an Position 580 in OATP1B3 als möglicherweise wichtige Kandidaten für die Transportaktivität identifiziert werden. Alle drei Aminosäuren sind sehr stark in der humanen OATP-Familie konserviert und der Strukturvorhersage nach in den zur Pore hin gewandten Transmembranhelices I und XI lokalisiert (Meier-Abt et al. 2005). Danach wäre es möglich, dass diese Aminosäuren wichtig für die Substratbindung und die Transportaktivität innerhalb der humanen OATP-Familie sind.

Mittels zielgerichteter Mutagenese wurden die positiv-geladenen Aminosäuren entweder durch Arginin, Lysin, Alanin, Glycin oder durch die korrespondierenden Aminosäuren anderer OATP-Familienmitglieder ersetzt. Dadurch sollte analysiert werden, inwieweit die positive Ladung und die Aminosäuren wichtig für den Transportprozess sind. Der OATP1B3-vermittelte Transport durch die generierten Lys41-Mutanten zeigte, dass die positive Ladung des Lysins an der Position 41 wichtig für die zelluläre Aufnahme von BSP und Pravastatin ist, da der Austausch des Lysins an dieser Position durch die Aminosäuren Alanin, Glutamin und Glycin

eine stark reduzierte Transportaktivität bewirkte. Der Austausch des Lysins an Position 41 durch die ebenfalls positiv-geladene Aminosäure Arginin hingegen, konnte die Aufnahme aufrechterhalten. Der leicht verringerte  $v_{\max}$ -Wert von Lys41>Arg verglichen mit dem OATP1B3-Wildtyp weist darauf hin, dass die Aminosäure Lysin an dieser Stelle besser für die Transportaktivität geeignet ist als die Aminosäure Arginin. Möglicherweise ist die längere positiv-geladene Seitenkette des Arginins für eine reduzierte Transportaktivität verantwortlich, da diese längere Seitenkette sterische Veränderungen und Interaktionen bewirken kann. Diese Vermutung konnte durch das Struktur-Modell bestätigt werden, das zeigte, dass Lysin 41 flexibler in der Pore liegt als Arginin an dieser Position. Für Arginin wird nach dem Modell eine reduzierte Flexibilität aufgrund von sterischen Veränderungen und neuen Interaktionen mit Ser37 und Tyr208 vorhergesagt, die eine alternative Seitenketten-Orientierung stabilisieren.

Die kinetischen Untersuchungen des Arg580 zeigten, dass eine Veränderung zu einer ungeladenen Aminosäure wie dem Glycin, in einer reduzierten  $v_{\max}$  resultiert. Dieses Ergebnis bestätigt die Annahme, dass die positive Ladung des Arginins an der Position 580 essentiell für die Transportaktivität ist. Der Austausch von Arginin zu Lysin hingegen führt zu einer teilweisen Aufrechterhaltung der maximalen Transportgeschwindigkeit. Das Struktur-Modell zeigt, dass lediglich das Arginin an der Position 580 ausreichend durch Interaktionen mit den benachbarten Aminosäuren Glu74 und Asn77 in der Pore fixiert ist. Im Gegensatz dazu zeigt das Modell, dass Lysin an dieser Stelle nicht mehr ausreichend fixiert ist, da es keine Interaktionen mehr mit Glu74 und Asn77 eingehen kann. Zusätzlich verursacht eine Mutation von Glu74 zu Alanin den gleichen Effekt, was ebenfalls eine Verringerung der  $v_{\max}$  bewirkt. An der Position 580 ist also die Aminosäure Arginin essentiell für die Aufrechterhaltung der OATP1B3-Transportaktivität. Die Ergebnisse der Glu74>Ala-Mutante waren vergleichbar mit den Ergebnissen der Arg580>Lys-Mutante, was darauf hinweist, dass die positive Ladung des Arginin 580 zusätzlich noch innerhalb der Pore durch Glu74 und Asn77 fixiert sein muss und dass Veränderungen an dieser Fixierung ebenfalls die OATP1B3-Transportaktivität beeinflussen.

Die Mutationen des Lys28 hatten keinen Einfluss auf die zelluläre Aufnahme von BSP und Pravastatin. Die positive Ladung des Lys28 ist daher nicht an der Substratbindung der beiden untersuchten Substrate beteiligt. Diese Daten

stimmen mit dem Struktur-Modell überein, in dem Lysin 28 am Ende der Transmembranhelix I lokalisiert ist und nicht zur Pore zeigt.

Die experimentell gewonnenen Daten und das Struktur-Modell weisen stark darauf hin, dass die positiven Ladungen von Lys41 und Arg580 zur Pore hin zeigen. Weiterhin können beide Aminosäuren aufgrund struktureller Bedingungen nicht durch andere positiv-geladene Aminosäuren ausgetauscht werden, ohne dass die OATP1B3-Transportaktivität beeinträchtigt wird. Lysin 41 ist innerhalb der OATP1-Unterfamilie stark konserviert, wohingegen Arginin 580 in allen OATPs stark konserviert ist. Diese Aminosäuren spielen daher wahrscheinlich eine essentielle Rolle in der Bildung der positiv-geladenen Pore. Zusätzlich könnte die hohe Konservierung der beiden Aminosäuren auf eine wichtige Rolle für großformatige Strukturveränderungen während des Transportprozesses hindeuten, was jedoch noch nicht aus dem aktuellen statischen Strukturmodell abgeleitet werden kann.

Für Pravastatin kann zusammengefasst werden, dass Lys41 und Arg580 ebenso relevant für die OATP1B3-vermittelte Aufnahme sind. Die Effekte der einzelnen Mutanten auf  $K_m$ - und  $v_{max}$ -Werte des OATP1B3-vermittelten Pravastatin-Transports könnten jedoch von den Effekten auf den BSP-Transport abweichen, da Pravastatin wahrscheinlich über einen anderen Mechanismus transportiert wird. Hinweise auf unterschiedliche OATP1B3-Transportmechanismen für BSP und Pravastatin ergab eine Studie, in der 10  $\mu$ M Rosiglitazon den BSP-Transport inhibierten, wohingegen die gleiche Konzentration an Rosiglitazon die Pravastatin-Aufnahme stimulierte (Bachmakov et al. 2008).

Interessanterweise zeigte eine Studie von Gui und Kollegen (Gui et al. 2008), dass ungeladene Aminosäuren wie Tyrosin, Serin und Threonin, die in der Transmembranhelix X von OATP1B3 lokalisiert sind, ebenfalls am Transport des OATP1B3-spezifischen Substrats Cholecystokinin-Oktapeptid beteiligt sind. In Kombination mit den vorliegenden Daten kann geschlossen werden, dass zusätzlich zu den geladenen Aminosäuren auch ungeladene, unpolare Aminosäuren für den Transportmechanismus von OATP1B3 wichtig sind, möglicherweise indem sie mit positiv-geladenen Seitenketten interagieren.

Zusammenfassend konnte der erste experimentelle Beweis für die Beteiligung konservierter positiv-geladener Aminosäuren am OATP1B3-Transport erbracht werden. Diese Ergebnisse werden durch das Struktur-Modell und das Konzept einer positiv-geladenen Pore unterstützt (Meier-Abt et al. 2005). Es konnte gezeigt

werden, dass die Aminosäuren Lysin 41 und Arginin 580 in OATP1B3, welche innerhalb der OATP-Familie konserviert sind, wichtig und essentiell für den OATP1B3-vermittelten Transport der Substrate BSP und Pravastatin sind.

## Literaturverzeichnis

- Abe, T., M. Unno, et al. (2001). "LST-2, a human liver-specific organic anion transporter, determines methotrexate sensitivity in gastrointestinal cancers." Gastroenterology **120**(7): 1689-1699.
- Abramson, J., I. Smirnova, et al. (2003). "Structure and mechanism of the lactose permease of Escherichia coli." Science **301**(5633): 610-615.
- Alvarez, A. I., R. Real, et al. (2010). "Modulation of the activity of ABC transporters (P-glycoprotein, MRP2, BCRP) by flavonoids and drug response." J Pharm Sci **99**(2): 598-617.
- Bachmakov, I., H. Glaeser, et al. (2008). "Interaction of oral antidiabetic drugs with hepatic uptake transporters: focus on organic anion transporting polypeptides and organic cation transporter 1." Diabetes **57**(6): 1463-1469.
- Bailey, D. G., G. K. Dresser, et al. (2007). "Naringin is a major and selective clinical inhibitor of organic anion-transporting polypeptide 1A2 (OATP1A2) in grapefruit juice." Clin Pharmacol Ther **81**(4): 495-502.
- Bao, Y., M. L. Pucci, et al. (2002). "Prostaglandin transporter PGT is expressed in cell types that synthesize and release prostanoids." Am J Physiol Renal Physiol **282**(6): F1103-1110.
- Bertani, G. (1951). "Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic Escherichia coli." J Bacteriol **62**(3): 293-300.
- Bhandari, P., A. C. Bateman, et al. (2005). "Mucosal expression of cyclooxygenase isoforms 1 and 2 is increased with worsening damage to the gastric mucosa." Histopathology **46**(3): 280-286.
- Boffa, L. C., G. Vidali, et al. (1978). "Suppression of histone deacetylation in vivo and in vitro by sodium butyrate." J Biol Chem **253**(10): 3364-3366.
- Boots, A. W., G. R. Haenen, et al. (2008). "Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical." Eur J Pharmacol **585**(2-3): 325-337.
- Bossuyt, X., M. Muller, et al. (1996). "Multispecific amphipathic substrate transport by an organic anion transporter of human liver." J Hepatol **25**(5): 733-738.
- Brauer, R. W., R. L. Pessotti, et al. (1955). "The distribution and excretion of S35-labeled sulfobromophthalein-sodium administered to dogs by continuous infusion." J Clin Invest **34**(1): 35-43.
- Briz, O., M. R. Romero, et al. (2006). "OATP8/1B3-mediated cotransport of bile acids and glutathione: an export pathway for organic anions from hepatocytes?" J Biol Chem **281**(41): 30326-30335.
- Brune, K. (2007). "Persistence of NSAIDs at effect sites and rapid disappearance from side-effect compartments contributes to tolerability." Curr Med Res Opin **23**(12): 2985-2995.

- Brune, K., A. Schweitzer, et al. (1977). "Parietal cells of the stomach trap salicylates during absorption." Biochem Pharmacol **26**(18): 1735-1740.
- Cui, Y., J. König, et al. (1999). "Drug resistance and ATP-dependent conjugate transport mediated by the apical multidrug resistance protein, MRP2, permanently expressed in human and canine cells." Mol Pharmacol **55**(5): 929-937.
- Cui, Y., J. König, et al. (2001). "Vectorial transport by double-transfected cells expressing the human uptake transporter SLC21A8 and the apical export pump ABCC2." Mol Pharmacol **60**(5): 934-943.
- Cvetkovic, M., B. Leake, et al. (1999). "OATP and P-glycoprotein transporters mediate the cellular uptake and excretion of fexofenadine." Drug Metab Dispos **27**(8): 866-871.
- Devereux, J., P. Haeberli, et al. (1984). "A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX." Nucleic Acids Res **12**(1 Pt 1): 387-395.
- Dixon, M. (1972). "The graphical determination of  $K_m$  and  $K_i$ ." Biochem J **129**(1): 197-202.
- Dresser, G. K., D. G. Bailey, et al. (2002). "Fruit juices inhibit organic anion transporting polypeptide-mediated drug uptake to decrease the oral availability of fexofenadine." Clin Pharmacol Ther **71**(1): 11-20.
- Dresser, G. K., U. I. Schwarz, et al. (2003). "Coordinate induction of both cytochrome P4503A and MDR1 by St John's wort in healthy subjects." Clin Pharmacol Ther **73**(1): 41-50.
- Friesema, E. C., R. Docter, et al. (1999). "Identification of thyroid hormone transporters." Biochem Biophys Res Commun **254**(2): 497-501.
- Fromm, M. F., R. B. Kim, et al. (1999). "Inhibition of P-glycoprotein-mediated drug transport: A unifying mechanism to explain the interaction between digoxin and quinidine." Circulation **99**(4): 552-557.
- Fuchikami, H., H. Satoh, et al. (2006). "Effects of herbal extracts on the function of human organic anion-transporting polypeptide OATP-B." Drug Metab Dispos **34**(4): 577-582.
- Gao, B., B. Hagenbuch, et al. (2000). "Organic anion-transporting polypeptides mediate transport of opioid peptides across blood-brain barrier." J Pharmacol Exp Ther **294**(1): 73-79.
- Giacomini, K. M., S. M. Huang, et al. (2010). "Membrane transporters in drug development." Nat Rev Drug Discov **9**(3): 215-236.
- Ginalski, K., A. Elofsson, et al. (2003). "3D-Jury: a simple approach to improve protein structure predictions." Bioinformatics **19**(8): 1015-1018.
- Glaeser, H., D. G. Bailey, et al. (2007). "Intestinal drug transporter expression and the impact of grapefruit juice in humans." Clin Pharmacol Ther **81**(3): 362-370.
- Glaeser, H. and M. F. Fromm (2008). "Animal models and intestinal drug transport." Expert Opin Drug Metab Toxicol **4**(4): 347-361.

- Glaeser, H., K. Mandery, et al. (2010). "Relevance of conserved lysine and arginine residues in transmembrane helices for the transport activity of organic anion transporting polypeptide 1B3." Br J Pharmacol **159**(3): 698-708.
- Gradhand, U., H. Tegude, et al. (2007). "Functional analysis of the polymorphism -211C>T in the regulatory region of the human ABCC3 gene." Life Sci **80**(16): 1490-1494.
- Grube, M., K. Kock, et al. (2006). "Modification of OATP2B1-mediated transport by steroid hormones." Mol Pharmacol **70**(5): 1735-1741.
- Grube, M., K. Kock, et al. (2006). "Organic anion transporting polypeptide 2B1 is a high-affinity transporter for atorvastatin and is expressed in the human heart." Clin Pharmacol Ther **80**(6): 607-620.
- Gudis, K. and C. Sakamoto (2005). "The role of cyclooxygenase in gastric mucosal protection." Dig Dis Sci **50 Suppl 1**: S16-23.
- Guex, N. and M. C. Peitsch (1997). "SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling." Electrophoresis **18**(15): 2714-2723.
- Gui, C. and B. Hagenbuch (2008). "Amino acid residues in transmembrane domain 10 of organic anion transporting polypeptide 1B3 are critical for cholecystokinin octapeptide transport." Biochemistry **47**(35): 9090-9097.
- Hagenbuch, B. and P. J. Meier (2003). "The superfamily of organic anion transporting polypeptides." Biochim Biophys Acta **1609**(1): 1-18.
- Hagenbuch, B. and P. J. Meier (2004). "Organic anion transporting polypeptides of the OATP/ SLC21 family: phylogenetic classification as OATP/ SLCO superfamily, new nomenclature and molecular/functional properties." Pflugers Arch **447**(5): 653-665.
- Hänggi, E., A. F. Grundschober, et al. (2006). "Functional analysis of the extracellular cysteine residues in the human organic anion transporting polypeptide, OATP2B1." Mol Pharmacol **70**(3): 806-817.
- Hasler, J. A. (1999). "Pharmacogenetics of cytochromes P450." Mol Aspects Med **20**(1-2): 12-24, 25-137.
- Hediger, M. A., M. F. Romero, et al. (2004). "The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteinsIntroduction." Pflugers Arch **447**(5): 465-468.
- Henry, D., L. L. Lim, et al. (1996). "Variability in risk of gastrointestinal complications with individual non-steroidal anti-inflammatory drugs: results of a collaborative meta-analysis." BMJ **312**(7046): 1563-1566.
- Hertog, M. G., E. J. Feskens, et al. (1993). "Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study." Lancet **342**(8878): 1007-1011.
- Hertog, M. G. L., P. C. Hollman, et al. (1992). "Content of Potentially Anticarcinogenic Flavonoids of 28 Vegetables and 9 Fruits Commonly Consumed in The Netherlands." J Agric Food Chem **40**: 2379-2383.

- Hertog, M. G. L., P. C. Hollman, et al. (1993). "Content of Potentially Anticarcinogenic Flavonoids of Tea Infusions, Wines, and Fruit Juices." J Agric Food Chem **41**(8): 1242-1246.
- Ho, R. H. and R. B. Kim (2005). "Transporters and drug therapy: implications for drug disposition and disease." Clin Pharmacol Ther **78**(3): 260-277.
- Ho, R. H., R. G. Tirona, et al. (2006). "Drug and bile acid transporters in rosuvastatin hepatic uptake: function, expression, and pharmacogenetics." Gastroenterology **130**(6): 1793-1806.
- Hofmann, U., M. Seiler, et al. (2002). "Determination of fexofenadine in human plasma and urine by liquid chromatography-mass spectrometry." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci **766**(2): 227-233.
- Hooft, R. W., G. Vriend, et al. (1996). "Errors in protein structures." Nature **381**(6580): 272.
- Huang, Y., M. J. Lemieux, et al. (2003). "Structure and mechanism of the glycerol-3-phosphate transporter from Escherichia coli." Science **301**(5633): 616-620.
- Jackson, L. M., K. C. Wu, et al. (2000). "Cyclooxygenase (COX) 1 and 2 in normal, inflamed, and ulcerated human gastric mucosa." Gut **47**(6): 762-770.
- Jacquemin, E., B. Hagenbuch, et al. (1994). "Expression cloning of a rat liver Na(+)-independent organic anion transporter." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(1): 133-137.
- Jagtap, S., K. Meganathan, et al. (2009). "Chemoprotective mechanism of the natural compounds, epigallocatechin-3-O-gallate, quercetin and curcumin against cancer and cardiovascular diseases." Curr Med Chem **16**(12): 1451-1462.
- Jain, V. K. and I. T. Magrath (1991). "A chemiluminescent assay for quantitation of beta-galactosidase in the femtogram range: application to quantitation of beta-galactosidase in lacZ-transfected cells." Anal Biochem **199**(1): 119-124.
- Kamada, T., J. Hata, et al. (2006). "Endoscopic characteristics and Helicobacter pylori infection in NSAID-associated gastric ulcer." J Gastroenterol Hepatol **21**(1 Pt 1): 98-102.
- Kanai, N., R. Lu, et al. (1995). "Identification and characterization of a prostaglandin transporter." Science **268**(5212): 866-869.
- Kartenbeck, J., U. Leuschner, et al. (1996). "Absence of the canalicular isoform of the MRP gene-encoded conjugate export pump from the hepatocytes in Dubin-Johnson syndrome." Hepatology **23**(5): 1061-1066.
- Knauer, M. J., B. L. Urquhart, et al. (2010). "Human skeletal muscle drug transporters determine local exposure and toxicity of statins." Circ Res **106**(2): 297-306.
- Kobayashi, D., T. Nozawa, et al. (2003). "Involvement of human organic anion transporting polypeptide OATP-B (SLC21A9) in pH-dependent transport across intestinal apical membrane." J Pharmacol Exp Ther **306**(2): 703-708.
- König, J., Y. Cui, et al. (2000). "Localization and genomic organization of a new hepatocellular organic anion transporting polypeptide." J Biol Chem **275**(30): 23161-23168.

- König, J., A. Seithel, et al. (2006). "Pharmacogenomics of human OATP transporters." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **372**(6): 432-443.
- Kopplow, K., K. Letschert, et al. (2005). "Human hepatobiliary transport of organic anions analyzed by quadruple-transfected cells." Mol Pharmacol **68**(4): 1031-1038.
- Kressmann, S., W. E. Muller, et al. (2002). "Pharmaceutical quality of different Ginkgo biloba brands." J Pharm Pharmacol **54**(5): 661-669.
- Kullak-Ublick, G. A., J. Glasa, et al. (1997). "Chlorambucil-taurocholate is transported by bile acid carriers expressed in human hepatocellular carcinomas." Gastroenterology **113**(4): 1295-1305.
- Kullak-Ublick, G. A., B. Hagenbuch, et al. (1995). "Molecular and functional characterization of an organic anion transporting polypeptide cloned from human liver." Gastroenterology **109**(4): 1274-1282.
- Kullak-Ublick, G. A., M. G. Ismail, et al. (2001). "Organic anion-transporting polypeptide B (OATP-B) and its functional comparison with three other OATPs of human liver." Gastroenterology **120**(2): 525-533.
- Laskowski, R. A., D. S. Moss, et al. (1993). "Main-chain bond lengths and bond angles in protein structures." J Mol Biol **231**(4): 1049-1067.
- Lee, T. K., C. L. Hammond, et al. (2001). "Intracellular glutathione regulates taurocholate transport in HepG2 cells." Toxicol Appl Pharmacol **174**(3): 207-215.
- Lee, W., H. Glaeser, et al. (2005). "Polymorphisms in human organic anion-transporting polypeptide 1A2 (OATP1A2): implications for altered drug disposition and central nervous system drug entry." J Biol Chem **280**(10): 9610-9617.
- Letschert, K., D. Keppler, et al. (2004). "Mutations in the SLCO1B3 gene affecting the substrate specificity of the hepatocellular uptake transporter OATP1B3 (OATP8)." Pharmacogenetics **14**(7): 441-452.
- Leuthold, S., B. Hagenbuch, et al. (2009). "Mechanisms of pH-gradient driven transport mediated by organic anion polypeptide transporters." Am J Physiol Cell Physiol **296**(3): C570-582.
- Lilja, J. J., K. T. Kivisto, et al. (1999). "Grapefruit juice increases serum concentrations of atorvastatin and has no effect on pravastatin." Clin Pharmacol Ther **66**(2): 118-127.
- Link, E., S. Parish, et al. (2008). "SLCO1B1 variants and statin-induced myopathy--a genomewide study." N Engl J Med **359**(8): 789-799.
- Lipinski, C. A., F. Lombardo, et al. (2001). "Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings." Adv Drug Deliv Rev **46**(1-3): 3-26.
- Lu, R., N. Kanai, et al. (1996). "Cloning, in vitro expression, and tissue distribution of a human prostaglandin transporter cDNA(hPGT)." J Clin Invest **98**(5): 1142-1149.

- Mandery, K., K. Bujok, et al. (2010). "Influence of cyclooxygenase inhibitors on the function of the prostaglandin transporter organic anion-transporting polypeptide 2A1 expressed in human gastroduodenal mucosa." J Pharmacol Exp Ther **332**(2): 345-351.
- Meier-Abt, F., Y. Mokrab, et al. (2005). "Organic anion transporting polypeptides of the OATP/SLCO superfamily: identification of new members in nonmammalian species, comparative modeling and a potential transport mode." J Membr Biol **208**(3): 213-227.
- Meier, P. J., U. Eckhardt, et al. (1997). "Substrate specificity of sinusoidal bile acid and organic anion uptake systems in rat and human liver." Hepatology **26**(6): 1667-1677.
- Nagase, T., K. Ishikawa, et al. (1998). "Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XII. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro." DNA Res **5**(6): 355-364.
- Nait Chabane, M., A. Al Ahmad, et al. (2009). "Quercetin and naringenin transport across human intestinal Caco-2 cells." J Pharm Pharmacol **61**(11): 1473-1483.
- Nemeth, K., G. W. Plumb, et al. (2003). "Deglycosylation by small intestinal epithelial cell beta-glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans." Eur J Nutr **42**(1): 29-42.
- Noe, B., B. Hagenbuch, et al. (1997). "Isolation of a multispecific organic anion and cardiac glycoside transporter from rat brain." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(19): 10346-10350.
- Nomura, T., H. Y. Chang, et al. (2005). "Prostaglandin signaling in the renal collecting duct: release, reuptake, and oxidation in the same cell." J Biol Chem **280**(31): 28424-28429.
- Nomura, T., R. Lu, et al. (2004). "The two-step model of prostaglandin signal termination: in vitro reconstitution with the prostaglandin transporter and prostaglandin 15 dehydrogenase." Mol Pharmacol **65**(4): 973-978.
- Nozawa, T., I. Tamai, et al. (2003). "Contribution of organic anion transporting polypeptide OATP-C to hepatic elimination of the opioid pentapeptide analogue [D-Ala<sup>2</sup>, D-Leu<sup>5</sup>]-enkephalin." J Pharm Pharmacol **55**(7): 1013-1020.
- Pal, D. and A. K. Mitra (2006). "MDR- and CYP3A4-mediated drug-herbal interactions." Life Sci **78**(18): 2131-2145.
- Patel, J., B. Buddha, et al. (2004). "In vitro interaction of the HIV protease inhibitor ritonavir with herbal constituents: changes in P-gp and CYP3A4 activity." Am J Ther **11**(4): 262-277.
- Pitt, B. R., J. R. Forder, et al. (1983). "Drug-induced impairment of pulmonary [3H]prostaglandin E1 removal in vivo." J Pharmacol Exp Ther **227**(2): 531-537.
- Remmele, W. and H. E. Stegner (1987). "[Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]." Pathologe **8**(3): 138-140.

- Robertson, S. M., R. T. Davey, et al. (2008). "Effect of Ginkgo biloba extract on lopinavir, midazolam and fexofenadine pharmacokinetics in healthy subjects." Curr Med Res Opin **24**(2): 591-599.
- Sanchez, R. and A. Sali (2000). "Comparative protein structure modeling. Introduction and practical examples with modeller." Methods Mol Biol **143**: 97-129.
- Satlin, L. M., V. Amin, et al. (1997). "Organic anion transporting polypeptide mediates organic anion/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchange." J Biol Chem **272**(42): 26340-26345.
- Satoh, H., F. Yamashita, et al. (2005). "Citrus juices inhibit the function of human organic anion-transporting polypeptide OATP-B." Drug Metab Dispos **33**(4): 518-523.
- Schinkel, A. H. and J. W. Jonker (2003). "Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview." Adv Drug Deliv Rev **55**(1): 3-29.
- Schuster, V. L. (1998). "Molecular mechanisms of prostaglandin transport." Annu Rev Physiol **60**: 221-242.
- Schuster, V. L. (2002). "Prostaglandin transport." Prostaglandins Other Lipid Mediat **68-69**: 633-647.
- Seithel, A., S. Eberl, et al. (2007). "The influence of macrolide antibiotics on the uptake of organic anions and drugs mediated by OATP1B1 and OATP1B3." Drug Metab Dispos **35**(5): 779-786.
- Senger, M., K. H. Glatting, et al. (1995). "X-HUSAR, an X-based graphical interface for the analysis of genomic sequences." Comput Methods Programs Biomed **46**(2): 131-141.
- Shimizu, M., K. Fuse, et al. (2005). "Contribution of OATP (organic anion-transporting polypeptide) family transporters to the hepatic uptake of fexofenadine in humans." Drug Metab Dispos **33**(10): 1477-1481.
- Simons, F. E. and K. J. Simons (1997). "Peripheral H1-blockade effect of fexofenadine." Ann Allergy Asthma Immunol **79**(6): 530-532.
- St-Pierre, M. V., B. Hagenbuch, et al. (2002). "Characterization of an organic anion-transporting polypeptide (OATP-B) in human placenta." J Clin Endocrinol Metab **87**(4): 1856-1863.
- Tamai, I., J. Nezu, et al. (2000). "Molecular identification and characterization of novel members of the human organic anion transporter (OATP) family." Biochem Biophys Res Commun **273**(1): 251-260.
- Tamai, I. and A. Tsuji (2000). "Transporter-mediated permeation of drugs across the blood-brain barrier." J Pharm Sci **89**(11): 1371-1388.
- Tegeder, I., J. Lotsch, et al. (1999). "Comparison of inhibitory effects of meloxicam and diclofenac on human thromboxane biosynthesis after single doses and at steady state." Clin Pharmacol Ther **65**(5): 533-544.
- Topper, J. N., J. Cai, et al. (1998). "Human prostaglandin transporter gene (hPGT) is regulated by fluid mechanical stimuli in cultured endothelial cells and expressed in vascular endothelium in vivo." Circulation **98**(22): 2396-2403.

- Towbin, H., T. Staehelin, et al. (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(9): 4350-4354.
- van Montfoort, J. E., B. Hagenbuch, et al. (1999). "Polyspecific organic anion transporting polypeptides mediate hepatic uptake of amphipathic type II organic cations." J Pharmacol Exp Ther **291**(1): 147-152.
- Venerito, M., G. Treiber, et al. (2006). "Effects of low-dose aspirin on gastric erosions, cyclooxygenase expression and mucosal prostaglandin-E2 do not depend on Helicobacter pylori infection." Aliment Pharmacol Ther **23**(8): 1225-1233.
- Walters, H. C., A. L. Craddock, et al. (2000). "Expression, transport properties, and chromosomal location of organic anion transporter subtype 3." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **279**(6): G1188-1200.
- Watkins, P. B., S. A. Wrighton, et al. (1987). "Identification of glucocorticoid-inducible cytochromes P-450 in the intestinal mucosa of rats and man." J Clin Invest **80**(4): 1029-1036.
- Wex, T., G. Treiber, et al. (2006). "Helicobacter pylori-induced downregulation of the secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) in gastric epithelial cell lines and its functional relevance for H. pylori-mediated diseases." Biol Chem **387**(7): 893-901.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name Kathrin Veronika Mandery

Geburtsdatum 26. August 1980

Geburtsort Schweinfurt

## Beruflicher Werdegang

07/2000 Abitur am Friedrich-Rückert-Gymnasium Ebern

10/2000 – 09/2002 Studium der Biologie an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg (Vordiplom)

10/2002 – 09/2004 Studium der Biomedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg (Bachelor of Science)

10/2004 – 09/2006 Studium der Biomedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg (Master of Science)

seit 02/2007 Promotionsstudium zur Erlangung des akademischen Grades: „Dr. rer. nat.“ am Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg gefördert durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft [DFG GL 588/2-1]

## Veröffentlichungen

### Originalarbeiten

**Mandery K**, Bujok K, Schmidt I, Wex T, Treiber G, Malfertheiner P, Rau TT, Amann KU, Brune K, Fromm MF, Glaeser H.

Influence of cyclooxygenase inhibitors on the function of the prostaglandin transporter organic anion-transporting polypeptide 2A1 expressed in human gastroduodenal mucosa.

J Pharmacol Exp Ther. 2010; 332(2): 345-351.

Impactfaktor 2008: 4,3

Glaeser H\*, **Mandery K\***, Sticht H, Fromm MF, König J.

Relevance of conserved lysine and arginine residues in transmembrane helices for the transport activity of organic anion transporting polypeptide 1B3.

Br J Pharmacol. 2010; 159(3): 698-708.

Impactfaktor 2008: 4,9

\* geteilte Erstautorenschaft

Kraft M, Glaeser H, **Mandery K**, König J, Auge D, Fromm MF, Schlötzer-Schrehardt UM, Welge-Lüssen U, Kruse FE, Zolk O.

The prostaglandin transporter OATP2A1 is expressed in human ocular tissues and transports the antiglaucoma prostanoid latanoprost.

Invest Ophthalmol Vis Sci. 2010; 51(5): 2504-2511.

Impactfaktor 2008: 3,6

### Abstracts

**Mandery K**, König J, Fromm MF, Glaeser H.

Characterization of the intestinal organic anion transporting polypeptides (OATPs). Jahrestagung 2007 der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft e.V.; Erlangen

**Mandery K**, König J, Fromm MF, Glaeser H.

Functional characterization of cells lines stably expressing the organic anion transporting polypeptide 4A1 (OATP4A1).

Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2007; 101: 377.

9. Jahreskongress für Klinische Pharmakologie 2007; Kiel

**Mandery K**, Wex T, Treiber G, Malfertheiner P, Fromm MF, Glaeser H.

Effects of low-dose aspirin and Helicobacter pylori on the expression of the prostaglandin transporter (OATP2A1) in human stomach and duodenum.

Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2008; 377 (Suppl. 1): 94.

49. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie 2008; Mainz

Glaeser H, **Mandery K**, Fromm MF, König J.  
Functional characterization of the importance of lysine- and arginin-residues in the uptake transporter OATP1B3.  
Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2008; 377 (Suppl. 1): 97.  
49. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie 2008; Mainz

Glaeser H, **Mandery K**, Fromm MF, König J.  
Role of Lysine- and Arginine-Residues for the Transport Activity of OATP1B3  
Drug Metab Rev. 2008; 40 (S1): 36.  
10th European Regional ISSX Meeting 2008, Wien (Österreich)

**Mandery K**, Fromm MF, Glaeser H.  
Influence of the nonsynonymous 1186G>A (Ala396Thr) single nucleotide polymorphism in SLCO2A1 on the transport activity.  
Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2008; 104: 522.  
10. Jahreskongress für Klinische Pharmakologie 2008; Berlin

Kraft ME, Welge-Lüssen U, Schlötzer-Schrehardt U, Kruse FE, Zolk O, Auge D, Glaeser H, **Mandery K**, König J, Fromm MF.  
The prostaglandin transporter OATP2A1 is expressed in human ocular tissues and transports the antiglaucoma prostanoid latanoprost.  
Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2009; 379 (Suppl. 1): 99.  
50. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie 2009; Mainz

**Mandery K**, Fromm MF, Glaeser H.  
Characterization of a HEK293 cell line stably expressing OATP2A1 and influence of acetylsalicylic acid on the transport activity of OATP2A1.  
Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2009; 379 (Suppl. 1): 96.  
50. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie 2009; Mainz

**Mandery K**, Sticht H, König J, Fromm MF, Glaeser H.  
Influence of lysine 41 on the transport activity of OATP1B3.  
Abstract 28.  
BioMedical Transporter 2009, 6th International Research Conference; Thun (Schweiz)

Kraft ME, Zolk O, Welge-Lüssen U, Schlötzer-Schrehardt U, Kruse FE, Glaeser H, **Mandery K**, König J, Fromm MF.  
Interaction of the antiglaucoma prostanoid latanoprost with the prostaglandin transporter OATP2A1.  
Br J Clin Pharmacol. 2009; 68 (Suppl. 1): 3.  
11. Jahreskongress für Klinische Pharmakologie 2009; Heidelberg

**Mandery K**, Bujok K, Schmidt I, Rau TT, Fromm MF, Glaeser H.  
Influence of cyclooxygenase inhibitors on the function of the prostaglandin transporter OATP2A1 expressed in human gastric mucosa.  
Br J Clin Pharmacol. 2009; 68 (Suppl. 1): 30.  
11. Jahreskongress für Klinische Pharmakologie 2009; Heidelberg

## Vorträge

Characterization of a HEK293 cell line stably expressing OATP2A1 and influence of acetylsalicylic acid on the transport activity of OATP2A1.

50. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie 2008; Mainz

## Danksagung

Vorab möchte ich allen danken, die mich während meiner Promotion unterstützt haben!

Namentlich möchte ich an erster Stelle Herrn Prof. Dr. med. Martin F. Fromm danken, dass ich diese Arbeit am Lehrstuhl für Klinische Pharmakologie und Klinische Toxikologie der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg durch die Bereitstellung ausgezeichneter Arbeitsmöglichkeiten durchführen konnte und ich die Möglichkeit hatte, an zahlreichen interessanten und informativen Tagungen und Fortbildungen teilnehmen zu können.

Ebenso möchte ich Herrn Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang Kreis vom Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg danken, dass er die Erstbetreuung dieser Arbeit seitens der Naturwissenschaftlichen Fakultät mit großem Interesse übernommen hat.

Meinen besonderen Dank möchte ich Herrn Dr. rer. nat. Hartmut Gläser für die Übertragung des interessanten Promotionsthemas, die hervorragende Betreuung und sein Vertrauen in meine Arbeit aussprechen. Seine wertvollen Ratschläge und die allzeitige Diskussionsbereitschaft zu wissenschaftlichen und methodischen Fragestellungen trugen wesentlich zum Gelingen meines Promotionsvorhabens bei.

Weiter möchte ich Frau Prof. Dr. med. Kerstin U. Amann und Herrn Dr. med. Tilman R. Rau aus dem Institut für Pathologie der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg danken, die maßgeblich durch ihre Unterstützung bei immunhistochemischen Fragestellungen und Bereitstellung von Paraffinschnitten zur OATP2A1-Untersuchung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. rer. nat. Heinrich Sticht aus der Abteilung für Bioinformatik des Instituts für Biochemie der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg für die strukturelle Modellierung von OATP1B3 und die freundliche Unterstützung bei allen bioinformatischen Fragestellungen.

Weiterhin geht mein Dank an Herrn Prof. Dr. med. h. c. Kay Brune vom Institut für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg für die wissenschaftliche Expertise auf dem Gebiet der Cyclooxygenaseinhibitoren und die Unterstützung bei der Erstellung des Manuskripts zur Expression und Funktion von OATP2A1.

Herrn Prof. Dr. med. Werner Siegmund und Herrn Dr. med. vet. Markus Keiser vom Institut für Pharmakologie der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald danke ich für die hervorragende Kooperation und für die Herstellung und Bereitstellung der stabil OATP1A2-exprimierenden HEK293-Zelllinie.

Gleichermaßen gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. med. Peter Malfertheiner, Herrn PD Dr. rer. nat. Thomas Wex und Herrn PD Dr. med. Gerhard Treiber (Klinik für Innere Medizin, Zollernalb-Klinikum gGmbH, Balingen) aus der Klinik für Gastroenterologie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg für die Bereitstellung der humanen gastoduodenalen Gewebeproben.

Auch möchte ich Herrn Prof. Richard B. Kim von der University of London Ontario in Kanada für die Bereitstellung des OATP1A2-Antiserums danken.

Abschließend danke ich allen derzeitigen und ehemaligen Kollegen des Instituts für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie für die gute Zusammenarbeit und das überaus herzliche Arbeitsklima, besonders aber Krystyna Bujok, Marion Rittmaier und Ingrid Schmidt für die stets freundliche und immer zuverlässige Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei meiner Laborarbeit.

Zu guter Letzt danke ich meinen ehemaligen und derzeitigen Mitdoktoranden für die schöne gemeinsame Zeit und wünsche ihnen alles Gute und viel Erfolg für ihre weitere Arbeit!

Die Experimente wurden mit finanzieller Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG GL 588/2-1) durchgeführt.