

# Der Einfluss von Arzneistofftransportern auf die pulmonale Absorption inhalierter Arzneistoffe



DISSERTATION

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

**Lisa Schaaf**

aus Gunzenhausen

Würzburg 2017



Eingereicht bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie am:

.....

Gutachter der schriftlichen Arbeit

1. Gutachter: .....

2. Gutachter: .....

Prüfer des öffentlichen Promotionskolloquiums:

1. Prüfer: .....

2. Prüfer: .....

3. Prüfer: .....

Datum des öffentlichen Promotionskolloquiums: .....

Doktorurkunde ausgehändigt am: .....

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Anleitung von

**Frau Prof. Dr. Petra Högger**

am Lehrstuhl für Pharmazeutische Chemie  
des Instituts für Pharmazie und Lebensmittelchemie  
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg angefertigt.

Meiner Familie





Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits an folgenden Stellen veröffentlicht:

Posterbeiträge:

Schaaf L, Chien HC, Yee SW, Giacomini KM, Högger P.

*Role of drug transporters in the pulmonary absorption of inhaled drugs: Influence of organic cation transporters OCT1 and OCT3 on the pharmacokinetics of ipratropium bromide, an anticholinergic drug.*

Chem-SyStM 2014, Würzburg

Posterpreis in der Kategorie Pharmazie und Lebensmittelchemie

Schaaf L, Vollmers F, Högger P.

*The ex-vivo human isolated perfused lung (IPL) model: Potentials for investigation of pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of pulmonary administered drugs.*

CRS German Chapter Annual Meeting 2012, Würzburg



# Danksagung

Vielen Dank an alle, die mich auf dem Weg zur Fertigstellung dieser Arbeit mit ihrer Expertise, ihrer Zeit und ihrer Moral unterstützt haben!

Herzlichen Dank, Frau Prof. Dr. Petra Högger, für die Aufnahme in Ihren Arbeitskreis, für die Möglichkeit, dieses einmalig facettenreiche und praxisrelevante Thema zu erforschen, für den Freiraum zum selbstständigen Arbeiten und für Ihr verständnisvolles und geduldiges Entgegenreten. Besonders möchte ich Ihnen dafür danken, dass Sie mir die beiden Forschungsaufenthalte in San Francisco ermöglicht haben, die für mich wundervolle professionelle und persönliche Lebenserfahrungen mit sich brachten.

Mein Dank gilt auch Prof. Kathleen M. Giacomini (Ph.D.), die mir die Forschung in ihrem Labor an der University of California San Francisco (UCSF), Schools of Pharmacy and Medicine, Department of Bioengineering and Therapeutic Sciences, gestattete. Dabei sei insbesondere auch James Huan-Chieh Chien (Ph.D.), Sook Wah Yee (Ph.D.) und Xiaomin Liang gedankt, die mich freundschaftlich empfangen haben und mit konstruktiven Vorschlägen, Diskussionen und Erläuterungen von Versuchsdurchführungen maßgeblich zu einem produktiven und erfolgreichen Forschungsaufenthalt mit unvergesslichen Momenten beigetragen haben. Für die finanzielle Förderung durch ein Reisestipendium danke ich dem Bayerisch-Kalifornischen Hochschulzentrum (BaCaTeC) an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg.

Dr. med. Boris Kardziev sowie dem gesamten OP-Team des Thoraxzentrums Münnerstadt gilt mein Dank für die engagierte und angenehme Zusammenarbeit im Rahmen des Lungen-Perfusions-Modells, für die Patientenrekrutierung sowie das Zurverfügungstellen von Lungenlappen, welches oftmals ein Höchstmaß an organisatorischer Koordination erforderte. An dieser Stelle sei auch allen Kollegen nochmals „Danke“ gesagt, die ihre wertvolle Zeit bereitgestellt haben, um mich an der experimentellen Durchführung von Versuchen am Lungen-Perfusions-Modell zu unterstützen. Insbesondere Dr. Frederic Vollmers bin ich zu großem Dank für die gemeinschaftliche Arbeit verpflichtet.

Prof. Dr. med. Thorsten Walles, Melanie Eigerdt und Stefanie Meyer aus der Thoraxchirurgie des Universitätsklinikums Würzburg danke ich für die Rekrutierung von Patienten, für das Überlassen von Lungengewebsproben und die immer freundliche Zusammenarbeit.

Vielen Dank an die Sekretärinnen Frau Ebner, Frau Möhler und Frau Schneider für die große Hilfsbereitschaft hinsichtlich organisatorischer Angelegenheiten und für ein stets freundliches Gespräch. Den Mitarbeitern der Institutswerkstatt danke ich für die Unterstützung in technischen Fragen und Dr. Bernd Reyer für die bereitwillige Hilfestellung bei jedem noch so komplizierten IT-Problem.

Allen ehemaligen und aktuellen Mitgliedern des Arbeitskreises Högger gilt mein Dank für eine unvergessliche Promotionszeit und die immer noch freudige Begrüßung bei jedem Besuch am Institut: Roswitha Scheblein, Dr. Klaus Uhlenhut, Dr. Frederic Vollmers, Dr. Martin Haas, Dr. Melanie Mülle, Dr. Steffen Jeßberger, Dr. Maïke Scherf-Clavel, Dr. Jianbo Xiao, Hui Cao, Stoyan Dirimanov, Andreas Pospiech, Linda Volpp, Florian Lang und Charlotte Beier.

Den Assistenten der Klinischen Pharmazie Dr. Armin Welker, Dr. Martin Haas, Dr. Steffen Jeßberger und Linda Volpp möchte ich für die intensive und effektive Zusammenarbeit innerhalb des KlinPharm-Teams während der Studentenbetreuung danken, die trotz allem zeitlichen Aufwand auch den Spaß nicht zu kurz kommen ließ.

Von Herzen möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, insbesondere bei meinen Eltern und Großeltern, die mich durch ihre tolerante und liebevolle Erziehung zu dem gemacht haben, was ich heute bin. Vielen Dank an meine Mama und meinen Bruder für die Babysitter-Dienste, die mir Freiräume zum konzentrierten Arbeiten geschaffen haben und für das Korrekturlesen der Arbeit. Danke auch an meine Freunde für ihre Herzlichkeit, Verbundenheit und so manches motivierende Gespräch.

Worte können nicht ausdrücken, was ich dir zu verdanken habe, lieber Mani. Du hast mir immer mit Ratschlägen zur Seite gestanden, fachliche Diskussionen mit mir geführt, in den richtigen Momenten einfach nur zugehört, Trost gespendet und es geschafft, mich immer zu motivieren. Deine Liebe gibt mir immer Halt und Sicherheit.

Danke, Samuel, dass du mir jeden Tag aufs Neue zeigst, was im Leben wirklich wichtig ist.

*Geh nicht immer auf dem vorgezeichneten Weg,  
der nur dahin führt, wo andere bereits  
gegangen sind.*

(Alexander Graham Bell, 1847 – 1922)



# Inhaltsverzeichnis

<b>A</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>23</b>
<b>1</b>	<b>Arzneistofftransporter in der humanen Lunge</b> .....	<b>24</b>
1.1	Transportvorgänge an Biomembranen .....	24
1.2	Transporterproteine in der Entwicklung von Arzneistoffen .....	27
1.3	ABC-Transporter .....	29
1.3.1	MDR1 .....	30
1.3.2	MRP1 .....	30
1.3.3	MRP5.....	31
1.4	SLC-Transporter .....	32
1.4.1	PEPT2.....	32
1.4.2	OCT1 .....	33
1.4.3	OCT2.....	35
1.4.4	OCT3.....	35
1.4.5	OCTN1 .....	36
1.4.6	OCTN2.....	37
1.4.7	MATE1 .....	38
1.5	Lokalisation von Arzneistofftransportern im Lungenepithel.....	39
1.6	Mit Arzneistofftransportern interagierende, pulmonal applizierte Pharmaka .....	42
<b>2</b>	<b>Analytischer Hintergrund: Prinzip der Genexpressions-Analyse mittels RT-qPCR-Technik</b> .....	<b>45</b>
2.1	Grundlagen der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	45
2.2	Prinzip der quantitativen real-time Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) .....	46
2.2.1	Absolute und relative Quantifizierung .....	47
2.2.2	Detektionsprinzipien .....	50
2.3	Optimierung, Normalisierung und Validierung der RT-qPCR-Analytik.....	52
2.3.1	Primerspezifität.....	53
2.3.2	Datenprozessierung.....	54
2.3.3	Effizienz der PCR .....	55
2.3.4	Referenz-Gene .....	56
<b>3</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit</b> .....	<b>59</b>
<b>B</b>	<b>Allgemeiner Teil</b> .....	<b>61</b>
<b>1</b>	<b>Pharmakokinetik von Ipratropiumbromid untersucht am humanen Lungen-Perfusions-Modell</b> .....	<b>62</b>
1.1	Hintergrund .....	62
1.1.1	Modelle zur Bestimmung der Pharmakokinetik pulmonal applizierter Arzneistoffe .....	62



1.1.2	Vorrausgegangene Untersuchungen am humanen Lungen-Perfusions-Modell (LPM) .....	65
1.2	Fragestellung .....	66
1.3	Pharmakodynamische und pharmakokinetische Eigenschaften von Ipratropiumbromid .....	67
1.3.1	Anwendung von Ipratropiumbromid in der Arzneimitteltherapie .....	67
1.3.2	Pharmakokinetik von Ipratropiumbromid .....	69
1.4	Prinzip der Bestimmung der Pharmakokinetik von Ipratropiumbromid am LPM...70	
1.5	Ergebnisse der Versuche am humanen Lungen-Perfusions-Modell .....	71
1.5.1	Charakteristika der Lungenlappen-Präparationen.....	71
1.5.2	Umverteilung von Ipratropiumbromid in die Perfusionsflüssigkeit nach Applikation unterschiedlicher Dosen.....	72
1.5.3	Umverteilung von Ipratropiumbromid in die Perfusionsflüssigkeit nach Vernebelung von L-Carnitin .....	74
1.6	Diskussion.....	76
1.6.1	Vergleich der am humanen Lungen-Perfusions-Modell ermittelten pharmakokinetischen Parameter mit <i>in vivo</i> Untersuchungen .....	76
1.6.2	Umverteilung von Ipratropiumbromid in die Perfusionsflüssigkeit nach Applikation unterschiedlicher Dosen.....	80
1.6.3	Umverteilung von Ipratropiumbromid in die Perfusionsflüssigkeit nach Vernebelung von L-Carnitin .....	82
<b>2</b>	<b>Einfluss von Sexualsteroidhormonen auf die mRNA-Expression von Arzneistofftransportern .....</b>	<b>84</b>
2.1	Hintergrund .....	84
2.1.1	Physiologie der Sexualsteroidhormone im menschlichen Körper .....	84
2.1.2	Physiologie des L-Carnitins im menschlichen Körper .....	86
2.1.3	Calu-3-Zelllinie als <i>in vitro</i> Modell des humanen Bronchialepithels.....	87
2.2	Fragestellung .....	88
2.3	Prinzip der Bestimmung der Genexpression von Arzneistofftransportern in Calu-3-Zellen.....	90
2.4	Ergebnisse der Zellkulturversuche .....	91
2.4.1	Genexpression von Arzneistofftransportern nach Hormon-Inkubation verglichen zu keiner Hormon-Inkubation .....	91
2.4.2	Genexpression von Arzneistofftransportern nach Inkubation mit weiblichen Sexualhormonen verglichen zur Inkubation mit Testosteron .....	93
2.4.3	Genexpression von Arzneistofftransportern nach Inkubation mit unterschiedlichen weiblichen Sexualsteroidhormonen.....	96
2.4.4	Genexpression von Arzneistofftransportern mit und ohne L-Carnitin-Inkubation .....	98

2.5	Diskussion.....	99
2.5.1	Einfluss der Sexualhormone auf die Genexpression von Transportern .....	101
2.5.2	Unterschiedliche Effekte weiblicher und männlicher Sexualhormone auf die Genexpression von Transportern .....	105
2.5.3	Einfluss von L-Carnitin auf die Expression von Arzneistofftransportern .....	105
<b>3</b>	<b>Unterschiede in der Genexpression von Arzneistofftransportern in humanem Lungengewebe.....</b>	<b>107</b>
3.1	Hintergrund .....	107
3.1.1	Geschlechtsspezifische Medizin.....	107
3.1.2	Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Pharmakokinetik von Arzneistoffen .....	109
3.2	Fragestellung .....	111
3.3	Prinzip der Bestimmung der Genexpression von Arzneistofftransportern in humanem Lungengewebe .....	112
3.4	Ergebnisse der Untersuchungen zur unterschiedlichen Genexpression von Arzneistofftransportern in humanem Lungengewebe .....	114
3.4.1	Charakteristika der untersuchten Gewebeproben .....	114
3.4.2	Genexpressions-Niveaus der untersuchten Transporter .....	114
3.4.3	Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Genexpression von Arzneistofftransportern.....	116
3.4.4	Altersspezifische Unterschiede in der Genexpression von Arzneistofftransportern.....	117
3.4.5	Korrelation der individuellen Transporter-Expressionen .....	120
3.4.6	Individuelle Genexpression von Arzneistofftransportern in Relation zur Pharmakokinetik am LPM.....	121
3.5	Diskussion.....	123
3.5.1	Genexpressions-Niveaus der untersuchten Transporter im humanen Lungengewebe .....	125
3.5.2	Geschlechts- und altersspezifische Unterschiede in der Genexpression der untersuchten Arzneistofftransporter .....	128
3.5.3	Korrelierende Genexpression von Arzneistofftransportern .....	130
<b>4</b>	<b>Unterschiede in der Protein-Expression von Arzneistofftransportern in humanem Lungengewebe.....</b>	<b>134</b>
4.1	Hintergrund .....	134
4.2	Fragestellung .....	135
4.3	Prinzip der Bestimmung der OCT3-Protein-Expression in humanem Lungengewebe .....	136

4.4	Ergebnisse der Untersuchungen zur OCT3-Protein-Expression in humanem Lungengewebe .....	136
4.4.1	Individuelle OCT3-Protein-Expression .....	136
4.4.2	Individuelle OCT3-Protein-Expression in Relation zur Pharmakokinetik am LPM.....	137
4.4.3	Individuelle OCT3-Protein-Expression in Relation zur individuellen OCT3-Genexpression .....	138
4.5	Diskussion.....	139
<b>5</b>	<b>Zelluläre Aufnahme von [<sup>3</sup>H]-Ipratropiumbromid in stabil transfizierte Zellen.....</b>	<b>142</b>
5.1	Hintergrund .....	142
5.2	Fragestellung .....	143
5.3	Prinzip der Bestimmung der zellulären Aufnahme von [ <sup>3</sup> H]-Ipratropiumbromid ([ <sup>3</sup> H]-IB) .....	144
5.4	Ergebnisse der Untersuchungen zur zellulären Aufnahme von [ <sup>3</sup> H]-Ipratropiumbromid ([ <sup>3</sup> H]-IB) .....	144
5.4.1	Expression der Transporter-Gene in stabil transfizierten Zellen .....	144
5.4.2	Aufnahme von [ <sup>3</sup> H]-IB in HEK-h-OCT1 Zellen.....	145
5.4.3	Aufnahme von [ <sup>3</sup> H]-IB in HEK-h-OCT3 Zellen.....	146
5.4.4	Aufnahme von [ <sup>3</sup> H]-Salbutamol ([ <sup>3</sup> H]-SB) in HEK-h-OCT1 und HEK-h-OCT3 Zellen .....	147
5.4.5	Inhibition der [ <sup>3</sup> H]-IB Aufnahme durch $\beta$ -Estradiol .....	148
5.5	Diskussion.....	149
<b>C</b>	<b>Experimenteller Teil.....</b>	<b>155</b>
<b>1</b>	<b>Entwicklung und Validierung der Ipratropiumbromid-Analytik .....</b>	<b>156</b>
1.1	Verwendete Reagenzien, Geräte und Materialien .....	156
1.1.1	Substanzen .....	156
1.1.2	Sonstige Reagenzien.....	156
1.1.3	LC-MS/MS-System .....	156
1.1.4	Sonstige Geräte .....	157
1.1.5	Materialien .....	157
1.2	LC-MS/MS-Methode.....	157
1.3	Auswahl des Internen Standards .....	159
1.4	Vergleich von Ipratropiumbromid (IB)-Extraktionsmethoden aus Lungen-Perfusions-Modell-Proben .....	161
1.5	Validierung der Ipratropiumbromid (IB)-Analytik .....	167
1.5.1	Selektivität .....	167

1.5.2	Linearität .....	168
1.5.3	Richtigkeit und Präzision .....	169
1.5.4	Bestimmungsgrenze .....	170
1.5.5	Wiederfindung, Matrixeffekt und Prozesseffizienz.....	171
1.5.6	Stabilität .....	174
<b>2</b>	<b>Pharmakokinetik von Ipratropiumbromid untersucht am humanen Lungen-Perfusions-Modell .....</b>	<b>175</b>
2.1	Verwendete Reagenzien, Geräte und Materialien .....	175
2.1.1	Substanzen .....	175
2.1.2	Applikationslösungen .....	175
2.1.3	Sonstige Reagenzien.....	175
2.1.4	Perfusionspuffer .....	176
2.1.5	LC-MS/MS-System .....	176
2.1.6	Sonstige Geräte .....	177
2.1.7	Materialien .....	177
2.2	Humanes Lungengewebe .....	178
2.3	Versuchsaufbau des Lungen-Perfusions-Modells .....	179
2.4	Durchführung der Untersuchungen am humanen Lungen-Perfusions-Modell (LPM).....	181
2.4.1	Versuchsvorbereitungen und Präparation des Lungenlappens .....	181
2.4.2	Perfusions- und Ventilationsparameter .....	183
2.4.3	Applikation von Ipratropiumbromid (IB).....	184
2.4.4	Applikation von L-Carnitin (CAR) mit anschließender Applikation von Ipratropiumbromid (IB) .....	184
2.4.5	Probengewinnung .....	185
2.5	Probenaufarbeitung und Vermessung mittels LC-MS/MS-Analytik.....	186
2.5.1	Probenaufarbeitung von Lungen-Perfusions-Modell (LPM)-Proben .....	186
2.5.2	Individuelle Kalibriergerade .....	187
2.5.3	LC-MS/MS-Methode .....	188
2.6	Bestimmung der tatsächlich deponierten Dosis .....	188
<b>3</b>	<b>Entwicklung einer RT-qPCR-Methode zur Detektion der mRNA-Expression von Arzneistofftransportern .....</b>	<b>192</b>
3.1	Verwendete Reagenzien, Geräte und Materialien .....	192
3.1.1	Primer.....	192
3.1.2	Reagenzien .....	192
3.1.3	Geräte.....	192
3.1.4	Materialien .....	193
3.2	Primer-Design .....	193

3.3	Test der Primer auf Signal-Spezifität .....	197
3.4	Bestimmung der Reaktions-Effizienzen .....	199
3.5	Optimierung der Primer-Konzentrationen .....	200
3.6	Referenz-Gen-Validierung .....	201
<b>4</b>	<b>Einfluss von Sexualsteroidhormonen auf die mRNA-Expression von Arzneistofftransportern .....</b>	<b>204</b>
4.1	Verwendete Reagenzien, Geräte und Materialien .....	204
4.1.1	Calu-3 Zellkulturlinie .....	204
4.1.2	Substanzen .....	204
4.1.3	Kits .....	204
4.1.4	Primer.....	204
4.1.5	Sonstige Reagenzien.....	205
4.1.6	Lösungen und Puffer .....	205
4.1.7	Geräte.....	206
4.1.8	Materialien .....	207
4.2	Standardprozeduren in der Zellkultur .....	207
4.2.1	Auftauen und Kultivieren.....	207
4.2.2	Passagieren.....	208
4.2.3	Zellzählung in Neubauer-Zählkammer .....	208
4.2.4	Test auf Mycoplasmen-Kontamination .....	209
4.3	Durchführung der Inkubationsversuche .....	210
4.3.1	Inkubation mit Sexualsteroidhormonen.....	210
4.3.2	Inkubation mit Sexualsteroidhormonen und L-Carnitin .....	210
4.3.3	Zellpelletierung nach Versuchsende .....	211
4.4	RNA-Isolierung und cDNA-Synthese .....	211
4.4.1	RNA-Isolierung.....	211
4.4.2	RNA-Quantifizierung .....	212
4.4.3	cDNA-Synthese .....	213
4.5	Vermessung der cDNA-Proben mittels RT-qPCR .....	213
4.5.1	Vorbereitung der Proben und Lösungen .....	213
4.5.2	Pipettieren der 96-Well-Platten.....	214
4.5.3	qPCR-Lauf.....	215
4.6	Auswertung der RT-qPCR-Ergebnisse .....	216
4.6.1	Reaktions-Effizienzen .....	216
4.6.2	IRC-Normalisierung .....	216
4.6.3	Normierung auf Referenz-Gene .....	217
4.6.4	Relative Quantifizierung mittels REST® .....	217

<b>5</b>	<b>Unterschiede in der Genexpression von Arzneistofftransportern in humanem Lungengewebe.....</b>	<b>218</b>
5.1	Verwendete Reagenzien, Geräte und Materialien .....	218
5.1.1	Verwendete Kits.....	218
5.1.2	Sonstige Reagenzien.....	218
5.1.3	Geräte.....	219
5.1.4	Materialien .....	219
5.2	Humanes Lungengewebe.....	220
5.3	RNA-Isolierung aus humanem Lungengewebe .....	220
5.3.1	Vorbereitung der Gewebeproben .....	220
5.3.2	RNA-Isolierung.....	221
5.3.3	Bestimmung der RNA-Konzentration.....	222
5.4	cDNA-Synthese .....	222
5.5	Vermessung der Proben mittels RT-qPCR .....	223
5.5.1	Versuchsplanungen .....	223
5.5.2	Vorbereitung der Proben und der Lösungen .....	224
5.5.3	Pipettieren der 384-Well-Platten .....	224
5.5.4	qPCR-Lauf.....	225
5.5.5	Reaktions-Effizienzen .....	225
5.6	Auswertung der Daten aus RT-qPCR-Messungen .....	226
5.6.1	Ausreißertest.....	226
5.6.2	IRC-Normalisierung .....	226
5.6.3	Normierung auf Referenz-Gene .....	227
5.6.4	Relative Quantifizierung mittels REST® .....	227
<b>6</b>	<b>Unterschiede in der Protein-Expression von Arzneistofftransportern in humanem Lungengewebe.....</b>	<b>229</b>
6.1	Verwendete Reagenzien, Geräte und Materialien .....	229
6.1.1	Reagenzien .....	229
6.1.2	Lösungen .....	229
6.1.3	Geräte.....	230
6.1.4	Materialien .....	231
6.2	Humanes Lungengewebe.....	231
6.3	Protein-Isolierung aus humanem Lungengewebe .....	231
6.3.1	Vorbereitung der Gewebeproben .....	231
6.3.2	Protein-Isolierung.....	232
6.3.3	Bestimmung der Protein-Konzentration .....	232
6.4	Protein-Detektion mittels Western-Blot-Analytik.....	233
6.4.1	Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe mittels SDS-Page und Transfer der Proteine .....	233

6.4.2	Inkubation der Membranen mit Antikörpern .....	234
6.4.3	Detektion .....	235
<b>7</b>	<b>Zelluläre Aufnahme von [<sup>3</sup>H]-Ipratropiumbromid in stabil transfizierte Zellen .....</b>	<b>236</b>
7.1	Verwendete Reagenzien, Geräte und Materialien .....	236
7.1.1	Radioaktiv markierte Substanzen .....	236
7.1.2	Stabil transfizierte Zellen .....	236
7.1.3	TaqMan® Genexpression Kits .....	236
7.1.4	Sonstige Reagenzien .....	237
7.1.5	Geräte .....	237
7.1.6	Materialien .....	238
7.2	Zellkultur .....	238
7.3	Verifizierung der Transporter-Expression in stabil transfizierten Zellen .....	239
7.3.1	RNA-Isolierung aus stabil transfizierten Zellen und cDNA-Synthese .....	239
7.3.2	Vermessung der cDNA mittels RT-qPCR .....	239
7.4	Zelluläre Aufnahme von [ <sup>3</sup> H]-Ipratropiumbromid ([ <sup>3</sup> H]-IB) .....	240
7.4.1	Inkubationspuffer .....	240
7.4.2	Inkubation der Zellen mit [ <sup>3</sup> H]-Ipratropiumbromid .....	240
7.4.3	Messung der Szintillation .....	241
7.4.4	Messung des Proteingehalts .....	241
7.5	Untersuchung der zellulären Aufnahme von [ <sup>3</sup> H]-Salbutamol ([ <sup>3</sup> H]-SB) .....	242
7.5.1	Inkubationspuffer .....	242
7.5.2	Inkubation der Zellen mit [ <sup>3</sup> H]-Salbutamol .....	242
7.6	β-Estradiol-induzierte Inhibition der zellulären Aufnahme von [ <sup>3</sup> H]-Ipratropiumbromid .....	242
7.6.1	β-Estradiol-Lösungen .....	242
7.6.2	Inkubationspuffer .....	243
7.6.3	Inkubation der Zellen .....	243
<b>D</b>	<b>Tabellarischer Anhang .....</b>	<b>245</b>
<b>1</b>	<b>Entwicklung und Validierung der Ipratropiumbromid (IB)-Analytik .....</b>	<b>246</b>
1.1	Auswahl des Internen Standards .....	246
1.2	Vergleich von Extraktionsmethoden aus Lungen-Perfusions-Modell-Proben .....	246
<b>2</b>	<b>Pharmakokinetik von Ipratropiumbromid (IB) untersucht am humanen Lungen-Perfusions-Modell (LPM) .....</b>	<b>247</b>
2.1	Individuelle Kalibriergeraden der 12 Perfusionen am LPM .....	247
2.2	Umverteilung von IB in die Perfusionsflüssigkeit .....	248
2.2.1	Applikation von 100 µg IB .....	248

2.2.2	Applikation von 40 µg IB .....	249
2.2.3	Applikation von 40 µg IB nach L-Carnitin-Vernebelung.....	250
2.3	AUC <sub>0-60 min</sub> .....	251
<b>3</b>	<b>Entwicklung einer RT-qPCR-Methode zur Detektion der mRNA-Expression von Arzneistofftransportern.....</b>	<b>252</b>
3.1	Experimentell bestimmte Schmelzpunkte und Reaktions-Effizienzen .....	252
3.2	Optimierung der Primer-Konzentration .....	252
3.3	Referenz-Gen-Validierung .....	254
3.3.1	Korrelation zwischen Referenz-Genen und BestKeeper in Zellen.....	254
3.3.2	Korrelation zwischen Referenz-Genen und BestKeeper in Gewebe .....	254
<b>4</b>	<b>Einfluss von Sexualsteroidhormonen auf die mRNA-Expression von Arzneistofftransportern .....</b>	<b>255</b>
4.1	Expression von Arzneistofftransportern nach Hormon-Inkubation verglichen zu keiner Hormon-Inkubation .....	255
4.1.1	Expression nach Inkubation mit Hormonen verglichen zu keiner Inkubation .....	255
4.1.2	Expression nach Inkubation mit Hormonen und L-Carnitin verglichen zu keiner Inkubation .....	256
4.1.3	Expression nach Inkubation mit Hormonen und L-Carnitin verglichen zur Inkubation mit L-Carnitin .....	257
4.2	Expression von Arzneistofftransportern nach Inkubation mit weiblichen Sexualsteroidhormonen verglichen zur Inkubation mit Testosteron .....	258
4.2.1	Expression nach Inkubation mit Estradiol und Progesteron verglichen zur Inkubation mit Testosteron .....	258
4.2.2	Expression nach Inkubation mit Estradiol sowie Progesteron und L-Carnitin verglichen zur Inkubation mit Testosteron und L-Carnitin.....	259
4.3	Expression von Arzneistofftransportern nach Inkubation mit unterschiedlichen weiblichen Sexualsteroidhormonen.....	260
4.3.1	Expression nach Inkubation mit Estradiol und Progesteron .....	260
4.3.2	Expression nach Inkubation mit Estradiol sowie Progesteron und L-Carnitin .....	261
4.4	Expression von Arzneistofftransportern mit und ohne L-Carnitin-Inkubation .....	262
<b>5</b>	<b>Unterschiede in der Genexpression von Arzneistofftransportern in humanem Lungengewebe.....</b>	<b>263</b>
5.1	Charakteristika der verwendeten Gewebeproben .....	263
5.2	C <sub>T</sub> -Werte der 79 untersuchten Gewebeproben .....	266
5.3	Expressions-Niveau der untersuchten Transporter-Gene.....	268



5.4	Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Genexpression der Transporter .....	268
5.4.1	Alle Gewebeproben .....	268
5.4.2	Gewebeproben < 50 Jahre .....	269
5.4.3	Gewebeproben 50 – 60 Jahre .....	269
5.4.4	Gewebeproben > 60 Jahre .....	270
5.5	Altersspezifische Unterschiede in der Genexpression der Transporter .....	270
5.5.1	Alle Gewebeproben .....	270
5.5.2	Gewebeproben von weiblichen Spendern .....	272
5.5.3	Gewebeproben von männlichen Spendern .....	273
5.6	Korrelation der individuellen Transporter-Expressionen .....	275
5.6.1	Individuelle Transporter-Expressionen .....	275
5.6.2	Korrelation der Transporter-Expressionen .....	277
5.7	Individuelle Unterschiede der Genexpression in Korrelation mit der am LPM gemessenen Pharmakokinetik .....	277
<b>6</b>	<b>Unterschiede in der Protein-Expression von Arzneistofftransportern in humanem Lungengewebe .....</b>	<b>278</b>
6.1	Individuelle Unterschiede der OCT3-Protein-Expression in Korrelation mit der am LPM gemessenen Pharmakokinetik .....	278
6.2	Individuelle Unterschiede der OCT3-Protein-Expression in Korrelation mit der individuellen OCT3-Genexpression .....	279
<b>7</b>	<b>Zelluläre Aufnahme von [<sup>3</sup>H]-Ipratropiumbromid ([<sup>3</sup>H]-IB) in stabil transfizierte Zellen .....</b>	<b>280</b>
7.1	Expression der Transporter-Gene in stabil transfizierten Zellen .....	280
7.2	[ <sup>3</sup> H]-IB-Aufnahme in HEK-h-OCT1 .....	280
7.2.1	Inkubation mit 3 nM [ <sup>3</sup> H]-IB .....	280
7.2.2	Inkubation mit 0,3 nM [ <sup>3</sup> H]-IB .....	281
7.3	[ <sup>3</sup> H]-IB-Aufnahme in HEK-h-OCT3 .....	281
7.3.1	Inkubation mit 3 nM [ <sup>3</sup> H]-IB .....	281
7.3.2	Inkubation mit 0,3 nM [ <sup>3</sup> H]-IB .....	282
7.4	Vergleich der Differenzen der Mittelwerte .....	282
7.5	[ <sup>3</sup> H]-Salbutamol-Aufnahme in HEK-h-OCT1 und HEK-h-OCT3 .....	283
7.6	β-Estradiol-Einfluss auf die [ <sup>3</sup> H]-IB-Aufnahme in HEK-h-OCT1 .....	283
<b>E</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>285</b>
<b>F</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>291</b>
<b>G</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>295</b>



# **A Einleitung**

# 1 Arzneistofftransporter in der humanen Lunge

## 1.1 Transportvorgänge an Biomembranen

Um an ihren vorgesehenen Wirkort zu gelangen müssen Arzneistoffe zumeist biologische Barrieren, wie beispielsweise das Darmepithel nach peroraler Anwendung oder das Lungenepithel nach Inhalation, überwinden. Die Integrität der Epithelzellschichten wird durch Zellverbindungskomplexe, bestehend aus Tight Junctions, Adherens Junctions und Desmosomen, aufrechterhalten [1]. An der luminalen Seite des Zellzwischenraums lokalisiert bestehen *Tight Junctions* aus einem dynamischen Netzwerk an integralen Membranproteinen, zytoplasmischen Gerüstproteinen und regulatorischen Proteinen, welches benachbarte Zellen miteinander verbindet und gleichzeitig eine Permeabilitätsbarriere ausbildet [1-3]. Meist direkt unterhalb der Tight Junctions platziert initiieren *Adherens Junctions*, welche ebenfalls äußerst dynamische Proteinkomplexe darstellen, den Zell-Zell-Kontakt und tragen durch die Verbindung der Aktinfilamente zwischen Zellen zur Regulierung des Aktin-Zytoskeletts bei [2, 3]. Ähnlich wie Adherens Junctions tragen *Desmosomen* primär zur mechanischen Stabilität von Zellverbindungen bei, indem Intermediärfilamente des Zytoskeletts zwischen angrenzenden Zellen verbunden werden [4]. Ergänzend sind als weitere wichtige Zell-Zell-Verbindungsstrukturen *Gap Junctions* zu nennen, welche die interzelluläre Kommunikation durch den Transfer von Ionen und kleinen Molekülen vermitteln [4]. Generell kann das jeweilige Epithel auf parazellulärem oder transzellulärem Weg überwunden werden. Unter *parazellulärem Transport* versteht man die passive Diffusion vorwiegend hydrophiler Moleküle durch Zellzwischenräume (Abbildung A.1 A) [5]. Die Diffusion kann durch die an der apikalen Zellseite lokalisierten Tight Junctions reguliert werden, da diese ionenselektive Poren ausbilden [1]. Die Permeabilität der Tight Junctions variiert dabei zwischen unterschiedlichen Gewebe- und Zelltypen stark [1]. Der *transzelluläre Transport* kann mittels passiver Diffusion durch Zellmembranen (Abbildung A.1 B), vermittelt durch transmembrane Transportproteine (Abbildung A.1 C) oder durch vesikulären Transport (Abbildung A.1 D) stattfinden. Diese Transportmechanismen finden an nahezu allen Biomembranen statt und dienen unter anderem zum Einschleusen essenzieller Moleküle und Ionen aus dem Extrazellulärraum in das Zytoplasma. Durch ihren Aufbau als Lipiddoppelschicht begrenzen Biomembranen Kompartimente innerhalb der Zelle und umschließen als Plasmamembran das Zytoplasma. Die Zellmembran, welche für Arzneistoffe mit Wirkort innerhalb von Zellen eine weitere biologische Barriere darstellt, ist einer kontinuierlichen Veränderung unterworfen und bildet eine äußerst dynamische Struktur [6]. Die *passive Diffusion* durch die Lipiddoppelschicht von Biomembranen erfolgt für vornehmlich lipophile Verbindungen entlang ihres Konzentrationsgradienten und ist nicht hemmbar [5, 7].

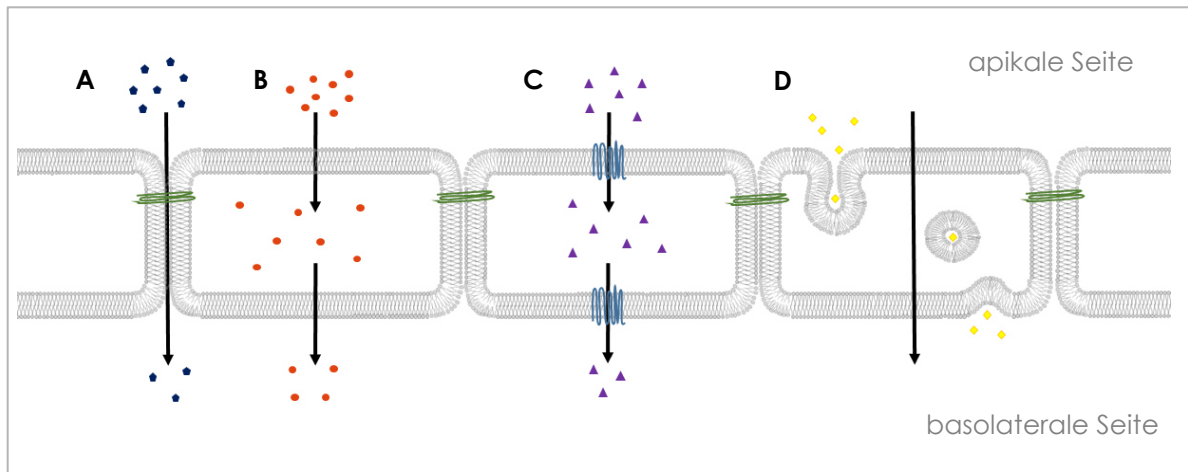


Abbildung A.1: Schematische Darstellung der Transportvorgänge an Zellmembranen von Epithelzellen. **A:** Parazellulärer Transport hydrophiler Moleküle mittels passiver Diffusion durch ionenselektive Poren von Tight Junctions (grün); **B:** Diffusion lipophiler Moleküle entlang ihres Konzentrationsgradienten durch die Zellmembranen; **C:** Transzellulärer Transport vermittelt durch Membranproteine (blau); **D:** Membranverlagernder (= vesikulärer) Transport durch Transzytose (modifiziert nach [5, 6, 8]).

Unter dem Oberbegriff *Transzytose* wird der membranverlagernde oder vesikuläre Transport bestehend aus *Endozytose* und *Exozytose* zusammengefasst, welcher Molekülen das Durchdringen von Zellen ermöglicht [5]. Physiologisch werden diese Prozesse genutzt um beispielsweise Membranproteine in die Plasmamembran einzufügen oder um für den Stoffwechsel relevante Moleküle in die Zellen aufzunehmen beziehungsweise auszuschleusen [5]. Mehrere verschiedene Mechanismen der Endozytose existieren parallel in humanen Zellen [6, 9]. Die *Clathrin-vermittelte Endozytose* ist der bekannteste Mechanismus der durch Einstülpung und anschließende Abkapselung der Plasmamembran gekennzeichneten Vesikelbildung. Durch Adaptorproteine und akzessorische Proteine wird die Polymerisation von Clathrin initiiert, was wiederum die Deformation der Membran stabilisiert und die Ausbildung von Vesikeln ermöglicht [9]. Daneben werden in der Literatur mehrere Clathrin-unabhängige Mechanismen der Endozytose beschrieben [5, 6, 9]. *Makropinozytose* beschreibt die unspezifische vesikuläre Aufnahme von Flüssigkeit aus dem Extrazellulärraum und wird durch externe Stimuli wie Wachstumsfaktoren initiiert [6, 7]. Die in spezialisierten Zellen stattfindende Aufnahme durch sukzessive Invagination der Plasmamembran um Partikel und kleinere Zellen wird als *Phagozytose* bezeichnet [9].

Prinzipiell können Membrantransporterproteine in vier Typen eingeteilt werden: Ionenkanäle, Aquaporine, Transporter (Carrier) und ATP-abhängige Pumpen [10]. *Ionenkanäle* sind porenbildende Transmembranproteine, welche anorganische Ionen mit hoher Spezifität entlang ihres elektrochemischen Gradienten passiv über Membranen transferieren

(siehe Abbildung A.2 A) [6]. Vorwiegend sind sie im geschlossenen Zustand vorhanden, die Steuerung erfolgt durch Stimuli wie das Membranpotential, Liganden, Licht oder auch mechanische Reize [6, 10]. Im geöffneten Zustand weisen Ionenkanäle eine sehr effiziente Durchflussrate auf und regulieren dabei das elektrische Potential von Zellen [10]. *Aquaporine* (Abbildung A.2 B) zählen ebenfalls zu den passiven Kanälen. In Abhängigkeit vom osmotischen Gradienten transportieren sie Wasser sowie einige kleinere ungeladene Moleküle, wie  $\text{CO}_2$ ,  $\text{NO}$ , Harnstoff oder Glycerin, bidirektional über Biomembranen [6, 10].

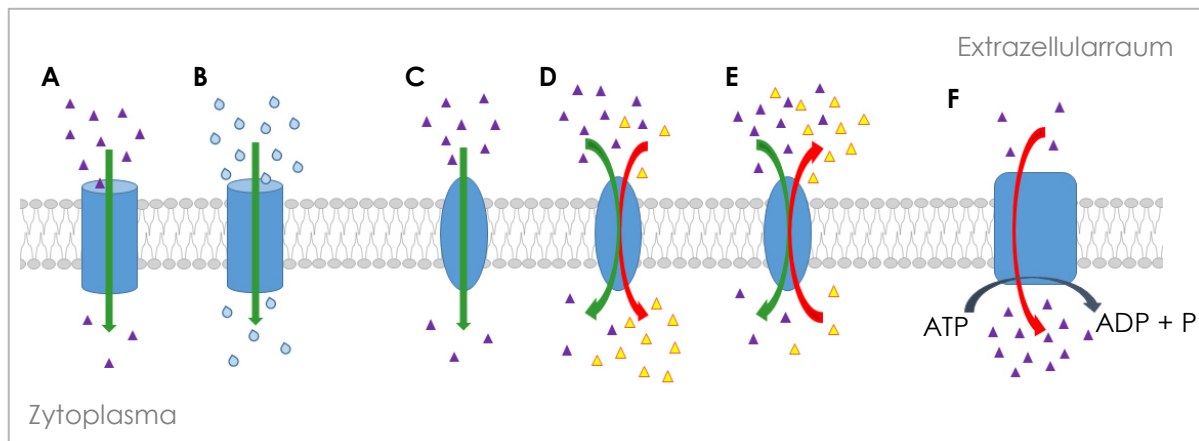


Abbildung A.2: Schematische Darstellung von Transporterproteinen in Zellmembranen. **A:** Ionenkanal: passiver Transport von selektiven Ionen; **B:** Aquaporin: passiver Transport von Wasser und kleineren ungeladenen Molekülen; **C:** Uniporter: passive erleichterte Diffusion spezifischer Substrate; **D:** Symporter: sekundär aktiver, gleichgerichteter Transport von spezifischen Substraten; **E:** Antiporter: sekundär aktiver, entgegengerichteter Transport von spezifischen Substraten; **F:** ATP-abhängige Transporter: primär aktiver Transport unter Hydrolyse von Adenosintriphosphat (ATP) zu Adenosindiphosphat (ADP) und Phosphat (P). Grüne Pfeile markieren einen passiven Transport von Molekülen entlang ihres Konzentrationsgradienten, rote Pfeile markieren einen aktiven Transport entgegen des Konzentrationsgradienten (modifiziert nach [10-12]).

*Transporter (Carrier)* ermöglichen die Translokation von spezifischen Substraten über Membranen durch Änderung ihrer Konformation. Durch diesen Transferprozess werden Moleküle im Vergleich zum Transport über Ionenkanälen wesentlich langsamer bewegt [10]. Transporter können sowohl passiven (Uniport) als auch aktiven Transport (Symport und Antiport) vermitteln [6]. *Uniporter* (siehe Abbildung A.2 C) transportieren ein spezifisches Substrat entlang dessen Konzentrationsgradienten ohne zusätzliche Energie aufzuwenden [6, 10]. Dieser Prozess wird auch als *erleichterte Diffusion* bezeichnet. Im Gegensatz dazu benötigen aktive Transporter Energie um spezifische Substrate gegen ihren Konzentrationsgradienten über Membranen zu transferieren [6]. Dabei wird die Bewegung eines Moleküls oder Ions gegen dessen Konzentrationsgradienten an die Bewegung eines anderen Moleküls oder Ions entlang dessen Konzentrationsgradienten gebunden, was als *sekundär*

aktiver Transport bezeichnet wird [10]. In Abhängigkeit von der Transportrichtung wird das Protein bei gleichgerichtetem Transport als *Symporter* (Abbildung A.2 D), bei entgegengerichtetem Transport als *Antiporter* (Abbildung A.2 E) benannt. Schließlich kann durch Energie aus dem Zellmetabolismus *primärer* oder *direkt aktiver Transport* stattfinden [5]. *ATP-abhängige Transporter* (Abbildung A.2 F) nutzen die aus der Hydrolyse von Adenosin-triphosphat (ATP) zu Adenosindiphosphat (ADP) und Phosphat gewonnene Energie, um Substrate gegen ihren Konzentrationsgradienten hinweg über Membranen zu bewegen [10, 12].

### 1.2 Transporterproteine in der Entwicklung von Arzneistoffen

Die Beachtung von Arzneistofftransportern während der Entwicklung von pharmakologisch aktiven Substanzen hat in den vergangenen Jahren deutlich an Bedeutung gewonnen. Transporterproteine können an der Absorption, Verteilung, Elimination sowie indirekt am Metabolismus von Pharmaka beteiligt sein und durch Inhibition oder Induktion zu deren pharmakokinetischer Variabilität beitragen [13, 14]. Folglich können klinisch manifeste Auswirkungen auf die Sicherheit und Wirksamkeit von Arzneistoffen in Patienten auftreten. In ihrer aktuellen Leitlinie zur Ermittlung von Arzneimittelinteraktionen fordert die *European Medicines Agency* (EMA) die *in vitro* Testung potentieller Wirkstoffe auf Transporter-basierte Interaktionen [15]. Auch die *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) beschreibt in einer Vorabversion ihrer Empfehlungen zu Interaktionsstudien detailliert das Vorgehen zur Bestimmung von Wechselwirkungen aufgrund involvierter Arzneistofftransporter [16]. Das Hauptaugenmerk liegt dabei auf den Efflux-Transportern *Multidrug-Resistance Protein 1* (MDR1 = *P-Glykoprotein*) und *Breast Cancer Resistance Protein* (BCRP). Für alle Wirkstoffe in der Entwicklungsphase soll geklärt werden, ob es sich um ein Substrat dieser beiden Transporter handelt und inwiefern gegebenenfalls eine Inhibition der Transporterfunktion stattfindet [16, 17]. Als prominentes Beispiel ist hier die Interaktion zwischen dem Antiarrhythmikum Chinidin, einem Substrat und Inhibitor von MDR1, und Digoxin, einem MDR1-Substrat mit geringer therapeutischer Breite, aufzuführen. Die gleichzeitige Gabe von Chinidin führt zu einer deutlich erhöhten Bioverfügbarkeit und folglich zu einem gesteigertem Nebenwirkungsrisiko des Herzglykosides Digoxin, vorwiegend bedingt durch intestinale MDR1-Inhibition [18]. Unter Berücksichtigung des aktuellen Forschungsstandes und der pharmakokinetischen Prozesse, welche für die untersuchte Substanz bekannt sind, muss zudem getestet werden, ob es sich um ein Substrat weiterer Transporter handelt [15, 16]. Wird beispielsweise ein potentieller neuer Wirkstoff überwiegend hepatisch oder biliär eliminiert, empfiehlt es sich zu prüfen, ob es sich um ein Substrat der *Organic Anion Transporting Polypeptide* OATP1B1 und OATP1B3 handelt [16, 17]. Sowohl für das Immunsuppressivum Cyclosporin A als auch für das Fibrat Gemfibrozil wurde ein inhibitorischer Effekt auf die

OATP-vermittelte Aufnahme von Statinen in Hepatozyten gezeigt [13, 18]. So wurden für Pravastatin und Rosuvastatin nach Cyclosporin A-Gabe bis zu 10-fach erhöhte Plasmaspitzenpiegel gemessen [18], was ein höheres Rhabdomyolyse-Risiko für Patienten mit dieser Arzneimittelkombination birgt. Falls sich ein potentieller neuer Wirkstoff als Substrat eines Transporters herausstellt und durch dessen Inhibition oder Induktion klinisch relevante Interaktionen auftreten könnten, sollten zusätzliche humane *in vivo* Studien durchgeführt werden [15, 16].

Da die Kosten für eine erfolgreiche Arzneistoffentwicklung kontinuierlich steigen, ist es von großem Interesse, potentielle Interaktionen zwischen Substanzen sowie den Einfluss von Transporterproteinen auf die Pharmakokinetik, die Wirksamkeit und die Sicherheit von pharmakologisch aktiven Substanzen frühzeitig zu erkennen. Zur Vorhersage von Interaktionen, welche auf der Expression von Arzneistofftransportern basieren, ist ein deutlicher Progress in der Etablierung von Modellen und Techniken zu konstatieren [13]. Neben spezifischen *in vitro* Zellkulturmodellen kommen auch *ex vivo* Modelle wie beispielsweise die isolierte und perfundierte Rattenleber (IPRL) zum Einsatz [13]. Darüber hinaus ermöglichen *in silico* Modelle schon in frühen Stadien des Wirkstoffdesigns anhand der physiochemischen Eigenschaften eines Arzneistoff-Kandidaten eine Prognose, ob es sich um ein Substrat eines Transporters handeln könnte [13]. Allerdings ist die Beurteilung der tatsächlichen klinischen Relevanz von Ergebnissen aus derartigen Modellen schwierig. Zumeist sind mehrere Transporter an der Aufnahme, Verteilung und Ausscheidung von Xenobiotika beteiligt, sodass Rückschlüsse auf einzelne Transporter nur begrenzt möglich sind [13]. Ferner können sich verschiedene genetische Variationen von Membrantransportern in klinischen Phänotypen manifestieren und dieser Polymorphismus kann mit einer unterschiedlichen therapeutischen Wirkung oder Nebenwirkung eines Pharmakons assoziiert sein [13, 19].

Der Fokus der Forschung zu Transporterproteinen liegt derzeit vorrangig auf deren Expression in den eliminierenden Organen Leber und Niere [20]. Daneben ist auch der Beitrag von Transportern zur Absorption oral angewandter Arzneistoffe über die Magen-Darm-Passage sowie zur ZNS-Gängigkeit über die Blut-Hirn-Schranke von Interesse [20]. Nur wenige Untersuchungen beschäftigten sich bisher mit dem Einfluss von Arzneistofftransportern auf die Pharmakokinetik pulmonal applizierter Substanzen sowie deren Expression in der humanen Lunge [21, 22]. Zu den Arzneistofftransportern, die am ehesten die Umverteilung inhalativ verabreichter Arzneistoffe beeinflussen, zählen Vertreter der *ATP-binding cassette* (ABC) Überfamilie sowie der *solute carrier* (SLC) Überfamilie [21].



### 1.3 ABC-Transporter

Die Überfamilie der ABC-Transporter besteht aus bislang 49 im humanen Körper detektierten und charakterisierten Mitgliedern [10]. Anhand der Homologie von Aminosäuren und der Anordnung der Domänen lassen sie sich in die sieben Unterfamilien ABCA – ABCG einordnen [23, 24]. Die Mehrzahl der humanen ABC-Transporterproteine besitzt typischerweise zwei *membranständige Domänen* (*Membrane Spanning Domain* = MSD), welche jeweils aus sechs membrangängigen  $\alpha$ -Helices bestehen, und zwei *ATP-bindende Domänen* (*Nucleotide Binding Domain* = NBD) [23] (siehe Abbildung A.3). Die beiden ATP-bindenden Domänen binden und hydrolysieren ATP (Adenosintriphosphat), wobei die freigesetzte Energie dazu verwendet wird, Substrate entgegen ihres elektrochemischen Gradienten über Membranen hinweg zu translokalisieren [10]. Der Transport kann dabei sowohl in die Zelle hinein als auch aus der Zelle heraus gerichtet sein und auch an Membranen von Zellorganellen, wie Mitochondrien und Golgi-Apparat, stattfinden [10]. Ein weites Spektrum an Substraten wird von ABC-Transporterproteinen über biologische Lipidmembranen translokalisiert, darunter befinden sich neben Sacchariden, Aminosäuren und Peptiden auch eine Vielzahl an hydrophoben Substanzen [23]. ABC-Transporter kommen in nahezu jedem Zelltyp in allen Spezies vor und spielen eine zentrale Rolle in physiologischen Prozessen wie dem Transport von Lipiden und der Sterin-Homöostase [10, 24, 25].

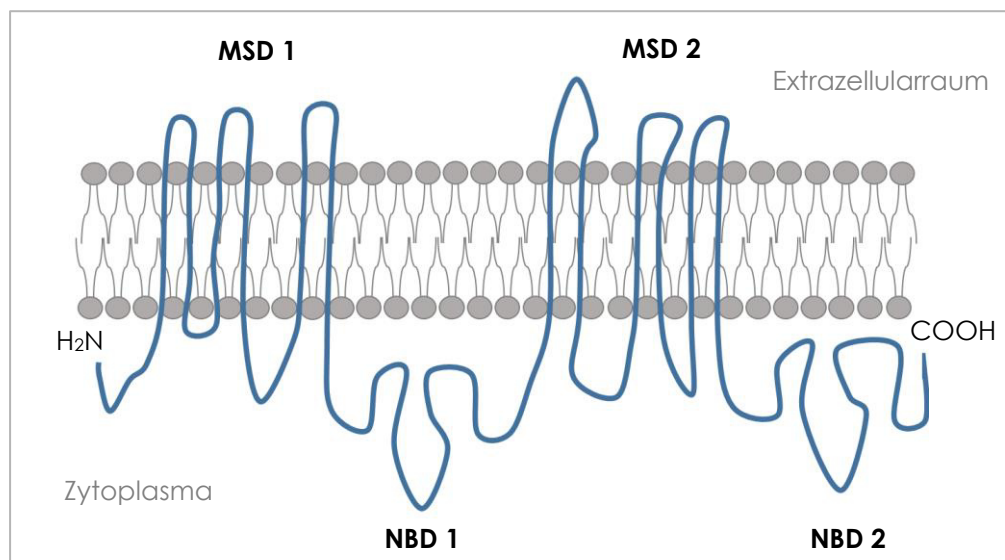


Abbildung A.3: Schematische planare Darstellung des MDR1-Transporterproteins in der Doppellipidschicht biologischer Membranen (modifiziert nach [26, 27]). Charakteristisch für membranständige ATP-Pumpen sind zwei homologe Hälften mit je einer membranständigen Domäne (MSD) und einer ATP-bindenden Domäne (Nucleotide Binding Domain = NBD).

### 1.3.1 MDR1

Das Gen ABCB1, lokalisiert auf Chromosom 7q21.12, kodiert für das Multidrug-Resistance Protein 1 (MDR1), auch bekannt als P-Glykoprotein (P-gp) [10, 28]. Das humane MDR1 ist ein glykosyliertes Membranprotein bestehend aus 1280 Aminosäuren (170 kDa), welche sich in zwei homologe Hälften mit jeweils einer MSD und einer NBD anordnen (Abbildung A.3) [27]. Unter *Multidrug Resistance* (MDR) wurde das Phänomen beschrieben, dass Tumorzellen, wenn sie gegen einen zytotoxischen Wirkstoff resistent waren, gleichzeitig auch gegenüber einer großen Vielfalt an strukturell und funktionell unterschiedlichen Substanzen eine Kreuzresistenz entwickelten [27, 29]. Diese Zellen zeigten oftmals eine ATP-abhängige Abnahme der zellulären Akkumulation einer Substanz sowie eine deutliche Überexpression an MDR1 [26, 27, 29]. Inzwischen wird der Begriff, unabhängig von seinem onkologischen Ursprung, allgemein für das Nichtansprechen von Wirkstoffen auf deren Zielzellen oder -organismen eingesetzt. MDR1 wird in verschiedenen Geweben des menschlichen Körpers in der apikalen Zellmembran exprimiert, insbesondere an physiologischen Barrieren, wie der Blut-Hirn-Schranke und dem Dünndarmepithel, sowie in Epithelzellen, die ein exkretorisches Kompartiment begrenzen [20]. Es trägt unter anderem zur renalen und biliären Ausscheidung von Xenobiotika sowie zum Schutz des Zentralnervensystems und anderer Gewebe vor der Akkumulation von Arzneistoffen und der daraus resultierenden Toxizität bei [20, 26]. MDR1 ist der meist untersuchte Efflux-Transporter, da ein breites Spektrum verschiedenster Wirkstoffe und deren Konjugate vom Zellinneren in den extrazellulären Raum transportiert werden [18]. Damit kann eine Überexpression von MDR1 die Bioverfügbarkeit von Arzneistoffen beeinflussen und in einer klinisch relevanten Wirkabschwächung oder kompletten Resistenz resultieren [27]. Daneben treten bedingt durch Induktion oder Inhibition des MDR1 Interaktionen zwischen Arzneistoffen auf (siehe 1.2). Substrate des MDR1 sind generell hydrophobe Moleküle, meist mit kationischen Eigenschaften [20]. Beispielhaft sind Zytostatika, wie Docetaxel, Vincristin und Doxorubicin, Kardiaka, wie Digoxin und Carvedilol, sowie Immunsuppressiva, wie Cyclosporin A und Tacrolimus, zu nennen [18, 20].

### 1.3.2 MRP1

Eine Unterfamilie der ABC-Transporter, welche ebenfalls in Korrelation mit Resistenzen von Wirkstoffen steht, ist die Gruppe der *Multidrug Resistance-Related Proteine* (MRP), mit aktuell neun bekannten Membranproteinen [30-32]. Der bereits 1992 geklonte erste Vertreter dieser Familie ist MRP1, kodiert durch das Gen ABCC1 auf Chromosom 16p13.1 [31]. Im Gegensatz zu der typischen Struktur der meisten ABC-Transporter (siehe 1.3) besteht MRP1 aus drei membranständigen Domänen (MSD) mit insgesamt 17 transmembranen  $\alpha$ -Helices und aus zwei ATP-bindenden Domänen (NBD) [31] (siehe Abbildung A.4).

Der N-Terminus des Proteins liegt auf der extrazellulären Seite der Plasmamembran. MRP1 fungiert in erster Linie als Efflux-Transporter für organische Anionen, wobei die Substratspezifität sehr umfassend ist [31]. Neben Xenobiotika, wie Methotrexat, Vincristin, Ciprofloxacin und Atorvastatin, sind auch endogene Stoffe bekannte Substrate von MRP1 [30, 31]. Zu ihnen zählen unter anderem Folsäure, Vitamin B12, Bilirubin und Leukotrien C4 sowie das ubiquitär in Zellen vorkommende tripeptidische Thiol Glutathion (GSH) [31]. Des Weiteren werden eine Reihe von Substanzen konjugiert an GSH (z. B. Paracetamol), mit Glucuronsäure (z. B. 17 $\beta$ -Estradiol) oder als Sulfat (z. B. Estron) über MRP1 transportiert [31]. Der Membrantransport von MRP1-Substraten kann unabhängig oder in Abhängigkeit von GSH verlaufen, da GSH sowohl als Cosubstrat als auch als Stimulus des Transports fungieren kann [30, 31]. MRP1 wird in den meisten humanen Geweben exprimiert und ist überwiegend an der basolateralen Zelloberfläche angesiedelt [26]. Auch in Tumorzellen wurde die Expression von MRP1 gezeigt, was die Therapieresistenzen von zytostatischen Arzneistoffen wie Doxorubicin, Etoposid und Methotrexat begründen kann [32].

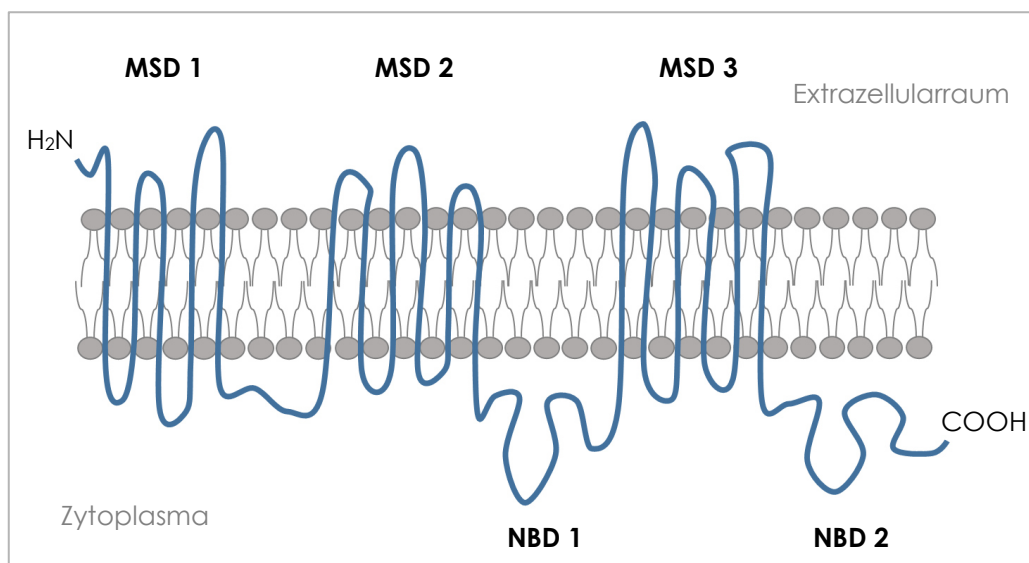


Abbildung A.4: Schematische planare Darstellung des MRP1-Transporterproteins in der Doppellipidschicht biologischer Membranen (modifiziert nach [26, 31]). Atypisch für membranständige ATP-Pumpen ist die hier vorliegende 5-Domänen-Struktur mit drei membranständigen Domänen (MSD) und zwei ATP-bindenden Domänen (Nucleotide Binding Domain = NBD).

### 1.3.3 MRP5

Ein weiterer ubiquitär in humanem Gewebe vorkommender MRP-Transporter ist MRP5, kodiert durch das Gen *ABCC5* auf Chromosom 3q27 [24]. Im Gegensatz zu MRP1 (siehe 1.3.2) ist MRP5, mit zwei MSD und zwei NBD, strukturell dem MDR1-Transporter ähnlich (siehe Abbildung A.3) [30]. Es vermittelt in erster Linie den Transport von organischen Anionen,

beispielsweise von Glucuronid-, Sulfat-, Glutamat- und GSH-Konjugaten [32, 33]. Inwiefern GSH zum Transport benötigt wird, ist noch nicht eindeutig geklärt [32]. Weiterhin ist MRP5 beteiligt am Transport von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) und cyclischem Guanosinmonophosphat (cGMP) [32]. In den meisten Zellen wird MRP5 an der basolateralen Plasmamembran exprimiert und fungiert als Efflux-Transporter [33]. MRP5 kann Resistenzen mehrerer Nukleotid- und Purin-Analoga begünstigen, unter anderem von Adefovir, 6-Mercaptopurin und 6-Thioguanin [23, 30]. Im Vergleich zu den übrigen Vertretern der MRP-Transporter werden MRP1 und MRP5 in der humanen Lunge auf mRNA-Ebene stark exprimiert [25, 34], weshalb sie für die vorliegende Arbeit relevant waren.

## 1.4 SLC-Transporter

Die Überfamilie der *solute carrier* (SLC) umfasst inzwischen 52 Familien mit insgesamt beinahe 400 Vertretern [12, 35]. Ein Transporter wird einer bestimmten Familie zugeordnet, wenn dessen Aminosäuresequenz mindestens 20 % Identität zu einem anderen Mitglied dieser Familie aufweist [12]. SLC-Transporterproteine umfassen funktionell sowohl passive Uniporter als auch sekundär aktive Symporter und Antiporter [36]. Das breite Substrat-Spektrum dieser Überfamilie reicht von anorganischen Kationen und Anionen über Aminosäuren, Vitamine und Zuckermoleküle bis hin zu Lipiden, Oligopeptiden und Neurotransmittern [36]. Für die vorliegende Arbeit von Interesse waren Vertreter der Familien SLC15 (Proton/Oligopeptid-Cotransporter), SLC22 (organische Kationen-/Anionen-/Zwitterionen-Transporter) und SLC47 (Multidrug and Toxin Extrusion (MATE) Transporter) [12, 35].

### 1.4.1 PEPT2

Transporter aus der Familie der Proton/Oligopeptid-Cotransporter (SLC15) nutzen den Protonengradienten an Zellmembranen zur simultanen Aufnahme von kurzkettingen Peptiden und Peptid-ähnlichen Strukturen in Zellen [37]. Die beiden Oligopeptid-Transporter PEPT1 und PEPT2 zeigen in ihrer Primärstruktur eine Identität von 50 % auf und haben im Wesentlichen die gleichen Substrate [37, 38]. Funktionelle Untersuchungen zeigten dabei allerdings, dass PEPT1 mit geringer Affinität und hoher Kapazität agiert, PEPT2 dagegen mit hoher Affinität und geringer Kapazität [37]. Beide Proteine können im Grunde alle denkbaren Di- und Tripeptide transportieren und auch Arzneistoffe mit Peptid-ähnlicher Struktur, darunter  $\beta$ -Lactam-Antibiotika und ACE-Hemmer, zählen zu ihren Substraten [37]. Es ist mittlerweile unumstritten, dass die beiden Transporter zur hohen Bioverfügbarkeit von Wirkstoffen mit Peptid-ähnlicher Struktur beitragen [21]. Im Gegensatz zu PEPT1 wird PEPT2 in der humanen Lunge, genauer an der apikalen Membran von

Bronchialepithelzellen und Typ II-Pneumozyten, exprimiert [37]. Die Primärstruktur von PEPT2 besteht aus 729 Aminosäuren und wird durch das Gen SLC15A2 auf Chromosom 3q13.33 kodiert [37, 38]. Die Struktur enthält zwölf *transmembrane Domänen (TMD)*, wobei der N- und der C-Terminus im Zytoplasma lokalisiert sind (siehe Abbildung A.5) [37, 38]. Die transmembranen Domänen 1 – 4 sowie 7 – 9 wurden als relevante Regionen für die Substratbindung und Transporterfunktion identifiziert [37]. Des Weiteren wurden in der Struktur von PEPT2 fünf Erkennungsstellen für Proteinkinase C postuliert [37]. Inwieweit dort tatsächlich eine Phosphorylierung stattfindet ist bisher nicht bekannt [37].

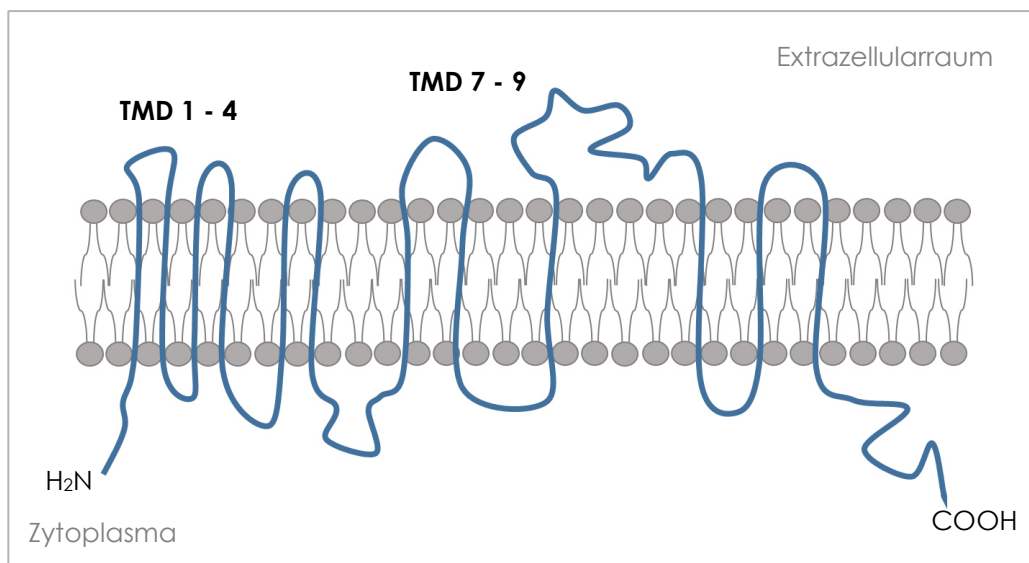


Abbildung A.5: Schematische planare Darstellung des PEPT2-Transporterproteins in der Doppellipidschicht biologischer Membranen (modifiziert nach [37]). Von den zwölf transmembranen Domänen (TMD) wurden TMD 1 – 4 und 7 – 9 als relevant für die Substratbindung und Transporterfunktion identifiziert.

### 1.4.2 OCT1

Die SLC22 Familie umfasst bisher 23 Transporter, von welchen inzwischen 13 funktionell charakterisiert wurden [35, 39]. Generell agieren diese als organische Kationentransporter (OCT), organische Anionentransporter (OAT) sowie organische Kationen/Carnitin-Transporter (OCTN) [35, 39, 40]. Die vermutete Membran-Topologie der Mitglieder ähnelt sich stark und besteht aus zwölf  $\alpha$ -helikalen transmembranen Domänen (TMD), einem großen extrazellulären Loop zwischen TMD 1 und 2 und einem großen intrazellulären Loop zwischen TMD 6 und 7 (siehe Abbildung A.6) [39]. Der extrazelluläre Loop vermittelt eine Oligomerisierung der Transporterproteine, der intrazelluläre Loop besitzt jeweils mehrere postulierte Phosphorylierungsstellen und ist in die posttranskriptionale Regulation involviert [39, 41, 42].

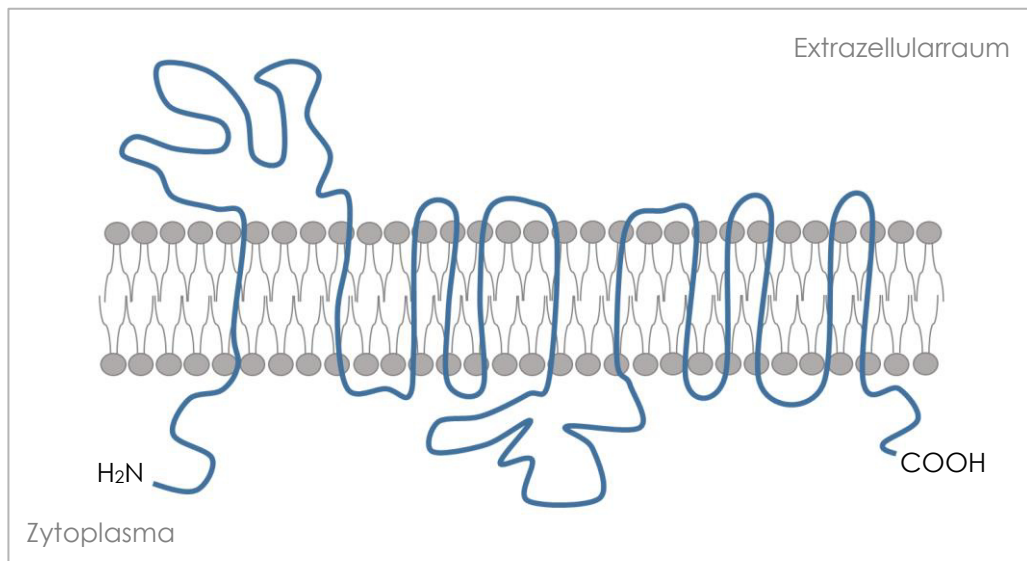


Abbildung A.6: Schematische planare Darstellung des OCT1-Transporterproteins in der Doppellipidschicht biologischer Membranen (modifiziert nach [39, 42]). Zwölf transmembrane Domänen (TMD), ein großer extrazellulärer Loop zwischen TMD 1 und 2 sowie ein großer intrazellulärer Loop zwischen TMD 6 und 7 sind charakteristisch für alle Transporter der SLC22-Familie.

Das Gen SLC22A1 befindet sich auf Chromosom 6q25.3 und kodiert für den organischen Kationentransporter OCT1, wobei die längere und prädominante zweier Isoformen ein funktionales Protein mit 554 Aminosäuren bildet [28, 39]. OCT1 ist vorrangig in der sinusoidalen Membran humaner Hepatozyten, aber auch in weiteren Organen wie beispielsweise dem Dünndarm, dem Herz und der Lunge sowie in verschiedensten Tumorgeweben, zu finden [20, 39]. OCT1 fungiert als Uniporter und vermittelt bei der hepatischen Ausscheidung vieler kationischer Xenobiotika den ersten Schritt durch deren Aufnahme in Hepatozyten [35, 39]. Zu den Substraten von OCT1 zählen neben mono- und bivalenten organischen Kationen auch schwache Basen und ungeladene Moleküle [39]. Unter anderem werden antivirale Arzneistoffe (Lamivudin und Aciclovir), antineoplastische Substanzen (Oxaliplatin und Picoplatin) und das Antidiabetikum Metformin von OCT1 transportiert [39, 43-45]. Metformin zählt zu den weltweit am häufigsten verschriebenen Arzneistoffen zur Behandlung von Diabetes mellitus Typ 2 und bewirkt eine reduzierte Gluconeogenese in Hepatozyten [13]. Zu klinisch relevanten Wechselwirkungen kann es kommen, wenn die OCT1-vermittelte Aufnahme von Metformin in Hepatozyten durch starke OCT1-Inhibitoren, wie beispielsweise Protonenpumpeninhibitoren oder einige Tyrosinkinaseinhibitoren, gehemmt wird [13, 20, 45, 46]. Daneben hat der humane OCT1 eine weit verbreitete (> 20 %) nicht-synonyme Variante, zeigt ethnische Unterschiede im Expressionsmuster und ist somit als hoch polymorph einzustufen [47, 48]. Die großen interindividuellen Expressionsunterschiede von OCT1 können zu starken Schwankungen in der hepatischen Eliminierung führen und zu klinisch relevanten Unterschieden in der Arzneimittelwirkung beitragen [39, 48, 49].

### 1.4.3 OCT2

Der humane organische Kationentransporter OCT2 wird durch das Gen SLC22A2 auf Chromosom 6q25.3 kodiert und umfasst 555 Aminosäuren [28, 39]. Die Tertiärstruktur in der Plasmamembran ähnelt der des OCT1 (siehe Abbildung A.6). OCT2 agiert ebenfalls als Uniporter, jedoch unterscheiden sich die beiden Transporter in ihrer Gewebeverteilung [39, 50]. OCT2 wird hauptsächlich in der basolateralen Membran der humanen proximalen Nierentubuli exprimiert und ist damit in die renale Ausscheidung vieler organischer Substanzen involviert [50]. Daneben wurde auch die Expression in anderen Organen wie Dünndarm, Lunge und Gehirn sowie in Neuronen nachgewiesen [20, 39]. Zwischen den humanen organischen Kationentransportern OCT1, OCT2 und OCT3 gibt es sowohl bezüglich der Substratspezifität als auch bezüglich der Spezifität von Inhibitoren Überschneidungen [39]. Zu den endogenen Substraten von OCT2 zählen unter anderem die Neurotransmitter Acetylcholin, Dopamin, Adrenalin, Serotonin und Histamin [39]. Arzneistoffe, die als OCT2-Substrate identifiziert wurden, umfassen neben antiviralen und antineoplastischen Arzneistoffen (siehe 1.4.2) auch NMDA-Rezeptor-Antagonisten (Memantin und Amantadin), H<sub>2</sub>-Rezeptorantagonisten (Cimetidin, Famotidin und Ranitidin), das Diuretikum Amilorid sowie Metformin [20, 39]. Da OCT2 den ersten Schritt in der renalen Exkretion vieler kationischer Arzneistoffe vermittelt, kann eine Inhibition des Transporters zu klinisch relevanten Wechselwirkungen führen [51]. Bekanntester OCT2-Inhibitor ist das Antihistaminikum Cimetidin, welches bei gleichzeitiger Gabe eine 1,5-fache Erhöhung der Plasma-AUC von Metformin, Pindolol und des Antiarrhythmikums Dofetilid zur Folge hatte [16]. Kido et al. untersuchten mehr als 900 Arzneistoffe hinsichtlich ihrer inhibitorischen Wirkung auf OCT2, wovon 244 eine 50-prozentige Reduktion der OCT2-vermittelten Aufnahme zeigten [51]. Die Substanzen gehörten verschiedensten strukturellen und pharmakologischen Klassen an, weshalb FDA (U.S. Food and Drug Administration) und EMA (European Medicines Agency) für vorrangig renal eliminierte neue Substanzen die Testung auf eine potentielle OCT2-Inhibition empfehlen [15, 16, 51]. Auch SLC22A2 weist eine häufige nicht-synonyme Variante auf, die für ein Protein mit eingeschränkter Funktion kodiert und somit zu einer verringerten renalen Ausscheidung kationischer Substanzen führen kann [39, 47]. Darüber hinaus ist die renale OCT2-Expression während eines akuten oder chronischen Nierenversagens verringert, was ebenfalls zu veränderten pharmakokinetischen Eigenschaften und Nephrotoxizität von OCT2-Substraten führen kann [39].

### 1.4.4 OCT3

SLC22A3 kodiert für den humanen organischen Kationentransporter OCT3 und ist auf Chromosom 6q25.3 lokalisiert [18, 39]. Das funktionelle Protein aus 556 Aminosäuren fungiert, wie OCT1 und OCT2, als Potential-sensitiver Uniporter zur Aufnahme kleiner

kationischer Moleküle und hat ebenfalls eine charakteristische Membran-Topologie mit zwölf transmembranen Domänen (siehe Abbildung A.6) [28, 39, 52]. OCT3 transportiert endogene Substanzen, wie Neurotransmitter (Adrenalin, Noradrenalin und Histamin), und Arzneistoffe, wie das Lokalanästhetikum Lidocain, das Antiarrhythmikum Chinidin und das Sympathomimetikum Etilefrin sowie Metformin, Oxaliplatin und Lamivudin, wobei es zu Überschneidungen mit der Substratspezifität von OCT1 und OCT2 kommt (siehe 1.4.2 und 1.4.3) [39]. Im Gegensatz zu OCT1 und OCT2, die überwiegend in einem der beiden eliminierenden Organen Leber und respektive Niere exprimiert werden, weist OCT3 ein breites Expressionsmuster in verschiedensten Geweben auf [18, 39]. Im Zentralnervensystem spielt OCT3 eine Schlüsselrolle bei der Aufnahme von Neurotransmittern und könnte therapeutisch relevant für neuropsychiatrische Erkrankungen sein, indem es kationische Arzneistoffe über die Blut-Hirn-Schranke transportiert [39, 40, 53]. OCT3 wird auch in der Plazenta stark exprimiert und trägt wahrscheinlich zur maternofetalen Passage von kationischen Substanzen bei [52, 54]. Inhibitoren des OCT3-vermittelten Transports, wie  $\beta$ -Estradiol, sowie OCT3-Missense-Mutationen können den pharmakologischen Effekt von Metformin reduzieren, Kardiotoxizität von OCT3-Substraten induzieren sowie zur fetalen Intoxikation bei Behandlung Schwangerer mit kationischen Substanzen führen [39, 55].

### 1.4.5 OCTN1

In einem Cluster auf Chromosom 5q31.1 befinden sich die beiden Gene SLC22A4 und SLC22A5, welche für die organischen Kationen/Carnitin-Transporter 1 und 2 (OCTN1 und respektive OCTN2) kodieren [39]. Der humane OCTN1 setzt sich aus 551 Aminosäuren zusammen und bildet zwölf transmembrane Domänen aus (siehe Abbildung A.6) [28, 39, 56]. Im Vergleich zu den übrigen Mitgliedern der SLC22-Familie besitzt OCTN1 eine intrazelluläre Nukleotid-Bindestelle, welche wahrscheinlich in die Regulation der Transportaktivität involviert ist [57]. OCTN1 ist ein multispezifischer, bidirektionaler und pH-abhängiger Transporter, der sowohl als Protonen/Kationen-Antiporter als auch als Uniporter für organische Kationen fungiert [39, 57, 58]. Zu den von OCTN1 transportierten Kationen gehören beispielsweise Acetylcholin, Chinidin, die beiden Anticholinergika Ipratropium und Tiotropium und der Calciumkanalantagonist Verapamil [39, 57]. Des Weiteren werden auch Zwitterionen, wie L-Carnitin, das Antioxidans Ergothionin und das Antikonvulsivum Gabapentin, von OCTN1 und OCTN2 transportiert, wodurch sie sich bezüglich ihrer Substratspezifität von den organischen Kationentransportern OCT1-3 abgrenzen [39, 57]. Vor allem in humanem Knochenmark, im Skelettmuskel, in der Niere und in der Trachea wurde eine hohe OCTN1-Expression beobachtet, in vielen weiteren Geweben wurde OCTN1 in einem geringeren Ausmaß detektiert [41]. Neben der Lokalisation in der luminalen Plasmamembran von Zellen wird der humane OCTN1 auch in der Mitochondrien-



membran ausgebildet [39]. Im renalen proximalen Tubulus ist OCTN1 an der Sekretion von Kationen sowie an der Reabsorption von Zwitterionen beteiligt [39]. Zu den OCTN1-Inhibitoren zählen Cimetidin, Chinidin, Verapamil, L-Carnitin und die Chinolon-Antibiotika Levofloxacin und Ofloxacin [58]. SLC22A4-Mutationen wurden mit inflammatorischen Erkrankungen wie Rheumatoider Arthritis, Morbus Crohn und Asthma bronchiale assoziiert [57]. In Patienten mit Einzelnukleotid-Polymorphismen (single nucleotide polymorphisms = SNPs) wurde eine verminderte renale Clearance von Gabapentin festgestellt [57].

### 1.4.6 OCTN2

Das funktionelle humane OCTN2-Protein, kodiert durch SLC22A5, besteht aus 557 Aminosäuren mit 75,8 % Ähnlichkeit zu OCTN1 und formiert ebenfalls zwölf transmembrane Domänen (TMD) (Abbildung A.6) [56, 59]. Es wird vermutet, dass TMD 4 und 11 am Transportweg oder an der Bindestelle beteiligt sind [41]. OCTN2 agiert als hoch-affiner Na<sup>+</sup>/Carnitin-Cotransporter, wobei der Carnitin-Transport elektrogen und stereospezifisch ist und Natriumionen die Affinität für L-Carnitin erhöhen [41, 56, 60]. Alternativ fungiert OCTN2 auch als polyspezifischer, bidirektionaler und Na<sup>+</sup>-unabhängiger Uniporter für organische Kationen [39, 41, 59]. Das Vorkommen von OCTN2 im Menschen ist beinahe ubiquitär mit der höchsten Expression in Niere, Leber, Skelettmuskel, Herz und Plazenta [41]. In Epithelzellen des renalen proximalen Tubulus und des Dünndarms ist OCTN2 in der luminalen Membran zu finden, wobei es im Dünndarm die Absorption von L-Carnitin aus der Nahrung und in der Niere die Reabsorption von kationischen und Zwitterionischen Substanzen aus dem Primärharn vermittelt [39]. Neben L-Carnitin gehören beispielsweise das zwitterionische Betalaktam-Antibiotikum Cephaloridin sowie kationische Arzneistoffe wie Verapamil, Oxaliplatin und Ipratropium zu den OCTN2-Substraten [39]. Sowohl die L-enantiomere Form des Carnitins als auch D-Carnitin bewirkten eine Abnahme des OCTN2-vermittelten Transports [56]. Als weitere OCTN2-Inhibitoren wurden beispielsweise Cimetidin, Verapamil und Nicotin identifiziert [41, 61]. Mehrere SNPs des SLC22A5 wurden in der Promotorregion sowie in der kodierenden Region ausgemacht, die zu einer eingeschränkten Funktion oder reduzierten Expression von OCTN2 führen [39, 62]. Diese Mutationen können in einem primären systemischen L-Carnitin-Mangel resultieren, da die Rückresorption von L-Carnitin in der Niere stark reduziert ist [62, 63]. Der Mangel an dem für die Oxidation von Fettsäuren essenziellen L-Carnitin (siehe 2.1.2) kann bei jüngeren Kindern eine hypoketonische Hypoglykämie, ein Reye-Syndrom oder den plötzlichen Kindstod hervorrufen, bei späterem Auftreten führt er zu Symptomen wie Kardiomyopathie und Muskelschwäche [64-66]. Daneben werden Mutationen in SLC22A in Verbindung mit einem erhöhten Risiko für chronisch-entzündliche Darmerkrankungen wie Morbus Crohn gebracht, wobei diese Annahme kontrovers diskutiert wird [39, 62]. Agonisten des Peroxisomen-Proliferator-aktivierten

Rezeptors  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ), wie Clofibrat, und PPAR $\gamma$ -Agonisten, wie das Glitazon-Antidiabetikum Rosiglitazon, erhöhen die OCTN2-Expression im Dünndarm respektive Kolon, wovon Patienten mit chronisch-entzündlicher Darmerkrankung eventuell profitieren könnten [39, 67].

### 1.4.7 MATE1

Der SLC47-Familie der *Multidrug and Toxin Extrusion* (MATE) Transporter wurden bislang nur zwei Gene, SLC47A1 und SLC47A2, zugeordnet, wobei letzteres durch unterschiedliche Splicevarianten in den drei Isoformen MATE2, MATE2-K und MATE2-B ausgeprägt ist [35, 68]. MATE2-K wird derzeit als die einzige aktive Form des SLC47A2-Gens postuliert und wird spezifisch in der Niere exprimiert [69-71]. Der humane MATE1-Transporter, kodiert durch SLC47A1 auf Chromosom 17p11.2, wird dagegen in vielen Geweben exprimiert, darunter Leber, Niere, Skelettmuskel und in geringerem Ausmaß auch in der Lunge [28, 69, 70]. Für das funktionelle MATE1-Protein wird dabei von 570 Aminosäuren mit wahrscheinlich 13 transmembranen Domänen ausgegangen (siehe Abbildung A.7) [69, 71].

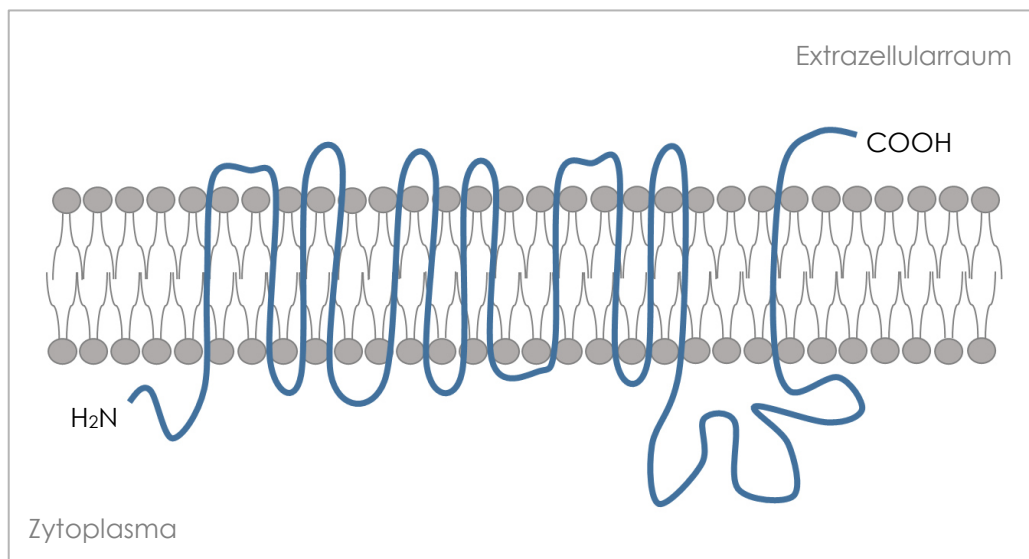


Abbildung A.7: Schematische planare Darstellung des MATE1-Transporterproteins in der Doppellipidschicht biologischer Membran (modifiziert nach [69, 71]). Der extrazelluläre C-Terminus sowie 13 transmembrane Domänen gelten als wahrscheinlich.

Der humane MATE1-Transporter wurde als H<sup>+</sup>/Kationen-Antiporter identifiziert, welcher auf der apikalen Seite von Epithelzellen als Efflux-Transporter für organische Kationen agiert [69, 71]. Da MATE1 in der luminalen Membran des proximalen Tubulus exprimiert wird, ist eine Beteiligung des Transporters an der renalen Sekretion von kationischen Arzneistoffen

wahrscheinlich [69]. Dabei steht er vermutlich im Zusammenspiel mit den auf der basolateralen Seite des Nierenepithels exprimierten Transportern OCT1-3, die eine Aufnahme von kationischen Substanzen in Epithelzellen vermitteln [71]. Zu den Substraten des MATE1-Transporters zählen neben kationischen Arzneistoffen, wie Cimetidin und Metformin, und zwitterionischen Substanzen, wie dem Betalaktam-Antibiotikum Cefalexin, auch einige anionische Substanzen, wie Estronsulfat und Aciclovir [69, 71]. Inhibitoren sind unter anderem H<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonisten (Cimetidin, Famotidin und Ranitidin), HIV-Proteaseinhibitoren (Ritonavir und Indinavir) sowie das Malaria-therapeutikum Pyrimethamin [69, 72]. Eine reduzierte renale Ausscheidung von Metformin durch MATE1-Inhibitoren konnte beobachtet werden [69]. Mehrere SNPs wurden detektiert, wovon einige zum totalen Funktionsverlust des MATE1-Proteins führen und somit eine unterschiedliche Distribution organischer Kationen erklären könnten [69]. Eine funktionelle Promotor-Variante von MATE1 zeigte einen signifikanten Einfluss auf die pharmakodynamischen Effekte von Metformin [73].

### 1.5 Lokalisation von Arzneistofftransportern im Lungenepithel

Das lokale Expressionsmuster von Arzneistofftransportern im pulmonalen Gewebe ist nur teilweise bekannt und die funktionelle Bedeutung der Transporter in der intakten Lunge wurde bisher nur in eingeschränktem Umfang untersucht [74]. Nur wenige zuverlässige Daten zur Lokalisation und relativen Expression der Transporter in humanem Bronchialepithel sind vorhanden. Dieses Informationsdefizit kann durch die anatomische und histologische Komplexität der humanen Lunge ansatzweise erklärt werden [74]. Obwohl in der Lunge viele unterschiedliche Typen an Epithelzellen vorhanden sind und diese nur 15 - 20 % der gesamten Zellpopulation im Lungenparenchym ausmachen [74], soll im Folgenden die Lokalisation der untersuchten Arzneistofftransporter im pulmonalen Epithel skizziert werden.

Im Vergleich zu Organen wie Dünndarm, Leber und Niere, welche primär in die Absorption und Elimination von Arzneistoffen involviert sind, wird MDR1 in der humanen Lunge auf mRNA-Ebene nur wenig exprimiert [21, 34]. Wie an anderen biologischen Barrieren wurde MDR1 im Epithel der Bronchien und Bronchiolen in der apikalen Membran detektiert (siehe Abbildung A.8) [75, 76]. Trotz widersprüchlicher Daten zeigte eine neuere Untersuchung die Expression von MDR1 auch im Alveolarepithel, genauer auf der apikalen Seite von Typ I-Pneumozyten [21, 77]. Daneben konnte der MDR1-Transporter auch in alveolaren Makrophagen sowie in Endothelzellen der Bronchialkapillaren nachgewiesen werden [21, 26].

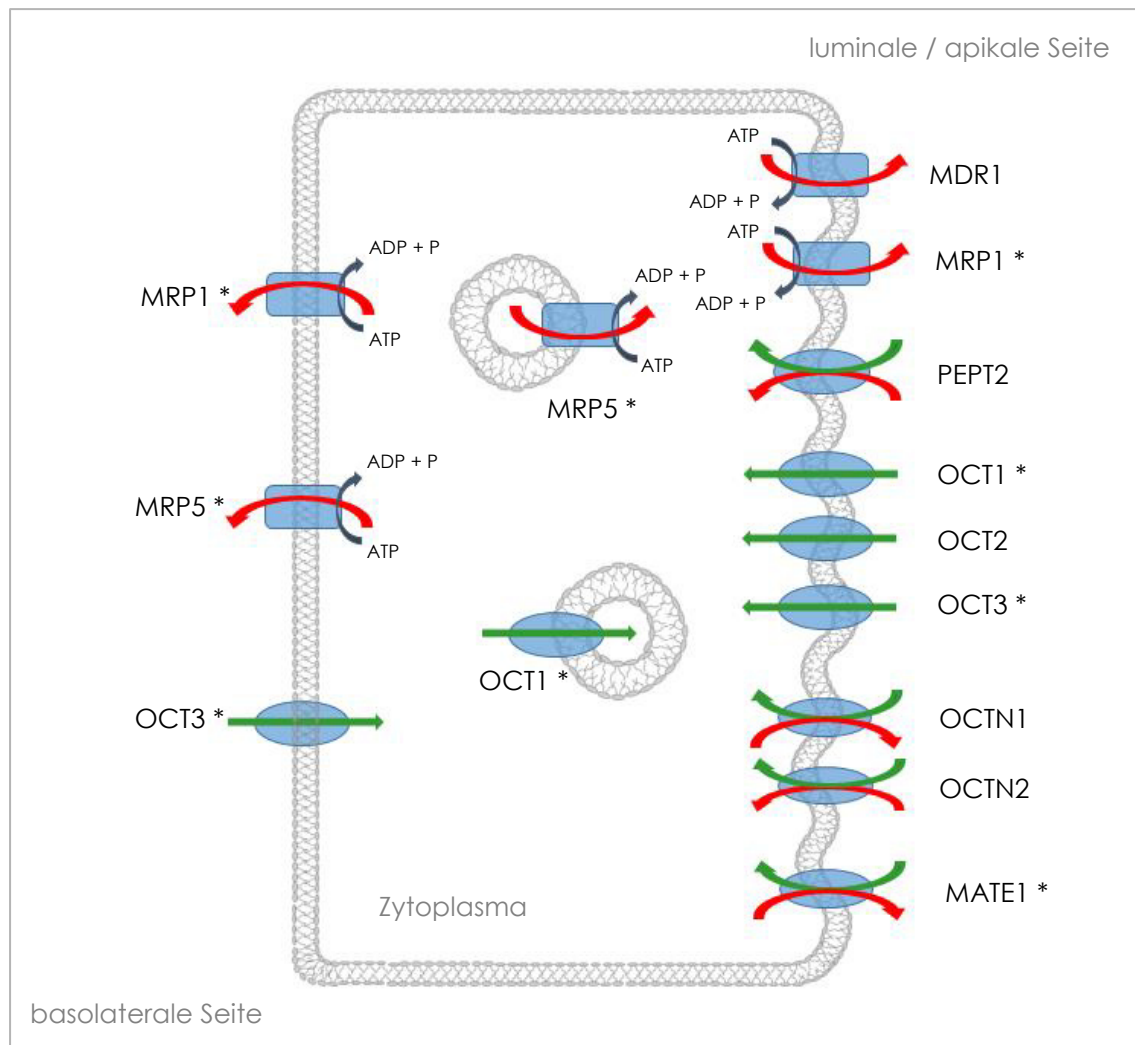


Abbildung A.8: Schematische Darstellung der Lokalisation und Funktion von Arzneistofftransportern in humanen Bronchialepithelzellen. Basolaterale Lage von MRP1, MRP5 und OCT3; luminale / apikale Lage von MDR1, MRP1, PEPT2, OCT1, OCT2, OCT3, OCTN1, OCTN2 und MATE1; intrazelluläre Lage von MRP5 und OCT3. \* kennzeichnet widersprüchliche / unvollständige Daten. OCT1, OCT2 und OCT3: Uniporter; PEPT2 und OCTN2: Symporter; OCTN1 und MATE1: Antiporter; MDR1, MRP1 und MRP5: ATP-abhängige aktive Transporter (Hydrolyse von ATP zu ADP und Phosphat). Grüne Pfeile markieren einen passiven Transport von Molekülen entlang ihres Konzentrationsgradienten, rote Pfeile markieren einen aktiven Transport entgegen des Konzentrationsgradienten. Modifiziert nach [21, 24, 70, 74, 75, 78-80].

Im Gegensatz zu MDR1 ist die mRNA-Expression von MRP1 und MRP5 in humanem Lungengewebe verglichen zu anderen Geweben hoch [25]. MRP1 wurde sowohl in pulmonalen Zelllinien als auch im humanen Bronchialepithel an der basolateralen Membran lokalisiert (Abbildung A.8) [75, 78, 81, 82]. Eine Untersuchung zeigte allerdings an der apikalen Membran des respiratorischen Flimmerepithels eine positive immunhistochemische Färbung für MRP1 [83]. Auch in alveolaren Makrophagen und in Basalzellen konnte MRP1 detektiert werden, alveolare Typ I- und Typ II-Pneumozyten zeigten dagegen keine positive Färbung [21, 26, 82]. MRP5 wird in den meisten Zellen auf der basolateralen Seite ausgebildet [33].

In humanen Bronchialepithelzellen, welche aus humanem Lungengewebe isoliert und anschließend kultiviert wurden, wurde MRP5 jedoch als intrazelluläres Protein beschrieben (Abbildung A.8) [78]. Im Widerspruch dazu wurde MRP5 in der Adenokarzinom-Zelllinie A549 als Plasmamembran-Protein identifiziert [78]. Wenn auch mit geringer Aussagekraft für das Bronchialepithel, konnte MRP5 in stabil transfizierten Zellen auf der basolateralen Membran lokalisiert werden [84].

PEPT2 zeigt, anders als PEPT1, eine relativ hohe mRNA-Expression in der humanen Lunge verglichen zu anderen Geweben [34]. In Epithelzellen der Trachea, der Bronchien und der Bronchiolen wird PEPT2 hauptsächlich in der apikalen Membran exprimiert (siehe Abbildung A.8) [37, 79]. In alveolaren Typ II-Pneumozyten wurde eine Lokalisierung im Zytoplasma detektiert, Typ I-Pneumozyten und alveolare Makrophagen wiesen keine PEPT2-Expression auf [79]. PEPT2 konnte darüber hinaus auch im Endothel kleiner pulmonaler Blutgefäße detektiert werden [79].

Auf mRNA-Ebene werden die organischen Kationen/Carnitin-Transporter OCTN1 und OCTN2 in pulmonalem Gewebe verglichen zu Gewebe aus anderen Organen relativ stark exprimiert, OCT1, OCT2 und OCT3 dagegen nur moderat bis gering [34, 85]. In humanen Zilien-tragenden Bronchialepithelzellen wurden die Transporterproteine OCT1, OCT2 und OCT3 in der luminalen Membran detektiert (siehe Abbildung A.8) [80]. OCT1 zeigte dabei auch innerhalb der Bronchialepithelzellen eine positive Färbung, OCT2 und OCT3 konnten zusätzlich in der gesamten Plasmamembran von Basalzellen gefunden werden [80]. Für OCT3 wurde auch eine positive immunhistochemische Färbung an der basolateralen Membran von Intermediärzellen festgestellt [80]. OCT3 wird außerdem in bronchialen Arterien und in glatten Muskelzellen in den Bronchien exprimiert [86]. Sowohl OCT1, OCT2 und OCT3 als auch OCTN1 und OCTN2 wurden in der alveolaren Epithelzelllinie A549 detektiert [87]. Allerdings gibt es keine Daten zur Lokalisation der Transporter OCT1-3 im distalen Lungengewebe [87]. Für OCTN1 wurde nur eine geringe Expression im humanen alveolaren Epithel ausgemacht, OCTN2 zeigte dagegen im Alveolarepithel eine deutliche Expression [85]. Sowohl OCTN1 als auch OCTN2 zeigten in humanen Epithelzellen der Trachea und der Bronchien eine starke Expression in der apikalen Membran (Abbildung A.8) [85]. Für MATE1 wurde bislang keine Untersuchung zur Lokalisation im pulmonalen Gewebe publiziert. Ausgehend von der Expression des MATE1-Transporters in der apikalen Membran von humanem Nierenepithel wird hier ebenfalls eine luminal Expression im Bronchialepithel angenommen (Abbildung A.8) [70, 71].

## 1.6 Mit Arzneistofftransportern interagierende, pulmonal applizierte Pharmaka

Der Einfluss von Arzneistofftransportern auf die Verteilung inhalierter Wirkstoffe *in vivo* wurde bisher nur im geringen Umfang untersucht, obwohl die Verfügbarkeit der Substanzen an ihrem Wirkort sowie deren pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Parameter teilweise von der Aktivität von Membrantransportern abhängen [21]. Eine Reihe von Untersuchungen beschäftigte sich aber mit der Frage, welche pharmakologisch aktiven Substanzen Substrate von Transporterproteinen sind, beziehungsweise als Induktoren oder Inhibitoren des Transports agieren. Einen Überblick über gängige pulmonal applizierte Wirkstoffe, welche mit Arzneistofftransportern interagieren zeigt Tabelle A.1.

Die inhalativen Glukokortikoide Budesonid und Flunisolid wurden in stabil transfizierten Zellen als Substrate des MDR1 Transporters identifiziert [88, 89]. Beclometasondipropionat, Mometasonfuroat und Ciclesonid, nicht aber Fluticasonpropionat und Triamcinolon verursachten in MDR1-überexprimierenden Kolonkarzinomzellen eine Inhibition des Calcein-Transports [90]. In der Bronchialepithelzelllinie 16HBE14o- reduzierte Budesonid den Transport des MRP1-Modellsubstrates Carboxyfluorescein, wohingegen Formoterol nur einen geringfügigen Effekt aufwies [91]. Ipratropiumbromid zeigte in geringer Konzentration eine Inhibition des MRP1-vermittelten Transports, in hoher Konzentration dagegen tendenziell einen verstärkten Transport [91]. N-Acetylcystein erhöhte den Transport über MRP1 sowohl in stabil transfizierten Zellen als auch in 16HBE14o-Zellen [91, 92]. In der humanen pulmonalen Epithelzelllinie Calu-1 reduzierte Budesonid die MRP1-Expression und führte dabei zu einem sensitivierenden Effekt für das Zytostatikum Vincristin [93].

OCTN1, OCTN2, OCT1 und OCT2, nicht jedoch OCT3, vermittelten eine Aufnahme von Ipratropiumbromid und Tiotropiumbromid in stabil transfizierte Zellen [94, 95]. Daneben reduzierte Ipratropiumbromid den Transport von Referenz-Substanzen in stabil transfizierte Zellen, welche OCT1, OCT3, OCTN1 oder OCTN2 überexprimierten [96]. Ipratropiumbromid bewirkte überdies auch in der neuen human Zelllinie des proximalen Tubulus Caki-1 eine starke Inhibition des OCTN2-vermittelten L-Carnitin-Transports [97]. Beclometasondipropionat, Budesonid und Fluticasonpropionat inhibierten den Transport des Modellsubstrats Tetraethylammonium (TEA) in OCT2-überexprimierende Zellen [80]. In einem geringeren Ausmaß wurde auch eine Reduktion des Transports in OCT1-stabil transfizierten Zellen durch Beclometasondipropionat und Budesonid beobachtet [80].

Tabelle A.1: Häufige pulmonal applizierte Wirkstoffe, die als Substrate (**S**), Induktoren (erhöhter Transport: **T** ↑) oder Inhibitoren (reduzierter Transport: **T** ↓) von Arzneistofftransportern identifiziert wurden. \* kennzeichnet vermutete Einflüsse auf Transporter. (modifiziert nach [5, 21, 80, 85-100]).

Wirkstoffklasse	Wirkstoff	Transporter	Einfluss	Referenzen
Anticholinergika	Ipratropiumbromid	<b>MRP1</b>	<b>T</b> ↓ / <b>T</b> ↑	[91]
		<b>OCT1</b>	<b>S</b> / <b>T</b> ↓	[94, 96]
		<b>OCT2</b>	<b>S</b>	[94]
		<b>OCT3</b>	<b>T</b> ↓	[96]
		<b>OCTN1</b>	<b>S</b> / <b>T</b> ↓	[95, 96]
		<b>OCTN2</b>	<b>S</b> / <b>T</b> ↓	[95-97]
	Tiotropiumbromid	<b>OCT1</b>	<b>S</b>	[94]
		<b>OCT2</b>	<b>S</b>	[94]
		<b>OCTN1</b>	<b>S</b>	[95]
		<b>OCTN2</b>	<b>S</b>	[95]
Beta-2-Sympathomimetika	Formoterol	<b>OCT1</b>	<b>T</b> ↓	[100]
		<b>OCT2</b>	<b>T</b> ↓	[100]
		<b>OCT3</b>	<b>S</b> * / <b>T</b> ↓	[86, 100]
		<b>OCTN1</b>	<b>S</b> * / <b>T</b> ↓ *	[85]
		<b>OCTN2</b>	<b>S</b> * / <b>T</b> ↓ *	[85]
	Salbutamol	<b>OCT1</b>	<b>S</b> / <b>T</b> ↓	[100]
		<b>OCTN1</b>	<b>S</b> * / <b>T</b> ↓ *	[85]
		<b>OCTN2</b>	<b>S</b> * / <b>T</b> ↓ *	[85, 99]
	Salmeterol	<b>OCT1</b>	<b>T</b> ↓	[100]
		<b>OCT2</b>	<b>T</b> ↓	[100]
<b>OCT3</b>		<b>T</b> ↓	[100]	
Glukokortikoide	Beclometasondipropionat	<b>MDR1</b>	<b>T</b> ↓	[90]
		<b>OCT1</b>	<b>T</b> ↓	[80]
		<b>OCT2</b>	<b>T</b> ↓	[80]
	Budesonid	<b>MDR1</b>	<b>S</b>	[89]
		<b>MRP1</b>	<b>T</b> ↓	[91, 93]
		<b>OCT1</b>	<b>T</b> ↓	[80]
		<b>OCT2</b>	<b>T</b> ↓	[80]
		<b>OCT3</b>	<b>T</b> ↓ *	[86]
	Ciclesonid	<b>MDR1</b>	<b>T</b> ↓	[90]
	Flunisolid	<b>MDR1</b>	<b>S</b>	[88]
	Fluticasonpropionat	<b>OCT2</b>	<b>T</b> ↓	[80]
		<b>OCT3</b>	<b>T</b> ↓ *	[86]
	Mometasonfuroat	<b>MDR1</b>	<b>T</b> ↓	[90]
Mukolytika	N-Acetylcystein	<b>MRP1</b>	<b>T</b> ↑	[91, 92]

Die beiden Beta-2-Sympathomimetika Salbutamol und Formoterol, nicht aber Salmeterol, bewirkten in frisch isolierten primären humanen Bronchialepithelzellen eine reduzierte Aufnahme von 4-[4-(Dimethylamino)-styryl]-N-methylpyridinium (ASP<sup>+</sup>), einem kationischen Modell-Substrat für den OCT-vermittelten Transport [85]. Die Autoren argumentieren mit dieser Beobachtung, dass die beiden Bronchodilatoren um den gleichen Transportmechanismus wie ASP<sup>+</sup>, wahrscheinlich die Aufnahme durch OCTN1 und/oder OCTN2, konkurrieren [85]. Die gleiche Gruppe stellte in humanen bronchialen glatten Muskelzellen eine reduzierte Aufnahme von Formoterol bei gleichzeitiger Inkubation mit Budesonid und Fluticasonpropionat fest und schlussfolgerte einen OCT3-vermittelten Transport von Formoterol [86]. In den humanen Bronchialepithelzelllinien Calu-3 und 16HBE14o- wurde eine Inhibition der Salbutamol-Aufnahme durch OCT-Inhibitoren beobachtet, was auf einen OCT-vermittelten Transport von Salbutamol hinwies [98]. Nach Verabreichung von L-Carnitin und Metacholin wurde für Salbutamol am humanen Lungenperfusionsmodell eine verzögerte Umverteilung in die Perfusionsflüssigkeit festgestellt, wofür eine kompetitive Inhibition von OCTN2 als wahrscheinlich erwogen wurde [99]. Allerdings konnte in keiner der Studien das exakte Mitglied der OCT-Familie ausgemacht werden. Eine neuere Untersuchung zeigte die Aufnahme von Salbutamol in OCT1-überexprimierende Zellen [100]. Darüber hinaus wurde für Salbutamol eine Inhibition des Transports in OCT1-stabil trans-fizierte Zellen konstatiert [100]. Formoterol und Salmeterol inhibierten die Aufnahme von Modellsubstraten in OCT1-, OCT2- und OCT3-exprimierende Zellen, wenn auch für OCT2 jeweils nur in einem geringen Ausmaß [100].



## 2 Analytischer Hintergrund: Prinzip der Genexpressions-Analyse mittels RT-qPCR-Technik

### 2.1 Grundlagen der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit der Entwicklung der Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction = PCR) im Jahr 1983 revolutionierte Kerry Banks Mullis die biochemische Forschung [101, 102] und wurde dafür 1993 mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet. Das Prinzip der PCR beruht auf der physiologisch in allen Lebewesen vorkommenden enzymatischen Vervielfältigung von DNA-Sequenzen während der Replikation. Die DNA-Amplifikation *in vitro* verläuft über mehrere Schritte (siehe Abbildung A.9): Doppelsträngige DNA wird zunächst unter Einwirkung hoher Temperaturen (90 - 95 °C) zu komplementären Einzelsträngen denaturiert [103]. Die Anlagerung spezifischer Oligonukleotid-Sequenzen (Primer) an die DNA-Einzelstränge (Annealing) erfolgt bevorzugt bei Temperaturen zwischen 55 °C und 65 °C [103]. Die Primer bestehen in der Regel aus 15 bis 30 Nukleotiden, welche komplementär zu den gegenläufigen Strängen der Ziel-DNA-Sequenz angeordnet sind. Sie dienen als Startpunkt für die DNA-Polymerasen, welche die Verlängerung des DNA-Doppelstrangs (Elongation) durch den Einbau freier Nukleotide katalysieren [103]. In Abhängigkeit vom Temperaturoptimum der eingesetzten thermostabilen Polymerase (zumeist Taq-Polymerase, Tth-Polymerase oder Pfu-Polymerase) findet dieser Reaktionsschritt bei 60 °C bis 75 °C statt [103]. Am Ende eines PCR-Zyklus liegt die doppelsträngige Ziel-DNA-Sequenz dupliziert vor.

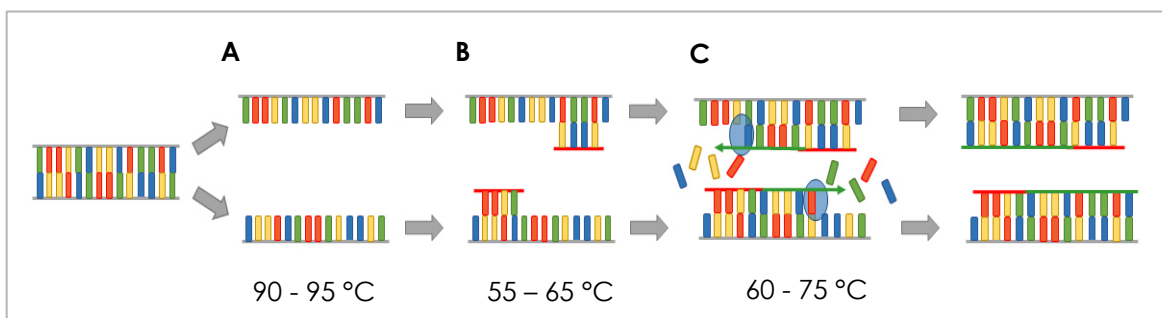


Abbildung A.9: Schematische Darstellung der Reaktionsschritte eines PCR-Zyklus. **A:** Denaturierung der doppelsträngigen DNA zu komplementären Einzelsträngen; **B:** Anlagerung der Primer (Annealing) an die DNA-Einzelstränge; **C:** Komplementäre Verlängerung des DNA-Doppelstrangs (Elongation) durch die DNA-Polymerase (blau) mit freien Nukleotiden (modifiziert nach [103]).

Die zyklische Wiederholung dieser Schritte verbunden mit der exponentiellen Vervielfältigung von Ziel-DNA-Sequenzen ist das zentrale Prinzip der PCR [103]. Gewöhnlich werden 40 Zyklen nacheinander geschaltet, sodass am Ende eines PCR-Experiments in der Theorie die  $2^{40}$ -fache Ausgangsmenge der amplifizierten DNA-Sequenz vorliegt (siehe Abbildung

A.10 A). Die Menge an synthetisierten Ziel-DNA-Sequenzen aufgetragen gegen die Anzahl der Zyklen stellt die Amplifikationskurve einer PCR dar und beschreibt die Reaktionskinetik einer PCR in vier Phasen (siehe Abbildung A.10 B) [103-106]. Die *Grundphase*, in der die Produktmenge relativ gering ist und nicht vom Hintergrund differenziert werden kann, erscheint nahezu linear. In der nachfolgenden *exponentiellen Phase*, auch *geometrische Phase* genannt, findet die ideale exponentielle Vervielfältigung der DNA-Sequenz statt [105]. Während der *linearen Phase* nimmt die Effizienz der PCR kontinuierlich ab und die Amplifikationskurve nähert sich einer arithmetischen Reihe an [107]. Schließlich steigt die Menge an PCR-Produkt in der *Plateau-Phase* nur noch schwach oder überhaupt nicht mehr an, da beispielsweise die Komponenten der PCR nur noch begrenzt vorhanden sind [104].

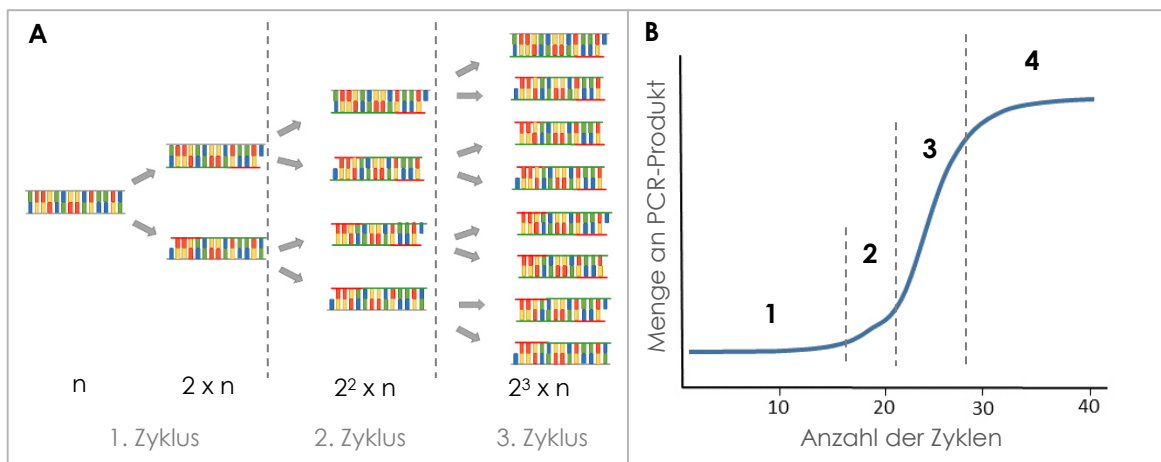


Abbildung A.10: **A:** Schematische Darstellung der exponentiellen Vervielfältigung von Ziel-DNA-Sequenzen während mehrerer PCR-Zyklen. Nach  $i$  Zyklen liegt theoretisch die  $2^i$ -fache Menge der Ausgangsmenge  $n$  der DNA-Sequenz vor. **B:** Schematische Darstellung der Reaktionskinetik einer PCR. Die vier Phasen der Amplifikationskurve sind die Grundphase (1), die exponentielle Phase (2), die lineare Phase (3) sowie die Plateau-Phase (4) (modifiziert nach [103-107]).

## 2.2 Prinzip der quantitativen real-time Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Anfang der neunziger Jahre entwickelten Higuchi et al. die PCR weiter, indem sie Ethidiumbromid, welches in doppelsträngige DNA interkaliert, in den Versuchsansatz dazu gaben und die zur steigenden DNA-Menge proportionale Fluoreszenz kontinuierlich detektierten [108, 109]. Die so entwickelte quantitative real-time Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) beruht auf dem Prinzip der ursprünglichen PCR und ermöglicht zusätzlich die Quantifizierung der Replikat einer DNA-Sequenz in der Ausgangsprobe. Mit dem Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen kann die zur Menge der amplifizierten DNA-Sequenz proportionale Zunahme eines Fluoreszenzsignals am Ende jedes Zyklus detektiert werden und ge-

stattet somit eine Beobachtung der Amplifikationskurve in *Echtzeit* (siehe Abbildung A.11 A und Abbildung A.12) [105]. Wie schnell das Fluoreszenzsignal dabei eine *Schwellenlinie* (*threshold line*) erreicht korreliert mit der Ausgangsmenge der Ziel-DNA-Sequenz in der Probe [110]. Die Schwellenlinie sollte oberhalb des berechneten Fluoreszenz-Grundrauschens in der exponentiellen Phase der Amplifikationskurve gesetzt werden [105]. Der *threshold cycle* ( $C_T$ ), auch *crossing point* ( $C_P$ ) oder *quantification cycle* ( $C_q$ ) genannt, wird als derjenige PCR-Zyklus definiert, an welchem die Fluoreszenz-Kurve der Probe diese Schwellenlinie überschreitet [105, 111, 112]. Die Quantifizierung der Ausgangsmenge an DNA kann sowohl *absolut* als auch *relativ* erfolgen. Insbesondere hinsichtlich der Datenprozessierung, der Normalisierung und der Validierung findet eine kontinuierliche Weiterentwicklung der qPCR-Methodik statt. Im Folgenden soll der aktuelle Wissensstand sowie die akkurate Umsetzung von qPCR-Experimenten nach der aktuell relevanten Leitlinie (*The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments* [112]) dargestellt werden.

### 2.2.1 Absolute und relative Quantifizierung

Um eine Ziel-Sequenz in einer Probe *absolut* zu quantifizieren wird zumeist eine Standardkurve herangezogen [113]. Hierfür wird eine Standard-Probe mit bekannter Kopien-Anzahl der Ziel-Sequenz vorzugsweise zehnfach schrittweise verdünnt [105, 110]. Die so generierten fünf bis sieben Standard-Proben werden zeitgleich zur Probe unbekannter DNA-Ausgangsmenge mittels qPCR vermessen (siehe Abbildung A.11 A). Durch lineare Regression der daraus hervorgegangenen  $C_T$ -Werte, logarithmisch aufgetragen gegen die Anzahl der DNA-Replikate, kann eine Standardkurve erstellt werden, aus welcher sich die Ausgangsmenge der Ziel-DNA-Sequenz in der Probe extrapolieren lässt (siehe Abbildung A.11 B) [107]. Idealerweise sollte die Standardkurve eine Steigung von etwa -3,32 (entspricht 100 % Effizienz) aufweisen, da eine stärker negative Steigung auf eine ineffiziente PCR hindeutet (siehe 2.3.2) [105].

Die relevanteste Limitierung dieser Quantifizierungsmethode liegt in der Notwendigkeit, für jede untersuchte Ziel-Sequenz einen zuverlässigen und unabhängigen Standard zu haben [110]. Eine alternative Berechnungsmethode schätzt deshalb die Kopien-Anzahl in der Ausgangsprobe ohne Verwendung einer Standardkurve anhand der PCR-Effizienz ab, allerdings wird hier eine bekannte Effizienz vorausgesetzt [114].

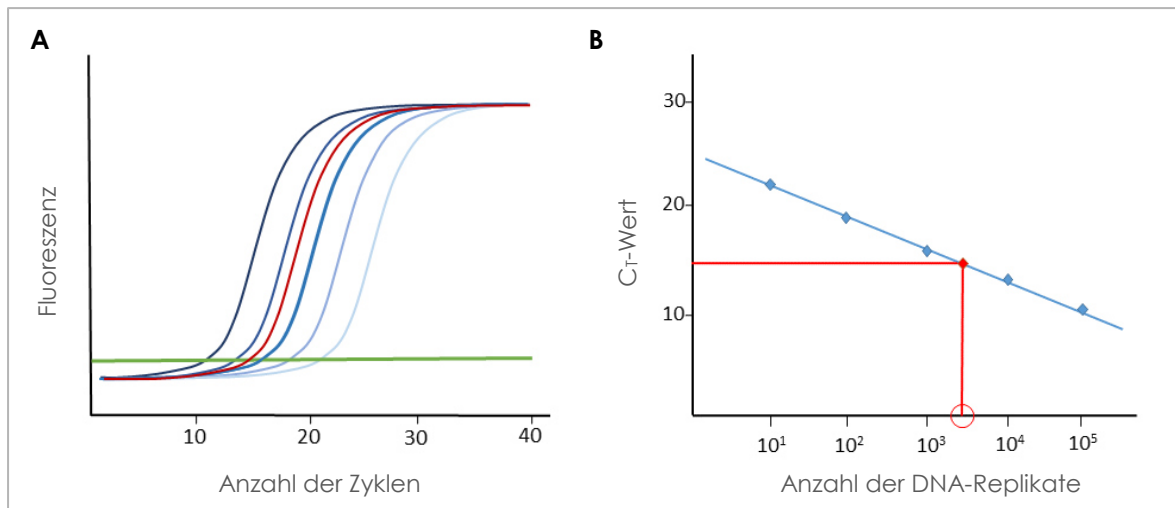


Abbildung A.11: Prinzip der absoluten DNA-Quantifizierung mittels qPCR. **A:** Schematische Darstellung der Amplifikationskurven von fünf Standard-Proben (blau) mit unterschiedlichen, bekannten Ausgangsmengen der Ziel-DNA-Sequenz und von einer Probe mit unbekannter Ausgangsmenge (rot). Die Schwellenlinie (threshold line) ist in grün dargestellt. Der  $C_T$ -Wert liegt dort, wo die Amplifikationskurve aus der Hintergrund-Fluoreszenz austritt und die Schwellenlinie schneidet. **B:** Die ermittelten  $C_T$ -Werte logarithmisch aufgetragen gegen die Anzahl der DNA-Replikate in den Ausgangsproben erlauben die lineare Regression einer Standardkurve. Die Ausgangsmenge in der unbekannt Probe kann über die Standardkurve quantifiziert werden (modifiziert nach [105, 113]).

Die *digitale PCR (dPCR)* ist eine neue Methode zur absoluten Quantifizierung von Nukleinsäuren, welche auf dem Prinzip beruht, dass durch Bildung von bis zu zehn Millionen kleinster Tröpfchen pro Experiment entweder kein oder genau ein Zielmolekül in jeder individuellen Reaktion zu finden ist [115, 116]. Jede Reaktion wird damit binär und die Anzahl der detektierten Signale lässt eine absolute Quantifizierung der DNA-Moleküle zu [115]. Es wurde berichtet, dass die digitale PCR eine größere Richtigkeit und Präzision sowie stärker reproduzierbare Ergebnisse aufweist als die herkömmliche qPCR [115].

Der Großteil an qPCR-Analysen macht jedoch Gebrauch von der *relativen Quantifizierungsmethode* [107]. Vereinfachend wird im Folgenden das Prinzip der relativen Quantifizierung anhand einer Referenz-Sequenz erläutert, jedoch mit dem Hinweis, dass die Verwendung lediglich eines Referenz-Gens in der RT-qPCR-Analytik inzwischen obsolet ist [112] (siehe 2.3.3). Zur relativen Quantifizierung erfolgt die Bestimmung einer Ziel-Oligonukleotid-Sequenz sowohl aus einer Probe (beispielsweise Zellen mit Behandlung) als auch aus einer Kontrolle (beispielsweise Zellen ohne Behandlung) mittels qPCR. Parallel dazu wird auch eine endogene Referenz-Sequenz sowohl in der Probe als auch in der Kontrolle detektiert (siehe Abbildung A.12). Die verwendete endogene Referenz-Sequenz sollte dabei zwischen Probe und Kontrolle möglichst wenig variieren (siehe 2.3.3) [107].

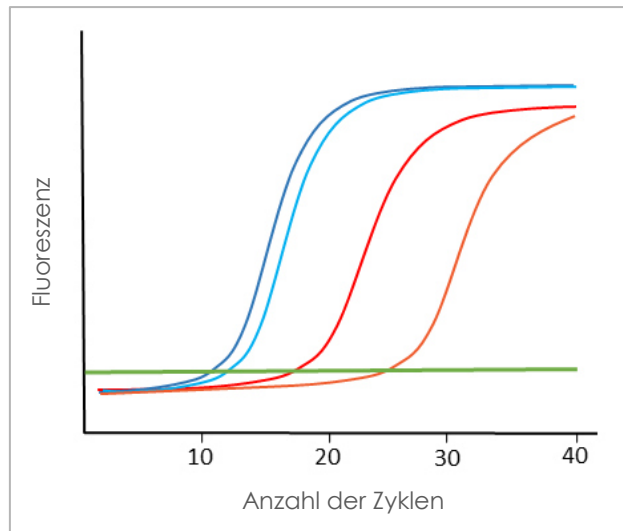


Abbildung A.12: Vereinfachtes Prinzip der relativen DNA-Quantifizierung mittels qPCR. Schematisch dargestellt sind die Amplifikationskurven einer Ziel-Sequenz in einer Probe (rot) und in einer Kontrolle (orange) sowie einer endogenen Referenz-Sequenz in der Probe (dunkelblau) und in der Kontrolle (hellblau). Die Schwellenlinie (threshold line) ist in grün dargestellt, der  $C_T$ -Wert liegt dort, wo die Amplifikationskurve aus der Hintergrund-Fluoreszenz austritt und die Schwellenlinie schneidet. Die Relative Quantifizierung erfolgt über die Differenz der  $C_T$ -Werte der Ziel-Sequenz zur endogenen Referenz-Sequenz ( $\Delta C_T$ -Wert) zwischen der Probe und der Kontrolle ( $\Delta\Delta C_T$ -Wert). Die Variation der  $C_T$ -Werte der Referenz-Sequenz sollte in der Probe und Kontrolle möglichst gering sein (modifiziert nach [107, 117]).

Die einfachste Berechnungsmethode der relativen Menge an DNA-Replikaten anhand der detektierten  $C_T$ -Werte stellt die  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode nach Formel 1 dar, wobei  $\Delta\Delta C_T$  nach Formel 2 berechnet wird [117].

$$\text{Relative Menge Ziel-Sequenz} = 2^{-\Delta\Delta C_T} \quad \text{Formel 1}$$

$$\Delta\Delta C_T = (C_{T\text{Ziel-Sequenz}} - C_{T\text{Referenz-Sequenz}})_{\text{Probe}} - (C_{T\text{Ziel-Sequenz}} - C_{T\text{Referenz-Sequenz}})_{\text{Kontrolle}} \quad \text{Formel 2}$$

Diese Methode setzt jedoch einerseits voraus, dass die Effizienz jeder PCR bei 100 % liegt, andererseits muss die verwendete Referenz-Sequenz in allen Proben und Kontrollen in gleicher Menge vorliegen [107]. Beide Voraussetzungen sind bei qPCR-Experimenten in der analytischen Praxis zumeist nicht gegeben, sodass mehrere Normalisierungs- und Validierungsschritte nötig sind, um valide Ergebnisse aus qPCR-Ergebnissen zu erhalten (siehe 2.3).

## 2.2.2 Detektionsprinzipien

Zur Detektion der DNA-Sequenzen mittels qPCR-Technik kommen prinzipiell drei grundlegende Methoden zum Einsatz. Das einfachste Detektionsprinzip beinhaltet die Einlagerung eines freien Fluoreszenzfarbstoff-Moleküls in die neu generierte doppelsträngige DNA, wobei dabei SYBR® Green I der meist genutzte Farbstoff ist (siehe Abbildung A.13 A) [105]. Freie SYBR® Green I -Moleküle zeigen nur wenig Fluoreszenz, nach Bindung an die *minor groove* der neu generierten DNA-Doppelhelix verstärkt sich, nach Anregung mit Licht von 497 nm Wellenlänge, die emittierte Fluoreszenz einer Wellenlänge von 525 nm bis zu 2000-fach verglichen zum freien Farbstoff-Molekül [105]. Dabei ist die molekulare Masse des generierten doppelsträngigen PCR-Produktes hauptauschlaggebend für die Intensität des detektierten Signals [111]. Da sich freie Fluoreszenzfarbstoff-Moleküle unspezifisch in doppelsträngige DNA einlagern, ist die Detektion jedoch störanfällig gegenüber eventuellen Primer-Dimeren und Verunreinigungen [111]. Die Erstellung einer Schmelzkurve (siehe 2.3.1) ist daher für diese Detektionssysteme obligat, was die Komplexität der Datenanalyse erhöht [111]. Wesentlich seltener als SYBR® Green I kommen Fluoreszenzfarbstoffe wie beispielsweise EvaGreen®, BOXTO oder TOTO-1 zum Einsatz, das ursprünglich verwendete Ethidiumbromid findet aufgrund seiner geringeren Affinität und der diskutierten Toxizität nur noch geringen Anklang [105, 110, 118].

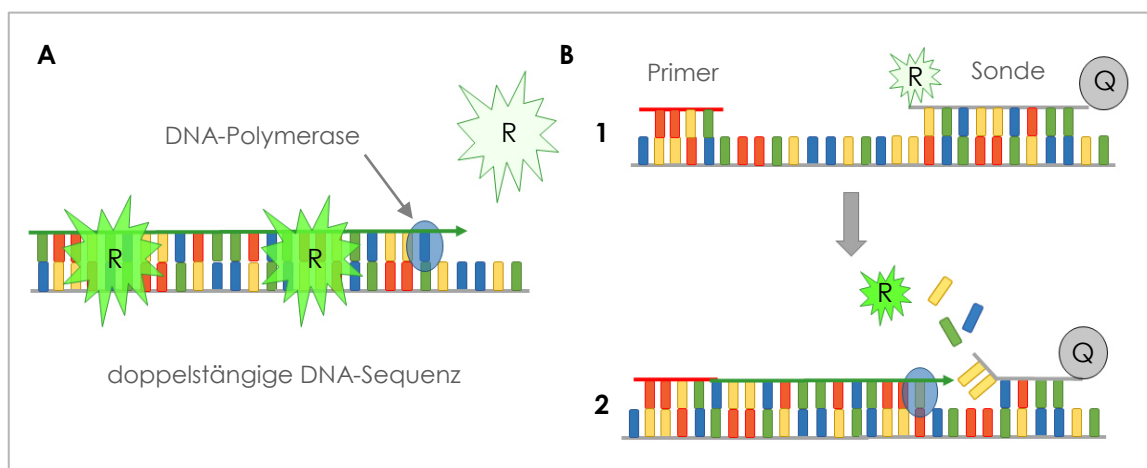


Abbildung A.13: Schematische Darstellung zweier häufiger Detektionsprinzipien der qPCR-Technik. **A:** Einlagerung freier Fluoreszenzfarbstoff-Moleküle (R) in die neu generierte doppelsträngige DNA-Sequenz. Durch die Bindung an die „minor groove“ der DNA-Doppelhelix verstärkt sich die emittierte Fluoreszenz von SYBR® Green I bis zu 2000-fach verglichen mit dem freien Farbstoff-Molekül. **B:** Verwendung spezifischer doppelt-markierter Hydrolyse-Sonden. **1:** Anlagerung spezifischer Primer und spezifischer TaqMan-Sonden an den DNA-Einzelstrang. Da sich der Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (R) in unmittelbarer Nähe zum Quencher (Q) befindet ist keine Fluoreszenz zu detektieren. **2:** Durch die Exonuklease-Aktivität der DNA-Polymerase findet neben der Elongation des DNA-Einzelstranges auch eine Freisetzung des Fluoreszenzfarbstoff-Moleküls und der Nukleotide aus der Sonde statt. Der räumliche Abstand zum Quencher-Molekül ermöglicht eine Detektion des Fluoreszenz-Signals (modifiziert nach [105, 110, 113]).

Einem weiteren Detektionsprinzip liegt die Verwendung Fluoreszenz-markierter Primer zugrunde. Die einfachste Form stellen dabei *LUX (light upon extension)*-Primer dar, welche aufgrund ihrer Nukleotid-Komplementarität an beiden Enden eine sogenannte *Hairpin-Struktur* ausbilden [105]. Durch diese Sekundärstruktur wird die Fluoreszenz des Fluorophors am 3'-Ende der Primer-Sequenz unterdrückt [104]. Die lineare Hybridisierung des Primers an den DNA-Einzelstrang bricht die Hairpin-Struktur auf und es findet eine erhebliche Zunahme des Fluoreszenzsignals statt [104, 107]. Nach ähnlichem Prinzip agieren *Sunrise-Primer* und *Scorpion-Primer*, allerdings enthalten sie zusätzlich einen Quencher, welcher in der Hairpin-Konformation die Fluoreszenz des Reporter-Fluoreszenzfarbstoffes mittels *FRET (Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer oder Förster-Resonanzenergietransfer)* unterdrückt [104, 107]. Unter Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET) versteht man die strahlungsfreie Energie-Übertragung zwischen zwei Farbstoffen (Donor und Akzeptor) mit überlappenden Emissions- und Absorptionsspektren in Abhängigkeit von deren räumlicher Distanz [119]. Sobald sich somit der Quencher in ausreichend großem Abstand zum Reporter-Fluorophor befindet, kann dessen Fluoreszenz detektiert werden. Die Auswahl an Reporter-Fluorophoren ist sehr zahlreich (FAM<sup>TM</sup>, ROX<sup>TM</sup>, JOE<sup>TM</sup>, ...), Beispiele für übliche Quencher-Fluorophore sind TAMRA<sup>TM</sup> oder DABCYL [105, 113].

Das dritte Detektionsprinzip bedient sich zusätzlicher Oligonukleotide, *Sonden* genannt, welche, ergänzend zu den Primern, einer für die Ziel-DNA-Sequenz spezifischen Basenanordnung folgen [105]. Sonden sind zumeist ebenfalls mit einem Reporter-Fluorophor und einem Quencher ausgestattet und funktionieren mittels Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET) [104, 107]. *TaqMan-Sonden* (oder *Hydrolysis-Sonden*) gehören zu den häufigst verwendeten Sonden [110] (siehe Abbildung A.13 B). Solange sich Reporter-Fluorophor und Quencher beide an der kurzen Oligonukleotid-Sequenz befinden wird die Fluoreszenz aufgrund der räumlichen Nähe unterdrückt [104, 107, 110]. Nach Anlagerung der TaqMan-Sonde und des Primers an die Ziel-DNA-Sequenz findet die Elongation des DNA-Einzelstrangs durch die verwendete DNA-Polymerase statt. Da die DNA-Polymerase zusätzlich eine 5'-Exonuklease-Aktivität aufweist werden dabei sowohl Nukleotide als auch die Fluorophore aus der gebundenen Sonde hydrolysiert [110, 113]. Die Freisetzung aus der Sonde ermöglicht, dass die Fluoreszenz des Reporter-Fluorophors nun zu detektieren ist. Nach Anregung mit Licht von 494 nm Wellenlänge emittiert der an TaqMan-Sonden kovalent gebundene Fluoreszenzfarbstoff FAM<sup>TM</sup> (6-Carboxyfluorescein) Licht mit einer Wellenlänge von 518 nm [105]. Ein Vorteil der Detektion mittels Sonden gegenüber der Quantifizierung mit freien Fluoreszenzfarbstoffen ist, dass neben der Verwendung von spezifischen Primer-Paaren, eine zusätzliche Spezifität der Amplifizierung erreicht wird, da nur ein Fluoreszenz-Signal entsteht, wenn die Sonde an ihr spezifisches komplementäres Zielmolekül bindet [111]. Ferner wird je Elongations-Reaktion genau ein Lichtquant aus der Sonde freigesetzt, womit das detektierte Fluoreszenz-Signal primär vom ursprünglich vorhandenen Ausgangsmaterial abhängig und in der Theorie direkt proportional zur Aus-

gangsmenge in der Probe ist [111]. *Molecular beacons* sind ebenfalls an beiden Enden mit einem Fluorophor markiert und formieren sich in Lösung zu einer Hairpin-Struktur, wodurch eine effektive Fluoreszenz-Unterdrückung stattfinden kann [113]. Während der Anlagerung an den komplementären DNA-Einzelstrang unterlaufen sie eine Konformationsänderung, wodurch Reporter-Fluorophor und Quencher getrennt werden und Fluoreszenz-Emission erfolgt [104, 113]. *Duale Hybridisierungssonden* bestehen, im Gegensatz zu oben genannten Sonden, aus zwei Fluoreszenz-markierten Oligonukleotiden, welche nebeneinander an den DNA-Einzelstrang binden [104, 105]. Hybridisierungssonden nutzen den Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET) um ein Fluoreszenz-Signal zu generieren, indem statt eines Quenchers ein Akzeptor-Fluorophor zum Einsatz kommt, welches durch die Energie des Donor-Fluorophors angeregt wird und Fluoreszenz emittiert [104, 105].

## 2.3 Optimierung, Normalisierung und Validierung der RT-qPCR-Analytik

Zumeist wird die relative Quantifizierung mittels qPCR zur Analyse der Genexpression genutzt. Da der Amplifizierung der DNA dabei der enzymatische Schritt der cDNA-Synthese aus RNA über die *Reverse Transkriptase* vorangestellt ist, wird diese Methodik auch als *RT-qPCR (Reverse Transkriptase – quantitative real-time Polymerase-Kettenreaktion)* bezeichnet [112]. Die RT-qPCR wird als Gold-Standard für Genexpressions-Analysen angesehen, da sich die Methodik, verglichen zu anderen eingesetzten Techniken, durch eine hohe Spezifität, Richtigkeit und schnelle Ergebnisse auszeichnet [115, 120, 121]. Ein weitläufig unterschätzter Aspekt ist allerdings, dass ein hohes Maß an Qualitäts-Sicherstellung und -Kontrolle gewährleistet sein muss, um zuverlässige Ergebnisse generieren zu können [120, 121].

Die Analyse der Genexpression mittels RT-qPCR umfasst einen mehrstufigen Prozess, bei welchem jeder Schritt potentielle Fehlerquellen birgt [105]. Bereits die Probengröße sollte auf eine einheitliche Menge, beispielsweise die Zellzahl oder die Gewebemasse, normalisiert werden, um vergleichbare Ausgangsbedingungen zu schaffen [105, 122]. Nichtsdestotrotz kann die nachfolgende RNA-Extraktion zu unterschiedlich hohen Ausbeuten führen, weshalb die Konzentration der extrahierten RNA bestimmt und auf eine identischen Menge normalisiert werden sollte [105, 122]. Dieser Schritt ist wichtig, um anschließend eine lineare reverse Transkription der RNA zu cDNA zu gewährleisten [105]. Daneben haben auch Reinheit und Integrität der isolierten RNA sowie potentielle Verunreinigung durch genomische DNA einen immensen Einfluss auf die Aussagekraft der Ergebnisse [111, 120]. Schließlich sollte auch zur qPCR eine konstante Menge an cDNA eingesetzt werden [105]. Prinzipiell ist es auch möglich, in einem Einzelschrittverfahren den Schritt der reversen



Transkription und der PCR zu vereinen, allerdings wird diese Methode als störanfälliger gegenüber RNA-Degradation und als weniger sensitiv verglichen zum zweistufigen Verfahren beschrieben [104].

### 2.3.1 Primerspezifität

Für eine möglichst effektive PCR spielen, neben den Komponenten der Reaktionsmischung, wie der geeigneten DNA-Polymerase, der Konzentration an Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs) oder dem Vorhandensein von PCR-Inhibitoren, vor allem die Spezifität und die Konzentrationen der Primer-Sequenzen eine immense Rolle. Das sorgfältige Primer-Design *in silico*, das sowohl die Betrachtung der Spezifität als auch der Sekundärstruktur der Oligonukleotide beinhalten sollte, sowie die empirische Validierung der Primerspezifität sind essentielle Voraussetzungen für die zuverlässige Quantifizierung von DNA- und mRNA-Sequenzen [120]. Da Primer-Paare, welche multiple Targets amplifizieren, unweigerlich zu fehlerhaften Ergebnissen führen, ist es gerade für qPCR-Experimente, die auf der unspezifischen Bindung freier Fluoreszenzfarbstoff-Moleküle in doppelsträngige DNA beruhen, unerlässlich, die generierten PCR-Produkte abschließend über eine Schmelzkurve zu analysieren [105, 107].

Indem nach dem Ende der PCR die Temperatur über einen definierten Bereich kontinuierlich gesteigert wird, kann bei derjenigen Temperatur, an der eine Trennung der DNA-Doppelstränge stattfindet (Schmelztemperatur  $T_m$ ), eine deutliche Reduktion der Fluoreszenz detektiert werden [105]. Die Schmelztemperatur einer DNA-Sekundär-Struktur, welche primär abhängig von Größe und prozentualem GC-Gehalt ist, wird anhand eines Peaks im Kurvenverlauf der negativen ersten Ableitung der Fluoreszenz, aufgetragen gegen die Temperatur, ersichtlich (siehe Abbildung A.14). Zeigt die Kurve dabei nur einen Peak, hat die vorausgegangene Amplifikation wahrscheinlich nur ein einziges Produkt generiert (siehe Abbildung A.14 A). Sind allerdings mehrere Peaks zu erkennen (siehe Abbildung A.14 B) muss davon ausgegangen werden, dass die PCR mehrere Sequenzen amplifiziert hat und die Primer damit nicht spezifisch sind [105].

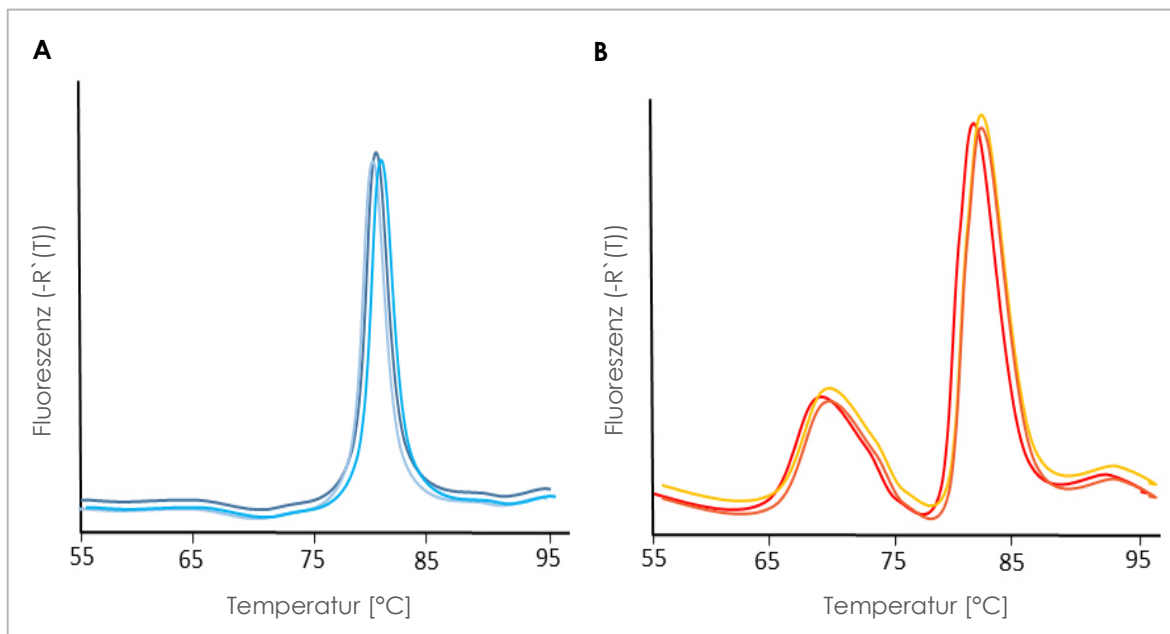


Abbildung A.14: Schematische Darstellung des Schmelzkurven-Verlaufs über einen Temperaturbereich von 55  $^{\circ}\text{C}$  – 95  $^{\circ}\text{C}$ , wobei die negative erste Ableitung der Fluoreszenz ( $-R'(T)$ ) gegen die Temperatur aufgetragen ist. **A:** Schmelzkurven dreier unterschiedlicher Ausgangskonzentrationen einer DNA-Sequenz resultieren jeweils in einem Peak, was die Spezifität der Primer wahrscheinlich macht. **B:** Schmelzkurven dreier unterschiedlicher Ausgangskonzentrationen einer DNA-Sequenz resultieren jeweils in mehreren Peaks, es liegt keine Primerspezifität vor (modifiziert nach [105]).

Für die Evaluierung der Primerspezifität ist jedoch die Schmelzkurven-Analyse nicht ausreichend, da sich die Peaks theoretisch überlappen und somit nicht unterschieden werden könnten [114]. Es ist daher empfehlenswert, die PCR-Produkte zusätzlich einmalig mittels Gelelektrophorese hinsichtlich ihrer einheitlichen Größe zu verifizieren [105, 120]. Darüber hinaus ist die Optimierung der Konzentration der Primer-Sequenzen im Reaktionsansatz für jedes Primer-Paar essentiell für eine möglichst effiziente PCR [105].

### 2.3.2 Datenprozessierung

Die detektierten Fluoreszenz-Rohdaten bedürfen vor der Analyse einiger Justierungsschritte [104, 105]. Zunächst erfolgt eine Normalisierung des Fluoreszenzsignals auf einen im Reaktionsmix vorhandenen passiven Referenzfarbstoff, um Unterschiede zwischen den einzelnen Reaktionen, hervorgerufen etwa durch minimal variierende Geräteparameter, zu kompensieren [105, 111]. Anschließend sollte überprüft werden, ob die globale Kalkulation des Hintergrundrauschens der Fluoreszenz (*baseline*) angemessen für jede individuelle Reaktion erfolgte und gegebenenfalls korrigiert werden [105, 111]. Die Fluoreszenzsignale werden danach an das Hintergrundrauschen adjustiert, um den Austritt der Amplifikationskurve aus dem Hintergrund vergleichbar zu machen [105]. Schließlich wird die Schwellen-

linie (threshold line) in der exponentiellen Phase (siehe 2.1) aller Amplifikationskurven gesetzt und die  $C_T$ -Werte können ermittelt werden [105, 111]. Sowohl das Hintergrundrauschen als auch die Schwellenlinie werden üblicherweise nach Algorithmen der verwendeten Software zuverlässig berechnet, unter Umständen kann allerdings eine Anpassung erforderlich sein [111].

Vor der Auswertung der  $C_T$ -Werte sollten die mitgeführten Kontrollen überprüft werden. Zu den wichtigsten Kontrollen zählen *Leerproben* (*no template controls = NTC*), welche obligat zur Detektion von potentiellen Kontaminationen sind und keine Fluoreszenz aufzeigen sollten [111, 112]. *Lauf-Vergleichs-Proben* (*inter-run controls = IRC*) kommen zum Einsatz wenn mehrere Platten miteinander verglichen werden, um mögliche Unterschiede zwischen den qPCR-Läufen zu kompensieren [123]. Kontrollen, die isolierte RNA ohne die Zugabe einer reversen Transkriptase enthalten werden *noRT-Kontrollen* genannt und können zur Bestimmung der genomischen DNA in der Probe herangezogen werden [105]. Falls keine parallele Detektion einer Standardkurve erfolgt, ist die zusätzliche Verwendung von *Positivkontrollen* sinnvoll [105].

### 2.3.3 Effizienz der PCR

Die Effizienz einer PCR beschreibt, inwieweit sich die Reaktion an eine ideale Amplifikation annähert. Die optimale und maximale Amplifikations-Effizienz beträgt 100 %, was einer exakten Verdoppelung der Ziel-Sequenz pro Zyklus entspricht [112, 124]. Tatsächlich liegt die Effizienz einer optimierten PCR zumeist im Bereich von 70 % bis 90 %, da Reaktionskomponenten die PCR inhibieren können [105, 106]. Schon geringste Differenzen zwischen den Amplifikations-Effizienzen von Ziel-Sequenz und Referenz-Sequenz können jedoch zu gravierenden Fehlern in der Berechnung von Expressionsunterschieden führen, was die Empfindlichkeit der relativen Quantifizierungsmethode gegenüber Variationen der Effizienz deutlich macht [106, 125]. Deshalb wird zum Teil die Meinung vertreten, dass durch RT-qPCR-Experimente nur zweifache oder größere Unterschiede zuverlässig detektiert werden können [124, 126]. Es ist daher essentiell die Amplifikations-Effizienz für jede Ziel- und Referenz-Sequenz zu bestimmen, wofür verschiedene Berechnungs-Methoden zur Verfügung stehen [105, 106, 112].

Die häufigste und derzeit von der Leitlinie empfohlene Methode ist die Erstellung einer Standardkurve aus unterschiedlichen Verdünnungen einer Probe, welche die zu amplifizierende Nukleinsäure-Sequenz enthält (siehe 2.2.1, Abbildung A.11) [106, 112]. Die durch lineare Regression ermittelte Steigung der Standardkurve wird zur Bestimmung der Effizienz nach Formel 3 herangezogen [105, 112].

$$\text{Effizienz [\%]} = (10^{-1/\text{Steigung}} - 1) * 100$$

Formel 3

Eine weitere Möglichkeit, die PCR-Effizienz zu berechnen, liegt in der Betrachtung des absoluten Fluoreszenzanstiegs während der exponentiellen Phase der PCR, wobei die Steigung einer linearen Regressionsgerade aus mindestens vier Punkten der logarithmierten Fluoreszenz dabei der Effizienz entspricht [105, 106, 125]. Ein Vorteil dieser Vorgehensweise liegt in der probenindividuellen Berechnung, allerdings unterliegt diese Methode großen Schwankungen, wenn die Punkte mehr oder weniger willkürlich gewählt werden [105, 106]. Weitere Berechnungsmethoden beruhen auf mathematischen Algorithmen, die alle Datenpunkte der Amplifikationskurve einer individuellen Probe miteinbeziehen [105, 106, 124]. Alle beschriebenen Methoden resultieren in Abschätzungen der wahren Effizienz, wobei jedoch noch nicht abschließend geklärt ist, welches Modell der realen Effizienz am nächsten kommt [105].

### 2.3.4 Referenz-Gene

Der wichtigste und oft kritischste Schritt der relativen Quantifizierung der Genexpression mittels RT-qPCR-Technik ist die Normalisierung auf Referenz-Gene. Die eingesetzten Referenz-Gene, häufig auch als *Housekeeping-Gene* bezeichnet, können als interne Kontrollen angesehen werden, welche die durch experimentelle Fehler bedingte Varianz der Ergebnisse reduzieren sollen [105, 121]. Fehler innerhalb einer Probe, wie inhibierende Einflüsse aus Gewebeproben, RNA-Menge und -Integrität, Pipettierfehler oder Enzymleistung, betreffen dabei Referenz-Gene im gleichen Ausmaß wie Ziel-Gene [105, 106, 127]. Zwar existieren weitere Normalisierungsstrategien mit genomischer DNA oder artefaktischen Nukleinsäuren, die Verwendung von Referenz-Genen stellt aber die empfohlene und weitaus häufigste Normalisierungsmethode dar [105, 112, 122].

Die Expression einzelner Referenz-Gene kann in unterschiedlichen Gewebeproben oder aufgrund experimenteller Einflüsse entscheidend variieren, weswegen der Einsatz lediglich eines Referenz-Gens nicht ausreichend ist [121, 128, 129]. Für eine zuverlässige Normalisierung sollten mindestens drei Referenz-Gene verwendet werden, wobei die optimale Anzahl und Art der eingesetzten Referenz-Gene experimentell ermittelt werden muss [112, 120, 121]. Da es keine universell einsetzbaren Referenz-Gene mit konstanter Expression gibt, muss die Expression potentieller Kandidaten für jedes experimentelle Vorhaben einzeln akribisch überprüft werden [121, 130]. Allerdings kommen eine Reihe von potentiellen

Kandidaten häufig zum Einsatz, da sie unter verschiedensten Bedingungen bereits konstante Expression gezeigt haben, darunter Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), die Untereinheiten 18 S und 28 S der ribosomalen RNA, Ubiquitin C (UBC) und Beta-Aktin (ACTB) [106, 128, 131]. Prinzipiell sind Referenz-Gene geeignet, deren Funktion nicht in die experimentelle Fragestellung involviert ist [105]. Ein ideales Referenz-Gen sollte konstitutiv exprimiert werden, nicht durch externe Einflüsse reguliert werden und möglichst geringe Variationen zwischen verschiedenen Proben aufweisen [131]. Die Normalisierung auf nicht adäquate Referenz-Gene führt zu einer Verzerrung der Ergebnisse, womit geringe Expressionsunterschiede nicht erkannt werden oder schlimmstenfalls tatsächlich nicht vorhandene Unterschiede ermittelt werden [105]. Eine systematische Validierung der verwendeten Referenz-Gene ist daher unbedingt erforderlich [112].

Zur Validierung von Referenz-Genen gibt es zwei prinzipielle Strategien: Ein Ansatz ermittelt den gesamten Fehler aus den Fluoreszenz-Rohdaten der Referenz-Gen-Kandidaten, wodurch sowohl experimentelle Fehler als auch biologische Variationen erfasst werden [105, 132]. Diese Methode stellt eine einfache Validierungs-Strategie dar, welche allerdings von einer akkuraten Arbeitsweise abhängt und einer weiteren Normalisierung, etwa auf die totale RNA-Menge, bedarf [105]. Der zweite Ansatz betrachtet durch Fehler verursachte Tendenzen, indem die Fluktuation zwischen den potentiellen Referenz-Genen verglichen wird [105, 121]. Somit kann ein experimenteller Fehler einer Probe erkannt werden, da theoretisch alle Referenz-Gene diese Variation aufzeigen, und von biologischen Variationen der Referenz-Gene in den Proben unterschieden werden [105]. Zusätzlich kann der Einfluss von Ausreißern drastisch reduziert werden, indem statt des arithmetischen Mittelwerts der geometrische Mittelwert aller Referenz-Gene berechnet wird [105, 121]. Excel-basierte Programme wie geNorm [121], BestKeeper® [127] oder NormFinder [133] ermöglichen die Abschätzung der Expressions-Stabilität potentieller Referenz-Genen durch multiple paarweise Vergleiche. Anhand dieser Validierungsstrategie lassen sich auch kleinste Expressions-Unterschiede zuverlässig detektieren [105].

Die finale statistische Auswertung der relativen Genexpression aus RT-qPCR-Experimenten sollte demnach sowohl Effizienz-korrigiert als auch normalisiert auf mindestens drei stabil exprimierte und validierte Referenz-Gene erfolgen [112]. Prinzipiell sollte die Auswertung mindestens drei biologische Replikate sowie zwei technische Replikate umfassen [123]. Eine Vielzahl an Software-Tools steht zur Datenanalyse aus RT-qPCR-Experimenten zur Verfügung, von welchen jedoch nicht jedes passend für die jeweilige qPCR-Anwendung ist [115].

Ein Kalkulationsmodell, welches die ermittelte Effizienz (E) berücksichtigt und den Mittelwert (MW) mehrerer Replikate zur relativen Quantifizierung heranzieht, beschreibt Formel 4 [105, 106, 127, 134]. Die relative Expressionsrate (R) einer Ziel-Sequenz wird dabei auf einen Referenz-Index, welcher das geometrische Mittel aus mindestens drei stabil exprimierten Referenz-Genen darstellt, normalisiert [127, 134].

$$R = \frac{(E_{\text{Ziel-Sequenz}})^{\Delta C_T_{\text{Ziel-Sequenz}} (MW_{\text{Kontrolle}} - MW_{\text{Probe}})}}{(E_{\text{Referenz-Index}})^{\Delta C_T_{\text{Referenz-Index}} (MW_{\text{Kontrolle}} - MW_{\text{Probe}})}}$$

Formel 4

Auf diesem Kalkulationsmodell basiert unter anderem das *Relative Expression Software Tool* (REST®), welches die relative Expression von Ziel-Genen bezogen auf Referenz-Gene Effizienz-korrigiert berechnet [135]. Dabei wird als statistischer Test der *Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test*® angewendet, welcher keine Normalverteilung der Daten voraussetzt und somit als adäquater Test für diese Art der Fragestellung angesehen wird [135].

### 3 Zielsetzung der Arbeit

Rund 5 % aller proteinkodierenden Gene im menschlichen Genom kodieren für Transporterproteine, was deren funktionellen Stellenwert deutlich macht [12]. Im Mittelpunkt der Forschung steht die Expression von Transportern in Dünndarm, Leber und Niere sowie deren Beitrag zur Bioverfügbarkeit und Verteilung von Arzneistoffen [20, 21]. Vergleichsweise wenig ist über die Expression und Lokalisation von Arzneistofftransportern in der humanen Lunge und deren Rolle bei Absorption, Distribution und Elimination von inhalativ verabreichten Wirkstoffen bekannt [21, 22], obgleich die Lunge mit über 100 Quadratmetern Oberfläche eine vielseitige Nutzung zur lokalen und systemischen Arzneimitteltherapie ermöglicht [136].

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, den Einfluss ausgewählter Arzneistofftransporter auf die Pharmakokinetik des pulmonal applizierten Anticholinergikums Ipratropiumbromid zu untersuchen. In einem *ex vivo* Modell der humanen perfundierten Lunge sollte dazu die Umverteilung von Ipratropiumbromid in die Perfusionsflüssigkeit mit und ohne vorherige Applikation des kompetitiven OCTN1/2-Inhibitors L-Carnitin analysiert werden. Erstmals sollten die dabei gewonnenen pharmakokinetischen Daten in direkte Relation zur Expression der Arzneistofftransporter gesetzt werden. Dazu sollten die entsprechenden individuellen Gewebeproben hinsichtlich ihrer Transporter-Expression auf mRNA- und Protein-Ebene untersucht werden. Ergänzend sollten die beiden Bronchodilatoren Ipratropiumbromid und Salbutamol als Tritium-markierte Substanzen in Untersuchungen mit stabil transfizierten Zellen bezüglich ihres zellulären Aufnahme-Verhaltens charakterisiert werden.

Ein weiteres Ziel bestand in der Untersuchung der pulmonalen Arzneistofftransporter-Expression in Hinsicht auf alters- und geschlechtsspezifische Unterschiede. Durch *in vitro* Versuche mit der humanen Bronchialepithelzelllinie Calu-3 sollten die regulatorischen Einflüsse der Sexualhormone Estradiol, Testosteron und Progesteron sowie von L-Carnitin auf die mRNA-Expression von Membrantransportern analysiert werden. Überdies sollte die Genexpression von Arzneistofftransportern in rund 80 humanen Lungengewebsproben im Hinblick auf das relative Expressions-Niveau, altersspezifische Differenzen und Unterschiede zwischen Proben von Männern und Frauen untersucht werden.





## **B Allgemeiner Teil**

# 1 Pharmakokinetik von Ipratropiumbromid untersucht am humanen Lungen-Perfusions-Modell

## 1.1 Hintergrund

### 1.1.1 Modelle zur Bestimmung der Pharmakokinetik pulmonal applizierter Arzneistoffe

In der Arzneimittelforschung werden verschiedenste Modelle zur Bestimmung pharmakokinetischer Eigenschaften von pulmonal applizierten Arzneistoffen angewandt. Die Vorteile der am häufigsten eingesetzten *Zellkultur-Modelle* bestehen in ihrer einfachen und schnellen Handhabung, der damit verbundenen hohen Durchsatz-Kapazität sowie einer relativ guten Reproduzierbarkeit der Versuche [137, 138]. Pulmonale Absorptions- und Transport-Mechanismen können mit den häufig verwendeten und gut charakterisierten humanen Bronchialzelllinien Calu-3 und 16HBE14o- erforscht werden, für Untersuchungen zum lokalen Metabolismus von Arzneistoffen in der Lunge eignet sich besonders die Bronchialzelllinie BEAS-2B [137]. Allerdings können durch die relativ statischen Bedingungen physiologische Prozesse wie etwa die mukoziliäre Clearance oder der Abtransport von Wirkstoffen über die systemische Zirkulation nur unzureichend wiedergespiegelt werden [138, 139]. Des Weiteren kommen hauptsächlich Modelle mit nur einem Zelltyp zum Einsatz, welche die Diversität der im humanen Bronchial- und Alveolar-Epithel vorliegende Zelltypen und auch die Komplexität der humanen Atemwege nur unzureichend wieder spiegeln [137]. Somit sind die Erkenntnisse aus *in vitro* Zellkultur-Versuchen nur eingeschränkt auf reale *in vivo* Bedingungen im Menschen übertragbar. Neuere Ansätze von Zellkultur-Modellen, die eine *Co-Kultur* verschiedener im Bronchial- und Alveolarepithel vorhandener Zelltypen verwenden, versuchen diese Limitierung zu kompensieren [140], der Forschungsstand zu diesen Modellen befindet sich jedoch erst im Anfangsstadium. Ein hochentwickelter Fortschritt der Zellkultur-Modelle besteht in der Generierung von *3D-Zellkulturen*, bei welchen verschiedene Zelltypen der humanen Atemwege in ein biologisch vaskularisiertes Grundgerüst eingebracht werden [141]. Durch Adhärenz und Vermehrung der Zellen entsteht ein dabei Modell mit hoher *in vitro* / *in vivo* Korrelation, welches neben der Diversität der vorliegenden Zellen auch die Funktionalität der Atemwege, wie beispielsweise die Mucus-Produktion, besser wiedergespiegelt. Bisher wird dieses Modell vorrangig zur Untersuchung von Pathogenen wie *Bordetella pertussis* eingesetzt, ein Einsatz beispielsweise für Transport-Studien benötigt noch weiterer Charakterisierung und Optimierung [141].

Näher an der Realität der Enzym- und Transporter-Ausstattung von humanem Lungengewebe sowie zum Teil auch an der Komplexität des Aufbaus der menschlichen Atemwege liegen *ex vivo* Modelle.

In *Dialyse-Modellen* mit tierischem oder humanem homogenisiertem Lungengewebe kann die Kinetik der Partikel-Auflösung verschiedener Formulierungen sowie die Verteilung von Arzneistoffen vom Lungengewebs-Kompartiment in Blut oder Plasma untersucht werden [142-144]. Sie haben gegenüber Zellkultur-Modellen ferner den Vorteil, dass Einflüsse wie etwa die Gewebefixierung von pharmakologisch genutzten Substanzen sowie deren komplexer Metabolismus mit berücksichtigt werden können [138]. Allerdings spiegeln auch diese Modelle den Aufbau der humanen Lunge nicht wieder. Die verwendeten Diffusionsmembranen stellen nur eine Annäherung an die physiologischen Barrieren dar [138]. Weitere Limitierungen bestehen darin, dass durch Homogenisierung des Gewebes eventuell Bindungsstellen und metabolische Enzyme freigesetzt werden könnten, die *in vivo* nicht verfügbar sind [138].

Ebenfalls zu den *ex vivo* Modellen zählt das System der *Lungen-Perfusions-Modelle*. Diese existieren sowohl auf Basis von Lungen tierischer Abstammung (beispielsweise Ratten, Kaninchen, Meerschweinchen [139, 145, 146]) als auch unter Verwendung humaner Lungenlappen-Präparationen [147], wie sie in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden. Dabei werden isolierte Lungen oder Lungenlappen in einem künstlichen System perfundiert, beatmet und Arzneistoffe über die Trachea respektive über die Hauptbronchien appliziert. Durch Detektion der Arzneistoffe im Perfusat kann deren Absorptionsrate bestimmt werden [145-147]. Mittels Verwendung von Lungen oder Lungenlappen wird die Architektur und Struktur der Atemwege aufrechterhalten und auch die Funktionalität des Gewebes ist nicht eingeschränkt [146], womit auch die pulmonale Clearance weiterhin stattfinden kann [139].

Die Vorteile der Verwendung *tierischer Lungen-Perfusions-Modelle* liegen in der besseren Möglichkeit zur Standardisierung der Versuche durch die Auswahl eines homogenen Tierkollektivs sowie in möglichen größeren Versuchsansätzen. Neben dem ethischen Aspekt zum Einsatz von Labortieren ist auch der Unterschied im Aufbau der Atemwege und damit verbunden eine eingeschränkte Vergleichbarkeit von tierischen und humanen Lungen ein Kritikpunkt. Im Gegensatz zur dichotomen Verzweigung der Atemwege beim Menschen sind die Verzweigungen der verwendeten Tier-Lungen hauptsächlich monopodialer Art [146]. Zudem ist die Morphologie der vorkommenden Zellen in der tierischen und humanen Lunge nicht identisch und auch Parameter wie die Atemfrequenz und das Tidalvolumen unterscheiden sich zum Teil deutlich [146], weswegen Ergebnisse aus tierischen Lungen-Perfusions-Modellen nur mit Einschränkungen auf den Menschen extrapoliert werden können.

Die Aussagekraft von Versuchen, die an *humanen Lungen-Perfusions-Modellen* durchgeführt wurden, ist wesentlich höher, da hier die Komplexität der humanen Atemwege in allen ihren Facetten weitestgehend erhalten bleibt [138]. Auch das gesamte Spektrum der

in der humanen Lunge vorkommenden Zelltypen wird, im Gegensatz zu Zellkultur- und Dialyse-Modellen, durch dieses Modell vertreten [146]. Ein weiterer Vorzug des humanen Lungen-Perfusions-Modell liegt in der Verwendung von Lungenlappen, welche Patienten im Rahmen der konventionellen Lungen-Karzinom-Therapie entnommen wurden, da somit kein zusätzlicher Eingriff durchgeführt werden muss. Allerdings hat der Einsatz dieser Präparationen auch Nachteile, wie die limitierte Verfügbarkeit von geeigneten Lungenlappen und die starken interindividuellen Variationen in der Lungenlappen-Größe sowie im Krankheitszustand und Alter der Patienten. Eine weitere Limitierung der Verwendung von humanen Lungenlappen ist die zeitliche Begrenzung. Aufgrund der physiologischen Humidität des Lungengewebes kann es während der Versuchsdurchführung zum Austrocknen aber auch zur Ödem-Bildung im Gewebe kommen, weshalb die maximale Versuchsdauer der Lungen-Perfusionen bei drei bis vier Stunden liegt [138]. Eine Untersuchung der Pharmakokinetik über mehrere Stunden oder sogar Tage ist somit nicht möglich. Dennoch zeigt dieses *ex vivo* Modell die größtmögliche Annäherung an reale *in vivo* Bedingungen [138] und bietet überdies die Möglichkeit, die tatsächlich deponierte Dosis präzise zu bestimmen. Ein weiterer Vorteil gegenüber *in vivo* Untersuchungen liegt in der Möglichkeit der uneingeschränkten Applikation von vorsichtig zu applizierenden Substanzen, wie etwa bronchokonstriktiven Reagenzien [146].

*In vivo Studien*, sowohl am Menschen als auch an Tieren, haben die höchste Relevanz bei der pharmakokinetischen Charakterisierung von Arzneistoffen [138]. Neben den oben erwähnten Vorteilen und Limitationen der Untersuchung am Tier ist hier zusätzlich zu berücksichtigen, dass bei Menschen eine orale Applikation inhalativer Arzneistoffe erfolgt, am Tier dagegen hauptsächlich nasal oder intratracheal appliziert wird [146]. Im Gegensatz zur freiwilligen forcierten Einatmung beim Menschen müssen Untersuchungen zur passiven Inhalation von aerolisierten Wirkstoffen an Tieren in Expositionskammern unterschiedlicher Art durchgeführt werden [146]. Direkte Applikationsmethoden, wie die Instillation von Flüssigkeiten oder Sprühnebeln in die Trachea, erfordern chirurgische Eingriffe unter Narkose der Tiere [146].

Als Nachteile der *in vivo* Untersuchungen zur Pharmakokinetik von pulmonal applizierten Substanzen am Menschen sind einerseits der wesentlich höhere zeitliche und monetäre Aufwand, andererseits ethische Aspekte, wie die Versuchsdurchführung an gesunden Probanden und das eventuelle Auftreten von Nebenwirkungen, zu nennen. Ferner muss beachtet werden, dass bei der Anwendung inhalierter Arzneistoffe am Menschen bis zu 60 - 90 % der verabreichten Dosis im Mund- und Rachen-Raum positioniert und anschließend verschluckt wird [148], wobei der genaue Prozentanteil der deponierten Dosis zumeist nicht ermittelbar ist. Dies hat zur Konsequenz, dass die gemessenen Plasma-Konzentrationen der untersuchten Arzneistoffe sowohl die aus dem Magen als auch die aus der Lunge absorbierte Wirkstoffmenge widerspiegeln. Zusätzlich können venöse

Proben Arzneistoffanteile, die teilweise schon in der Leber metabolisiert wurden, enthalten [138]. Folglich können Untersuchungen zur Umverteilung von Arzneistoffen vom luminalen Bereich der Atemwege in die systemische Zirkulation nur ungenügend nachvollzogen werden.

### **1.1.2 Vorrausgegangene Untersuchungen am humanen Lungen-Perfusions-Modell (LPM)**

Mit einem nach Lindner et al. [147] modifizierten *ex vivo* Modell der humanen perfundierten Lunge wurden im Arbeitskreis bereits verschiedenste Fragestellungen zu pulmonal applizierten Arzneistoffen untersucht. Nach Applikation zweier unterschiedlicher, kommerziell im Handel erhältlicher Formulierungen von Beclometasondipropionat, einem Glukokortikoid zur inhalativen Anwendung, wurde ein Unterschied im zeitlichen Verlauf der Umverteilung der Substanz vom Lungengewebe in die Perfusionsflüssigkeit festgestellt [142]. Diese Beobachtung konnte mit unterschiedlichen Aerosol-Partikelgrößen der Formulierungen und den damit verbundenen Lösungs-Vorgängen in der Bronchialflüssigkeit erklärt werden [142]. Durch diese Erkenntnisse zeigte sich die prinzipielle Eignung des humanen Lungen-Perfusions-Modells (LPM) zur Ermittlung von pharmakokinetischen Parametern pulmonal applizierter Arzneistoffe.

In einer neueren Untersuchung wurden erstmals unterschiedlich formulierte Pulverpartikel des insulinähnlichen Wachstumsfaktor I (Insulin-like growth factor I = IGF I), einem anabol wirkendem Polypeptid mit 70 Aminosäuren, am LPM untersucht [149]. Im Gegensatz zu vorausgegangenen *in vitro* Versuchen, die eine unterschiedliche Freisetzung von IGF I aus den beiden Formulierungen zeigten, wurde *ex vivo* ein identischer zeitlicher Verlauf der Umverteilung in die Perfusionsflüssigkeit konstatiert [149]. Dies verdeutlichte zum einen die höhere Aussagefähigkeit des *ex vivo* Modells, zum anderen konnte die potentielle systemische Verfügbarkeit von Substanzen mit höherer molarer Masse nach pulmonaler Applikation gezeigt und somit die vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten des etablierten Modells unterstrichen werden.

Darüber hinaus wurde in einer sowohl die pharmakokinetischen als auch die pharmakodynamischen Effekte von Beta-2-Sympathomimetika untersuchenden Studie gezeigt, dass das langwirksame GW597901 im Vergleich zum kurzwirksamen Salbutamol eine höhere Tendenz zur Retention im Lungengewebe aufwies [99]. Nach einer erfolgreich durch Metacholin-Provokation induzierten Bronchokonstriktion wurde ein verzögerter bronchodilatatorischer Effekt für das langwirksame GW597901 festgestellt [150], was die Eignung des Modells auf die Untersuchung pharmakodynamischer Fragestellungen erweiterte. Zusätzlich konnte sowohl nach Metacholin-Vernebelung als auch nach vorheriger Applika-

tion von L-Carnitin eine deutlich reduzierte Umverteilung von Salbutamol in die Perfusionsflüssigkeit während der 60-minütigen Perfusion festgestellt werden [99]. Diese Beobachtung wurde auf eine verzögerte pulmonale Absorption, bedingt durch eine kompetitive Inhibition des OCTN2-Transporters durch Metacholin und L-Carnitin, zurückgeführt [99]. Auch für das langwirksame Beta-2-Sympathomimetikum Salmeterol konnte nach vorheriger L-Carnitin-Vernebelung eine reduzierte Umverteilung in den Perfusionspuffer konstatiert werden [151].

Die Aufnahme von Salbutamol und Salmeterol in bronchiale Epithelzellen wurde über einen OCTN2-vermittelten Transport vermutet [85, 98], da beide Beta-2-Sympathomimetika bei physiologischem pH-Wert positiv geladen vorliegen [152, 153] und somit als potentielle Substrate für organische Kationentransporter gelten. Sowohl Metacholin (Acetyl- $\beta$ -methylcholin) als auch der endogene Neurotransmitter Acetylcholin wurden als Inhibitoren des OCTN2-vermittelten Transports identifiziert [154]. Auch Carnitin ist in seiner L-enantiomeren Form als Substrat und selektiver kompetitiver Inhibitor der beiden organischen Kationentransporter OCTN1 und OCTN2 bekannt [56, 60, 85, 154], was die Hypothese des OCTN2-vermittelten Transports bekräftigte.

## 1.2 Fragestellung

Eine Vielzahl von Arzneistofftransportern wird in der humanen Lunge exprimiert, deren Einfluss auf die Pharmakokinetik und Pharmakodynamik inhalativer Arzneistoffe jedoch bisher nicht eindeutig geklärt ist [21]. Mithilfe des *ex vivo* Modells der humanen perfundierten Lunge (LPM) konnte bereits die Beteiligung eines organischen Kationentransporters an der Umverteilung von Beta-2-Sympathomimetika in den Perfusionspuffer gezeigt werden [99, 151]. Daraus entwickelte sich die Frage, inwieweit auch für andere pulmonal eingesetzte Arzneistoffgruppen spezifische Aufnahme-Routen, wie organische Kationentransporter, aus dem luminalen Bereich der Atemwege in die systemische Zirkulation existieren. Folglich sollte das inhalative Anticholinergikum Ipratropiumbromid (IB) am LPM appliziert und bezüglich seiner pulmonalen Pharmakokinetik sowie in Hinblick auf den Einfluss von Transportern im humanen Lungengewebe untersucht werden. In Untersuchungen an stabil transfizierten Zellen wurde IB als Substrat von OCTN1 und OCTN2 identifiziert [95]. Dabei zeigte L-Carnitin eine inhibierende Wirkung auf die zelluläre Aufnahme von IB [95], was eine nähere Betrachtung am LPM anregte.

Einerseits sollte die Beeinflussung der pulmonalen IB-Absorption durch L-Carnitin untersucht werden, indem vor Applikation von IB eine Vernebelung von L-Carnitin durchgeführt wurde. Erwartet wurde dabei eine kompetitive Hemmung der an der Aufnahme

beteiligten Transporter und somit eine Verzögerung der Umverteilung von IB in die Perfusionsflüssigkeit. Andererseits sollte durch Applikation zweier unterschiedlich hoher IB-Dosen geprüft werden, inwieweit eine höhere Substanzmenge eine Autoinhibition oder Sättigung der Aufnahme von IB mit sich brachte. Sowohl eine kompetitive Hemmung durch Substrate der organischen Kationentransporter als auch eine Sättigung durch zu hohe Substanzmengen könnten zu potentiellen Interaktionen mit inhalativ verabreichten Substanzen wie Beta-2-Sympathomimetika oder Glukokortikoiden führen und wären somit von klinischer Bedeutung.

## **1.3 Pharmakodynamische und pharmakokinetische Eigenschaften von Ipratropiumbromid**

### **1.3.1 Anwendung von Ipratropiumbromid in der Arzneimitteltherapie**

Ipratropiumbromid (IB) ist als Arzneistoff der Wirkstoffklasse der Anticholinergika oder Parasympatholytika zugehörig. Durch kompetitiven Antagonismus am muskarinischen Acetylcholinrezeptor  $M_3$ , einem G-Protein-gekoppelten Rezeptor, wird die Wirkung des Acetylcholins vermindert. Indem die Aktivierung der Phospholipase C und somit die Bildung der sekundären Botenstoffe Inositoltrisphosphat ( $IP_3$ ) und Diacylglycerin (DAG) sowie die Freisetzung von Calciumionen verhindert wird, wird durch Anticholinergika die Erregungsweiterleitung an glatten Muskelzellen blockiert. Dies hat zur Folge, dass an glatten Muskelzellen, wie beispielsweise in der Bronchialmuskulatur vorhanden, eine Kontraktion vermieden und somit eine Dilatation erzielt wird [7]. Da IB allerdings ein nicht-selektiver Inhibitor von  $M_1$ -,  $M_2$ - und  $M_3$ -Rezeptoren ist, kann der bronchodilatierende Effekt durch die Blockade am  $M_2$ -Rezeptor und die darauffolgende Acetylcholin-Ausschüttung teilweise antagonisiert werden [155].

In Deutschland wird IB vornehmlich zur symptomatischen Therapie der Chronisch Obstruktiven Lungenkrankheit (COPD = chronic obstructive pulmonary disease) eingesetzt. Die COPD ist mit Symptomen wie meist progressiver Atemnot, Husten und morgendlichem Auswurf assoziiert, welche durch eine individuell variable Kombination aus einer chronisch obstruktiven Bronchiolitis und einer emphysematösen destruktiven Veränderung des Lungenparenchyms verursacht wird [156]. Weltweit wird die COPD in der Statistik der Todesursachen vom fünften Rang im Jahr 2002 auf den vierten Rang im Jahre 2030 ansteigen, was mit einer geschätzten Prävalenz von 4 – 20 % bei über 40-jährigen Erwachsenen einhergeht [157]. Neben einer sofortigen Tabakkarenz ist der Einsatz von Bronchodilatoren, wie Anticholinergika und Beta-2-Sympathomimetika, als Basistherapie zur Symptomprävention und -reduktion indiziert [156, 158]. Für diese Indikation sind neben

Ipratropiumbromid aus der Gruppe der Anticholinergika auch die länger wirksamen Wirkstoffe Tiotropiumbromid und Glycopyrroniumbromid sowie seit 2012 Acclidiniumbromid und seit 2014 Umeclidiniumbromid (siehe Abbildung B.1) in Deutschland zugelassen [159-162].

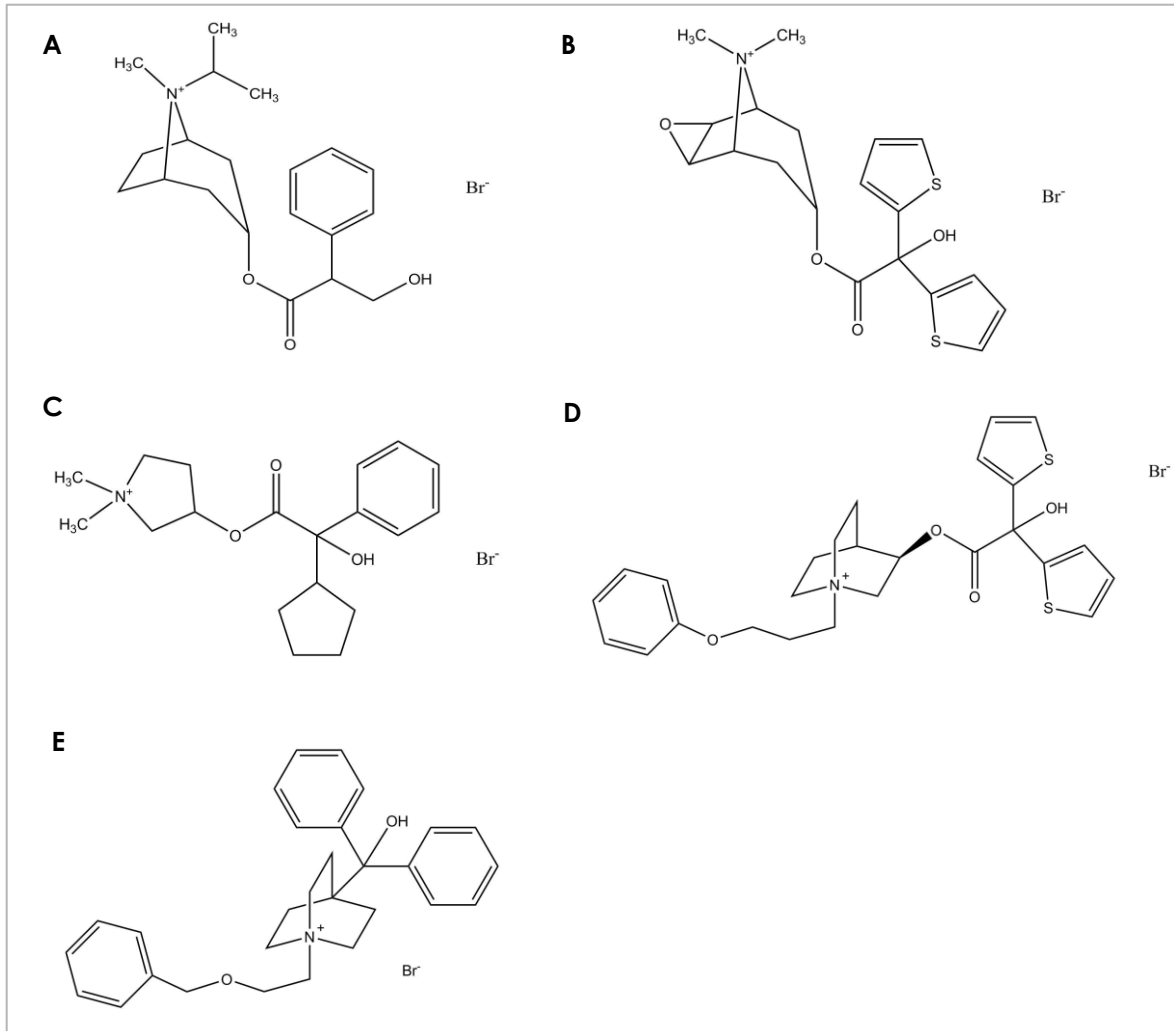


Abbildung B.1: Strukturformeln der in Deutschland zur Bronchospasmolyse zugelassenen Anticholinergika. **A:** Ipratropiumbromid, **B:** Tiotropiumbromid, **C:** Glycopyrroniumbromid, **D:** Acclidiniumbromid, **E:** Umeclidiniumbromid.

Zusätzlich wird IB auch zur Therapie des Asthma bronchiale eingesetzt, einer chronisch entzündlichen Atemwegserkrankung mit bronchialer Hyperreaktivität sowie einer individuell variablen Atemwegsobstruktion [163]. In Deutschland tritt Asthma bronchiale bei circa 10 % der Bevölkerung im Kindesalter und bei 5 % der Erwachsenen auf [163], weltweit sind etwa 300 Millionen Menschen betroffen [157]. Allerdings ist IB zur Bedarfstherapie des Asthma bronchiale nach dem Einsatz von Beta-2-Sympathomimetika nur Mittel der zweiten Wahl, in schweren Fällen kann es auch mit einem rasch wirkenden Beta-



2-Sympathomimetikum (RABA = rapid acting beta-2 agonist) kombiniert werden [163]. Fertigarzneimittel in Deutschland enthalten als fixe Kombinationen Fenoterolhydrobromid + Ipratropiumbromid sowie Salbutamolsulfat + Ipratropiumbromid [164]. Ein weiteres Indikationsgebiet des IB liegt in der Therapie von bradykarden Arrhythmien, bei welchen es allerdings als perorale bzw. parenterale Formulierung zum Einsatz kommt [165]. Darüber hinaus wird IB in Kombination mit Xylometazolinhydrochlorid als Nasenspray zur symptomatischen Behandlung von Nasenschleimhautanschwellung und Rhinorrhoe im Zusammenhang mit Schnupfen eingesetzt [164, 166].

Sowohl zur Therapie der COPD als auch des Asthma bronchiale wird IB inhalativ appliziert. Dazu stehen in Deutschland Fertigpräparate mit Formulierungen von Ipratropiumbromid als Monohydrat in Lösung zur Anwendung im Vernebler, zur Druckgasinhalation als Dosier-Aerosol oder zur Anwendung mit RespiMat® Inhalatoren zur Verfügung [167]. Bei der inhalativen IB-Therapie treten atropinartige, systemische Nebenwirkungen wie Harnverhalt, Mydriasis oder tachykarde Arrhythmien aufgrund der lokalen Applikation und der geringen Resorption nur gelegentlich auf, dagegen kommt es häufig zu Mundtrockenheit und Hustenreiz, gelegentlich ist sogar eine paradoxe Bronchokonstriktion zu beobachten [7, 168, 169].

Laut Arzneiverordnungsreport 2012 nahm die Zahl der verordneten Tagesdosen (DDD = defined daily dose) von Anticholinergika zur Bronchospasmolyse in einem Zeitraum von zehn Jahren (2002 – 2011) von 39 Millionen DDD auf 164 Millionen DDD um das Vierfache zu [170], was mit der zunehmenden Prävalenz der COPD in Deutschland korreliert. Dieser Anstieg ist jedoch hauptsächlich auf die Zunahme der Verordnungen des länger wirksamen Tiotropiumbromids zurückzuführen, die Verordnungszahlen von IB sanken dagegen in den letzten Jahren [170].

### **1.3.2 Pharmakokinetik von Ipratropiumbromid**

Nach inhalativer Anwendung von Ipratropiumbromid (IB) mittels kommerzieller Dosier-aerosole erfolgt je nach Formulierung und Inhalationstechnik eine Deposition von 10 - 30 % der applizierten Dosis in der Lunge [169]. Etwa zwei Drittel der Dosis werden schon im oropharyngealen Bereich abgeschieden und anschließend verschluckt [148]. Als quartäres Ammoniumsalz ist IB nur zu einem geringen Anteil (0,9 – 6,1 % [168]) aus dem Magen-Darm-Trakt resorbierbar und wird nach oraler Aufnahme größtenteils (88,5 % [169]) über den Fäzes ausgeschieden, womit systemische unerwünschte Nebenwirkungen reduziert werden. Allerdings wird der über die Lunge aufgenommene Dosisanteil innerhalb weniger Minuten in den systemischen Kreislauf aufgenommen, die Bioverfügbarkeit nach Inhalation, ohne Berücksichtigung des verschluckten Anteils, wird auf 7 – 28 % geschätzt

[168, 169]. Dabei unterliegt sowohl die orale als auch die inhalative Bioverfügbarkeit hohen interindividuellen Schwankungen [171]. IB bindet nur minimal an Plasmaproteine (4 – 10 % [168]) und weist ein scheinbares Verteilungsvolumen von 176 L auf [169]. Die Abnahme der Plasmakonzentrationsspiegel erfolgt biphasisch [171], mit einer terminalen Halbwertszeit von 1,6 Stunden, wobei die Gesamt-Clearance 2,3 L/min und die renale Clearance 0,9 L/min beträgt [155, 171]. Als Hauptmetabolismus wird eine Oxidation in der Leber postuliert, dabei sind die wesentlichen Metabolite nicht aktiv [168, 169]. Auch die Hydrolyse des Esters führt zu inaktiven Produkten [155]. Nach Inhalation ist ein Wirkungseintritt nach 15 Minuten zu beobachten, mit einer maximalen Verbesserung der Lungenfunktion nach 1 - 2 Stunden und einer Wirkdauer von 3 - 6 Stunden [155]. Aufgrund der geringen Halbwertszeit ist eine Verabreichung alle 6 - 8 Stunden erforderlich [155], die Dosis liegt dabei jeweils bei 20 - 40 µg IB, was ein bis zwei Aerosolhuben des Fertigarzneimittels *Atrovent® N Dosieraerosol* entspricht [169].

#### **1.4 Prinzip der Bestimmung der Pharmakokinetik von Ipratropiumbromid am LPM**

In einem nach Lindner et al. [147] modifizierten Modell [99, 142, 150] wurden humane Lungenlappen-Präparationen, bestehend aus einem bis drei Lungenlappen, in einem halboffenen Kreislauf perfundiert und erneut ventiliert. Die Lungenlappen wurden unmittelbar vor Versuchsdurchführung von Bronchialkarzinom-Patienten im Rahmen der konventionellen Therapie entnommen (siehe *Experimenteller Teil* 2.2). Mittels katheterisierter Arterien konnte der auf 37 °C temperierte Perfusionspuffer (siehe *Experimenteller Teil* 2.1.4) in die Lungenlappen-Präparationen gepumpt werden und trat nach Perfusion der selbigen am venösen Ausgang wieder aus (siehe *Experimenteller Teil* 2.3, Abbildung C.7). Durch Variation der Flussrate konnte ein Perfusionsdruck im optimalen Bereich von 20 – 40 mmHg erzielt werden, der pH-Wert des Perfusionspuffers lag optimaler Weise bei 7,4 (siehe *Experimenteller Teil* 2.4.2). Die Ventilation erfolgte über einen an den Haupt- oder Lappenbronchus festgenähten Silikonschlauch durch ein externes Beatmungsgerät im BiPAP (Biphasic Positive Airway Pressure) – Modus mit einer Atemfrequenz von 15 /min und einer Inspirationszeit von 1,7 s (weitere Ventilationsparameter siehe *Experimenteller Teil* 2.4.2).

Die Applikation von Ipratropiumbromid (IB) erfolgte aus dem Fertigarzneimittel *Atrovent® N Dosieraerosol* über eine zwischen Beatmungsgerät und Bronchus installierte Applikationshilfe, dabei wurde pro Hub eine nominale Menge von 20 µg IB [169] freigesetzt. Sechs Versuche am Lungen-Perfusions-Modell wurden mit der für COPD-Patienten üblichen Einmaldosis von 40 µg IB [169] durchgeführt. Um eine potentielle Sättigung von Arzneistoff-

transportern und eine damit verbundene veränderte Umverteilung von IB aus dem Lungengewebe in die Perfusionsflüssigkeit festzustellen, wurden zusätzlich drei Versuche mit Applikation von 100 µg IB ausgeführt. Drei weitere Versuche beinhalteten die vorherige zehnmütige Vernebelung einer 155 mM wässrigen L-Carnitin-Lösung (siehe *Experimenteller Teil 2.1.2*) mit Hilfe eines Inhalationsgerätes und die anschließende Applikation von 40 µg IB (siehe *Experimenteller Teil 2.4.4*). Letztgenannte Versuche sollten Aufschluss über eine potentielle Inhibition von Arzneistofftransportern und somit der Umverteilung in die Perfusionsflüssigkeit geben. Nach IB-Applikation erfolgte eine Probenentnahme zu definierten Zeitpunkten aus dem venösen Ausgang der Lungenlappen-Präparation mit anschließendem Volumenersatz (siehe *Experimenteller Teil 2.4.5*).

Die bei -80 °C gelagerten Proben wurden durch Proteinfällung mittels Acetonitril und anschließender dispersiven Festphasenextraktion aufgearbeitet (siehe *Experimenteller Teil 2.5.1*). Jeweils parallel dazu wurde eine individuelle Kalibriergerade aus der Blank-Lösung der jeweiligen Perfusion im IB-Konzentrationsbereich von 0 – 5 ng/ml erstellt (siehe *Experimenteller Teil 2.5.2*). Die Analyse erfolgte unter Verwendung einer neu entwickelten und validierten LC-MS/MS-Methode (siehe *Experimenteller Teil 1.2*) mit Ipratropium-d7-bromid (7DIB) als Internem Standard. Zur Bestimmung der tatsächlich deponierten Dosis wurde die an Applikationshilfe und zugehörige Verbindungsstücke adsorbierte IB-Menge extrahiert und ebenfalls mittels LC-MS/MS-Technik analysiert (siehe *Experimenteller Teil 2.6*). Die in den Perfusions-Proben gemessenen IB-Konzentrationen wurden auf den prozentualen Anteil der tatsächlich deponierten Dosis normalisiert um der unterschiedlich hohen IB-Deposition in den Lungenlappen-Präparationen gerecht zu werden.

## **1.5 Ergebnisse der Versuche am humanen Lungen-Perfusions-Modell**

### **1.5.1 Charakteristika der Lungenlappen-Präparationen**

Die Charakteristika der verwendeten humanen Lungenlappen-Präparationen sind in Tabelle B.1 dargestellt, wobei die Nummerierung der Experimente nach ihrem chronologischen Ablauf erfolgte. Während Experiment 1 - 3 wurden 100 µg Ipratropiumbromid (IB) appliziert, während Experiment 4 – 6 sowie 10 - 12 erfolgte eine Applikation von 40 µg IB und während Experiment 7 – 9 fand eine Vernebelung von L-Carnitin mit anschließender Applikation von 40 µg IB statt.

Tabelle B.1: Charakteristika der Lungenlappen-Präparationen mit Applikation von 100 µg Ipratropiumbromid (IB) (Experiment 1 – 3), mit Applikation von 40 µg IB (Experiment 4 - 6 und 10 – 12) und mit L-Carnitin-Vernebelung und anschließender Applikation von 40 µg IB (Experiment 7 – 9). m = männlich, w = weiblich, r = rechter Lungenflügel, l = linker Lungenflügel, OL = Oberlappen, ML = Mittellappen, UL = Unterlappen.

Experiment Nr.	Spender		Lungenlappen-Präparation		Dauer der Perfusion [min]
	Alter [J]	Geschlecht	Entnommenes Gewebe	Gewicht vor / nach Perfusion [g]	
1	61	m	r UL	738 / 758	60
2	85	w	r UL	240 / 288	60
3	56	w	l OL, UL	525 / 666	80
4	64	m	l UL	433 / 462	80
5	53	m	l OL	335 / 323	60
6	59	w	r UL	358 / 476	60
7	44	m	l OL	250 / 280	60
8	70	m	l OL	309 / 307	80
9	66	w	r OL, ML, UL	748 / 698	80
10	66	m	l UL	195 / 203	80
11	72	m	r UL	376 / 376	80
12	74	m	r OL	218 / 244	80

Sowohl bei Patient 3 als auch bei Patient 9 wurde anstelle einer Lobektomie eine Pneumektomie durchgeführt. Der linke Lungenflügel des Menschen besteht aus Ober- und Unterlappen, der rechte Lungenflügel dagegen aus Ober-, Mittel- und Unterlappen [172], weshalb sich die Präparationen hinsichtlich ihrer Lungenlappen-Anzahl unterschieden. Das mittlere Alter der operierten Patienten betrug  $64 \pm 10$  Jahre (MW  $\pm$  SD) und ein Drittel der Patienten war weiblichen Geschlechts. Das mittlere Gewicht der Präparationen vor Beginn der Perfusion betrug  $396 \pm 178$  g (MW  $\pm$  SD). Insgesamt fünf Perfusionen wurden frühzeitig (zum Zeitpunkt 60 min) beendet, da eine unzureichende Perfusion oder Beatmung stattfand oder es zu sichtbaren Bildungen von Ödemen kam.

### 1.5.2 Umverteilung von Ipratropiumbromid in die Perfusionsflüssigkeit nach Applikation unterschiedlicher Dosen

Nach Applikation von 40 µg Ipratropiumbromid (IB) und 100 µg IB am humanen Lungen-Perfusions-Modell konnten deutliche, jedoch statistisch nicht signifikante Unterschiede (einfaktorielle ANOVA mit Tukey's Post-Hoc-Test,  $p > 0,05$ ) der Umverteilung von IB in die Perfusionsflüssigkeit festgestellt werden (siehe Abbildung B.2).

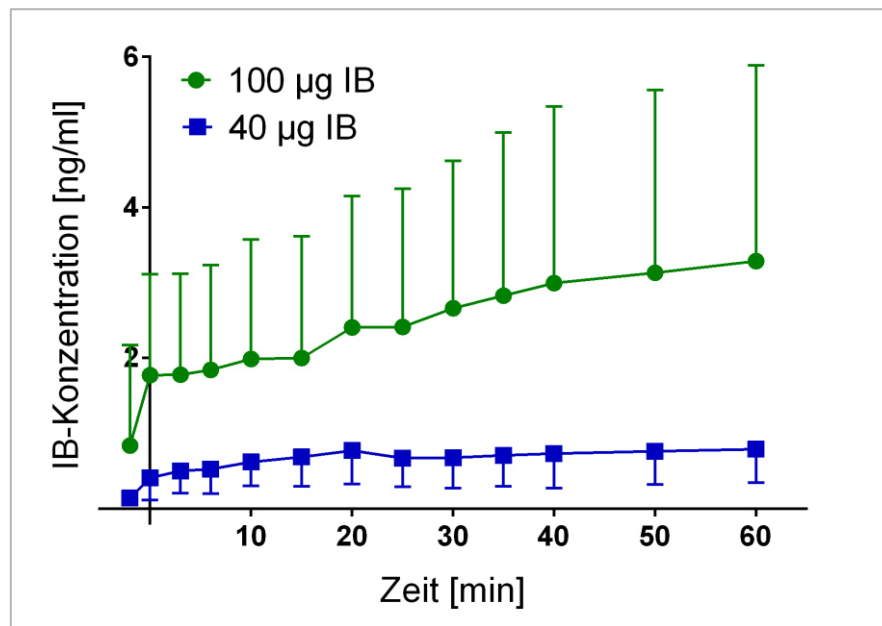


Abbildung B.2: Zeitlicher Verlauf der Umverteilung von Ipratropiumbromid (IB) in die Perfusionsflüssigkeit. Dargestellt sind die Kurvenverläufe nach Applikation von 100 µg IB (grün,  $n = 3$ ) und nach Applikation von 40 µg IB (blau,  $n = 6$ ). Die Konzentrationen wurden normalisiert auf den prozentualen Anteil der tatsächlich deponierten Dosis (MW  $\pm$  SD). Es lagen zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede vor (einfaktorielle ANOVA mit Tukey's Post-Hoc-Test,  $p > 0,05$ ).

Da zwei der drei Perfusionen mit Applikation von 100 µg IB aufgrund unzureichender Beatmung und Perfusion bereits nach 60 Minuten beendet werden mussten, konnten nur bis zu diesem Zeitpunkt aussagekräftige Vergleiche stattfinden. Die maximal erreichte IB-Konzentration nach 60 min lag nach Applikation von 40 µg IB bei  $0,79 \pm 0,45$  ng/ml ( $n = 6$ ) und nach Verabreichung von 100 µg IB bei  $3,29 \pm 2,60$  ng/ml ( $n = 3$ ). Die gemessenen Werte wurden dabei jeweils auf den prozentualen Anteil der tatsächlich deponierten Dosis (siehe *Experimenteller Teil 2.6*) normalisiert. Der Zeitpunkt -2 min beschreibt den Beginn der IB-Applikation, während welcher bereits die erste Probe genommen wurde. Zum Zeitpunkt 0 min war die Applikation vollständig ausgeführt.

Die Werte der Area under the curve (Fläche unter der Kurve) vom Zeitpunkt 0 min bis zum Zeitpunkt 60 min ( $AUC_{0-60 \text{ min}}$ ) betragen  $155,1 \pm 119,4$  ng/ml x min für 100 µg IB und  $41,8 \pm 22,6$  ng/ml x min für 40 mg IB (siehe Abbildung B.4). Die  $AUC_{0-60 \text{ min}}$  nach Applikation von 100 µg IB war dabei signifikant höher (einfaktorielle ANOVA mit Holm-Sidak's Post-Hoc-Test,  $p < 0,05$ ) als nach Applikation von 40 µg IB. Eine dosisabhängige Proportionalität der Konzentrationen und auch der  $AUC_{0-60 \text{ min}}$  ließ sich aus den Mittelwerten näherungsweise ableiten. Somit war eine Sättigung eventuell beteiligter Transporter durch die 2,5-fache Menge der applizierten Dosis offenbar noch nicht eingetreten.

### 1.5.3 Umverteilung von Ipratropiumbromid in die Perfusionsflüssigkeit nach Vernebelung von L-Carnitin

Nach Applikation von 40 µg Ipratropiumbromid (IB) mit und ohne vorheriger Vernebelung von L-Carnitin (CAR) am humanen Lungen-Perfusions-Modell konnten keine signifikanten Unterschiede (einfaktorielle ANOVA mit Tukey's Post-Hoc-Test,  $p > 0,05$ ) der Umverteilung in die Perfusionsflüssigkeit festgestellt werden (siehe Abbildung B.3). Die maximal erreichte IB-Konzentration zum Zeitpunkt 80 min lag nach Applikation von 40 µg IB mit vorheriger CAR-Vernebelung bei  $0,75 \pm 0,81$  ng/ml und nach Verabreichung von 40 µg IB ohne CAR-Vernebelung bei  $0,91 \pm 0,62$  ng/ml. Die Werte wurden auch hier jeweils auf den prozentualen Anteil der tatsächlich deponierten Dosis (siehe Experimenteller Teil 2.6) normalisiert.

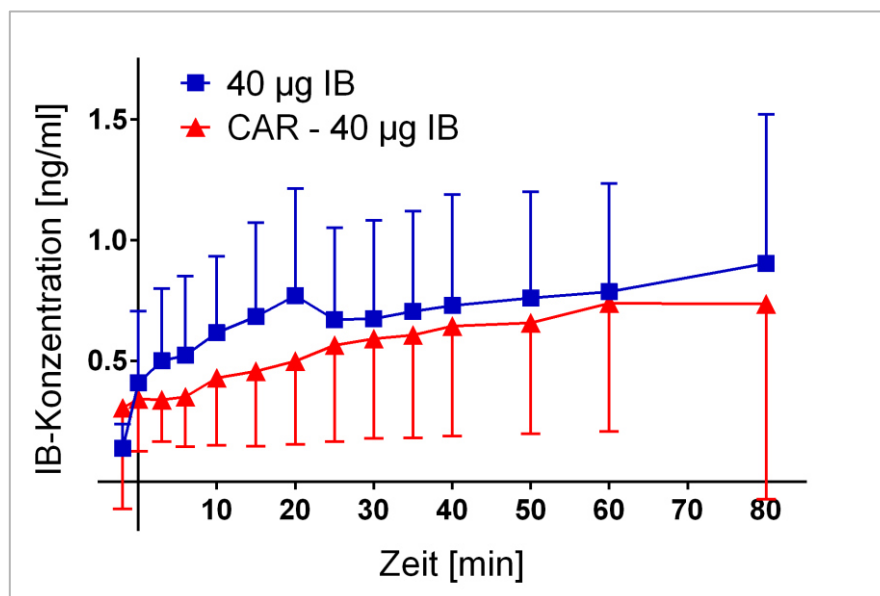


Abbildung B.3: Zeitlicher Verlauf der Umverteilung von Ipratropiumbromid (IB) in die Perfusionsflüssigkeit. Dargestellt sind die Kurvenverläufe nach Applikation von 40 µg IB mit vorheriger Vernebelung von L-Carnitin (CAR) (rot,  $n = 3$ ) und nach Applikation von 40 µg IB ohne vorheriger Vernebelung von CAR (blau,  $n = 6$ ). Die Konzentrationen wurden normalisiert auf den prozentualen Anteil der tatsächlich deponierten Dosis (MW  $\pm$  SD). Zum Zeitpunkt 80 min wurden weniger Daten in die Auswertung eingeschlossen, da nicht alle Perfusionen bis zu diesem Zeitpunkt durchgeführt wurden (40 µg IB:  $n = 4$ ; CAR + 40 µg IB:  $n = 2$ ). Es lagen zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede vor (einfaktorielle ANOVA mit Tukey's Post-Hoc-Test,  $p > 0,05$ ).

Die  $AUC_{0-60 \text{ min}}$ -Werte lagen nach CAR-Vernebelung mit anschließender Applikation von 40 µg IB bei  $33,4 \pm 22,9$  ng/ml x min und nach Verabreichung von 40 µg IB ohne vorheriger CAR-Vernebelung bei  $41,8 \pm 22,6$  ng/ml x min (siehe Abbildung B.4). Die Werte unterschieden sich dabei nicht signifikant (einfaktorielle ANOVA mit Holm-Sidak's Post-Hoc-Test,

$p > 0,05$ ) und eine Inhibition der IB-Umverteilung in die Perfusionsflüssigkeit durch eine vorangegangene CAR-Vernebelung konnte somit nicht gezeigt werden.

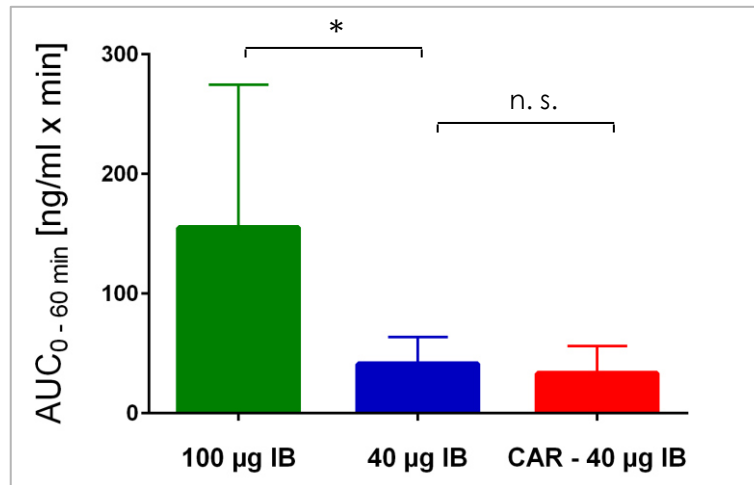


Abbildung B.4: Area under the curve ( $AUC_{0-60 \text{ min}}$ ) der durchgeführten Perfusionen nach Applikation von 100 µg Ipratropiumbromid (IB) (grün,  $n = 3$ ), nach Applikation von 40 µg IB (blau,  $n = 6$ ) und nach L-Carnitin (CAR)-Vernebelung mit anschließender Applikation von 40 µg IB (rot,  $n = 3$ ). Die Werte wurden normalisiert auf den prozentualen Anteil der tatsächlich deponierten Dosis ( $MW \pm SD$ ). \*  $p < 0,05$  (einfaktorielle ANOVA mit Holm-Sidak's Post-Hoc-Test, n. s. = nicht signifikant).

Auch unter der Annahme, die IB-Verteilung in die Perfusionsflüssigkeit sei abhängig vom Gewicht der Lungenlappen-Präparation, ließ sich nach Normalisierung auf das Gewicht [kg] der Präparationen die gleiche, jedoch nicht signifikante Tendenz erkennen (einfaktorielle ANOVA mit Holm-Sidak's Post-Hoc-Test,  $p > 0,05$ ): Der  $AUC_{0-60 \text{ min}}$ -Wert lag für die Applikation von 100 µg IB bei  $356,9 \pm 273,1 \text{ ng/ml/kg} \times \text{min}$  und damit 2,4-fach über dem Wert der Applikation von 40 µg IB ( $151,7 \pm 120,5 \text{ ng/ml/kg} \times \text{min}$ ). Nach CAR-Vernebelung mit anschließender Applikation von 40 µg IB lag der  $AUC_{0-60 \text{ min}}$ -Wert bei  $114,5 \pm 90,9 \text{ ng/ml/kg} \times \text{min}$  und demnach 25 % unter dem Wert nach alleiniger IB-Applikation (siehe Abbildung B.5).

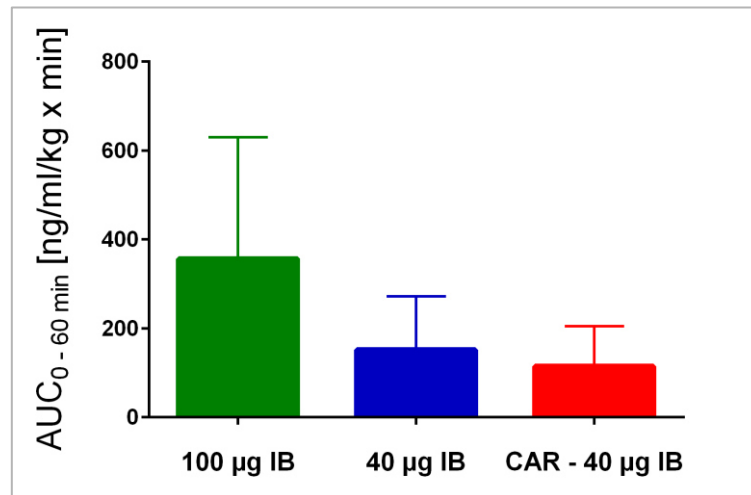


Abbildung B.5: Area under the curve ( $AUC_{0-60 \text{ min}}$ ) der durchgeführten Perfusionsen nach Applikation von 100 µg Ipratropiumbromid (IB) (grün,  $n = 3$ ), nach Applikation von 40 µg IB (blau,  $n = 6$ ) und nach L-Carnitin (CAR)-Vernebelung mit anschließender Applikation von 40 µg IB (rot,  $n = 3$ ). Die dargestellten Werte wurden normalisiert auf den prozentualen Anteil der tatsächlich deponierten Dosis und auf das Gewicht der Präparation ( $MW \pm SD$ ). Keine signifikanten Unterschiede nach einfaktorieller ANOVA mit Holm-Sidak's Post-Hoc-Test ( $p > 0,05$ ).

## 1.6 Diskussion

### 1.6.1 Vergleich der am humanen Lungen-Perfusions-Modell ermittelten pharmakokinetischen Parameter mit *in vivo* Untersuchungen

Die Plasmakonzentration von Ipratropiumbromid (IB) nach Inhalation therapeutischer Dosen ist gering, weswegen eine äußerst sensitive analytische Methode zur exakten Bestimmung von Nöten ist [138, 139, 148]. Untersuchungen zur Pharmakokinetik von IB nach Inhalation an gesunden Probanden zeigten teilweise das Problem von geringen Plasmakonzentrationen und vergleichsweise hohen Bestimmungsgrenzen (lower limit of quantification = LLOQ: 500 pg/ml), wodurch der Plasmaspiegel nur über eine Stunde detektiert werden konnte [171]. Die in der vorliegenden Arbeit eigens entwickelte Extraktionsmethode mit anschließender LC-MS/MS-Analytik konnten dahingehend optimiert werden, dass ein LLOQ von 10 pg/ml erreicht wurde (siehe *Experimenteller Teil 1.5.4*). Dieses stimmt bestens mit neueren publizierten Methoden zur Bestimmung von IB aus Rattenplasma (LLOQ = 8 pg/ml) [173], Pferdeplasma (LLOQ = 10 pg/ml) [174] und humanem Plasma (LLOQ = 50 pg/ml) [175] überein. In Anlehnung an internationale Richtlinien [176-179] erfolgte die Validierung der Extraktions- und LC-MS/MS-Methode (siehe *Experimenteller Teil 1.5*). Die zuverlässige Detektion von IB aus den Perfusions-Proben wurde durch eine Linearität im Konzentrationsbereich von 0 – 5 ng/ml (siehe *Experimenteller Teil 1.5.2*) sowie einer Intraday- / Interday-Richtigkeit und -Präzision von  $\geq 93,8 \%$  respektive  $\leq 2,5 \%$  sichergestellt (siehe *Experimenteller Teil 1.5.3*). Für jede Perfusion individuell generierte



Kalibriergeraden aus Perfusions-Blank-Lösungen (siehe *Experimenteller Teil 1.5.5*) ermöglichten eine Messung ohne detaillierte Validierung der bei der LC-MS/MS-Analytik auftretenden Matrixeffekte [180-184], da die Matrix der Kalibriergeraden und der zu vermessenden Perfusionsproben als identisch angesehen werden konnte.

Die tatsächlich deponierte IB-Dosis betrug im Mittel  $36,4 \pm 9,0 \%$  (MW  $\pm$  SD) der nominalen Dosis (siehe *Experimenteller Teil 2.6*). Allgemein wird davon ausgegangen, dass nach inhalativer Anwendung am Patienten ebenfalls bis zu 60 – 90 % der applizierten Dosis in der oropharyngealen Region abgelagert und anschließend geschluckt werden [148]. Somit erreicht auch nach Anwendung *in vivo* lediglich ein Anteil von circa einem Drittel der pulmonal applizierten Dosis den anvisierten Wirkort, was hervorragend mit den in der vorliegenden Arbeit ermittelten Werten korreliert. In Untersuchungen zur Pharmakokinetik von Beta-2-Sympathomimetika am LPM wurden jedoch deutlich höhere Anteile an tatsächlich deponierter Wirkstoffmenge erzielt (71 - 96 % der vernebelten Wirkstoffmenge) [151, 185, 186]. Dabei wurden die Arzneistoffe allerdings mithilfe eines Verneblers appliziert, nicht wie in den hier vorgenommenen Untersuchungen mittels handelsüblichen Druckgasdosieraerosol. Es kann angenommen werden, dass durch Vernebelung Wirkstoffaerosole unter geringerer Druckauswirkung frei gesetzt werden als durch Druckgasdosieraerosole, womit eine geringere Ablagerung an der Applikationshilfe und damit eine höhere tatsächlich deponierte Dosis begründet werden könnte. Nach Applikation von Beclometasondipropionat am LPM aus zwei unterschiedlichen Druckgasdosieraerosolen wurden im Mittel nur 69 % (Sanasthmax®) und 78 % (Ventolair®) der nominalen Wirkstoffmenge in der Lunge deponiert [142], was aber noch immer unverkennbar mehr war, als in der vorliegenden Arbeit. Ein weiterer Erklärungsansatz für die geringeren Werte in dieser Untersuchung findet sich in der Bestimmungsmethode der tatsächlich deponierten Dosis: Abweichend von bisherigen Untersuchungen am LPM wurde ein zweiter Interner Standard eingesetzt, um den aus der Applikationshilfe extrahierten Dosisanteil zu bestimmen. Es wurde festgestellt, dass lediglich  $65,5 \pm 3,9 \%$  des Internen Standards aus der Extraktionshilfe extrahiert werden konnte (siehe *Experimenteller Teil 2.6*). Daraus ließ sich schlussfolgern, dass auch nur der gleiche prozentuale Anteil des applizierten Wirkstoffes aus der Applikationshilfe extrahiert wurde, was zur Berechnung von höheren Werten der adsorbierten Dosis und damit zu geringeren Werten für den tatsächlich deponierten Dosisanteil führte. Nach Applikation von IB an einem Dialysemodell wurden dagegen ebenfalls circa zwei Drittel des Arzneistoffes anschließend an den verwendeten Applikationshilfen wiedergefunden und dementsprechend ein Drittel der Substanz auf das Gewebe appliziert [144]. Auch in tierischen Lungen-Perfusions-Modellen konnte zum Teil nur eine Lungen-Deposition der untersuchten Stoffe von circa einem Drittel erreicht werden [139]. Somit stehen die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Werte zur tatsächlich deponierten IB-Dosis bestens im Einklang zu *ex vivo* und *in vivo* gewonnenen Daten.

Hydrophile kleine Moleküle, wie Ipratropiumbromid (log P-Wert: -1,8 [187]), werden innerhalb der ersten zehn Minuten nach Applikation aus dem Lungengewebe absorbiert, lipophile kleine Moleküle sogar innerhalb von Sekunden oder weniger Minuten [188]. Diese Abschätzung korreliert ausgezeichnet mit den hier erhaltenen Daten, da zehn Minuten nach Ende der IB-Applikation bereits 53 - 85 % der zum Zeitpunkt 60 min detektierten Konzentration gemessen werden konnte (siehe *Tabellarischer Anhang 2.2*). Die maximalen IB-Konzentrationen nach Applikation von 40 µg IB mit vorheriger L-Carnitin-Vernebelung betragen 0,16 – 1,31 ng/ml, nach Applikation von 40 µg IB 0,20 – 1,63 ng/ml und nach Applikation von 100 µg IB entsprechend 0,83 - 6,00 ng/ml (siehe *Tabellarischer Anhang 2.2*). Die gemessenen Konzentrationen wurden dabei auf den prozentualen Anteil der tatsächlich deponierten Dosis normalisiert (siehe *Experimenteller Teil 2.6*), um einer unterschiedlich starken Deposition von IB in den Lungenlappen-Präparationen gerecht zu werden. Im Gegensatz zu vorangegangenen Untersuchungen am LPM wurden die Konzentrationen in dieser Studie nicht in % der applizierten Dosis ausgedrückt, da gerade der Unterschied zwischen zwei verschiedenen Dosierungen festgestellt werden sollte. Unter Berücksichtigung des verwendeten Perfusionspuffer-Volumens (1,5 l) lagen die umverteilten absoluten Wirkstoffmengen der zwölf Perfusionen demzufolge im Bereich von 0,06 – 2,36 µg, was wiederum 0,15 – 2,36 % der nominalen IB-Dosis entsprach. Demnach kann die Umverteilung von IB in den Perfusionspuffer mit 0,7 – 9,0 % der tatsächlich deponierten Dosis abgeschätzt werden. Die postulierte Bioverfügbarkeit von IB nach Inhalation ist mit 7 – 28 % [168, 169] in einem deutlich höheren Bereich angesiedelt. Ein möglicher Erklärungsansatz für die differierenden Werte liegt in der unterschiedlichen Bestimmungsmethode. Nach inhalativer IB-Applikation an gesunden Probanden wurde über die kumulative renale Ausscheidungsrate eine Bioverfügbarkeit von  $6,9 \pm 5,1$  % (MW  $\pm$  SD) bestimmt, dabei wurde aber auch, im Gegensatz zu den Untersuchungen am LPM, der verschluckte Dosisanteil miteinbezogen [171]. Daneben lag in den Lungenlappen-Präparationen eine geringere totale Resorptionsoberfläche als in der humanen Lunge *in vivo* vor, womit die niedrigere Bioverfügbarkeit in den vorliegenden Experimenten ebenfalls erklärbar wäre. Unter Berücksichtigung der hohen interindividuellen Schwankungen der publizierten Werte [171] liegen die in der vorliegenden Untersuchung ermittelten, prozentual in den Perfusionspuffer umverteilten IB-Mengen durchaus in einem vergleichbaren Bereich.

Bei gesunden Probanden und Patienten mit chronischen Lungenerkrankungen, wie *Asthma bronchiale*, kann die pulmonale Applikation von Arzneistoffen zu variierenden pharmakokinetischen Beobachtungen führen [148]. Dies wird mit einer weniger effizienten Arzneistoff-Deposition in erkrankten Patienten begründet [148]. In der vorliegenden Studie wurden Lungenlappen von Patienten mit einem resektablen Bronchialkarzinom verwendet. Damit muss von einer zumindest teilweise eingeschränkten Funktion gegenüber gesundem Lungengewebe ausgegangen werden. Jedoch sind auch COPD-Patienten,

bei welchen IB hauptsächlich therapeutisch angewandt wird, von einer eingeschränkten Lungenfunktion mit FEV<sub>1</sub>/FVC-Werten < 0,7 [156] betroffen, womit eine vergleichbare Arzneistoff-Deposition zu den Versuchen am LPM angenommen werden kann. Hohe inter-individuelle Schwankungen der Bioverfügbarkeit wurden auch nach inhalativer Applikation an gesunden Probanden festgestellt [171].

Neben physiologischen Komponenten, wie dem Lungenvolumen, und pathophysiologischen Einflüssen, wie der Verengung der Atemwege, spielen auch Inhalationstechniken der Probanden wie die Einatemgeschwindigkeit, das Einatemvolumen und die Zeit des Atemanhaltens eine Rolle für die Deposition der Partikel in den Atemwegen [189]. Bedingt durch die unterschiedliche Lokalisation und Größe der verwendeten Lungenlappen sowie durch den variierenden Gesundheitszustand der Spender enthielten die am LPM gewonnenen Daten ebenfalls hohe Standardabweichungen. Trotz konstanter Ventilationsparameter, wie der Atemfrequenz von 15/min, einer Inspirationszeit von 1,7 s, dem positiven end-expiratorischen Druck (PEEP) von 1 mbar und einem angestrebten maximalen Druck von 20 mbar, variierte aufgrund der unterschiedlichen Beschaffenheit und Größe der Lungenlappen-Präparationen das erzielte Atemminutenvolumen ( $4,40 \pm 2,32$  L/min (MW  $\pm$  SD), siehe *Experimenteller Teil 2.4.2*). Möglicherweise kam es dadurch zu unterschiedlichem Depositions-Verhalten des applizierten Aerosols und somit zu einer variierenden Absorption. Allerdings konnte keine Korrelation des Atemminutenvolumens mit der jeweiligen tatsächlich deponierten Dosis festgestellt werden. Außerdem zeigten die auf das Gewicht der Präparationen normalisierten Werte der AUC<sub>0-60 min</sub> (siehe Abbildung B.5) die gleichen Tendenzen wie die nicht normalisierten Werte der AUC<sub>0-60 min</sub> der detektierten IB-Konzentrationen (siehe Abbildung B.4). Ein weiteres Kriterium für zuverlässige Absorptionvorgänge in den verwendeten Lungenlappen ist die Stabilität der Präparationen. Als Indikator hierfür wurde die Gewichtszunahme während der Perfusion herangezogen, wobei bei einer Zunahme von über 75 % des Ausgangsgewichts von einem manifesten Lungenödem ausgegangen wurde, ein kritischer Bereich wurde bei einer Gewichtszunahme von 50 – 75 % erreicht [147]. Über die Gewichtskontrolle vor und nach der Perfusion [139] wurde eine eventuelle Ödem-Bildung kontrolliert, wobei lediglich drei Präparate eine nennenswerte Gewichtszunahme (20 -35 %) nach Perfusion zeigten (siehe Tabelle B.1) und somit keiner der Lungenlappen an den kritischen Bereich gelangte.

Ein immenser Vorteil der Untersuchung mittels humanen Lungen-Perfusionsmodell liegt in der Betrachtung der Verteilung inhalativ verabreichter Substanzen in Abwesenheit hepatischer Metabolismus-Vorgänge. Bei Analyse von Blutproben aus in klinischen *in vivo* Studien könnte möglicherweise ein Teil der inhalierten Substanz bei der Leberpassage bereits metabolisiert und die Konzentration dementsprechend unterschätzt werden [148]. Im Gegensatz zu schnell fallenden Plasmaspiegelkurven nach IB-Inhalation von gesunden Probanden [171] konnte in den vorliegenden Untersuchungen eine tendenziell steigende

IB-Konzentration im Probenpuffer konstatiert werden (siehe Abbildung B.2 und Abbildung B.3), womit die Hypothese des schnellen Metabolismus in der Leber unterstützt wird. Bei Interpretation der vorliegenden Ergebnisse muss berücksichtigt werden, dass auch im Bronchialepithel ein präsystemischer Metabolismus von Xenobiotika stattfinden kann [137, 139], was unter Umständen die IB-Konzentrationen im Perfusionspuffer minimieren hätte können. So zum Beispiel werden auch in der Lunge Phase I und Phase II Enzyme, wie Cytochrom P-450 Enzyme, exprimiert, wobei jedoch die metabolische Kapazität der Lunge im Vergleich zur Leber relativ gering ist [190]. Wie die Enzymausstattung ist auch die pulmonale Clearance, bestehend aus mukoziliärer Clearance, Phagozytose durch Makrophagen und Metabolismus, im humanen Lungen-Perfusions-Modell weitestgehend erhalten und damit exzellent vergleichbar mit der Situation *in vivo* [139]. Da IB als funktionelle chemische Gruppe einen Ester enthält, welcher sowohl durch im Lungengewebe exprimierte Esterasen [191] als auch im alkalischen Milieu einer Ester-Spaltung unterliegen kann, musste der pH-Wert während der Perfusionsversuche in engen Zeitabständen kontrolliert und gegebenenfalls angepasst werden (siehe *Experimenteller Teil 2.4.2*). Ergänzend wurden Stabilitätsuntersuchungen mit IB in exemplarischen Blank-Lösungen der Perfusions-Experimente durchgeführt, welche keine signifikante Erniedrigung der IB-Konzentration nach zweistündiger Inkubation bei 37 °C ergaben (siehe *Experimenteller Teil 1.5.6*). Demnach kann davon ausgegangen werden, dass auch während der Versuchsdurchführung kein Abbau von Ipratropiumbromid durch Komponenten der Blank-Lösung stattfand.

### **1.6.2 Umverteilung von Ipratropiumbromid in die Perfusionsflüssigkeit nach Applikation unterschiedlicher Dosen**

Die Untersuchungen am Lungen-Perfusions-Modell zeigten nach Applikation von 100 µg Ipratropiumbromid (IB) deutlich höhere, allerdings zu keinem Zeitpunkt signifikant unterschiedliche Konzentrationen im Perfusionspuffer als nach Verabreichung von 40 µg IB. Bedingt durch starke interindividuelle Unterschiede der Lungenlappen-Präparationen sowie eine vergleichsweise geringe Anzahl an Versuchen wurden hohe Standardabweichungen der IB-Konzentrationen beobachtet, was die fehlende statistische Signifikanz erklärte. Im Gegensatz dazu konnte bei Betrachtung der *Area under the curve* ( $AUC_{0-60 \text{ min}}$ ) ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ) konstatiert werden, der Wert der  $AUC_{0-60 \text{ min}}$  lag nach Applikation von 100 µg IB in etwa 3,7-fach über dem Wert nach Applikation von 40 µg IB (siehe 1.5.2). Nach Normalisierung auf das Gewicht der Lungenlappen-Präparationen konnte ein 2,4-facher Wert für die  $AUC_{0-60 \text{ min}}$  festgestellt werden (siehe 1.5.3), was mit der 2,5-fach höheren applizierten IB-Dosis korrelierte. Eine vermutete Sättigung des Absorptionsmechanismus, bedingt durch sättigbare Transporterproteine nach Applikation einer höheren Dosis IB, konnte somit nicht bestätigt werden. Diese Erkenntnis steht bestens im Einklang mit Untersuchungen zur Absorption von IB nach peroraler Applikation an

gesunden Probanden, wobei nach Anwendung höherer Dosen ebenfalls keine Sättigung der Aufnahme festgestellt wurde [171]. Aus *in vivo* Inhalationsstudien an Ratten wurde zudem geschlussfolgert, dass es keine spezialisierten Absorptionsmechanismen für IB in der Lunge gibt [139]. Allerdings bestätigen neuere *in vitro* Untersuchungen, dass Ipratropiumbromid ein Substrat der organischen Kationentransporter OCT1 und OCT2 [94] sowie OCTN1 und OCTN2 [95] ist. Diese und weitere Transporter wurden bereits im humanen Bronchialepithel und in humanen Bronchialzellkultur-Modellen nachgewiesen [21]. Für das Beta-2-Sympathomimetikum Salbutamol wurde überdies der aktive Transport in den Bronchialepithelzellen Calu-3 und 16HBE14o- gezeigt [98], eine neuere Untersuchung diskutiert OCT1 als hauptverantwortlichen Transporter [100]. Die Relevanz der Transporter-vermittelten Absorption nach pulmonaler Applikation pharmazeutischer Formulierungen *in vivo* ist jedoch noch weitestgehend ungeklärt [21]. Die hier gewonnen Erkenntnisse lassen keine Rückschlüsse auf die Beteiligung von Arzneistofftransportern an der Umverteilung von Ipratropiumbromid *ex vivo* zu, es können lediglich Hypothesen aufgestellt werden: Entweder sind die beteiligten Transporter im Epithel der Lunge hoch genug exprimiert, so dass eine 2,5-fach höhere IB-Dosis die Transporterkapazität nicht erschöpft, oder aber der aktive Transport von Ipratropiumbromid aus dem Bronchialepithel ist nicht der alleinige Absorptionsweg und spielt sowohl *ex vivo* als auch *in vivo* nur eine untergeordnete Rolle.

Da die komplexen Absorptions- und Eliminationsvorgänge in den verschiedenen Lungenregionen nicht differenziert untersucht werden konnten, wurde bei der Betrachtung der Ergebnisse aus den Perfusionsversuchen von der Lunge als ein Ein-Kompartiment-Modell [139] ausgegangen. Für eine passive Absorption sowie für die pulmonale Clearance wird allgemein eine Kinetik erster Ordnung angenommen, ein aktive Absorption dagegen würde über eine Michaelis-Menten-Kinetik beschrieben [139]. Den Konzentrations-Zeitverläufen der gemessenen Daten (siehe Abbildung B.2 und Abbildung B.3) konnte keine der beiden Kinetik-Modelle eindeutig zugeordnet werden, da weder ein exponentieller Kurvenverlauf noch eine gesättigte Umverteilung von IB zu erkennen war. Somit sind neben einer Transporter-Beteiligung an den Umverteilungsvorgängen auch andere Transportwege, wie die passive Diffusion durch die wässrigen Poren der Tight Junctions, also ein parazellulärer Transport, für IB nicht auszuschließen [5, 188]. Aufgrund der dauerhaft positiven Ladung des Ipratropiums scheint dagegen die passive Diffusion durch die Lipiddoppelschicht der Zellmembranen des Bronchialepithels unwahrscheinlich. Weiterhin muss ein vesikulärer Transport durch die Zellen des Lungenepithels bedacht werden, welcher jedoch primär für Makromoleküle wie Peptide und Proteine beschrieben wurde [5]. Zudem unterliegt die Rezeptor-vermittelte Endozytose respektive Transzytose ebenfalls einer Sättigungskinetik [192], die hier nicht zu beobachten war. Eine aktive Absorption von Ipratropiumbromid, vermittelt durch Transporterproteine, erscheint demnach durchaus wahrscheinlich.

### 1.6.3 Umverteilung von Ipratropiumbromid in die Perfusionsflüssigkeit nach Vernebelung von L-Carnitin

Nach vorheriger Vernebelung des selektiven OCTN1/2-Substrates [57, 154, 193] und -Inhibitors [56] L-Carnitin konnten keine signifikant geringeren IB-Konzentrationen im Perfusionspuffer detektiert werden. Die daraus resultierende  $AUC_{0-60 \text{ min}}$  wurde dabei um 20 % des Wertes nach alleiniger IB-Verabreichung verringert, normalisiert auf das Gewicht der Präparationen fand eine Reduktion um 25 % des entsprechenden Wertes nach IB-Applikation statt. Die Reduktion der  $AUC_{0-60 \text{ min}}$  war jedoch in beiden Fällen nicht signifikant (siehe 1.5.3). Vergleichbare Untersuchungen zur Reduktion der Wirkstoffkonzentration im Perfusionspuffer nach vorheriger Vernebelung von L-Carnitin stellten für Salbutamol [185] und Salmeterol [151] jeweils eine Verringerung der Konzentration von über 90 % fest. Aus dieser deutlichen Inhibition der Umverteilung der beiden Beta-2-Sympathomimetika über die Dauer der Versuchsdurchführung wurde geschlussfolgert, dass beide Substanzen einem OCTN1- oder OCTN2-vermitteltem Transport unterliegen [99, 151, 185]. Da der Transport über OCTN1 und OCTN2 pH-abhängig verläuft [85], ist möglicherweise nicht nur eine kompetitive Inhibition der Transporter-Moleküle durch L-Carnitin als Grund für die reduzierte Umverteilung von Salbutamol und Salmeterol zu nennen, sondern auch ein veränderter, stärker negativer pH-Wert im luminalen Bereich der Lunge. Dieser hätte weiterhin zur Folge, dass Wirkstoffe zu einem größeren Anteil protoniert vorliegen und somit zu einem geringeren Teil mittels passiver Diffusion durch die Lipiddoppelschicht der Epithelzellen absorbiert werden. Auf das permanent positiv geladene Ipratropium wäre diese Auswirkung nicht vermerkbar gewesen, was nach dieser Hypothese zu keiner zusätzlichen Reduktion der Absorption geführt hätte. Ein weiterer möglicher Erklärungsansatz für die festgestellte unterschiedliche Hemmung der Umverteilung besteht in der Theorie, dass im Absorptionsprozess von IB zusätzliche Transporter beteiligt sind im Kontrast zur Absorption von Beta-2-Sympathomimetika. *In vitro* wurde IB bereits als Substrat von OCT1 und OCT2, jedoch nicht von OCT3 identifiziert [94]. Für Salbutamol wurde in einer neueren Untersuchung lediglich der OCT1-vermittelte Transport beschrieben [100]. Das Ausmaß der Beteiligung einzelner Transporter an den Absorptionsvorgängen in der humanen Lunge hängt zusätzlich von deren relativem Expressionsmuster im Lungengewebe ab, was bis dato nur unzureichend untersucht ist [21].

Das humane Lungen-Perfusions-Model bietet, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, die einzigartige Möglichkeit, pharmakokinetische Eigenschaften von inhalativen Arzneistoffen *ex vivo* zu untersuchen und gleichzeitig eine potentielle inhibierende Wirkung von parallel inhalativ applizierten Substanzen zu evaluieren. In der Arzneimitteltherapie kommen bereits eine Reihe von Präparaten zum Einsatz, welche eine Kombination von inhalativen Wirkstoffen enthalten, wie beispielsweise die kombinierte Formulierung von Ipratropiumbromid und Salbutamolsulfat oder von Formoterolhemifumarat und Beclometasondipropionat [164, 170]. Humanstudien zur Zulassung dieser Arzneistoff-Kombinationen betrachten

oftmals vorrangig pharmakodynamische Fragestellungen. Nach unserem Wissenstand ist beispielsweise keine *in vivo* Studie publiziert, welche die Pharmakokinetik von pulmonal appliziertem Ipratropiumbromid nach separater Applikation mit dem Einsatz von kombinierten Wirkstoff-Formulierungen vergleicht. Inwiefern *in vivo* durch die zeitgleiche Inhalation mehrerer Arzneistoffe eine Beeinflussung der pharmakokinetischen Parameter, wie beispielsweise eine geringere pulmonale Absorption durch Sättigung von Transporterproteinen, stattfindet ist daher häufig nicht bekannt. Die Beantwortung dieser Fragestellung, die zur Abschätzung etwaiger Interaktionen immens wichtig wäre, könnte anhand des humanen Lungen-Perfusions-Modells in einem zukünftigen Projekt erforscht werden.

Aus den Untersuchungen zur Pharmakokinetik von Ipratropiumbromid am humanen Lungen-Perfusions-Modell kann zusammenfassend konstatiert werden, dass die Umverteilung aus dem luminalen Bereich der humanen Lunge in den Perfusionspuffer nach Applikation einer 2,5-fach höheren Dosis IB noch nicht gesättigt war und somit auch noch keine Sättigung der beteiligten Transporter beobachtet werden konnte. Weiterhin wurde deutlich, dass OCTN1 und OCTN2 nicht die primär an der Absorption von IB beteiligten Transporter waren, da keine signifikante Reduktion der absorbierten IB-Wirkstoffmenge durch L-Carnitin zu beobachten war. Damit kann für Ipratropiumbromid die zusätzliche Beteiligung weiterer Transporter, wie OCT1-3, als Absorptionsweg hypothetisiert werden, wofür die Transporter-Expression im Lungengewebe genauer untersucht werden sollte. Der tatsächlich deponierte Dosisanteil und die prozentual in den Perfusionspuffer umverteilte Wirkstoffmenge korrelierten bestens mit bisherigen *in vivo* Daten, was somit die Übertragbarkeit der *ex vivo* generierten Daten auf die Situation *in vivo* unterstreicht und die hervorragende Eignung des Modells für komplexere Fragestellungen zur pulmonalen Pharmakokinetik pharmakologisch aktiver Substanzen hervorhebt.

## 2 Einfluss von Sexualsteroidhormonen auf die mRNA-Expression von Arzneistofftransportern

### 2.1 Hintergrund

#### 2.1.1 Physiologie der Sexualsteroidhormone im menschlichen Körper

Sexualhormone sind an der Steuerung der Sexualfunktion, an der Ausbildung der Geschlechtsmerkmale und an der Gonadenentwicklung beteiligte endogene Botenstoffe. Damit zählen Steroidhormone wie Androgene, Estrogene und Gestagene aber auch Peptidhormone wie die Gonadotropine FSH (Folikel-stimmulierendes Hormon), LH (Luteinisiertes Hormon) und hCG (humanes Choriongonadotropin) zu dieser Gruppe [7]. Zu den weiblichen Sexualhormonen zählen im Wesentlichen Estrogene und Gestagene, wobei die Steroide Estradiol und respektive Progesteron (siehe Abbildung B.6 A und B) die bedeutendsten Vertreter sind. Aus den männlichen Steroidhormonen ist das Testosteron als wichtigstes Androgen hervorzuheben (siehe Abbildung B.6 C).

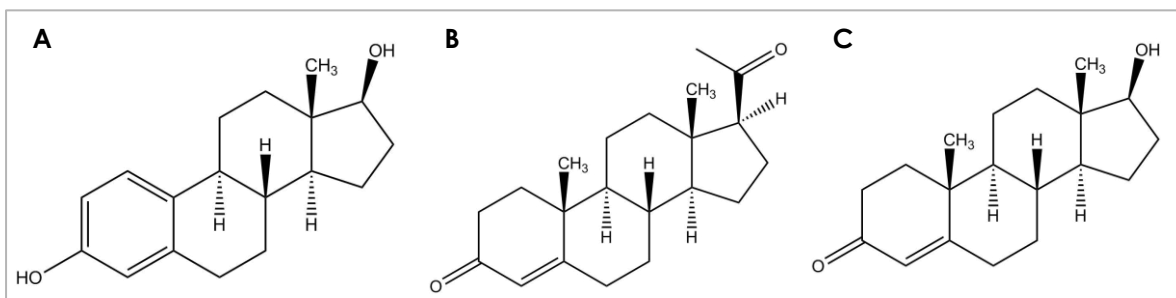


Abbildung B.6: Strukturformeln von **A**: Estradiol, **B**: Progesteron und **C**: Testosteron.

Androgene sowie geringe Mengen an weiblichen Sexualhormonen werden hauptsächlich in den Leydig-Zellen der männlichen Testes synthetisiert [194]. In den Ovarien von Frauen findet die Biosynthese von Estrogenen und Progesteron sowie geringer Mengen an männlichen Sexualhormonen in den Granulosa-Zellen und der Theca-Interna statt [7, 194, 195]. Zusätzlich werden Estrogene und Progesteron in der weiblichen Nebennierenrinde gebildet, die Biosynthese von Progesteron findet darüber hinaus in hoher Menge in der Plazenta von schwangeren Frauen statt [7]. Überdies können viele Zellen lokal Steroidhormone produzieren und somit zur gewebespezifischen Feinregulation der hormonellen Wirkung beitragen [194]. Progesteron wird ausgehend von Cholesterin gebildet und stellt ein Zwischenprodukt der Testosteron-Biosynthese dar [194]. Testosteron wiederum kann über das Enzym Aromatase (CYP19A1) zu Estradiol umgewandelt werden [194]. Stimuliert



wird die Biosynthese der Sexualsteroidhormone durch die im Hypophysenvorderlappen sezernierten Hormone FSH und LH [194]. Der Metabolismus des Testosterons findet vorrangig in der Leber statt, wobei den Enzymen  $5\alpha$ -Reduktase und  $17\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Schlüsselrollen zukommen [7]. Testosteron wird durch die  $5\alpha$ -Reduktase in das biologisch ebenfalls aktive  $5\alpha$ -Dihydrotestosteron (DHT) umgewandelt [196], Estradiol und Progesteron werden in der Leber hydroxyliert [194], unter anderem durch CYP3A4 [197]. Durch die anschließende Glucuronidierung oder Sulfatierung der Hydroxygruppen am Steroid-Grundgerüst wird die renale Elimination der Metabolite ermöglicht [195].

Täglich werden in Männern etwa 7 mg Testosteron sezerniert [194]. Prämenopausale Frauen setzen am Tag 25 – 100  $\mu$ g Estradiol und 20 mg Progesteron frei, in der Schwangerschaft steigt die Progesteron-Synthese in der Plazenta auf bis zu 250 mg an. Postmenopausal reduziert sich die Estradiol-Sekretion bei Frauen auf 5 – 10  $\mu$ g täglich [7]. Die pulsatile Ausschüttung von Sexualhormonen ist morgens am größten, sie unterliegt einer circadianen Rhythmik [7]. In Männern liegen im Plasma Testosteron-Konzentrationen zwischen 2 und 10 ng/ml (7 - 35 nM) vor [194, 198]. Estradiol liegt bei erwachsenen Frauen, abhängig vom Stadium des Menstruationszyklus, im Bereich von 25 - 300 pg/ml (0,09 – 1,1 nM) im Plasma vor, Progesteron erreicht in nicht-schwangeren Frauen Plasmakonzentrationen von 0,2 - 27 ng/ml (0,6 - 86 nM) [194, 198]. Dabei unterliegen vor allem die weiblichen Sexualhormone großen Schwankungen sowohl während des Menstruationszyklus als auch über die unterschiedlichen Lebensstadien hinweg. Estradiol und Testosteron sind in Plasma und Serum in ungebundener, freier Form zu finden (1 - 3 %) [196] aber hauptsächlich nicht-kovalent gebunden an das Sexual-Hormon-bindende Globulin (SHBG) und Albumin oder als Glucuronid- und Sulfatkonjugate [199]. Progesteron wird primär gebunden an Transcortin, dem Cortisol bindenden  $\alpha$ -Globulin (CBG), transportiert [200]. Lediglich der ungebundene Anteil der Steroidhormone ist biologisch aktiv [196]. Dabei muss berücksichtigt werden, dass die in der Literatur berichteten Serum-Konzentrationen an freiem Testosteron einer hohen Diskrepanz unterliegen [201]. Im Alter nimmt die freie Plasma-Konzentration an Estradiol und Testosteron ab, da vermehrt Sexual-Hormon-bindendes Globulin gebildet wird [7, 196].

Estradiol bindet mit hoher Affinität an den nukleären Estrogenrezeptor [202]. Dieser unterliegt einer Konformationsänderung und bindet dimerisiert als Ligand/Rezeptor-Komplex an das *Estrogen-Response-Element* (ERE) empfindlicher Gene, wodurch die Transkription genetischer Information aktiviert wird [195, 203]. Des Weiteren kann der Ligand/Rezeptor-Komplex auch an andere Transkriptionsfaktoren binden und somit auch auf die Transkription von Genen ohne ERE einwirken [195, 204]. Entsprechend verläuft der molekulare Wirkmechanismus von Testosteron über den Androgenrezeptor, Progesteron wirkt über den Progesteronrezeptor [205]. Die Aktivierung des Transkriptions-Prozesses resultiert in der Synthese spezifischer mRNA-Sequenzen, welche wiederum für die

Translation von Proteinen an den Ribosomen kodieren [202]. Darüber hinaus wird eine vom Genom unabhängige Wirkung der Sexualsteroidhormone über membranständige Rezeptoren beschrieben [195, 206, 207]. Zu den Testosteron-vermittelten Wirkungen zählen die Spermiogenese, die Ausbildung männlicher Fortpflanzungsorgane und sekundärer Geschlechtsmerkmale sowie die Stimulation der Erythropoetin-Biosynthese. Daneben hat es eine anabole Wirkung und trägt zum Skelett- und Muskelaufbau bei [194]. Estradiol reguliert durch negative Rückkopplung die FSH- und LH-Freisetzung aus der Hypophyse [194]. Neben der Ausbildung und Ausprägung weiblicher Sexualorgane und sekundärer Geschlechtsmerkmale ist Estradiol unter anderem am Wachstum des Endometriums sowie an der Hemmung des Knochenabbaus beteiligt und erhöht die Bildung von Progesteron- und Serotonin-Rezeptoren [7, 194]. Progesteron induziert die Differenzierung des Endometriums sowie dessen Rückbildung, erhöht die Ruhetemperatur und die Drüsenbildung in den Brüsten und wirkt daneben schwach auf die Natriumretention und den Proteinkatabolismus [7, 194]. In der Schwangerschaft ist es durch Hemmung der Uteruskontraktilität und Menstruation unabdingbar [7, 194].

### 2.1.2 Physiologie des L-Carnitins im menschlichen Körper

Carnitin ( $\beta$ -Hydroxy- $\gamma$ -trimethylammoniumbutyrat) liegt unter physiologischen Bedingungen als Zwitterion und somit als Molekül elektrisch neutral vor [208]. Lediglich die L-enantiomere Form ist bioaktiv [208]. Die Substanz ist wasserlöslich und wird hauptsächlich renal ausgeschieden [65, 208, 209]. L-Carnitin (siehe Abbildung B.7) wird im Menschen in Leber und Niere sowie eventuell in Gehirn und Hoden synthetisiert, aber auch in signifikanten Mengen über die Nahrung aufgenommen [56, 208, 210]. Die Biosynthese findet dabei aus den essenziellen Aminosäuren Lysin und Methionin statt [210, 211]. In der Nahrung ist L-Carnitin in hohen Konzentrationen in rotem Fleisch enthalten, zu einem geringeren Ausmaß unter anderem auch in Fisch, Geflügel und Milchprodukten, wobei 70 – 80 % des diätetischen L-Carnitins absorbiert werden [211].

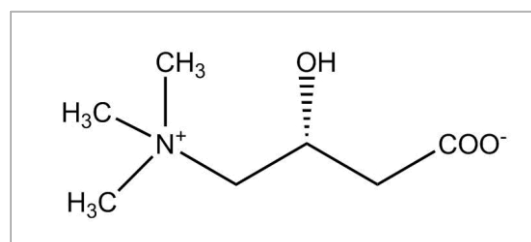


Abbildung B.7: Strukturformel von L-Carnitin ( $\beta$ -Hydroxy- $\gamma$ -trimethylammoniumbutyrat), vorliegend als Zwitterion.

Für die Translokation langkettiger Fettsäuren in Mitochondrien und für die nachfolgende  $\beta$ -Oxidation ist die endogene Substanz L-Carnitin essenziell [60]. Langkettige Fettsäuren werden an der Außenmembran der Mitochondrien enzymatisch mit L-Carnitin verestert und anschließend über den spezifischen Transporter Carnitin-Acylcarnitin-Translokase, lokalisiert an der Innenmembran der Mitochondrien, in die Mitochondrien geschleust [59, 65, 211]. Kurz- und mittelkettige Fettsäuren, welche in den Mitochondrien nach  $\beta$ -Oxidation akkumulieren, können wiederum mit Carnitin verestert und aus den Mitochondrien transportiert werden [211]. Dieser Mechanismus stellt sicher, dass bei einem Überangebot von kurzkettigem Acyl-Coenzym A (CoA) wieder freies CoA in den Mitochondrien zur Verfügung steht [211].

Verglichen zu Frauen liegen in Männern höhere Plasmaspiegel an freiem und totalem L-Carnitin vor, da mehr als 90 % des im Körper vorkommenden L-Carnitins im Skelettmuskel vorhanden ist [211]. In Männern mit uneingeschränkter Ernährung (Omnivore) konnten Plasmaspiegel von  $49,4 \pm 7,3 \mu\text{M}$  L-Carnitin (total) gemessen werden, in omnivoren Frauen betragen die Spiegel  $43,3 \pm 5,5 \mu\text{M}$  [212]. Noch deutlicher war der Unterschied bei strikter vegetarischer Ernährung: Männer hatten im Mittel Plasmaspiegel von  $46,7 \pm 8,1 \mu\text{M}$  an totalem L-Carnitin, Frauen dagegen nur  $36,6 \pm 8,2 \mu\text{M}$  [212].

### **2.1.3 Calu-3-Zelllinie als *in vitro* Modell des humanen Bronchialepithels**

Die adhärenente humane Bronchialepithelzelllinie Calu-3, gewonnen aus dem Lungen-Adenokarzinom eines 25-jährigen kaukasischen Mannes [213], ist eine der am häufigsten verwendeten Zelllinien zur Charakterisierung pulmonal applizierbarer Substanzen [190]. Die Zelllinie bildet einen konfluenten Monolayer, der generell aus dicht aneinandergelagerten polygonalen und kubischen Zellen besteht [139, 214]. Die Zellen vermehren sich kontinuierlich mit einem schnellen und gleichbleibendem Wachstumsverhalten [214]. Ausgesät auf Transwells unter Ausbildung einer Luft/Flüssigkeits-Grenzschicht (air liquide interface culture = AIC) zeigt die Zelllinie ein polarisiertes Transportverhalten zwischen apikaler und basolateraler Seite [214]. An der apikalen Oberfläche der Calu-3-Zellen werden Mikrovilli ausgebildet [214]. Calu-3-Zellen zeigten als einzige von zwölf untersuchten Zelllinien, die aus humanem Lungenkrebs gewonnen wurden, ein für das natürliche Lungenepithel charakteristisches mRNA- und Protein-Expressionsmuster, weshalb sie zu den besser ausdifferenzierten Zelllinien gezählt werden [190, 215, 216]. Die Expression von Mucin 1, Mucin 2 und CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) konnte in Calu-3-Zellen nachgewiesen werden [217], was auf seröse Zelleigenschaften hinweist.

Die Zelllinie Calu-3 wurde als eine potentiell zur Untersuchung von pulmonalen Absorptionsvorgängen geeignete Zelllinie identifiziert [137]. Unerlässlich um als solches

Modell fungieren zu können ist dazu die Fähigkeit der Zellen, Tight Junctions ausbilden zu können [137]. Für Calu-3-Zellen wurden maximale TEER-Werte (transepithelial electrical resistance = transepithelialer elektrischer Widerstand) von 400 bis zu 2500  $\Omega/\text{cm}^2$  gemessen [218], wodurch die Integrität der Zell-Monolayer und die Ausbildung von Tight Junctions bestätigt wurde. Dabei nahm der gemessene Widerstand mit der Anzahl der Tage in Kultur zu, wobei nach 10 bis 14 Tagen eine Plateau-Phase erreicht wurde [214], was in Korrelation mit der beobachteten Zellmorphologie steht [219]. Neben funktionellen Tight Junctions wurden in Calu-3-Zellen weitere interzelluläre Verbindungsstellen wie Desmosomen und Zonula adherens (siehe *Einleitung* 1.1) nachgewiesen [190]. Im Vergleich zu Caco-2-Zellen, der Standard-Zelllinie zur Untersuchung des Absorptionsverhaltens peroral applizierter Substanzen, zeigen Calu-3-Zellen eine deutlich geringere Permeabilität, was einen geringeren parazellulären Transport in Calu-3-Zellen vermuten lässt [220]. Daten zur Permeabilität durch Calu-3-Monolayer zeigten eine lineare Relation zwischen dem Logarithmus der Permeabilität der untersuchten Substanzen und dem Logarithmus ihres Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient (logP) [214]. Der scheinbare Permeabilitätskoeffizient von hydrophilen Substanzen war indirekt proportional zu deren Molekulargewicht [219]. Außerdem wurde eine gute Korrelation zwischen *in vitro* Daten aus Experimenten mit Calu-3-Zellen und *in vivo* Daten aus Ratten gezeigt [219].

Darüber hinaus exprimiert die Zelllinie Calu-3 mehrere metabolisierende CYP-Enzyme [214], welche als funktionell aber nicht induzierbar beschrieben wurden [190]. Ferner wurde in Calu-3-Zellen die mRNA von allen fünf bisher bekannten humanen organischen Kationentransportern sowie der Peptidtransporter PEPT1 und PEPT2 detektiert [22, 98]. Auch die Funktionalität der Efflux-Transporter MDR1 und MRP1 wurde in Calu-3 Zellen beschrieben [81, 190, 221]. Demzufolge werden Calu-3-Zellen in der Arzneimittelforschung als geeignetes *in vitro* Modell zum Screening von pulmonal zu applizierenden Substanzen verwendet, da sie neben der Eignung zur Untersuchung des Transport- und Absorptionsverhalten von Xenobiotika auch metabolische Kapazität und Funktionalität aufweisen.

## 2.2 Fragestellung

Es gibt Hinweise darauf, dass die Sexualhormone Estradiol und Testosteron an geschlechtsspezifischen Unterschieden beim Transport endogener Substanzen und Xenobiotika involviert sind [197]. Im Allgemeinen wird die Transkription von Genen in vielen Fällen von Steroidhormonen durch eine Veränderung der Zusammensetzung an Basen der synthetisierten RNA beeinflusst [202]. Des Weiteren ist eine Zunahme an spezifischen mRNA-Molekülen, verursacht durch Sexualhormone, zu beobachten [202]. Ein prominentes Beispiel der hormoninduzierten Modifikation der Genexpression ist das der Catechol-O-

methyltransferase (COMT), einem metabolisierenden Enzym, dessen Substrate unter anderem endogene Neurotransmitter, wie Dopamin und Noradrenalin, aber auch Arzneistoffe, wie beispielsweise Levodopa sind [222]. Physiologische Konzentrationen an Estradiol reduzierten das mRNA-Niveau der Catechol-O-methyltransferase sowohl zeit- als auch dosisabhängig [222]. Auch für mehrere Transporterproteine konnte eine hormonelle Regulation beobachtet werden. Für einige OATP (Organic Anion Transporting Polypeptide) Transporter, darunter OATP1A2, OATP1B1 und OATP5A1, wurde in der humanen Androgen-sensitiven Prostata-Adenokarzinom-Zelllinie LNCaP eine signifikant höhere mRNA-Expression unter Androgen-freien Bedingungen gezeigt verglichen zur Anwesenheit von Androgenen im Medium [223]. Ein deutlicher Anstieg der renalen mRNA-Expression in Ratten konnte dagegen nach Testosteron-Verabreichung an weiblichen Tieren ermittelt werden, Estradiol bewirkte an männlichen Tieren eine Reduktion der OATP-Expression [224]. Das Gen SLC22A5, welches für den organischen Kationen/Carnitin-Transporter OCTN2 kodiert, wurde in Brustkrebs-Zelllinien als Estrogen-induziertes Gen identifiziert [204]. Die Expression von SLC22A5 ist mit dem Estrogen-Rezeptor-Status in Brustkrebs-Zelllinien und -Gewebe-proben assoziiert und wird über ein *Estrogen-Response-Element* (ERE) vermittelt [204]. In Ratten konnte gezeigt werden, dass die renale mRNA- und Protein-Expression von OCT2 durch Testosteron erhöht, durch Estradiol leicht erniedrigt wird [225]. Gleichzeitig wurde aber kein Effekt der beiden Hormone auf die OCT1-Expression in der Ratten-Niere festgestellt [225].

Die Expression der organischen Kationen/Carnitin-Transporter OCTN1 und OCTN2 in der humanen Niere ist hoch verglichen zu anderen untersuchten Organen und Geweben [41]. Beide Transporter werden auf der luminalen Seite des proximalen Tubulus exprimiert [17, 20] und sind maßgebend an der Rückresorption von L-Carnitin aus dem Primärharn beteiligt (siehe *Einleitung* 1.4.5), wobei OCTN2 die bedeutendere Rolle zugeordnet wird [226]. Mutationen von SLC225A wurden als Grund für den Funktionsverlust des Transporters identifiziert [57, 63]. Als Folge kommt es zu einem primären systemischen L-Carnitin-Mangel, welcher sich in Symptomen wie beispielsweise Kardiomyopathie, Muskelschwäche und Fatigue äußert (siehe *Einleitung* 1.4.6) [64, 65]. Neben der Tatsache, dass L-Carnitin sowohl ein Substrat als auch ein Inhibitor von OCTN1 und OCTN2 ist [56, 57, 154, 193], wird auch eine Modifikation der Genexpression dieser Transporter durch L-Carnitin diskutiert. In Ratten mit induziertem L-Carnitin-Defizit wurde eine um den Faktor 1,7 erhöhte mRNA-Expression von OCTN2 verglichen zu Kontroll-Ratten gezeigt [226]. Daraus wurde geschlossen, dass die Plasma-Carnitin-Konzentration die renale OCTN2-Expression reguliert [226].

Bisher ist nicht bekannt, inwieweit sich die Plasma-Spiegel der Sexualhormone Estradiol, Progesteron und Testosteron einerseits und des L-Carnitins andererseits auf die Expression von Arzneistofftransportern im humanen Bronchialepithel auswirken. Da alle vier Substanzen bei Männern und Frauen in unterschiedlichen Konzentrationen im Plasma

vorliegen ist ein geschlechtsspezifischer Unterschied der Transporter-Expression denkbar. Damit verbunden wäre auch eine unterschiedliche Pharmakokinetik pulmonal applizierter Substanzen bei Männern und Frauen ableitbar. Es stellte sich somit die Frage, inwiefern die drei Sexualhormone sowie L-Carnitin einen regulatorischen Effekt auf die mRNA-Expression ausgewählter Transporter in der menschlichen Lunge haben. Um dieses zu untersuchen, wurden Inkubationsversuche mit der humanen Bronchialepithelzelllinie Calu-3 als geeignetes *in vitro* Modell durchgeführt.

## 2.3 Prinzip der Bestimmung der Genexpression von Arzneistofftransportern in Calu-3-Zellen

Die humane Bronchialepithelzelllinie Calu-3 wurde unter aseptischen Bedingungen kultiviert und nach Zellzählung in einer definierten Dichte ausgesät (siehe Experimenteller Teil 4.2 und 4.3). Durch die Zugabe wässriger Hormon-Inkubationslösungen (siehe Experimenteller Teil 4.1.6) in das Medium wurden Inkubationsversuche mit physiologischen Konzentrationen von 35 nM Testosteron, 1 nM Estradiol, 69 nM Progesteron sowie einer Kombination aus 1nM Estradiol und 69 nM Progesteron durchgeführt (siehe Experimenteller Teil 4.3.1). Die tägliche Zugabe der Hormon-Lösungen zur gleichen Tageszeit über 21 Tage zielte darauf aus, die circadiane Rhythmik im menschlichen Körper und die dauerhafte Exposition mit Sexualhormonen, auch in der Wachstumsphase, zu imitieren. Weitere Inkubationsversuche wurden nach gleichem Prinzip mit einer zusätzlichen L-Carnitin-Inkubation (50 µM) über 72 Stunden durchgeführt (siehe Experimenteller Teil 4.3.2), um eventuelle additive Effekte des L-Carnitins auf die Expression der Transporter zu beurteilen. Die Ansätze erfolgten jeweils im Triplikat und Kontrollen ohne Zugabe von Inkubationslösungen sowie mit alleiniger Zugabe von L-Carnitin wurden mitgeführt. Nach 21 Tagen wurden die Versuche durch Pelletierung einer einheitlichen Zellzahl beendet (siehe Experimenteller Teil 4.3.3).

Zur Bestimmung der relativen Genexpression der Arzneistofftransporter MRP1, OCT3, OCTN1, OCTN2 und PEPT2 wurde aus den Zellen zunächst RNA isoliert (siehe Experimenteller Teil 4.4.1), mittels Nanodrop-Methode quantifiziert (siehe Experimenteller Teil 4.4.2) und anschließend in cDNA umgeschrieben (siehe Experimenteller Teil 4.4.3). Unter Verwendung eigens entworfener und optimierter Primer-Paare (siehe Experimenteller Teil 3.2 – 3.5) erfolgte die Vermessung der cDNA mittels qPCR-Technik (siehe Experimenteller Teil 4.5.3). Die Auswertung erfolgte Effizienz-korrigiert (siehe Experimenteller Teil 4.6.1) und auf die drei Referenz-Gene 18 S RNA, GAPDH und ACTB normiert. Diese wurden im Vorfeld der Untersuchungen ausgiebig validiert (siehe Experimenteller Teil 3.6) um eine konstante Expression unter den verschiedenen Inkubationsbedingungen zu gewährleisten.

## 2.4 Ergebnisse der Zellkulturversuche

### 2.4.1 Genexpression von Arzneistofftransportern nach Hormon-Inkubation verglichen zu keiner Hormon-Inkubation

Um den Einfluss der Sexualhormone Estradiol (EST), Testosteron (TEST) und Progesteron (PRO) auf die Genexpression der Arzneistofftransporter MRP1, OCT3, OCTN1, OCTN2 und PEPT2 zu analysieren, wurden zunächst die Zellkultur-Ansätze mit Hormon-Inkubation in Relation zu den jeweiligen Kontrollen ohne Inkubation (no treatment = NT) betrachtet (siehe Abbildung B.8). MRP1 und OCTN1 zeigten tendenziell eine geringfügig höhere Expression nach Hormon-Inkubation in physiologischen Konzentrationen über 21 Tage. Dabei konnte jeweils nach Inkubation mit der Kombination aus EST und PRO eine signifikant höhere Expression im Vergleich zu NT festgestellt werden (MRP1:  $111,6 \pm 9,1$  %,  $p = 0,0449$ ; OCTN1:  $112,9 \pm 10,1$  %,  $p = 0,0468$ , zweiseitiger Student-t-Test). OCT3, OCTN2 und PEPT2 waren dagegen tendenziell nach Hormon-Inkubation geringer exprimiert, signifikante Unterschiede wurden dabei für die Inkubation mit EST verglichen zu NT bestimmt (OCTN2:  $82,8 \pm 4,2$  %,  $p = 0,0002$ ; PEPT2:  $80,8 \pm 15,6$  %,  $p = 0,0482$ , zweiseitiger Student-t-Test).

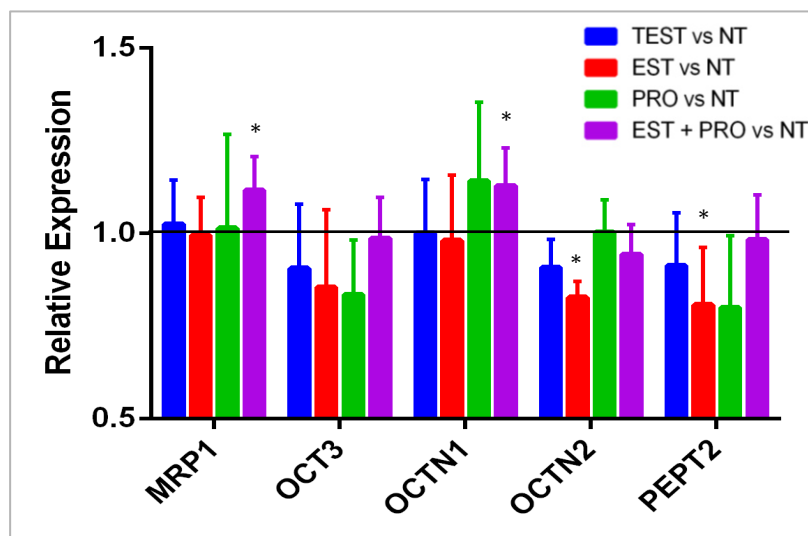


Abbildung B.8: Relative Genexpression (MW  $\pm$  SD) der Arzneistofftransporter MRP1, OCT3, OCTN1, OCTN2 und PEPT2: nach Inkubation der Calu-3-Zellen mit Testosteron (TEST) 35 nM verglichen zu keiner Inkubation (no treatment = NT) (blau: TEST vs. NT, n = 4); nach Inkubation der Calu-3-Zellen mit Estradiol (EST) 1 nM verglichen zu NT (rot: EST vs. NT, n = 4); nach Inkubation der Calu-3-Zellen mit Progesteron (PRO) 69 nM verglichen zu NT (grün: PRO vs. NT, n = 3); nach Inkubation der Calu-3-Zellen mit EST 1 nM und PRO 69 nM verglichen zu NT (lila: EST + PRO vs. NT, n = 3). \* Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) nach zweiseitigem Student-t-Test.

Bei Betrachtung der Ergebnisse nach Inkubation der Zellen mit Hormonen und zusätzlicher L-Carnitin (CAR)-Zugabe verglichen mit keiner Inkubation (NT) (siehe Abbildung B.9) zeigten OCT3 und PEPT2 wiederum eine tendenziell höhere, OCTN1 eine geringere Expression nach Hormon- und CAR-Behandlung. MRP1 wies dagegen mit zusätzlicher CAR-Inkubation tendenziell geringere Expression nach Behandlung mit Hormonen auf und für OCTN2 ließ sich keine eindeutige Tendenz erkennen. Interessanterweise wurden für vier Transporter statistisch signifikante Unterschiede nach Inkubation mit der Kombination aus EST, PRO und CAR im Vergleich zu NT festgestellt (OCT3:  $91,8 \pm 4,7$  %,  $p = 0,0156$ ; OCTN1:  $112,3 \pm 8,0$  %,  $p = 0,0240$ ; OCTN2:  $77,0 \pm 6,5$  %,  $p = 0,0008$ ; PEPT2:  $83,0 \pm 1,6$  %,  $p < 0,0001$ , zweiseitiger Student-t-Test).

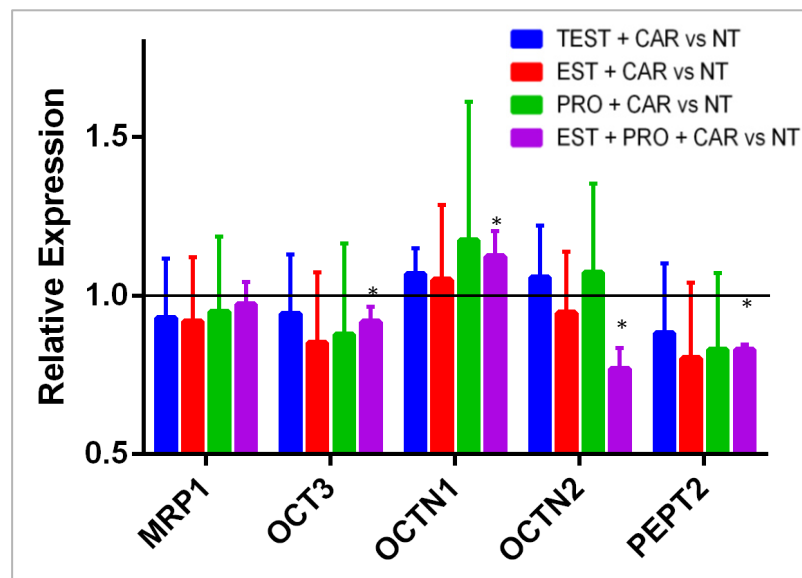


Abbildung B.9: Relative Genexpression (MW  $\pm$  SD) der Arzneistofftransporter MRP1, OCT3, OCTN1, OCTN2 und PEPT2: nach Inkubation der Calu-3-Zellen mit Testosteron (TEST) 35 nM und L-Carnitin (CAR) 50  $\mu$ M verglichen zu keiner Inkubation (no treatment = NT) (blau: TEST + CAR vs. NT,  $n = 4$ ); nach Inkubation der Calu-3-Zellen mit Estradiol (EST) 1 nM und CAR 50  $\mu$ M verglichen zu NT (rot: EST + CAR vs. NT,  $n = 4$ ); nach Inkubation der Calu-3-Zellen mit Progesteron (PRO) 69 nM und CAR 50  $\mu$ M verglichen zu NT (grün: PRO + CAR vs. NT,  $n = 4$ ); nach Inkubation der Calu-3-Zellen mit EST 1 nM, PRO 69 nM und CAR 50  $\mu$ M verglichen zu NT (lila: EST + PRO + CAR vs. NT,  $n = 3$ ). \* Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) nach zweiseitigem Student-t-Test.

Auch nach Hormon- und zusätzlicher CAR-Inkubation, betrachtet in Relation zur jeweiligen Kontrolle mit alleiniger CAR-Zugabe (siehe Abbildung B.10), wurden für vier Transporter nach Exposition der Zellen mit der Kombination aus EST, PRO und CAR verglichen zur alleinigen Inkubation mit CAR statistisch signifikante Unterschiede bestimmt (OCT3:  $83,3 \pm 4,3$  %,  $p = 0,0026$ ; OCTN1:  $89,4 \pm 6,6$  %,  $p = 0,0496$ ; OCTN2:  $69,3 \pm 5,1$  %,  $p = 0,005$ ; PEPT2:



73,6 ± 8,6 %,  $p = 0,0059$ , zweiseitiger Student-t-Test). Zusätzlich konnte für PEPT2 auch für alle weiteren Hormon-Inkubationen mit CAR verglichen zur CAR-Kontrolle eine signifikant geringere Genexpression beobachtet werden (TEST + CAR vs. CAR: 85,4 ± 6,3 %,  $p = 0,0157$ ; EST + CAR vs. CAR: 79,0 ± 9,1 %,  $p = 0,0164$ ; PRO + CAR vs. CAR: 80,6 ± 8,7 %,  $p = 0,0182$ , zweiseitiger Student-t-Test).

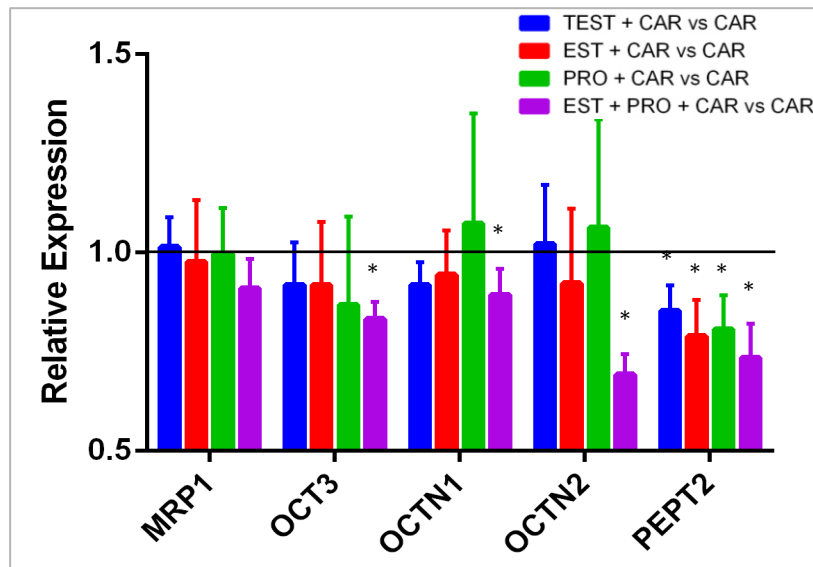


Abbildung B.10: Relative Genexpression (MW ± SD) der Arzneistofftransporter MRP1, OCT3, OCTN1, OCTN2 und PEPT2: nach Inkubation der Calu-3-Zellen mit Testosteron (TEST) 35 nM und Carnitin (CAR) 50 µM verglichen zur Inkubation mit CAR 50 µM (blau: TEST + CAR vs. CAR,  $n = 3$ ); nach Inkubation der Calu-3-Zellen mit Estradiol (EST) 1 nM und CAR 50 µM verglichen zur Inkubation mit CAR 50 µM (rot: EST + CAR vs. CAR,  $n = 3$ ); nach Inkubation der Calu-3-Zellen mit Progesteron (PRO) 69 nM und CAR 50 µM verglichen zur Inkubation mit CAR 50 µM (grün: PRO + CAR vs. CAR,  $n = 3$ ); nach Inkubation der Calu-3-Zellen mit EST 1 nM, PRO 69 nM und CAR 50 µM verglichen zur Inkubation mit CAR 50 µM (lila: EST + PRO + CAR vs. CAR,  $n = 3$ ). \* Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) nach zweiseitigem Student-t-Test.

#### 2.4.2 Genexpression von Arzneistofftransportern nach Inkubation mit weiblichen Sexualhormonen verglichen zur Inkubation mit Testosteron

Zur Überprüfung, inwiefern die weiblichen Sexualhormone Estradiol (EST) und Progesteron (PRO) sowie die Kombination aus beiden einen, verglichen zum männlichen Sexualhormon Testosteron (TEST), gegenläufigen Effekt auf die Arzneistofftransporter-Expression hatten, wurden die Zellkultur-Ansätze mit Zugabe von weiblichen Sexualhormonen in physiologischer Konzentration über 21 Tage in Relation zur Testosteron-Zugabe in physiologischer Konzentration betrachtet (siehe Abbildung B.11).

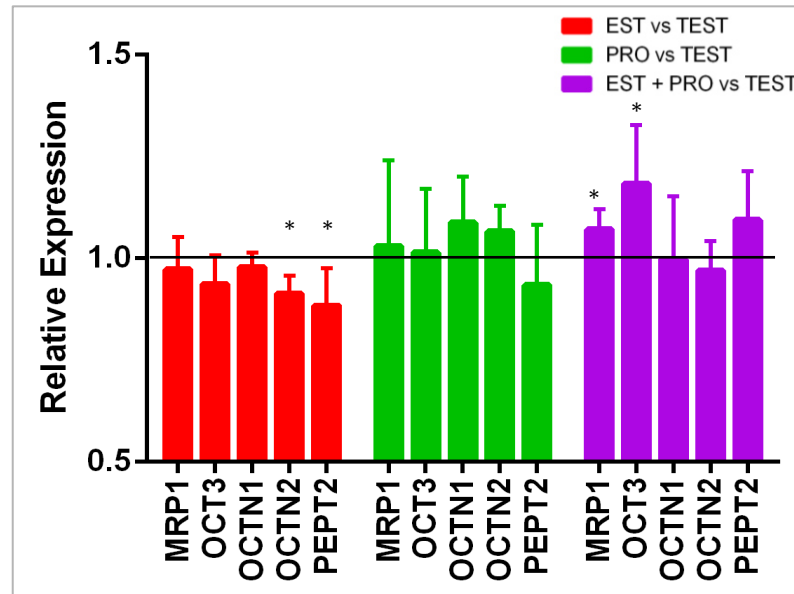


Abbildung B.11: Relative Genexpression (MW  $\pm$  SD) der Arzneistofftransporter MRP1, OCT3, OCTN1, OCTN2 und PEPT2: nach Inkubation der Calu-3-Zellen mit Estradiol (EST) 1 nM verglichen zur Inkubation mit Testosteron (TEST) 35 nM (rot: EST vs. TEST, n = 4); nach Inkubation der Calu-3-Zellen mit Progesteron (PRO) 69 nM verglichen zur Inkubation mit TEST 35 nM (grün: PRO vs. TEST, n = 3); nach Inkubation der Calu-3-Zellen mit EST 1 nM und PRO 69 nM verglichen zur Inkubation mit TEST 35 nM (lila: EST + PRO vs. TEST, n = 3). \* Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) nach zweiseitigem Student-t-Test.

Lediglich geringfügig geringere Expressionen ließen sich für alle Transporter nach Inkubation mit EST verglichen zu TEST feststellen, mit statistisch signifikanten Unterschieden für OCTN2 ( $91,4 \pm 4,3 \%$ ,  $p = 0,0070$ , zweiseitiger Student-t-Test) und PEPT 2 ( $88,4 \pm 9,3 \%$ ,  $p = 0,0456$ ). Im Gegensatz dazu war nach Zugabe von PRO verglichen zu TEST eine tendenziell höhere, wenn auch nicht signifikante, Genexpression zu vermerken. Dementsprechend konnten im Vergleich zu TEST keine synergistischen negativ-regulatorischen Effekte der weiblichen Sexualhormone bei gleichzeitiger Inkubation festgestellt werden. Im Gegenteil wiesen hier sowohl MRP1 ( $107,1 \pm 5,0 \%$ ,  $p = 0,0321$ , zweiseitiger Student-t-Test) als auch OCT3 ( $118,4 \pm 14,3 \%$ ,  $p = 0,0447$ ) sogar eine höhere Expression auf.

Auch der entsprechende Vergleich der Expressionen nach Inkubation mit weiblichen Sexualhormonen und zusätzlicher CAR-Inkubation in Relation zur Exposition mit TEST und CAR zeigte keinen eindeutigen synergistischen Effekt (siehe Abbildung B.12). Einzig für PEPT2 konnte hier sowohl nach Inkubation mit EST und CAR ( $90,5 \pm 4,8 \%$ ,  $p = 0,0075$ , zweiseitiger Student-t-Test) als auch nach PRO- und CAR-Behandlung ( $93,6 \pm 3,7 \%$ ,  $p = 0,0126$ ) im Vergleich zur Zugabe von TEST und CAR eine signifikant niedrigere Genexpression festgestellt werden. Diese Reduktion der PEPT2-Expression war auch nach Exposition mit beiden weiblichen Sexualhormonen kombiniert mit CAR erkennbar, allerdings wies sie keine Signifikanz auf ( $87,9 \pm 16,4 \%$ ,  $p = 0,1868$ ). Lediglich für OCTN2 konnte eine deutliche

und signifikant niedrigere Expression nach Zugabe der Kombination der weiblichen Sexualhormone mit CAR im Vergleich zu TEST und CAR festgestellt werden ( $75,1 \pm 7,4 \%$ ,  $p = 0,0009$ ).

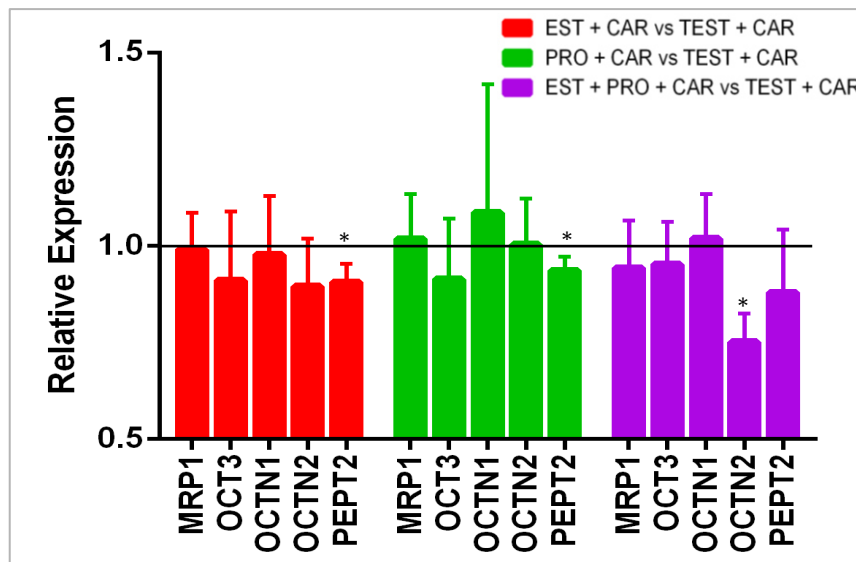


Abbildung B.12: Relative Genexpression (MW  $\pm$  SD) der Arzneistofftransporter MRP1, OCT3, OCTN1, OCTN2 und PEPT2: nach Inkubation der Calu-3-Zellen mit Estradiol (EST) 1 nM und L-Carnitin (CAR) 50  $\mu$ M verglichen zur Inkubation mit Testosteron (TEST) 35 nM und CAR 50  $\mu$ M (rot: EST + CAR vs. TEST + CAR, n = 4); nach Inkubation der Calu-3-Zellen mit Progesteron (PRO) 69 nM und CAR 50  $\mu$ M verglichen zur Inkubation mit TEST 35 nM und CAR 50  $\mu$ M (grün: PRO + CAR vs. TEST + CAR, n = 4); nach Inkubation der Calu-3-Zellen mit EST 1 nM, PRO 69 nM und CAR 50  $\mu$ M verglichen zur Inkubation mit TEST 35 nM und CAR 50  $\mu$ M (lila: EST + PRO + CAR vs. TEST + CAR, n = 3). \* Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) nach zweiseitigem Student-t-Test.

Die Unterschiede in der Genexpression der Arzneistofftransporter nach Inkubation der Calu-3-Zellen mit weiblichen und männlichen Sexualhormonen waren damit nur marginal vorhanden. Auch ein vermuteter synergistischer Effekt der weiblichen Sexualhormone Estradiol und Progesteron konnte nicht bestätigt werden. Tendenziell war allerdings nach Estradiol-Inkubation eine größere Expressions-Reduktion verglichen zu Testosteron zu beobachten als nach Exposition mit Progesteron verglichen zu Testosteron.

### 2.4.3 Genexpression von Arzneistofftransportern nach Inkubation mit unterschiedlichen weiblichen Sexualsteroidhormonen

Um die Vermutung eines unterschiedlichen Einflusses der beiden weiblichen Sexualhormone Estradiol (EST) und Progesteron (PRO) sowie deren Kombination auf die Transporter-Expression in Calu-3-Zellen zu verifizieren, wurden auch diese verschiedenen Interventionen zueinander in Relation gesetzt und analysiert (siehe Abbildung B.13). Tatsächlich konnte für alle untersuchten Transporter nach Inkubation mit PRO tendenziell eine höhere Genexpression als nach Inkubation mit EST festgestellt werden. Am deutlichsten und statistisch signifikant war dieser Unterschied für OCTN2 ( $119,4 \pm 6,1 \%$ ,  $p = 0,0051$ , zweiseitiger Student-t-Test). Zusätzlich wurde ersichtlich, dass dieser Unterschied für OCTN2 nach Zugabe von beiden weiblichen Sexualhormonen verglichen zur EST-Inkubation weniger deutlich und statistisch nicht signifikant war ( $108,7 \pm 7,2 \%$ ,  $p = 0,1042$ ), allerdings verglichen zur PRO-Inkubation sogar in einer signifikanten Reduktion der Expression resultierte ( $89,4 \pm 3,4 \%$ ,  $p = 0,0058$ ).

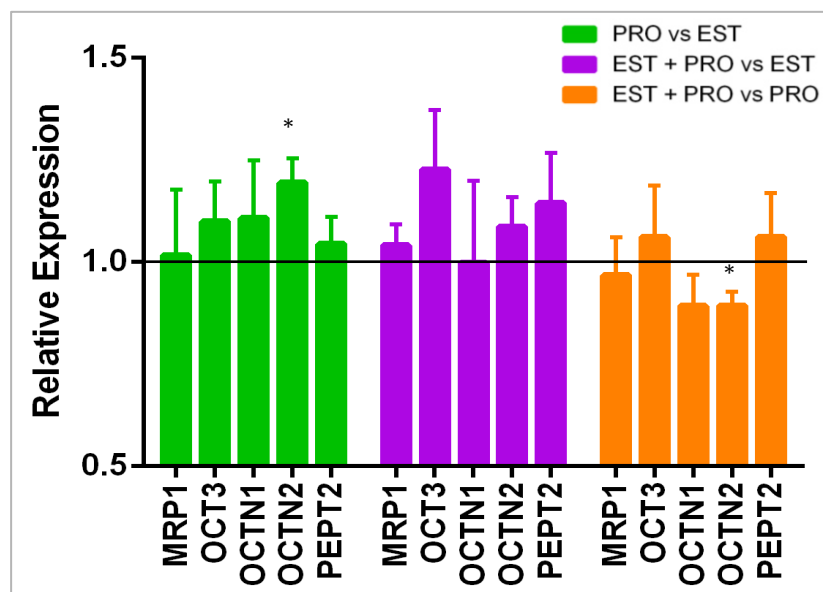


Abbildung B.13: Relative Genexpression ( $MW \pm SD$ ) der Arzneistofftransporter MRP1, OCT3, OCTN1, OCTN2 und PEPT2: nach Inkubation der Calu-3-Zellen mit Progesteron (PRO) 69 nM verglichen zur Inkubation mit Estradiol (EST) 1 nM (grün: PRO vs. EST,  $n = 3$ ); nach Inkubation der Calu-3-Zellen mit EST 1 nM und PRO 69 nM verglichen zur Inkubation mit EST 1 nM (lila: EST + PRO vs. EST,  $n = 3$ ); nach Inkubation der Calu-3-Zellen mit EST 1 nM und PRO 69 nM verglichen zur Inkubation mit PRO 69 nM (orange: EST + PRO vs. PRO,  $n = 3$ ). \* Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) nach zweiseitigem Student-t-Test.

Die Tendenz der höheren Genexpression nach PRO-Inkubation in Relation zur Exposition mit EST konnte auch für die jeweiligen Versuchsansätze mit zusätzlicher Zugabe von CAR bestätigt werden (siehe Abbildung B.14), allerdings wurden keine statistisch signifikanten

Unterschiede ermittelt (zweiseitiger Student-t-Test,  $p > 0,05$ ). Zusätzlich zeigte sich für alle untersuchten Transporter nach Zugabe von EST, PRO und CAR verglichen zur Zugabe von PRO und CAR eine niedrigere Expression, die deutlichsten und statistisch signifikanten Unterschiede konnten dabei für OCTN1 ( $74,9 \pm 10,2 \%$ ,  $p = 0,0038$ ) und OCTN2 ( $80,1 \pm 15,3 \%$ ,  $p = 0,0431$ ) beobachtet werden.

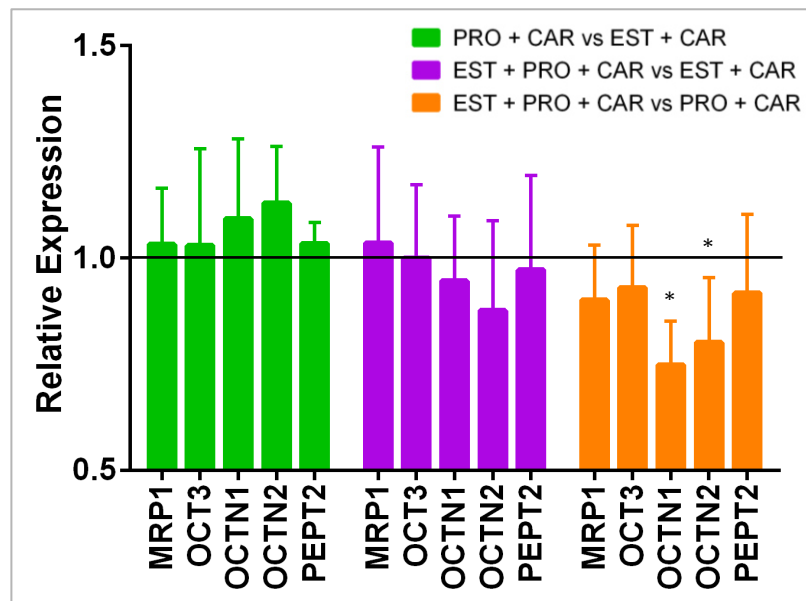


Abbildung B.14: Relative Genexpression (MW  $\pm$  SD) der Arzneistofftransporter MRP1, OCT3, OCTN1, OCTN2 und PEPT2: nach Inkubation der Calu-3-Zellen mit Progesteron (PRO) 69 nM und L-Carnitin (CAR) 50  $\mu$ M verglichen zur Inkubation mit Estradiol (EST) 1 nM und CAR 50  $\mu$ M (grün: PRO + CAR vs. EST + CAR,  $n = 4$ ); nach Inkubation der Calu-3-Zellen mit EST 1 nM, PRO 69 nM und CAR 50  $\mu$ M verglichen zur Inkubation mit EST 1 nM und CAR 50  $\mu$ M (lila: EST + PRO + CAR vs. EST + CAR,  $n = 3$ ); nach Inkubation der Calu-3-Zellen mit EST 1 nM, PRO 69 nM und CAR 50  $\mu$ M verglichen zur Inkubation mit PRO 69 nM und CAR 50  $\mu$ M (orange: EST + PRO + CAR vs. PRO + CAR,  $n = 3$ ). \* Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) nach zweiseitigem Student-t-Test.

Aus diesen Ergebnissen wurde deutlich, dass die beiden weiblichen Sexualhormone durchaus unterschiedliche, größtenteils sogar gegenläufige Auswirkungen auf die Expression der untersuchten Arzneistofftransporter hatten. Unter dem Einfluss von Progesteron schien dabei die Genexpression der Transporter jeweils höher zu sein als nach Estradiol-Inkubation oder nach Zugabe der Kombination aus Estradiol und Progesteron.

## 2.4.4 Genexpression von Arzneistofftransportern mit und ohne L-Carnitin-Inkubation

Neben dem Effekt von Hormonen auf die Expression von Transportern sollte auch die Wirkung der zusätzlichen L-Carnitin (CAR)-Zugabe hinsichtlich eventueller regulatorischer Effekte auf die Genexpression von Arzneistofftransportern untersucht werden. Deshalb wurden die jeweiligen Zellkultur-Ansätze mit CAR-Inkubation in Relation zu denjenigen ohne CAR-Inkubation betrachtet und analysiert (siehe Abbildung B.15). Die Ergebnisse zeigten wenig eindeutige, zum Teil sehr inhomogene Tendenzen mit Ausnahme der Zugabe von EST, PRO und CAR verglichen zur alleinigen Zugabe von EST und PRO. Alle untersuchten Transporter wiesen hier eine reduzierte Expression auf, für MRP1 ( $89,1 \pm 8,9 \%$ ,  $p = 0,0496$ ), OCTN2 ( $83,0 \pm 11,3 \%$ ,  $p = 0,0236$ ) und PEPT2 ( $86,9 \pm 9,5 \%$ ,  $p = 0,0327$ ) konnte sogar eine signifikante Reduktion der Genexpression festgestellt werden (zweiseitiger Student-t-Test).

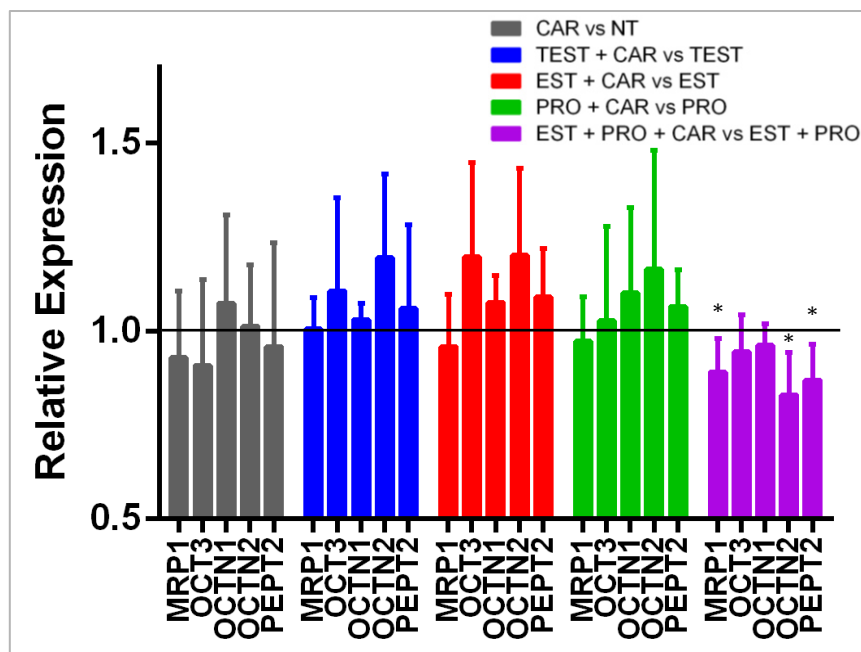


Abbildung B.15: Relative Genexpression (MW  $\pm$  SD) der Arzneistofftransporter MRP1, OCT3, OCTN1, OCTN2 und PEPT2: nach Inkubation der Calu-3-Zellen mit L-Carnitin (CAR) 50  $\mu$ M verglichen zur keiner Inkubation (no treatment = NT) (grau: CAR vs. NT,  $n = 4$ ); nach Inkubation der Calu-3-Zellen mit Testosteron (TEST) 35 nM und CAR 50  $\mu$ M verglichen zur Inkubation mit TEST 35 nM (blau: TEST + CAR vs. TEST,  $n = 3$ ); nach Inkubation der Calu-3-Zellen mit Estradiol (EST) 1 nM und CAR 50  $\mu$ M verglichen zur Inkubation mit EST 1 nM (rot: EST + CAR vs. EST,  $n = 3$ ); nach Inkubation der Calu-3-Zellen mit Progesteron (PRO) 69 nM und CAR 50  $\mu$ M verglichen zur Inkubation mit PRO 69 nM (grün: PRO + CAR vs. PRO,  $n = 3$ ); nach Inkubation der Calu-3-Zellen mit EST 1 nM, PRO 69 nM und CAR 50  $\mu$ M verglichen zur Inkubation mit EST 1 nM und PRO 69 nM (lila: EST + PRO + CAR vs. EST + PRO,  $n = 4$ ). \* Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) nach zweiseitigem Student-t-Test.

## 2.5 Diskussion

Zur Untersuchung der regulatorischen Einflüsse der Sexualsteroidhormone und L-Carnitin auf die Expression von Arzneistofftransportern im humanen Bronchialepithel wurde die Zelllinie Calu-3 als *in vitro* Modell gewählt. Diese gilt als die am besten charakterisierte Bronchialzelllinie und reicht bezüglich ihrer Funktionalität und ihres Expressionsmusters an das humane Bronchialepithel am ehesten heran [190] (siehe 2.1.3). Die Kultivierung der Calu-3-Zellen erfolgte während der hier dargestellten Versuche in konventioneller Kultur bedeckt mit flüssigem Nährmedium (liquide covered culture = LCC) in der Zellkulturflasche und nicht auf Transwells ausgesät unter Ausbildung einer Luft/Flüssigkeits-Grenzschicht (air liquide interface culture = AIC). Zwar ist die AIC der natürlichen Physiologie der humanen Lunge näher, da an der Luft zugewandten Seite Mucus produziert wird [227], allerdings ist diese Art der Kultivierung mit einem erheblichen monetären und zeitlichen Mehraufwand verbunden. Aber auch in LCC werden Tight Junctions ausgebildet und ein vergleichbarer polarisierter Transport findet statt [190, 228, 229]. Der Effekt der Genregulation wurde unabhängig von der Kultivierungsmethode erwartet, weshalb hier die einfachere und kostengünstigere Methode der LCC gewählt wurde. Noch immer stellt die Verunreinigung mit Mykoplasmen eines der größten Probleme in der Forschung mit Zellkulturen dar, in verschiedenen Untersuchungen wurden zwischen 11 und 70 % der verwendeten Zellen als kontaminiert identifiziert [230]. Die Kontamination mit Mykoplasmen kann zu einer deutlichen Veränderung des Expressionsmusters und damit zu nicht reproduzierbaren Ergebnissen in Zellkultur-Versuchen führen [231]. Für eine Vielzahl von Genen, darunter auch solche, die für Ionenkanäle, Rezeptoren und Wachstumsfaktoren kodieren, konnte eine bis zu 12-fache Expressionsänderung beobachtet werden [231]. Eine akribische Untersuchung war somit unabdingbar, da eine Veränderung der Zellfunktionalität und des Expressionsmusters der untersuchten Transporter durch Mykoplasmen nicht auszuschließen war. Unmittelbar vor Versuchsstart, während der Durchführung und nach Versuchsende wurden die Calu-3-Kulturen jeweils hinsichtlich eventueller Mykoplasmen-Kontamination untersucht (siehe *Experimenteller Teil* 4.2.4) und somit die Beständigkeit der ausgesäten Zellen sichergestellt.

Mathias et al. beobachteten keinen aktiven Transport von organischen Kationen durch Calu-3-Monolayer [219], was allerdings in neueren Publikationen widerlegt werden konnte [87, 98, 100]. Die mRNA der fünf humanen organischen Kationentransporter OCT1-3 und OCTN1/2 wurde in Calu-3-Zellen mittels konventioneller PCR detektiert [98]. In den vorliegenden Untersuchungen wurden nur geeignete Primer-Paare für die Transporter OCTN1, OCTN2 und OCT3 eingesetzt, da für OCT1 und OCT2 keine ausreichenden Signale nach Vermessung mittels RT-qPCR erzielt wurden (siehe *Experimenteller Teil* 3.4). Auch Endter et al. sowie Mukherjee et al. konnten für OCT2 keine und für OCT1 nur eine geringe Expression in Calu-3-Zellen feststellen [22, 232]. Diese eingeschränkte Expression von OCT1

und OCT2 wurde auch in weiteren untersuchten humanen Bronchial- und Alveolar-Zelllinien bestätigt [22]. Auch in humanem Lungengewebe wurde eine vergleichsweise geringe Expression von OCT2 ermittelt [34]. Neben organischen Kationentransportern sollten auch Vertreter der ABC-Transporter (siehe *Einleitung* 1.3) untersucht werden. Ausgewählt wurde der prominenteste und am intensivsten untersuchte Transporter MDR1 sowie MRP1 und MRP5, da diese im humanen Lungengewebe eine relativ hohe mRNA- oder Protein-Expression zeigten [21, 74, 75]. Für MDR1 konnte mit den verwendeten Primern kein Signal detektiert werden, welches deutlich aus dem Grundrauschen heraustrat (siehe *Experimenteller Teil* 3.3). Auch Bleasby et al. fanden in der humanen Lunge nur eine geringe Expression von MDR1 [34], wohingegen andere Gruppen eine deutliche Expression und Aktivität in Calu-3-Zellen und primären Bronchialepithelzellen beschrieben [76, 221]. Für MRP5 konnte ebenfalls kein passendes Primer-Paar validiert werden, da mit dem verwendeten Primern keine Signal-Spezifität erreicht wurde (siehe *Experimenteller Teil* 3.3). Zur Vollständigkeit der Ergebnisse wäre eine Untersuchung aller Transporter von Interesse wünschenswert gewesen. Ergänzend zu den bereits erwähnten Transportern wurde zusätzlich PEPT2, dessen Expression im humanen Lungengewebe als hoch eingestuft wird (siehe *Einleitung* 1.4.1), untersucht [21]. Alle verwendeten Primer wurden hinsichtlich ihrer Signal-Spezifität verifiziert (siehe *Einleitung* 2.3.1 und *Experimenteller Teil* 3.3) und in optimierter Konzentration eingesetzt (siehe *Experimenteller Teil* 3.5). Damit wurde eine spezifische und möglichst effiziente Detektion des jeweiligen Targets gewährleistet und die Stichhaltigkeit der ermittelten Ergebnisse sichergestellt.

Um eine relative Vergleichbarkeit zwischen den Zellkultur-Ansätzen zu ermöglichen wurden für die hier diskutierten Untersuchungen mehrere Normalisierungsschritte in der Durchführung der Inkubationsversuche und in der anschließenden Detektion mittels RT-qPCR eingehalten. Neben der Aussaat einer einheitlichen Zellzahl in die Zellkulturflaschen und der Pelletierung einer definierten Zellzahl nach Versuchsende (siehe *Experimenteller Teil* 4.3) wurde eine konstante Menge an totaler RNA in cDNA umgeschrieben (siehe *Experimenteller Teil* 4.4) um die Proben auf eine einheitliche RNA-Menge zu normalisieren. In allen Versuchsansätzen wurde dabei eine hohe Ausbeute (> 330 ng/µl) an totaler RNA erreicht. Anstatt totale RNA zu isolieren, wäre eine weitere Option die Isolierung von Messenger-RNA (mRNA) über deren spezifische Poly(A)-Enden gewesen [233]. Da der Anteil von mRNA an der totalen RNA nur etwa 2 % beträgt, ist bei dieser Präparations-Technik allerdings eine wesentlich geringere Ausbeute zu erwarten. Dadurch sind im Zuge der Bestimmung der RNA-Konzentration auch stärker ausgeprägte relative Abweichungen der Messwerte möglich. Für die cDNA-Synthese ist von entscheidender Bedeutung, sowohl die Menge an umgeschriebener RNA als auch die Art der Transkription in allen Proben gleich zu halten [234], was durch die hier gewählte Präparations-Technik gewährleistet wurde. cDNA wurde unter Verwendung von randomisierten Hexamer-Primern synthetisiert, welche zwar eine unspezifische Amplifikation aber auch eine hohe Ausbeute initiieren [111].



Weitere essentielle Normalisierungsschritte beinhalteten die Verwendung von Lauf-Vergleichs-Proben (inter-run controls = IRC) (siehe *Einleitung* 2.3.2 und *Experimenteller Teil* 4.6.2) und die Effizienz-korrigierte Auswertung der detektierten Werte (siehe *Einleitung* 2.3.2 und *Experimenteller Teil* 4.6.1). Die der RT-qPCR-Technik zugrundeliegende exponentielle Amplifikation wird auch als Achillesferse der Technologie beschrieben, da nur bei gleicher Amplifikations-Kinetik der Reaktionen eine valide Quantifizierung möglich ist [124]. Bereits geringe Abweichungen zwischen den Reaktions-Effizienzen können zu verzerrten Ergebnissen führen, weshalb teilweise die Meinung vertreten wird, dass mittels RT-qPCR nur eine zuverlässige Detektion von größer als zweifachen Unterschieden möglich ist (siehe *Einleitung* 2.3.2) [124, 126]. Die detektierten Expressions-Unterschiede der vorliegenden Untersuchungen waren allesamt geringer als zweifach, weswegen sie trotz statistischer Signifikanz mit Vorsicht zu interpretieren sind. Der entscheidende Schritt der relativen Quantifizierung der Genexpression mittels RT-qPCR-Technik war allerdings die Normalisierung auf mindestens drei Referenz-Gene (siehe *Einleitung* 2.3.3). Da nur Referenz-Gene, welche unter den vorliegenden Versuchsbedingungen konstant exprimiert wurden, eine akkurate Normalisierung erlaubten, war eine Validierung der Referenz-Gene unabdingbar (siehe *Experimenteller Teil* 3.6). Mit der Verwendung von 18 S RNA, GAPDH und ACTB kamen drei häufig eingesetzte Referenz-Gene zum Einsatz, die eine konstante Expression während aller Versuchsbedingungen aufzeigten (siehe *Experimenteller Teil* 4.6.3). Die relative Quantifizierung wurde mithilfe der REST® Software durchgeführt, welche aufgrund der Normalisierung auf mehrere Referenz-Gene und der Effizienz-korrigierten Datenverarbeitung mit den MIQE-Richtlinien konform geht [112, 115, 135]. Folglich wurden in der vorliegenden Arbeit international anerkannte, hohe Qualitätsstandards zur zuverlässigen Detektion von Genexpressions-Unterschieden mittels RT-qPCR-Technik angewandt.

### **2.5.1 Einfluss der Sexualhormone auf die Genexpression von Transportern**

Über einen Zeitraum von 21 Tagen wurden die Hormonlösungen täglich zu den Calu-3-Zellen hinzugegeben (siehe *Experimenteller Teil* 4.3), da schon während der initialen Wachstumsphase des Zell-Monolayers die dauerhafte Anwesenheit der Sexualhormone gewährleistet sein sollte. Nach dieser Zeitspanne war die Ausbildung eines konfluenten Monolayers sichergestellt und es war ferner davon auszugehen, dass die eventuell modifizierte Transkription abgeschlossen war. Die tägliche Zugabe zur gleichen Uhrzeit imitierte die circadiane Rhythmik der pulsatilen Hormonausschüttung im menschlichen Körper, welche morgens am stärksten ist [7]. Es erfolgte eine additive Zugabe der Sexualsteroidhormone ins Zellkulturmedium bis zum Wechsel des Mediums nach maximal drei Tagen. Damit war an Tag zwei und drei nach Mediumwechsel theoretisch eine höhere Hormonkonzentration im Medium zu erwarten. Allerdings konnte die Expression mehrerer CYP-

Enzyme, welche Steroidhormone metabolisieren, in Calu-3 Zellen nachgewiesen werden [214]. Somit kann davon ausgegangen werden, dass während der Versuchsdurchführung zumindest ein partieller Metabolismus der Steroidhormone in den Calu-3-Zellen stattgefunden hat, was jedoch nicht experimentell verifiziert wurde. Unter Berücksichtigung dieser Theorie nahm die tatsächliche Konzentration an Sexualsteroidhormonen im Medium folglich im Laufe von 24 Stunden deutlich ab und die additive Zugabe der Hormonlösungen konnte einer Neudosierung annähernd gleichgestellt werden. Die Hormonspiegel im menschlichen Körper unterliegen neben tageszeitabhängigen Schwankungen auch altersabhängigen Unterschieden, wobei Kinder, postmenopausale Frauen sowie Männer über 50 Jahre im Mittel geringere Plasmakonzentrationen an Sexualsteroiden aufweisen als Erwachsene unter 50 Jahren [7, 198]. Daneben zeigen die in der Literatur beschriebenen physiologischen Konzentrationen an Sexualsteroidhormonen, unter anderem bedingt durch unterschiedliche Detektionsmethoden, zum Teil erhebliche interindividuelle Variationen [201, 235]. In einer Gruppe von 25 – 80-jährigen Männern wurden Serum-Konzentrationen an totalem Testosteron von 1,6 – 31 nM gemessen, mit mittleren Spiegeln an freiem Testosteron von 0,33 nM [201]. Die gewählten Versuchskonzentrationen der vorliegenden Untersuchung lagen mit 35 nM Testosteron im maximalen Bereich der physiologischen Plasmakonzentrationen bei Männern [194]. Noch drastischer sind die Schwankungen der Estradiol- und Progesteron-Plasmakonzentrationen bei prämenopausalen Frauen, da sie zusätzlich vom Stadium des Menstruationszyklus abhängig sind [194, 198]. Während der Schwangerschaft werden sogar maximale Konzentrationen von 550 nM Progesteron im Serum gemessen [198]. Die eingesetzten Konzentrationen der vorliegenden Untersuchungen von 1 nM Estradiol und 69 nM Progesteron orientierten sich am oberen physiologischen Bereich der Plasmakonzentrationen bei prämenopausalen, nicht-schwangeren Frauen [194, 198].

Der Vergleich der Versuche nach Hormon-Exposition mit den Inkubationsansätzen ohne Hormon-Zugabe (siehe 2.4.1) zeigte keine einheitliche Tendenz im Genexpressionsverhalten der untersuchten Transporter untereinander. Sowohl geringfügig höhere (MRP1 und OCTN1) als auch niedrigere (OCT3, OCTN2 und PEPT2) mRNA-Expressionen wurden detektiert. Diese Beobachtung ließ vermuten, dass die fünf untersuchten Transporter unterschiedlichen Regulations-Mechanismen unterliegen. Da die Sexualsteroidhormone jeweils verschiedene molekulare Wirkmechanismen aufweisen und prinzipiell sowohl eine höhere als auch eine geringere Genexpression induzieren können [195, 205], scheint dieser Erklärungsansatz durchaus plausibel. Es fiel außerdem auf, dass dagegen die Expression der einzelnen Transporter durch beinahe alle Hormon-Lösungen gleichgerichtet modifiziert wurde (Abbildung B.8). Beispielsweise zeigte MRP1 unter Einfluss aller Steroidhormone jeweils eine tendenzielle höhere Expression als ohne Hormon-Zugabe, OCT3 dagegen jeweils eine geringe Expression. Auch die Ansätze mit zusätzlicher L-Carnitin-Inkubation lieferten im Vergleich zu den Kontrollen (ohne Inkubation, Abbildung B.9, und alleinige L-Carnitin-

Inkubation, Abbildung B.10) größtenteils die gleichen Tendenzen. Somit wiesen alle Sexualsteroidhormone einen ähnlichen Einfluss auf die Regulation der Genexpression der einzelnen Transporter auf.

In der Literatur sind bis dato wenige vergleichbare *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen zu den Auswirkungen von Sexualsteroidhormonen auf die Genexpression der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Transporter beschrieben (siehe Tabelle B.2). Für MRP1 wird *in vitro* nach Behandlung mit Estradiol keine Veränderung der Genexpression, nach Behandlung mit Progesteron dagegen eine deutliche Erhöhung in primären humanen plazentalen Trophoblasten beschrieben [236]. Dieser unterschiedliche Effekt der beiden weiblichen Sexualsteroidhormone konnte in den vorliegenden Untersuchungen nicht ermittelt werden (siehe 2.4.1). Der direkte Vergleich der Estradiol-Inkubation gegen Progesteron zeigte eine nahezu gleiche MRP1-Expression (siehe 2.4.3).

Tabelle B.2: In der Literatur beschriebene Effekte der Sexualsteroidhormone Estradiol (EST), Progesteron (PRO) und Testosteron (TEST) auf die Genexpression von Arzneistofftransportern verglichen mit den ermittelten signifikanten Effekten in der vorliegenden Arbeit (siehe Abbildung B.8). ↑: erhöhte Genexpression; ↓: erniedrigte Genexpression; ↔ keine veränderte Genexpression (n. a. = nicht analysiert).

Transporter	Hormon	Zellen / Gewebe	Effekt	Referenz	Ermittelter Effekt (vorliegende Arbeit)
MRP1	EST	primären humanen plazentalen Trophoblasten	↔	[236]	↔
	PRO		↑		↔
OCT1	TEST	Niere kastrierter männlicher Mäuse	↔	[237]	n. a.
OCT2			↑		n. a.
OCT3			↔		↔
OCTN1			↓		↔
OCTN2			↔		↔
OCT1	EST	Niere von Mäusen	↔	[238]	n. a.
OCT2			↔		n. a.
OCT3			↔		↔
OCTN1			↔		↔
OCTN2			↔		↓
OCTN2	EST	verschiedene Brustkrebs-Zelllinien	↑	[169]	↓
PEPT2	EST	humane Gliom-Zelllinie und primäre Gliazellen aus Ratten	↔	[128]	↓
	TEST		↔		↔

*In vivo* Untersuchungen an kastrierten männlichen Mäusen zeigten nach Testosteron-Applikation eine höhere OCT2- und eine geringere OCTN1-Genexpression in der Niere, dagegen schienen OCT1, OCT3 und OCTN2 nicht durch Testosteron reguliert zu sein [237]. Im Einklang damit wiesen auch die vorliegenden Ergebnisse keine statistisch signifikante

Regulation der Genexpression von OCT3 und OCTN2 durch Testosteron auf. Allerdings wurde konträr auch für OCTN1 kein Testosteron-induzierter Effekt beobachtet (siehe 2.4.1). Ebenfalls keine Veränderungen der mRNA-Expression von OCT1-3 und OCTN1/2 in Mäusenieren wurden nach Verabreichung von Estradiol konstatiert [238]. Dies geht wiederum mit der nur wenig veränderten Expression von OCT3 und OCTN1 nach Estradiol-Zugabe konform, wohingegen für OCTN2 in der vorliegenden Studie eine statistisch signifikante Reduktion der mRNA-Expression detektiert wurde (siehe 2.4.1). Im Widerspruch dazu wurde in verschiedenen Brustkrebs-Zelllinien eine erhöhte Genexpression von OCTN2 durch Estrogen beschrieben [204].

Hervorzuheben aus den eigenen Ergebnissen ist die statistisch signifikant geringere Expression von PEPT2 in allen Inkubationsansätzen von Hormonlösungen kombiniert mit L-Carnitin verglichen zur alleinigen L-Carnitin-Zugabe (Abbildung B.10). Diese einheitlichen Ergebnisse lassen ein Sexualhormon-reguliertes Expressionsverhalten des Peptidtransporters vermuten. Allerdings konnten in einer humanen Gliom-Zelllinie und in primären Gliazellen aus Ratten keine Expressionsunterschiede von PEPT2 nach Inkubation mit Testosteron und Estradiol festgestellt werden (siehe Tabelle B.2) [128]. Dieselbe Untersuchung zeigte darüber hinaus auch keine Veränderung des PEPT2-vermittelten Transports eines Dipeptid-Derivativs nach Hormon-Inkubation [128]. Die Vergleichbarkeit dieser Studie mit den vorliegenden Ergebnissen ist aber aufgrund der Unterschiede hinsichtlich Gewebe und Spezies nur eingeschränkt gegeben. Im Besonderen ist weiterhin zu betrachten, dass in den eigenen Versuchen nach Inkubation mit Estradiol (OCTN2 und PEPT2) oder noch deutlicher nach Inkubation mit der Kombination aus den beiden weiblichen Sexualhormonen Estradiol und Progesteron (MRP1 und OCT3) verglichen zu keiner Inkubation eine statistisch signifikant unterschiedliche Genexpression detektiert werden konnten (Abbildung B.8). Auch nach Inkubation mit Estradiol, Progesteron und zusätzlich L-Carnitin verglichen zu keiner Inkubation und respektive alleiniger L-Carnitin-Inkubation wurden signifikante Unterschiede der Expression von OCT3, OCTN1, OCTN2 und PEPT2 festgestellt (Abbildung B.9 und Abbildung B.10). Diese Ergebnisse ließen einen additiven Effekt der beiden weiblichen Sexualhormone vermuten, der sich mit L-Carnitin zusätzlich verstärkt zeigte. In Untersuchungen an Interleukin-1 $\beta$ -stimulierten Endothelzellen konnte bereits ein negativer additiver Effekt der beiden weiblichen Sexualhormone auf die Expression der Adhäsionsmoleküle VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1) und ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1) festgestellt werden [239]. Allerdings konnte die Vermutung eines synergistischen Effekts von Estradiol und Progesteron auf die Genexpression der untersuchten Transporter nach direktem Vergleich der Inkubationen mit diesen beiden Hormonen nicht bestätigt werden (siehe 2.4.3). Es zeigten sich vielmehr tendenzielle gegenläufige Auswirkungen von Estradiol und Progesteron (siehe Abbildung B.13 und Abbildung B.14). Der additive Effekt von Sexualhormonen und L-Carnitin auf die Expression eines Zielgens wurde nach unserem Wissensstand bisher nicht untersucht.

### **2.5.2 Unterschiedliche Effekte weiblicher und männlicher Sexualhormone auf die Genexpression von Transportern**

Nach direktem Vergleich der Transporter-Expression in Versuchsansätzen mit weiblichen und männlichen Sexualsteroidhormonen (siehe 2.4.2) konnte für alle untersuchten Transporter eine geringfügig niedrigere Expression nach Estradiol-Inkubation als nach Testosteron-Zugabe festgestellt werden (Abbildung B.11). Auch unter zusätzlicher L-Carnitin-Zugabe konnte diese Tendenz beobachtet werden (Abbildung B.12). Für die Versuchsansätze mit Progesteron wurde dagegen tendenziell eine höhere Genexpression der untersuchten Transporter als nach Testosteron-Zugabe ermittelt, was nach zusätzlicher L-Carnitin-Inkubation allerdings nicht bestätigt werden konnte. Da kein gegenläufiger Effekt auf die Transporter-Expression durch Inkubation mit weiblichen und männlichen Hormonen beobachtet wurde, ist der beim direkten Vergleich aufgetretene, nur geringe Unterschied stimmig. Der unterschiedliche Effekt der beiden weiblichen Sexualsteroidhormone Estradiol und Progesteron wurde gesondert untersucht, indem die Versuchsansätze mit den beiden Hormonen sowie deren kombinierter Einsatz in Relation gesetzt wurden (siehe 2.4.3). Dabei zeigte sich sowohl mit als auch ohne zusätzliche L-Carnitin-Inkubation eine tendenziell höhere Genexpression der untersuchten Transporter nach Progesteron-Zugabe als nach Zusatz von Estradiol (Abbildung B.13 und Abbildung B.14). Estradiol und Progesteron erreichen während des Menstruationszyklus nicht gleichzeitig ihre maximalen Plasmakonzentrationen. Während Estradiol zu Beginn der Ovulationsphase seinen Spitzenspiegel erreicht, ist für Progesteron erst circa 8 Tage später, in der Lutelphase ein maximaler Spiegel zu vermerken [194, 198]. Weiterhin erhöht Estradiol die Biosynthese der Progesteron-Rezeptoren, Progesteron dagegen reduziert die Anzahl der Estradiol-Rezeptoren [7]. Dies könnte die zum Teil gegenläufigen Beobachtungen nach Inkubation mit beiden weiblichen Sexualhormonen erklären.

### **2.5.3 Einfluss von L-Carnitin auf die Expression von Arzneistofftransportern**

Für die Inkubationsversuche mit L-Carnitin, verglichen zu keiner L-Carnitin-Zugabe (siehe 2.4.4), konnte lediglich bei gleichzeitiger Inkubation mit Estradiol und Progesteron eine signifikante Reduktion der Expression von MRP1, OCTN2 und PEPT2 festgestellt werden (Abbildung B.15). Die Inkubations-Konzentration von L-Carnitin im Medium (50  $\mu\text{M}$ ) orientierte sich an gemessenen Plasmaspiegeln an totalem L-Carnitin in erwachsenen Männern und Frauen, wobei die Konzentration in Frauen, bedingt durch den geringeren Skelettmuskelanteil, um circa 10 % geringer ist als bei Männern [212]. Allerdings akkumuliert L-Carnitin in Zellen und liegt dort in millimolaren Konzentrationen vor [59], weswegen auch eine Verwendung höherer Konzentrationen an L-Carnitin im Medium denkbar gewesen wäre. Die Inkubation mit L-Carnitin erfolgte über 72 Stunden an konfluenten Calu-3-

Monolayern. Nach induziertem L-Carnitin-Defizit an Ratten wurde postuliert, dass bei erniedrigten Carnitin-Plasma-Konzentrationen eine Erhöhung der renalen OCTN2 mRNA-Expression und Aktivität stattfand [226]. Eine Autoregulation hervorgerufen durch einen L-Carnitin-Defizit wäre ein plausibler Mechanismus, der bereits nach 72 Stunden abgeschlossen sein sollte. Dies rechtfertigte die kurze Inkubationsdauer in der eigenen Studie, zum besseren Vergleich mit den Ergebnissen der Hormon-Inkubationsversuche wäre auch eine Inkubation über 21 Tage denkbar gewesen. Wurden Ratten ohne Carnitin-Defizit über eine Dauer von 14 Tagen mit L-Carnitin behandelt, hatte dies keine Regulation der renalen OCTN2-Expression zur Folge [226]. Auch in Darm, Leber und Skelettmuskel von Ratten und in der humanen embryonalen Nierenzelllinie 293-EBNA konnte weder nach L-Carnitin-Exposition noch nach induziertem L-Carnitin-Defizit eine Regulation der mRNA-Expression festgestellt werden [226]. In diesem Kontext scheint eine Regulation der Transporter-Expression in der menschlichen Lunge durch unterschiedliche L-Carnitin-Spiegel in Männern und Frauen unwahrscheinlich. Durch die hier dargestellten Ergebnisse könnte die Hypothese aufgestellt werden, dass bei Frauen durch hohe L-Carnitin-Spiegel eine negative Regulation der Transporter MRP1, OCTN2 und PEPT2 stattfindet. Da die Reduktion der Transporter-Expression jedoch weniger als 20 % betrug, ist die klinische Relevanz fraglich.

Erstmals wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von Sexualsteroidhormonen auf die Genexpression von Arzneistofftransportern in Calu-3-Zellen untersucht. Zusammenfassend ist dabei festzuhalten, dass primär das weibliche Sexualhormon Estradiol sowie der kombinierter Einsatz von Estradiol und Progesteron statistisch signifikante Veränderungen der Genexpression einzelner Transporter bewirkten. Ein synergistischer Effekt der beiden weiblichen Sexualhormone auf die Transporter-Expression konnte jedoch nicht bestimmt werden. Verglichen zur Exposition mit dem männlichen Sexualhormon Testosteron waren die untersuchten Arzneistofftransporter darüber hinaus nach Inkubation mit Estradiol tendenziell geringer, nach Inkubation mit Progesteron tendenziell höher exprimiert. L-Carnitin zeigte keine entscheidende Beeinflussung der Transporter-Expression in Calu-3-Zellen. Da Unterschiede in der mRNA-Expression nicht zwingend in Unterschieden der entsprechenden Protein-Expression und -Funktionalität resultieren und die Übertragung auf in vivo Bedingungen in der humanen Lunge nur eingeschränkt möglich ist, können nur vorsichtige Rückschlüsse auf die Einflüsse von Sexualhormonen auf die Expression von Transportern im menschlichen Lungengewebe und deren klinische Relevanz gemacht werden.

## 3 Unterschiede in der Genexpression von Arzneistofftransportern in humanem Lungengewebe

### 3.1 Hintergrund

#### 3.1.1 Geschlechtsspezifische Medizin

Die relativ junge Disziplin der *Geschlechtsspezifischen Medizin* oder auch *Gendermedizin* befasst sich mit der Thematik, inwieweit Krankheiten sich hinsichtlich ihrer Pathophysiologie, der auftretenden klinischen Symptome, der therapeutischen Behandlungsoptionen und ihrer Prognose zwischen den Geschlechtern unterscheiden [240]. Im englischsprachigen Raum existieren für das deutsche Wort *Geschlecht* zwei sich unterscheidende Begriffe: *Sex* bezieht sich auf biologische Faktoren, also auf das Vorhandensein und die Funktion von Geschlechtschromosomen (Gonosomen) und Reproduktionsorganen [241]. *Gender* definiert dagegen verhaltensbezogene, psychosoziale und kulturelle Charakteristika, wird jedoch oftmals fälschlicherweise als Synonym für *sex* verwendet [241]. Der deutsche Terminus *Geschlecht* vereint dagegen beide Definitionen.

Prominentes Beispiel einer Krankheit mit geschlechtsspezifischen Unterschieden ist die *Koronare Herzkrankheit* (KHK), welche weltweit sowohl bei Frauen als auch bei Männern als die häufigste Todesursache gilt [242]. Generell sind Frauen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung einer manifesten KHK älter als Männer und zeigen stärkere Ausprägungen an kardiovaskulären Risikofaktoren [243]. Bei prämenopausalen Frauen ist die Ereignisrate für eine KHK gering, wofür eine verzögerte Manifestation einer Atherosklerose durch endogene Estrogene als verantwortlich vermutet wird [243]. Dagegen steigt das Risiko, eine KHK zu entwickeln, für postmenopausale Frauen, da sich die Risikofaktoren verschlechtern [242, 243]. Der systolische Blutdruck steigt bei älteren Frauen deutlicher an als bei gleichaltrigen Männern, der Spiegel an Gesamtcholesterol und LDL (Low Density Lipoprotein) erhöht sich bei Frauen nach der Menopause und auch das Körpergewicht nimmt zu [243]. Daneben erhöht sich das Risiko, eine KHK zu entwickeln, für Frauen mit diagnostiziertem Diabetes mellitus wesentlich drastischer als bei männlichen Diabetikern [244]. Der akute Myokardinfarkt präsentiert sich bei Frauen häufiger mit atypischen diffusen vaso-vegetativen Symptomen, was verglichen zu Männern häufiger zu Fehldiagnosen führt [243]. Daraus resultieren wiederum weniger strikte Behandlungsstrategien für Frauen als für Männer [243]. Die Überlebensrate nach einem akuten Myokardinfarkt ist für Frauen geringer als für Männer [243]. Auch die Ergebnisse nicht-invasiver Untersuchungen, wie der Elektrokardiographie (EKG), sind für weibliche Patienten weniger zuverlässig als für männliche Patienten, da es keine geschlechtsspezifischen Interpretations-Kriterien gibt, obgleich Frauen beispielsweise einen höheren Ruhepuls und ein längeres QT-Intervall aufweisen als Männer [243]. Zudem sind Frauen nach Einnahme QT-Zeit-verlängernder Medikamente anfälliger

als Männer, eine potentiell lebensgefährliche Torsade-de-Pointes-Tachykardie zu entwickeln [245]. Diese klinisch relevante Nebenwirkung wird durch eine stärkere QT-Zeit-Verlängerung einiger therapeutisch eingesetzter Antiarrhythmika in Frauen begründet [246].

Weniger Aufmerksamkeit als kardiovaskulären Erkrankungen wird, sowohl in der Forschung als auch in der Praxis, geschlechtsspezifischen Unterschieden von Atemwegserkrankungen gewidmet [247]. Neben physiologischen Besonderheiten, wie beispielsweise einer kleineren Lunge und einem geringeren spezifischen Atemwegswiderstand in Mädchen und Frauen und einer höheren Vitalkapazität in Männern, gibt es Divergenzen in den Inzidenzraten und Prognosen der Erkrankungen des Respirationstrakts [247]. Bis zu einem Alter von fünf Jahren tritt eine Neudiagnose von *Asthma bronchiale* für Jungen doppelt so häufig auf wie für Mädchen [247]. Die Inzidenzraten nähern sich bis zum Ende der Pubertät (15 – 19 Jahre) an, ab dem geschlechtsreifen Alter erfolgt für Frauen häufiger eine Neudiagnose als für Männer und nach der Menopause reversieren sich die Inzidenzraten erneut [247, 248]. Frauen leiden an schwereren Formen der Krankheit und werden häufiger aufgrund akuter Exazerbationen hospitalisiert als Männer [248]. Dabei scheint im Erwachsenenalter der weibliche Hormonstatus eine erhebliche Rolle zu spielen, da bei Asthmatikerinnen eine prämenstruelle Verschlechterung der Symptomatik konstatiert wurde [247, 248]. Die Morbiditäts- und Mortalitätsraten für COPD (chronic obstructive pulmonary disease) sind in fast allen Industrieländern für Frauen geringer als für Männer, wobei sich die Raten durch den wachsenden Anteil an rauchenden Frauen annähern [247]. Ähnlich verhält es sich für die Zahlen zu Morbidität und Mortalität bei *Lungenkarzinomen*: Weltweit erkranken und sterben etwa doppelt so viele Männer wie Frauen an einer malignen Veränderung in der Lunge [249]. Steigende Zahlen zu Inzidenz und Mortalität von Lungenkrebs in Frauen reflektieren einen veränderten Trend im Zigaretten-Konsum, dessen Höhepunkt für Frauen circa 20 Jahre später als für Männer erreicht wurde [249, 250]. Frauen scheinen dabei durch den Tabak-Konsum eine höhere Anfälligkeit für gesundheitliche Schäden zu haben als Männer [247]. Im Kontrast dazu ist der Anteil der an Lungenkarzinom erkrankten Nichtraucherinnen deutlich höher als der von männlichen Nichtrauchern [249]. Obgleich sie eher als vaskuläre Erkrankung einzustufen ist, äußert sich die *pulmonale arterielle Hypertonie* unter anderem in respiratorischen Symptomen, wie Dyspnoe und Husten [251]. Die Krankheit, welche durch einen mittleren Pulmonalarteriendruck von  $> 25$  mmHg in Ruhe oder  $> 30$  mmHg während Anstrengung definiert ist, tritt bei Frauen etwa viermal häufiger auf als bei Männern [251]. Zum Zeitpunkt der Diagnose haben Männer, verglichen zu Frauen, einen signifikant höheren Pulmonalarteriendruck und die geschätzte 5-Jahres-Überlebensrate ist für Männer geringer [251]. Darüber hinaus zeigten Endothelin-Rezeptor-antagonisten für Frauen einen höheren klinischen Nutzen als für Männer [251].



### 3.1.2 Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Pharmakokinetik von Arzneistoffen

Lange Zeit blieb bei der Zulassung von Arzneimitteln der Aspekt der geschlechtsspezifischen Unterschiede in der Pharmakokinetik und Pharmakodynamik von Arzneistoffen unbeachtet. Frauen im gebärfähigen Alter wurden von klinischen Studien ausgeschlossen, unter anderem begründet auf hormonellen Schwankungen im Verlauf des Menstruationszyklus, Zufuhr von exogenen Hormonen oder einem fötalen Risiko während der Schwangerschaft [252-254]. Erst im Jahr 1993 wurde von der FDA (U.S. Food and Drug Administration) eine Leitlinie herausgegeben, welche forderte, dass beide Geschlechter in die Entwicklung von Arzneistoffen einbezogen, potentielle pharmakokinetische Unterschiede evaluiert und klinische Daten nach Geschlechtern differenziert ausgewertet werden sollten [252, 255]. Zeitgleich wurde in den USA ein Gesetz erlassen, welches für vom NIH (National Institutes of Health) finanzierte Humanstudien vorschrieb Frauen miteinzuschließen [253, 255]. Dagegen ist es in der EU aktuell noch immer nicht obligat Frauen und Männer in klinische Studien gleichmäßig zu involvieren [253, 254]. Obwohl inzwischen deutlich mehr Frauen an klinischen Studien teilnehmen, werden die daraus hervorgehenden Ergebnisse oftmals nicht differenziert nach Geschlechtern dargestellt [254]. Noch immer sind Frauen in den frühen Phasen der Arzneimittelzulassung, die sich mit der Pharmakokinetik, Nebenwirkungen, Sicherheit und der Dosierung von Arzneimitteln befassen, unterrepräsentiert [253].

Generell leben Frauen länger als Männer, wenden häufiger Arzneimittel an, da sie öfter krank werden und häufiger an chronischen Erkrankungen leiden, und haben eine höhere Inzidenz an unerwarteten Arzneimittelwirkungen [253, 256]. Geschlechtsspezifische Unterschiede bezüglich der Pharmakokinetik und Pharmakodynamik spielen dabei eine Schlüsselrolle für die Wirksamkeit und Sicherheit von Arzneimitteln [240]. Auf molekularer Ebene werden Arzneistofftransporter sowie metabolisierende Enzyme als Ursachen für eine unterschiedliche Pharmakokinetik bei Mann und Frau diskutiert [252]. So wurde für den Transporter MDR1 in Gewebeproben der humanen Leber eine doppelt so hohe Expression in Proben von Männern im Vergleich zu Frauen festgestellt [257]. Der Calciumkanalantagonist Verapamil, ein Substrat von MDR1, zeigte nach oraler Verabreichung bei weiblichen Probanden eine geringere Clearance und eine höhere Bioverfügbarkeit [258]. Unter den Enzymen des Phase-I-Metabolismus ist für CYP2D6 eine geringe Aktivität in normal-metabolisierenden (extensive metabolisers) Frauen verglichen zu Männern beobachtet worden [259]. Eine andere Untersuchung ließ allerdings eine geringfügig höhere CYP2D6-Aktivität in Frauen vermuten [260]. Über CYP2D6 verstoffwechselte Arzneistoffe sind mannigfaltig und zählen zu den verschiedensten Wirkstoffklassen, wie beispielsweise den Antidepressiva (Imipramin und Amitriptylin), Opioiden (Codein und Oxycodon) und  $\beta$ -Blockern (Metoprolol und Propranolol) [261]. Metoprolol wies nach oraler Einnahme eine geringere Clearance und höhere Plasmaspiegel in Frauen verglichen zu Männern auf [240,

252]. Ein reduzierter Metoprolol-Metabolismus aufgrund einer geringeren CYP2D6-Aktivität wäre eine plausible Erklärung für diese Beobachtung. Bedingt durch die höhere Bioverfügbarkeit von Metoprolol wurde in Frauen auch eine stärkere Reduktion der Herzfrequenz und des systolischen Blutdrucks beobachtet [252], allerdings könnten dadurch auch verstärkt Metoprolol-assoziierte Nebenwirkungen für Frauen auftreten [240]. Für CYP3A4, das eine große Bandbreite an Xenobiotika metabolisiert, konnte in humanen hepatischen Mikrosomen eine höhere Aktivität in Proben von Frauen verglichen zu Proben von Männern gezeigt werden [262]. Jedoch wird die geschlechtsspezifische Aktivität von CYP3A4 kontrovers diskutiert [252, 263]. In einer neueren Bewertung der Literatur wurde für Arzneistoffe, die ausschließlich als CYP3A4-Substrate gelten, wie etwa Midazolam, Zolpidem und Nifedipin, eine statistisch signifikant niedrigere Clearance in Frauen festgestellt [263]. Dieser geringe Unterschied hat jedoch wahrscheinlich keinen klinisch relevanten Stellenwert [263]. Von den metabolisierenden Enzymen der Phase II ist die Uridin-Diphosphat-Glucuronosyltransferase UGT1A6 hervorzuheben, welche in der Leber von Männern eine höhere Protein-Expression und -Aktivität aufweist als in Frauen [252, 264]. Damit könnte eine geringere Glucuronidierung von Paracetamol, einem Substrat der Uridin-Diphosphat-Glucuronosyltransferase UGT1A6, in Frauen begründet werden [252, 256].

Neben molekularen Mechanismen können auch physiologische Unterschiede zu geschlechtsspezifischen Abweichungen in der Pharmakokinetik von Arzneistoffen beitragen. Im Allgemeinen haben Frauen ein geringeres Körpergewicht, einen geringeren Anteil an Muskelmasse und einen höheren Prozentsatz an Körperfett [256], was die Verteilung von therapeutischen Wirkstoffen beeinflussen kann. Darüber hinaus liegt bei Frauen eine im Vergleich zu Männern um 10 % reduzierte glomeruläre Filtrationsrate vor [252, 265]. Dadurch kann es zu einer geringeren Exkretion renal eliminierender Arzneistoffe bei Frauen kommen, wie es für Digoxin gezeigt wurde [240]. Die geringere Sekretion von Magensäure in Frauen kann die Resorption und damit die Bioverfügbarkeit oral applizierter Arzneistoffe verändern [256].

Ausschlaggebend für die klinische Relevanz geschlechtsspezifischer Differenzen ist zumeist aber nicht eine pharmakokinetische, sondern die oftmals deutlicher ausfallende pharmakodynamische Variabilität von Arzneistoffen [252]. Beispielsweise zeigt das Ansprechen von Analgetika offensichtliche Unterschiede zwischen den Geschlechtern: Morphin weist in Frauen ein späteres Einsetzen und eine höhere Potenz der Wirkung auf, was mit dem unterschiedlichem Ausmaß an Atemdepression nach Morphin-Einnahme korrelierte, ohne dass pharmakokinetischen Unterschiede zu detektieren waren [266].

## 3.2 Fragestellung

Die Suche nach geschlechtsspezifischen Unterschieden in pharmakokinetischen Prozessen und resultierenden pharmakodynamischen Wirkungen und Nebenwirkungen wurde in den letzten beiden Dekaden forciert vorangetrieben. Nichtsdestotrotz sind Informationen zu dem in Mann und Frau unterschiedlichen Transport über biologische Membranen und den zugrunde liegenden molekularen Wirkmechanismen bisher nur begrenzt vorhanden. Erkenntnisse aus Tiermodellen lassen sich nicht uneingeschränkt auf Menschen übertragen und in unterschiedlichen Geweben können gegenläufige Beobachtungen gemacht werden [197]. Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Physiologie und Entwicklung der humanen Lunge sind schon direkt nach der Geburt, über das Kindesalter hinweg bis hin ins hohe Alter festzustellen [247]. Daneben werden im Menschen Arzneistofftransporter im Bronchialepithel exprimiert, die an der Aufnahme von Wirkstoffen nach inhalativer Anwendung beteiligt sind [21]. Bisher beschäftigte sich, nach unserem Wissensstand, lediglich eine Studie, basierend auf Gewebeproben von drei männlichen und vier weiblichen Spendern, mit der geschlechtsspezifischen Expression von Arzneistofftransportern in der humanen Lunge [267]. Dabei wurde für beinahe alle untersuchten Transporter eine höhere Protein-Expression in Gewebeproben weiblicher Spender festgestellt [267]. Weil die Anzahl der untersuchten Lungengewebsproben in dieser Studie allerdings recht gering war, stellte sich die Frage, ob diese Beobachtung in einem größeren Spender-Kollektiv auf Ebene der Genexpression bestätigt werden konnte.

Vor allem Frauen nach der Menopause und ältere Männer können, durch den altersbedingt modifizierten Hormonhaushalt Änderungen in der Expression von Genen aufweisen [205, 248, 268]. Auch die Lungenfunktion und -struktur verändert sich mit zunehmendem Alter, was sich beispielsweise in einer Reduktion des Alveolarluftvolumens, der Lungelastizität und der maximalen expiratorischen Atemstromstärke äußert [247]. Inwieweit die Expression von Transportern im Lungengewebe zwischen unterschiedlichen Altersgruppen variiert, war bislang nicht bekannt. Deswegen sollte in circa 80 humanen Lungengewebsproben die Genexpression ausgewählter Arzneistofftransporter analysiert und auf geschlechts- und altersspezifische Unterschiede überprüft werden. Zusätzlich sollte die Untersuchung einer hohen Anzahl an Proben ermöglichen, die relative Expression der Transporter im humanen Lungengewebe genauer zu evaluieren.

Darüber hinaus stellte sich die Frage, ob individuelle Unterschiede in der Genexpression von Arzneistofftransportern in der Lunge zu einem abweichenden pharmakokinetischen Verhalten inhalativ angewandter Arzneistoffe führen. Dazu sollte die einzigartige Möglichkeit genutzt werden, die am humanen Lungen-Perfusions-Modell (LPM) gewonnenen pharmakokinetischen Daten zu Ipratropiumbromid in direkte Korrelation zu molekular-

biologischen Erkenntnissen zu setzen, indem Gewebeproben aus LPM-Experimenten hinsichtlich der Expression von Transportern untersucht wurden.

### 3.3 Prinzip der Bestimmung der Genexpression von Arzneistofftransportern in humanem Lungengewebe

Zur Untersuchung der mRNA-Expression von Arzneistofftransportern wurden humane Lungengewebsproben aus Versuchen am Lungen-Perfusions-Modell (Thoraxzentrum Bezirk Unterfranken, Münnerstadt) sowie aus dem Universitätsklinikum Würzburg verwendet (siehe *Experimenteller Teil 5.2*). Unter ständiger Stickstoff-Kühlung wurden die individuellen Proben zunächst pulverisiert und zu 25 - 30 mg Gewebe aliquotiert (siehe *Experimenteller Teil 5.3.1*), um für alle Proben eine vergleichbare Ausgangsmenge zu erreichen (Normalisierungsschritt 1, Abbildung B.16). Aus den Aliquoten wurde, unter Anwendung eines Rotor-Stator-Dispergierers zur Homogenisierung der Proben, die Gesamt-RNA isoliert (siehe *Experimenteller Teil 5.3.2*) und die Konzentration der RNA in wässriger Lösung mittels Nanodrop-Methode bestimmt (siehe *Experimenteller Teil 5.3.3*). Jeweils 1000 ng totale RNA wurden anschließend in cDNA umgeschrieben (siehe *Experimenteller Teil 5.4*), was eine Normierung der Proben auf eine einheitliche Menge an totaler RNA bewirkte (Normalisierungsschritt 2, Abbildung B.16).

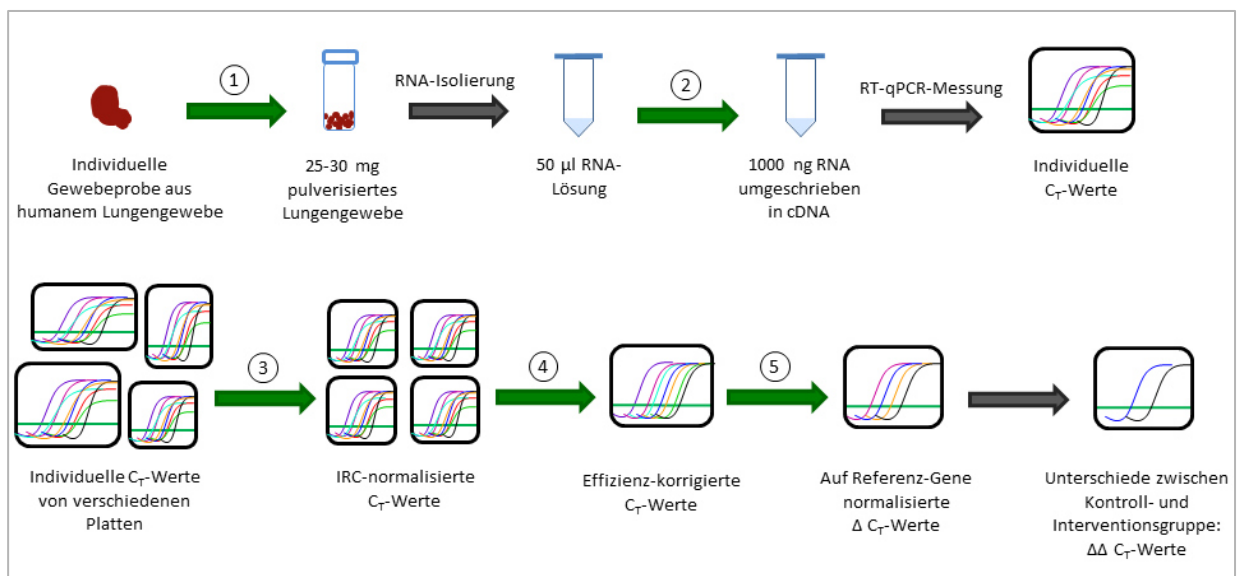


Abbildung B.16: Normalisierungsschritte während der Probenbearbeitung und der Datenprozessierung zur Bestimmung der Genexpression von Arzneistofftransportern in humanem Lungengewebe. **1:** Probenvorbereitung und Normalisierung auf eine einheitliche Masse. **2:** Normalisierung auf eine konstante Menge an in cDNA umgeschriebener totaler RNA. **3:** Normalisierung der  $C_T$ -Werte auf Lauf-Vergleichs-Proben (inter-run controls = IRC). **4:** Effizienz-Korrektur der  $C_T$ -Werte. **5:** Normalisierung auf stabil exprimierte Referenz-Gene.

Die Vermessung der cDNA-Lösungen erfolgte für alle Proben und alle Ziel-Gene im Triplikate, wobei immer Kontrollen, wie Leerproben (no-template controls = NTC) und Lauf-Vergleichs-Proben (inter-run controls = IRC), mitgeführt wurden (siehe *Experimenteller Teil 5.5.1*). Jeweils 10 ng an in cDNA umgeschriebener RNA wurden mit einem für das Ziel-Gen spezifischen Primer/Sonden-Mix und dem Reaktions-Mix versetzt und mittels RT-qPCR-Technik vermessen (siehe *Experimenteller Teil 5.5.3*). Dabei erfolgte die Detektion über den Fluoreszenzfarbstoff FAM™, welcher während der Synthese des DNA-Doppelstrangs durch die Polymerase aus seiner kovalenten TaqMan-Sonden-Bindung freigesetzt wurde (siehe *Experimenteller Teil 5.5.4*). Die so ermittelten individuellen  $C_T$ -Werte wurden nach Überprüfung durch einen Ausreißertest (siehe *Experimenteller Teil 5.6.1*) auf die mitgeführten IRC normalisiert (siehe *Experimenteller Teil 5.6.2*), um eventuellen Unterschieden bei der Vermessung der einzelnen Platten gerecht zu werden (Normalisierungsschritt 3, Abbildung B.16). Anschließend wurden die Werte auf die für jedes untersuchte Gen individuell ermittelte Effizienz der PCR-Amplifikation (siehe *Experimenteller Teil 5.5.5*) korrigiert (Normalisierungsschritt 4, Abbildung B.16). Die Effizienz-korrigierten  $C_T$ -Werte wurden auf das geometrische Mittel der drei mitgeführten Referenz-Gene 18 S RNA, GAPDH und ACTB normalisiert (Normalisierungsschritt 5, Abbildung B.16) und mittels REST®-Software relativ quantifiziert (siehe *Experimenteller Teil 5.6.3* und *5.6.4*). Nach Normalisierung der  $C_T$ -Werte auf Referenz-Gene wurden  $\Delta C_T$ -Werte ermittelt, die auf eine Kontrollgruppe relativierte Quantifizierung lieferte die sogenannten  $\Delta\Delta C_T$ -Werte.

Zur Untersuchung geschlechtsspezifischer Unterschiede wurden Proben von männlichen Patienten als Kontrollgruppe und Proben von weiblichen Spenderinnen als Interventionsgruppe definiert. Nach ähnlichem Prinzip wurden altersspezifische Unterschiede ermittelt, wobei die Proben der jeweils jüngeren Patientengruppe als Intervention und die Proben der älteren Patientengruppe als Kontrolle angesehen wurde. Individuelle Expressionsunterschiede der Lungengewebsproben wurden bestimmt, indem jede individuelle Probe als Intervention galt und die Kontrolle aus dem Mittelwert aller untersuchten Proben bestand. Diese individuellen Transporter-Expressionen wurden einer Korrelationsanalyse unterzogen, um eventuell zusammenhängende Expressionen einzelner Transporter zu identifizieren. Zudem wurden die individuellen Transporter-Expressionen hinsichtlich einer Korrelation mit den am LPM ermittelten individuellen Werten der  $AUC_{0-60 \text{ min}}$  von Ipratropiumbromid überprüft, was den Einfluss einzelner Arzneistofftransporter auf die pharmakokinetischen Eigenschaften von Ipratropiumbromid darlegen sollte. Das Genexpressions-Niveau der untersuchten Transporter im Lungengewebe wurde anhand der für jede Probe individuell ermittelten  $\Delta C_T$ -Werten verglichen.

### **3.4 Ergebnisse der Untersuchungen zur unterschiedlichen Genexpression von Arzneistofftransportern in humanem Lungengewebe**

#### **3.4.1 Charakteristika der untersuchten Gewebeproben**

Neben den zwölf in 1.5.1 charakterisierten Gewebeproben aus den Lungen-Perfusions-Experimenten wurden weitere 67 Proben zu den Untersuchungen der Transporter-Expression herangezogen und ausgewertet. Davon stammten 21 Proben aus dem Thoraxzentrum Bezirk Unterfranken (Münnerstadt), 46 Gewebeproben wurden uns aus dem Universitätsklinikum Würzburg zur Verfügung gestellt. Von weiblichen Patienten stammten 27 Gewebeproben, was somit 34 % der insgesamt 79 humanen Lungengewebsproben ausmachte.

Das mittlere Alter der Spender betrug  $64,0 \pm 12,1$  Jahre (MW  $\pm$  SD), wobei die Männer im Schnitt  $65,1 \pm 11,8$  Jahre alt waren, die Frauen  $61,9 \pm 12,5$  Jahre. Die Gewebeproben wurden in unterschiedliche Altersklassen der Patienten eingeteilt und ausgewertet. Vier der 27 Patientinnen, die jünger als 50 Jahre waren, wurden als prämenopausal eingestuft. Zwölf Patientinnen, die zum Zeitpunkt der Operation älter als 60 Jahre waren, wurden als postmenopausal eingestuft. Die dritte Altersstufe bildeten die 50 - 60-jährigen Frauen mit elf Gewebeproben. Diesen Altersgruppen entsprechend wurden auch die Gewebeproben von männlichen Patienten eingeteilt: Vier Patienten waren zum Zeitpunkt der Operation jünger als 50 Jahre, elf Spender waren zwischen 50 und 60 Jahre alt und 37 Männer waren älter als 60 Jahre. Insgesamt wurden somit in der Altersklasse der unter 50-jährigen Patienten acht Gewebeproben untersucht, 22 Patienten waren der Altersklasse 50 - 60 Jahre zugehörig und 49 Patienten waren älter als 60 Jahre.

Dem linken Lungenflügel entstammten 37 der Gewebeproben, 30 davon waren aus dem linken Oberlappen, sieben aus dem linken Unterlappen entnommen worden. Entsprechend stammten 39 Proben aus dem rechten Lungenflügel, wobei 24 Proben dem rechten Oberlappen, zwei Proben dem rechten Mittellappen und 13 Proben dem rechten Unterlappen zugeordnet werden konnten. Zu drei Gewebeproben wurden keine detaillierten Informationen zur genaueren Lokalisation zur Verfügung gestellt. Individuelle Charakteristika zu Gewebeproben und Spender sind im tabellarischen Anhang (D.5.1) zu finden.

#### **3.4.2 Genexpressions-Niveaus der untersuchten Transporter**

Der Vergleich der Genexpression von Arzneistofftransportern im humanen Lungengewebe zeigte unterschiedlich hohe Expressions-Niveaus. Nach Normierung auf das geometrische Mittel der drei Referenz-Gene ACTB, GAPDH und 18 S RNA konnten die  $\Delta C_T$ -Werte der

neun untersuchten Transporter-Gene aus allen 79 Gewebeproben untereinander verglichen werden (Abbildung B.17). OCT3 wies dabei im Mittel die geringsten  $\Delta C_T$ -Werte auf, der Median lag bei 7,47, das 5 % - 95 % Perzentil zwischen 6,14 – 9,23, was auf die höchste mRNA-Expression in den 79 Gewebeproben schließen ließ. OCT2 zeigte die höchsten  $\Delta C_T$ -Werte (Median: 16,93; 5 % - 95 % Perzentil: 15,29 – 18,91) und damit die geringste mRNA-Expression. Allerdings konnten hier lediglich 56 Gewebeproben in die Auswertung eingeschlossen werden, da die  $C_T$ -Werte der restlichen Proben nicht ausreichend detektierbar waren ( $C_T$ -Werte > 35, siehe *Experimenteller Teil* 5.6). MRP1 zeigte nach OCT3 die zweitniedrigsten  $\Delta C_T$ -Werte (Median: 9,23; 5 % - 95 % Perzentil: 8,18 – 10,24), gefolgt von OCTN2, MATE1, MDR1 und MRP5, die alle vier in etwa das gleiche Expressions-Niveau aufwiesen (siehe *Tabellarischer Anhang* 5.3). Tendenziell geringfügig weniger exprimiert war OCTN1 (Median 11,98; 5 % - 95 % Perzentil: 10,10 – 13,32) und neben OCT2 wies OCT1 das geringste Expressions-Niveau auf (Median 13,63; 5 %- 95 % Perzentil: 12,33 – 15,05).

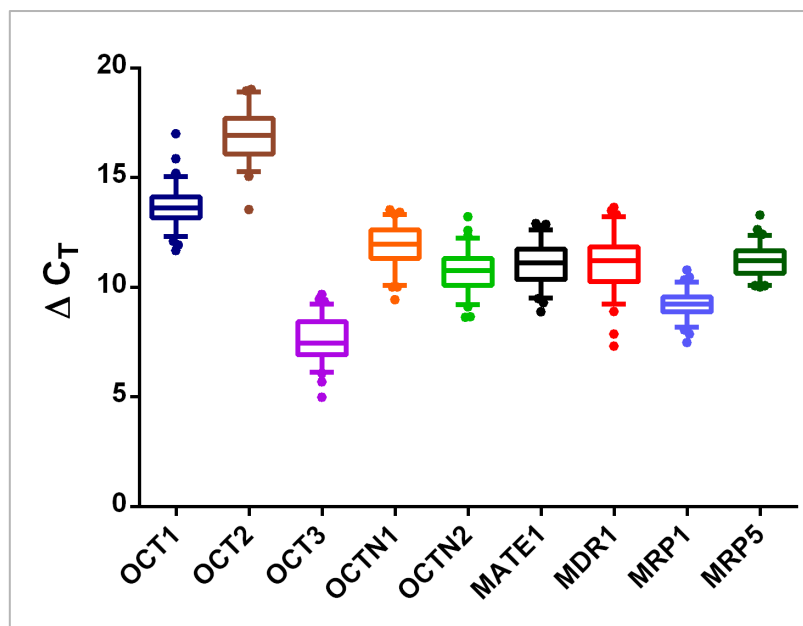


Abbildung B.17: Expressions-Niveaus der neun untersuchten Transporter-Gene OCT1 (dunkelblau), OCT2 (braun), OCT3 (lila), OCTN1 (orange), OCTN2 (hellgrün), MATE1 (schwarz), MDR1 (rot), MRP1 (hellblau) und MRP5 (dunkelgrün). Dargestellt sind die jeweiligen auf das geometrische Mittel der drei Referenz-Gene ACTB, GAPDH und 18 S RNA normierten  $\Delta C_T$ -Werte. Daten aus 79 humanen Lungengewebeproben mit Ausnahme von OCT2: 56 Proben, da bei 23 Proben keine bzw. unzureichende  $C_T$ -Werte (> 35) detektiert wurden. Box-Whisker-Plot (Box 25 % - 75 %, Whisker 5 % - 95 %).

Alle untersuchten Transporter zeigten somit ein individuelles und voneinander verschiedenes Expressions-Niveau mit der höchsten Genexpression für OCT3 und der geringsten Genexpression für OCT2.

### 3.4.3 Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Genexpression von Arzneistofftransportern

Nach Auswertung der Daten von 27 Gewebeproben weiblicher Patienten und 52 Gewebeproben männlicher Patienten konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test,  $p > 0,05$ ). Lediglich geringfügige Tendenzen ließen sich erkennen: OCT1 zeigte mit 128 % (Standardfehler (SEM) 58 - 276 %) die stärkste Abweichung der Genexpression in Lungengewebsproben weiblicher Patienten verglichen zu der in Proben männlicher Patienten. MATE 1 war bei Frauen zu 115 % (SEM 46 - 281 %), MRP5 zu 112 % (SEM 58 - 217 %), OCT3 zu 111 % (SEM 45 - 273 %) und OCTN2 zu 110 % (SEM 45 - 257 %) exprimiert, verglichen zu Männern. MDR1 war dagegen tendenziell im Lungengewebe weiblicher Spender niedriger exprimiert (92 %, SEM 28 - 301 %). OCTN1 und MRP1 zeigten kaum Unterschiede bezüglich der Genexpression der untersuchten Transporter (Abbildung B.18).

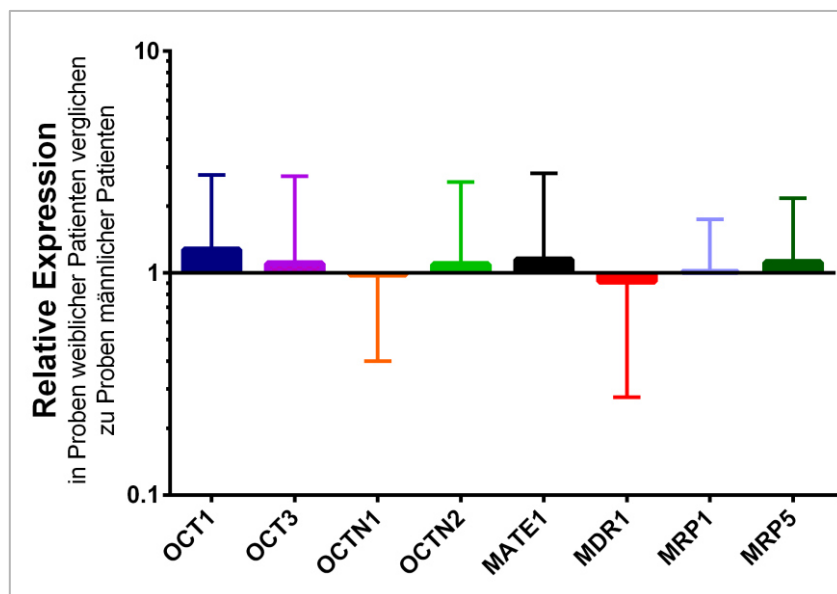


Abbildung B.18: Relative Expression der untersuchten Transporter-Gene OCT1 (dunkelblau), OCT3 (lila), OCTN1 (orange), OCTN2 (hellgrün), MATE1 (schwarz), MDR1 (rot), MRP1 (hellblau) und MRP5 (dunkelgrün) in Gewebeproben weiblicher Patienten ( $n = 27$ ) verglichen zu Gewebeproben männlicher Patienten ( $n = 52$ ). Keine signifikanten Unterschiede (Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test,  $p > 0,05$ ).

Auch bei differenzierter Betrachtung der drei unterschiedlichen Altersklassen (Patienten jünger als 50 Jahre, Patienten zwischen 50 und 60 Jahren und Patienten älter als 60 Jahre) ließen sich keine signifikanten Unterschiede feststellen (Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test,  $p > 0,05$ ). Allerdings konnten unterschiedliche Tendenzen der geschlechtsspezifischen Transporter-Expression zwischen den Altersklassen beobachtet



werden: In der Gruppe der über 60-jährigen Patienten waren kaum Unterschiede zu erkennen (Abbildung B.19 C), wohingegen die Expressions-Unterschiede in der Altersklasse der 50 - 60-Jährigen schon deutlicher ausfielen (Abbildung B.19 B). Die Expressionen von MDR1 und MRP5 lagen beispielsweise im Lungengewebe weiblicher Patienten mit 130 % jeweils über derjenigen im Lungengewebe männlicher Patienten, die OCT1-Expression war sogar 161 % (SEM 57,5 – 361,8 %) der Expression bei Männern. Am deutlichsten waren jedoch unterschiedliche Tendenzen in der Gruppe der Patienten unter 50 Jahren zu erkennen (Abbildung B.19 A): MDR1 war bei Frauen verglichen zu Männern lediglich zu 38,4 % (SEM 14,8 - 100,6 %) exprimiert, was beinahe einer dreifachen Überexpression im Lungengewebe männlicher Spender entsprach. Ähnlich starke Überexpression, allerdings im Lungengewebe weiblicher Spender, zeigten MATE1 (277,4 %, SEM 102,5 - 735,6 %), OCT1 (208,3 %, SEM 78,8 - 363,7 %) und auch OCT3 (196,2 %, SEM 78,7 - 457,5 %). Allerdings konnte auch hier, trotz der deutlichen Unterschiede, keine Signifikanz erreicht werden, da die betrachtete Altersklasse mit vier Gewebeproben männlicher Spender und vier Gewebeproben weiblicher Spender eine zu geringe Stichprobe umfasste.

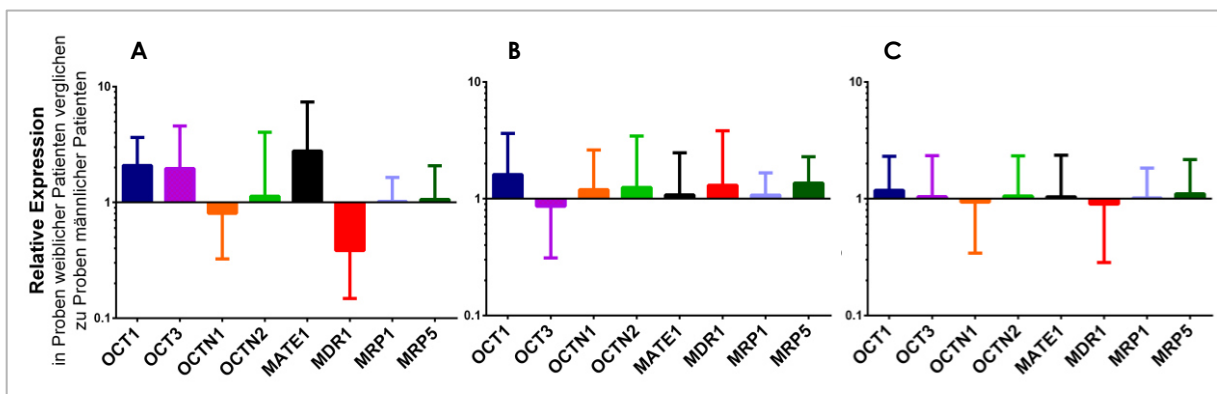


Abbildung B.19: Relative Expression der untersuchten Transporter-Gene OCT1 (dunkelblau), OCT3 (lila), OCTN1 (orange), OCTN2 (hellgrün), MATE1 (schwarz), MDR1 (rot), MRP1 (hellblau) und MRP5 (dunkelgrün) in Gewebeproben weiblicher Patienten verglichen zu Gewebeproben männlicher Patienten bei **A**: Patienten < 50 Jahre (weiblich: n = 4, männlich: n = 4), **B**: Patienten 50 – 60 Jahre (weiblich: n = 11, männlich: n = 11), **C**: Patienten > 60 Jahre (weiblich: n = 12, männlich: n = 37). Keine signifikanten Unterschiede (Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test,  $p > 0,05$ ).

### 3.4.4 Altersspezifische Unterschiede in der Genexpression von Arzneistofftransportern

Um der Frage nach altersspezifischen Unterschieden in der Genexpression der untersuchten Arzneistofftransporter nachzugehen, wurden die Expressionen in den Lungengewebsproben der drei unterschiedlichen Altersklassen gegeneinander verglichen, wobei

der Vergleich jeweils mit allen Proben sowie nur mit Proben von weiblichen Spendern und nur mit Proben männlicher Spender durchgeführt wurde.

Nach Gegenüberstellung der Transporter-Expression in Gewebeproben von Spendern jünger als 50 Jahre mit derjenigen in Proben aus der Altersgruppe der 50 - 60-Jährigen konnte eine tendenzielle, aber nicht signifikante (Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test,  $p > 0,05$ ) Überexpression aller Transporter in der Gruppe der unter 50-Jährigen festgestellt werden (Abbildung B.20 A). Bei differenzierter Betrachtung von Gewebeproben männlicher und weiblicher Spendern in diesen Altersgruppen konnte eine gegenläufige Beobachtung gemacht werden: In Frauen waren die Transporter OCT1, OCT3 und MATE1 tendenziell in der jüngeren Gruppe höher exprimiert, MDR1 tendenziell niedriger exprimiert (Abbildung B.20 B). Dagegen waren in Männern OCT3 und MATE1 in der jüngeren Gruppe tendenziell weniger, OCTN1 und MRP5 tendenziell stärker exprimiert (Abbildung B.20 C). MDR1 war in Männern sogar signifikant ( $p = 0,019$ , Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test) höher exprimiert (252,8 %, SEM 85,7 - 532,1 %) in der Altersgruppe der unter 50-Jährigen im Vergleich zur Gruppe der 50 - 60-Jährigen. Wie bereits unter 3.4.3 festgestellt, ließen sich auch bei dieser Betrachtung in der Gruppe der jüngeren Patienten unterschiedliche Expressionen der Transporter in Männer und Frauen feststellen.

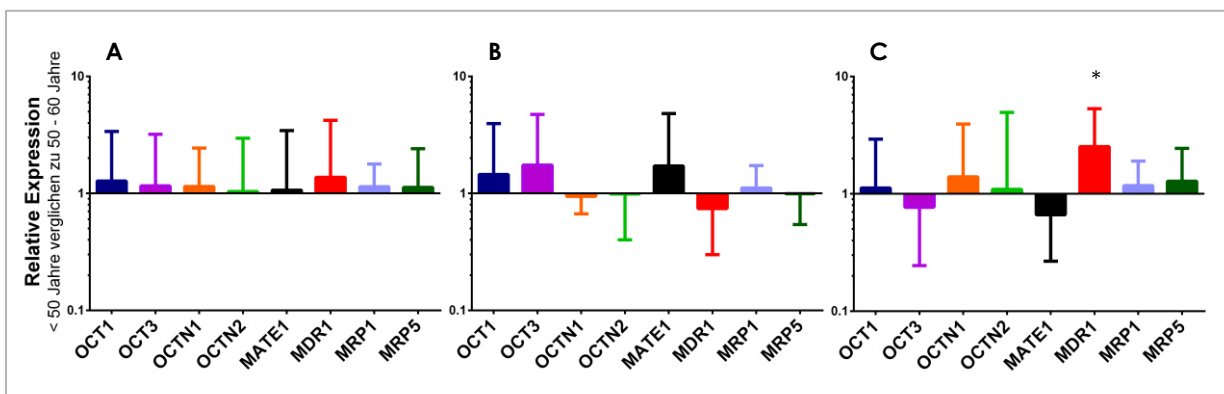


Abbildung B.20: Relative Expression der untersuchten Transporter-Gene OCT1 (dunkelblau), OCT3 (lila), OCTN1 (orange), OCTN2 (hellgrün), MATE1 (schwarz), MDR1 (rot), MRP1 (hellblau) und MRP5 (dunkelgrün) in Gewebeproben von Patienten < 50 Jahren verglichen zu Patienten von 50 - 60 Jahren bei **A**: allen Patienten ( $n = 8$  vs.  $n = 22$ ), **B**: weiblichen Patienten ( $n = 4$  vs.  $n = 11$ ), **C**: männlichen Patienten ( $n = 4$  vs.  $n = 11$ ). \* Signifikante Überexpression von MDR1 bei Männern < 50 Jahre verglichen mit Männern von 50 - 60 Jahren. (Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test,  $p < 0,05$ ).

Der Vergleich aller Gewebeproben in der Altersklasse von unter 50-Jährigen gegen die Altersklasse von über 60-Jährigen ließ nur eine geringe, nicht signifikante (Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test,  $p > 0,05$ ) Überexpression von OCT3 und MDR1 erkennen

(Abbildung B.21 A). Auch hier zeigte eine getrennte Betrachtung der Gewebeprobe männlicher und weiblicher Patienten deutlichere, aber nicht signifikante Unterschiede. Wiederum waren in Frauen die Transporter OCT1, OCT3 und MATE1 in der jüngeren Gruppe höher, MDR1 tendenziell niedriger exprimiert (Abbildung B.21 B). Nach Überprüfung der Gewebeprobe von Männern konnte man dagegen eine deutliche Überexpression von MDR1 und eine geringere Expression von OCT1 und MATE1 in der jüngeren Patientengruppe feststellen (Abbildung B.21 C).

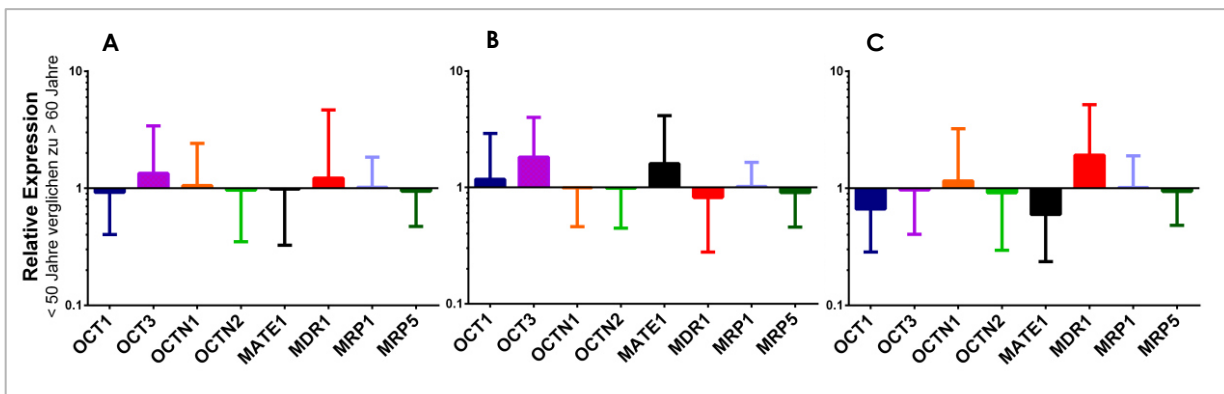


Abbildung B.21: Relative Expression der untersuchten Transporter-Gene OCT1 (dunkelblau), OCT3 (lila), OCTN1 (orange), OCTN2 (hellgrün), MATE1 (schwarz), MDR1 (rot), MRP1 (hellblau) und MRP5 (dunkelgrün) in Gewebeprobe von Patienten < 50 Jahren verglichen zu Patienten > 60 Jahren bei **A**: allen Patienten ( $n = 8$  vs.  $n = 49$ ), **B**: weiblichen Patienten ( $n = 4$  vs.  $n = 12$ ), **C**: männlichen Patienten ( $n = 4$  vs.  $n = 37$ ). Keine signifikanten Unterschiede (Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test,  $p > 0,05$ ).

Die Gruppe der 50 - 60-Jährigen zeigte unter Betrachtung aller Proben eine tendenziell geringere Expression nahezu aller untersuchten Transporter verglichen zur Gruppe der über 60-Jährigen (Abbildung B.22 A). Die gleiche, sogar stärker ausgeprägte Tendenz zeigte der Vergleich der Gewebeprobe von männlichen Patienten in diesen beiden Altersgruppen (Abbildung B.22 C), wohingegen die Gewebeprobe weiblicher Patienten nahezu keine Unterschiede aufwies (Abbildung B.22 B). Des Weiteren war OCT1 in der jüngeren Gruppe jeweils weniger exprimiert als in der Gruppe der über 60-Jährigen. Sowohl bei Betrachtung aller Gewebeprobe (72,2 %, SEM 31,9 - 121,2 %,  $p = 0,026$ ) als auch bei Betrachtung der Gewebeprobe männlicher Spender (59,2 %, SEM 31,7 - 166,7 %,  $p = 0,004$ ) war der Unterschied in der OCT1-Expression statistisch signifikant (Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test,  $p > 0,05$ ), nicht jedoch bei Proben weiblicher Patienten.

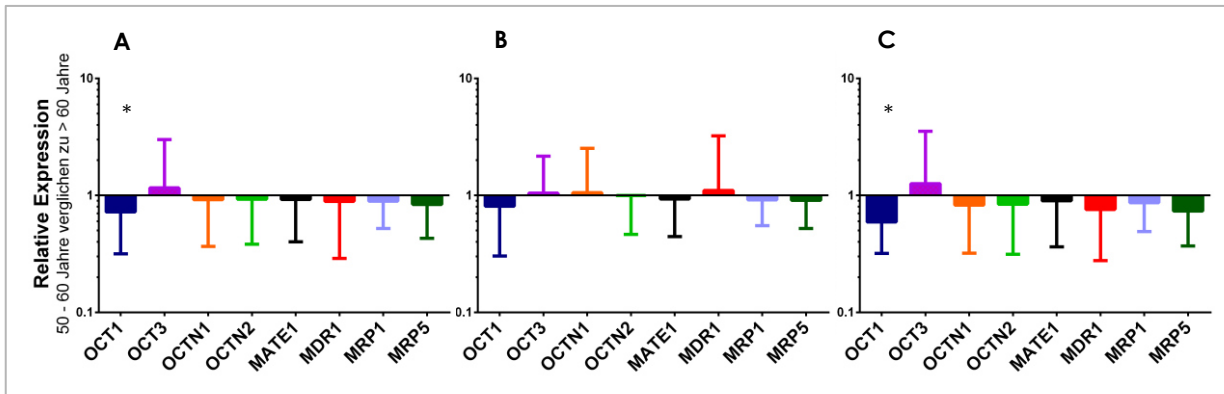


Abbildung B.22: Relative Expression der untersuchten Transporter-Gene OCT1 (dunkelblau), OCT3 (lila), OCTN1 (orange), OCTN2 (hellgrün), MATE1 (schwarz), MDR1 (rot), MRP1 (hellblau) und MRP5 (dunkelgrün) in Gewebeproben von Patienten von 50 - 60 Jahren verglichen zu Patienten > 60 Jahren bei **A**: allen Patienten ( $n = 22$  vs.  $n = 49$ ), **B**: weiblichen Patienten ( $n = 11$  vs.  $n = 12$ ), **C**: männlichen Patienten ( $n = 11$  vs.  $n = 37$ ). \* Signifikante Unterexpression von OCT1 sowohl bei allen Patienten als auch bei Männern von 50 – 60 Jahren verglichen zu Patienten > 60 Jahren (Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test,  $p < 0,05$ ).

### 3.4.5 Korrelation der individuellen Transporter-Expressionen

Um zu überprüfen, inwiefern die individuellen Transporter-Expressionen der Gewebeproben miteinander korrelieren, wurden die Einzelwerte aus 79 Proben einer Pearson-Korrelationsanalyse unterzogen. Diese Einzelwerte repräsentierten dabei für jeden untersuchten Transporter die x-fache Abweichung vom Mittelwert aller Gewebeproben, normalisiert auf das jeweilige geometrische Mittel der drei Referenz-Gene (siehe *Experimenteller Teil* 5.6.3). Die deutlichste Korrelation untereinander zeigten dabei MRP1 und OCTN2 (siehe Abbildung B.23 A) mit einem Korrelationskoeffizienten  $r$  von 0,689 (zweiseitiger Student-t-Test,  $p < 0,05$ ). Auch die Korrelationen von OCTN1 und OCTN2 (siehe Abbildung B.23 B), MRP5 und OCTN2 (siehe Abbildung B.23 C), MRP1 und MATE1 (siehe Abbildung B.23 D) und MRP1 und MDR1 (siehe Abbildung B.23 E) wiesen jeweils einen Korrelationskoeffizienten  $r > 0,5$  auf und waren statistisch signifikant (zweiseitiger Student-t-Test,  $p < 0,05$ ).

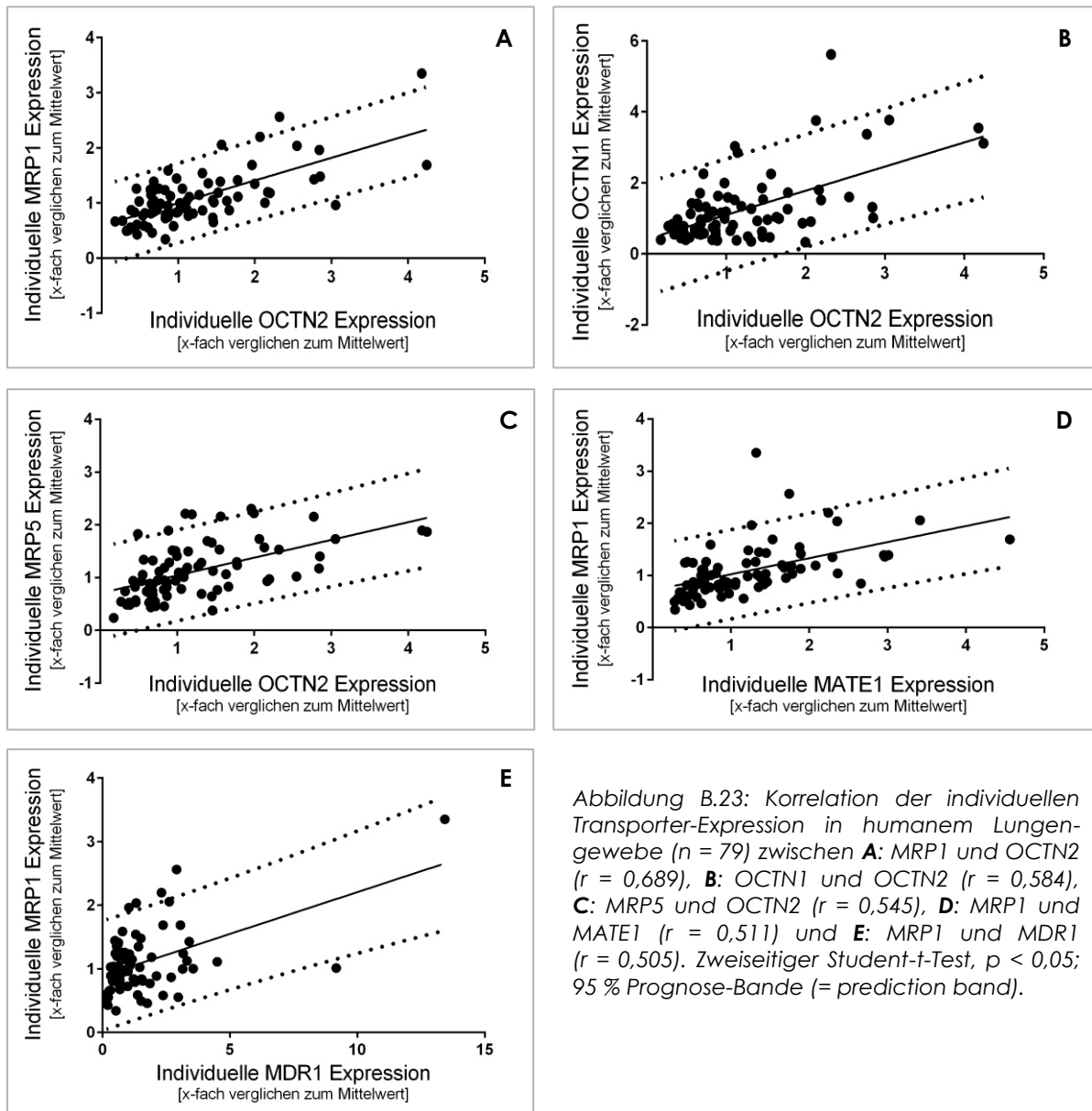


Abbildung B.23: Korrelation der individuellen Transporter-Expression in humanem Lungengewebe ( $n = 79$ ) zwischen **A**: MRP1 und OCTN2 ( $r = 0,689$ ), **B**: OCTN1 und OCTN2 ( $r = 0,584$ ), **C**: MRP5 und OCTN2 ( $r = 0,545$ ), **D**: MRP1 und MATE1 ( $r = 0,511$ ) und **E**: MRP1 und MDR1 ( $r = 0,505$ ). Zweiseitiger Student- $t$ -Test,  $p < 0,05$ ; 95 % Prognose-Bande (= prediction band).

### 3.4.6 Individuelle Genexpression von Arzneistofftransportern in Relation zur Pharmakokinetik am LPM

Um eine Korrelation der beobachteten Pharmakokinetik von Ipratropiumbromid (IB) am LPM (siehe 1.5) mit der jeweiligen individuellen Genexpression von Arzneistofftransportern in den entsprechenden Lungengeweben zu untersuchen, wurde eine Pearson-Korrelationsanalyse der detektierten  $AUC_{0-60 \text{ min}}$  und der ermittelten Einzelwerten der Transporter-Expressionen durchgeführt. Da während der LPM-Experimente 1 - 3 eine höhere IB-Dosis verabreicht wurde, konnten diese Experimente allerdings nicht in die Analyse miteinfließen, sodass nur Daten aus neun Perfusionen zur Verfügung standen. Die Einzelwerte der Transporter-Expression repräsentierten dabei wiederum die x-fache Abweichung vom Mittelwert aller 79 Gewebeprobe, normalisiert auf das jeweilige geometrische Mittel der

drei Referenz-Gene (siehe *Experimenteller Teil* 5.6.3). Es konnte eine statistisch signifikante negative Korrelation der  $AUC_{0-60 \text{ min}}$  mit der individuellen Expression von MRP 5 in den entsprechenden Gewebeproben festgestellt werden (siehe Abbildung B.24 A), der Korrelationskoeffizient  $r$  betrug dabei  $-0,699$  (zweiseitiger Student-t-Test,  $p = 0,036$ ). Eine weitere tendenzielle, jedoch nicht signifikante negative Korrelation ließ sich zwischen der  $AUC_{0-60 \text{ min}}$  und der individuellen Expression von OCTN2 erkennen (siehe Abbildung B.24 B), der Korrelationskoeffizient  $r$  betrug hier  $-0,617$  ( $p = 0,077$ ).

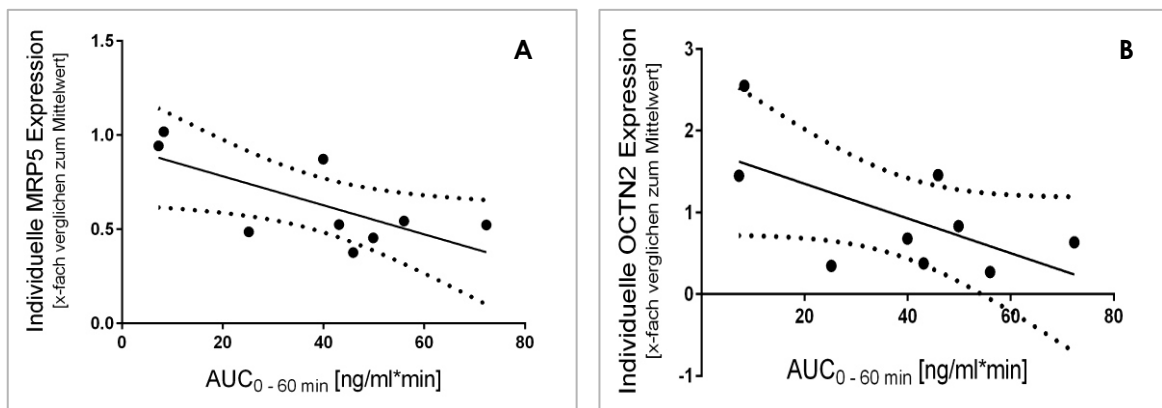


Abbildung B.24: Korrelation der  $AUC_{0-60 \text{ min}}$  von Ipratropiumbromid (IB) mit der individuellen Transporter-Expression im jeweiligen humanen Lungengewebe. **A:** MRP5 ( $r = -0,699$ ,  $p = 0,036$ ), **B:** OCTN2 ( $r = -0,617$ ,  $p = 0,077$ ). Zweiseitiger Student-t-Test; 95 % Konfidenz-Bande (= confidence band);  $n = 9$ .

Unter der Überlegung, Transporter könnten sich durch ihre jeweiligen Mechanismen synergistisch auf die Umverteilung von IB in die Perfusionsflüssigkeit auswirken, wurden auch die Korrelationen der  $AUC_{0-60 \text{ min}}$  mit den Mittelwerten aus verschiedenen Kombinationen der untersuchten Transporter überprüft. Eine signifikante Korrelation (zweiseitiger Student-t-Test,  $p < 0,05$ ) konnte dabei lediglich zwischen der  $AUC_{0-60 \text{ min}}$  und der Kombination von OCTN2 und MRP5 festgestellt werden (Abbildung B.25 A). Wie bereits unter Betrachtung der Korrelationen einzelner Transporter mit der  $AUC_{0-60 \text{ min}}$ , konnte auch hier eine negative Korrelation der Transporter-Expressionen ermittelt werden ( $r = -0,691$ ,  $p = 0,0395$ ). Auch die Kombinationen der Transporter MDR1, MATE1, OCTN1 und OCTN2 zeigte eine negative Korrelation ( $r = -0,605$ ,  $p = 0,0845$ , Abbildung B.25 B), allerdings ohne statistische Signifikanz. Des Weiteren korrelierten auch die Kombination von OCTN1 und OCTN2 ( $r = -0,616$ ,  $p = 0,0772$ , Abbildung B.25 C) sowie die Kombination von OCT1, OCT3, OCTN1 und OCTN2 ( $r = -0,594$ ,  $p = 0,092$ , Abbildung B.25 D) mit der  $AUC_{0-60 \text{ min}}$ .

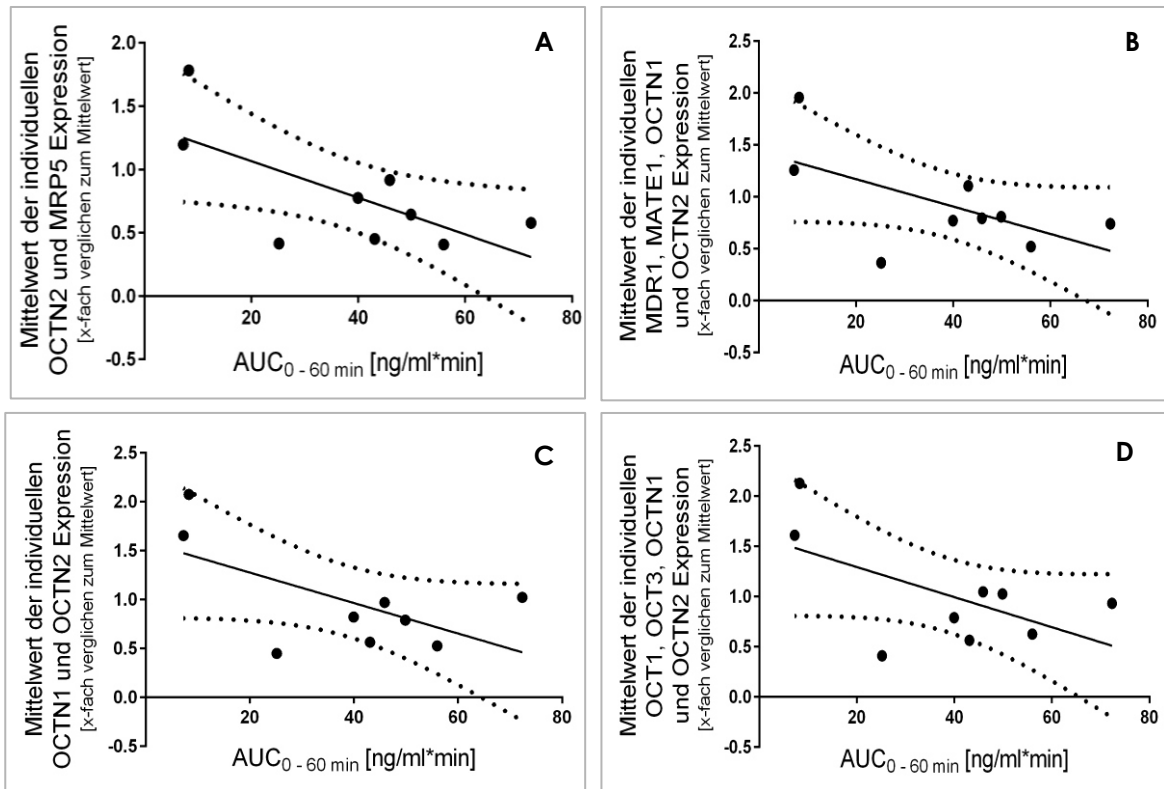


Abbildung B.25: Korrelation der  $AUC_{0-60 \text{ min}}$  von Ipratropiumbromid (IB) mit der Kombinationen der individuellen Transporter-Expression im jeweiligen humanen Lungengewebe. **A:** MRP5 und OCTN2 ( $r = -0,691, p = 0,0395$ ), **B:** MDR1, MATE1, OCTN1 und OCTN2 ( $r = -0,605, p = 0,0845$ ), **C:** OCTN1 und OCTN2 ( $r = -0,616, p = 0,0772$ ), **D:** OCT1, OCT3, OCTN1 und OCTN2 ( $r = -0,5936, p = 0,092$ ). Zweiseitiger Student-t-Test,  $n = 9$ , 95 % Konfidenz-Bande.

### 3.5 Diskussion

In die Auswertung der vorliegenden Untersuchung wurden 79 humane Lungengewebsproben einbezogen, wovon circa ein Drittel von weiblichen Spenderinnen stammte. Sowohl im Thoraxzentrum Bezirk Unterfranken in MÜNnerstadt als auch im Universitätsklinikum Würzburg wurden in etwa doppelt so viele Männer wie Frauen für diese Studie rekrutiert und anschließend entsprechende Proben zur Verfügung gestellt (siehe *Tabellarischer Anhang 5.1*). Damit korreliert der Anteil an Gewebeproben von weiblichen Patientinnen mit aktuellen Daten zu Neuerkrankungen an Lungenkrebs in Deutschland, welche für das Jahr 2012 von 34490 Männer und 18020 Frauen ausgehen [269]. Zu den Einschlusskriterien der vorliegenden Studie zählte die Erkrankung an einem resektablen Bronchialkarzinom (siehe *Experimenteller Teil 5.2*), weshalb die zwischen den Proben und den Erkrankungszahlen konstatierte Korrelation nicht überraschend ist. Das durchschnittliche Alter der männlichen ( $65,1 \pm 11,8$  Jahre) und weiblichen Spender ( $61,9 \pm 12,5$  Jahre) bei Operation und Probenentnahme ließ erkennen, dass die für diese Studie rekrutierten Frauen tenden-

ziell jünger waren als die teilnehmenden Männer. Auch das mittlere Erkrankungsalter an Lungenkrebs in Deutschland im Jahr 2012 wies für Frauen ein geringeres Alter bei Diagnose auf als für Männer [269]. Allerdings lag das Alter der Studienteilnehmer im Mittel unter dem durchschnittlichen Erkrankungsalter, welches für Männer 70 Jahre und für Frauen 69 Jahre betrug [269]. Diese Abweichung könnte darauf beruhen, dass eine eingeschränkte Lungenfunktion oder starke Komorbidität des Patienten gegen eine operative Teilresektion des Lungengewebes, wie sie an Teilnehmern der Studie durchgeführt wurde, als therapeutische Maßnahme sprechen kann [250]. Da ältere Patienten (> 70 Jahre) generell eher zu diesem Patientenkreis zählen und sich die perioperative Morbidität mit zunehmendem Alter erhöht [250], wurden eventuell tendenziell mehr jüngere als ältere Tumorpatienten operiert.

Während der Rekrutierung von Patienten für die Studie wurden diese nicht nach dem jeweiligen Stadium des Lungenkarzinoms und nach ihren Komorbiditäten unterschieden. Auch der Raucher-Status der Patienten wurde nicht ermittelt. Diese Faktoren könnten eventuell einen Einfluss auf die Genexpression der untersuchten Arzneistofftransporter ausgeübt haben. Berg et al. untersuchten die Genexpression von diversen Transportern und metabolisierenden Enzymen im Lungengewebe von sieben COPD-Patienten, die seit mindestens sechs Monaten mit dem Rauchen aufgehört hatten, und drei gesunden Nichtraucherern [270]. Dabei wurde für keines der 91 untersuchten Gene ein signifikanter Expressionsunterschied zwischen COPD-Patienten und gesunden Probanden detektiert [270]. Auch eine weitere Studie konnte in frisch isolierten Bronchialepithelzellen keinen statistisch signifikanten Unterschied der mRNA-Expression von MDR1 zwischen Rauchern und ehemaligen Rauchern oder Nichtrauchern feststellen [76]. Bei Betrachtung der Transporter-Expression im peripheren Lungengewebe verglichen zu den zentralen Atemwegen zeigte sich dagegen für mehrere Gene eine statistisch signifikant unterschiedliche mRNA Expression [270]. Unter ihnen befanden sich die in der vorliegenden Arbeit ebenfalls analysierten Gene SLC15A2, SLC22A4 und SLC47A1, welche für PEPT2, OCTN1 und respektive MATE1 kodieren [270]. Die Autoren sahen die Begründung für die beobachteten Differenzen in der differentiellen Zellpopulation in den jeweiligen Regionen der humanen Lunge [270]. Indem in der vorliegenden Studie das Gewebe aus dem peripheren, tumorfreien Bereich der humanen Lunge entnommen wurde, sollte die Heterogenität bezüglich Zellpopulation und Transporter-Expression in den Proben gering gehalten werden.

Die Kryokonservierung von Gewebeproben wird im Hinblick auf die Vermeidung von RNA-Degradation und der Ausbeute bei RNA-Extraktion verglichen zu Formalin- und Alkohol-basierenden Fixierungen als Goldstandard angesehen [271]. Dabei birgt die Langzeitlagerung bei -80 °C keinen Nachteil gegenüber der Lagerung in Stickstoff [272]. In einer Untersuchung an Lungentumor-Proben konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass keine Minimierung der RNA-Qualität oder der detektierten Genexpression eintrat, wenn die Pro-



ben über einen zeitlichen Verlauf von 120 Minuten bei Raumtemperatur gelagert wurden [273]. Obwohl es in der vorliegenden Studie nicht möglich war, die Proben direkt nach Entnahme schockzufrieren (siehe *Experimenteller Teil* 2.4.5 und 5.2), kann demzufolge von der Stabilität der RNA und der Proteine während der Lagerung auf Trockeneis und der anschließenden Langzeitlagerung bei -80 °C ausgegangen werden. Die auf eine einheitliche Ausgangsmenge normalisierten Proben erzielten bei der anschließenden RNA-Isolierung hohe Ausbeuten, im Mittel wurden Konzentrationen von  $193 \pm 108$  ng/ $\mu$ l RNA in Wasser bestimmt. Da insbesondere für Untersuchungen an individuellen Gewebeproben keine adäquate Zellzählung möglich ist, wird die Normalisierung auf die gesamte RNA als beste Alternative erachtet [129], was in der vorliegenden Untersuchung durch das Umschreiben einer einheitlichen Menge Gesamt-RNA in cDNA erfolgte (siehe *Experimenteller Teil* 5.4). Die verwendeten Methoden der RNA-Isolierung und cDNA-Synthese wurden bereits unter 2.5 diskutiert. Die Auswertung der RT-qPCR-Daten erfolgte korrigiert auf IRC (inter-run controls) (siehe *Einleitung* 2.3.2 und *Experimenteller Teil* 5.6.2) und auf die Reaktions-effizienz, welche für jedes Gen individuell bestimmt wurde (siehe *Einleitung* 2.3.2 und *Experimenteller Teil* 5.5.5). Besonders für den Vergleich von Proben aus unterschiedlichen Individuen ist eine adäquate Normalisierung auf mehrere Referenz-Gene unerlässlich [129], da die Expression von einzelnen Referenz-Genen erheblich variieren kann (siehe *Einleitung* 2.3.3). Daher fand eine Referenz-Gene-Validierung statt (siehe *Experimenteller Teil* 3.6) und die konstante Expression von 18 S RNA, GAPDH und ACTB wurde in allen Proben mittels BestKeeper® Software verifiziert (siehe *Experimenteller Teil* 5.6.3). Somit wurde die methodische Qualität der relativen Quantifizierung mittels RT-qPCR in der vorliegenden Untersuchung nach international anerkannten Richtlinien [112] sichergestellt.

#### **3.5.1 Genexpressions-Niveaus der untersuchten Transporter im humanen Lungengewebe**

Für die untersuchten Arzneistofftransporter wurden im humanen Lungengewebe unterschiedlich hohe Expressions-Niveaus festgestellt. Prinzipiell ist es nicht möglich, einen direkten Vergleich zwischen den Transporter-Expressionen zu machen, da die ermittelten  $\Delta C_T$ -Werte (siehe *Einleitung* 2.2.1) auf individuellen Reaktionen mit unterschiedlichen Primer/Sonden-Mischungen beruhen. Damit ist keine absolute Aussage bezüglich der x-fachen Expression der Transporter untereinander machbar. Da jedoch aus TaqMan-Sonden, im Gegensatz zur SYBR®-Green-basierten Quantifizierung, pro Verdoppelungs-Reaktion eines DNA-Doppelstranges (Elongation) genau ein Lichtquant freigesetzt wird, ist das detektierte Fluoreszenz-Signal primär vom ursprünglich vorhandenen Ausgangsmaterial abhängig und damit in der Theorie direkt proportional zur Ausgangsmenge an cDNA in der Probe (siehe *Einleitung* 2.2.2). Dieses Prinzip ermöglichte zumindest eine ordinale Einordnung der Transporter-Expressionen. Je kleiner der detektierte  $C_T$ -Wert und

der daraus berechnete  $\Delta C_T$ -Wert (normalisiert auf Referenz-Gene) war, desto höher musste die Ausgangskonzentration der entsprechenden cDNA-Sequenz in der Probe gewesen sein. Allerdings war dieser Vergleich nur möglich, weil für alle Reaktionen dieselbe Schwellenlinie (thresholde line) festgelegt wurde (siehe *Einleitung 2.2* und *Experimenteller Teil 5.6*).

In der Literatur wurden bisher nur wenige, inkonsistente Beobachtungen zur relativen Expression von Arzneistofftransportern im humanen Lungengewebe gemacht. Bleasby et al. untersuchten das mRNA-Expressions-Profil von 50 Arzneistofftransportern in verschiedenen humanen Geweben, darunter in der Lunge, in der fötalen Lunge und in Lungentumorgewebe (siehe Tabelle B.3) [31]. Die jeweilige Intensität der Expression wurde in groben Quartilen, die sich auf Daten von 19000 Genen in 100 Geweben bezogen, ausgedrückt [34]. Im Lungengewebe wurden MDR1 und OCT2 dem 0 – 25 %-Quartil zugeordnet, OCT1 und OCT3 lagen in dem 25 – 50 %-Quartil und OCTN1, OCTN2, MRP1 sowie MRP5 waren in dem Quartil von 50 – 75 % angesiedelt [34]. Diese Werte müssen allerdings unter dem Gesichtspunkt betrachtet werden, dass dabei mit der Expressionsintensität aus einer Vielzahl an Genen in einer Vielzahl an Geweben verglichen wurde. Dementsprechend ist für die relative Expression der Arzneistofftransporter untereinander im Lungengewebe nur eine Tendenz zu entnehmen.

Tabelle B.3: Vergleich der in der vorliegenden Studie ermittelten relativen Arzneistofftransporter-Expressionen im humanen Lungengewebe ( $n = 79$ ) mit Angaben aus der Literatur. Bleasby et al. relativierten die mRNA-Expressionsintensität auf 19000 Gene in 100 Geweben [34]; Sakamoto et al. untersuchten die Protein-Expression in sieben individuellen Gewebeproben [267]; Berg et al. analysierten die mRNA-Expression in Gewebeproben von sieben COPD-Patienten und drei gesunden Probanden [270]. Einteilung in relativ hohe Expression (+++), relativ moderate Expression (++) , relativ geringe Expression (+) und nicht detektierbare Expression (-); (n. a. = nicht analysiert).

<b>Arzneistofftransporter</b>	vorliegende Studie (siehe 3.4.2)	Bleasby et al. [34]	Sakamoto et al. [267]	Berg et al. [270]
<b>OCT1</b>	+	++	- / +	- / +
<b>OCT2</b>	- / +	+	- / +	-
<b>OCT3</b>	+++	++	-	++
<b>OCTN1</b>	++	+++	+++	+ / ++
<b>OCTN2</b>	++	+++	-	+
<b>MATE1</b>	++	n. a.	n. a.	+
<b>MDR1</b>	++	+	+	+
<b>MRP1</b>	++	+++	++	++
<b>MRP5</b>	++	+++	+	+

Sakamoto et al. untersuchten die Protein-Expression diverser Arzneistofftransporter in sieben individuellen humanem Lungengewebsproben (siehe Tabelle B.3) [267]. Dabei wurden für OCTN1 die höchsten Proteinmengen detektiert, gefolgt von MRP1 [267]. MDR1 und MRP5 zeigten im Mittel geringere Protein-Expressionen, wohingegen OCT1 und OCT2 jeweils in drei von sieben Proben nicht detektiert werden konnten [267]. OCT3 und OCTN2 wurden in keiner Probe detektiert, da die Protein-Mengen jeweils unterhalb der Detektionsgrenze lagen [267]. Jedoch muss dabei erwähnt werden, dass für die verschiedenen Transporter unterschiedlich hohe Detektionsgrenzen erreicht wurden, die bis zu einem Faktor zehn variierten [267]. Zudem zeigten die Protein-Mengen starke interindividuelle Schwankungen, für MRP1 wurde beispielsweise ein 18-facher Unterschied zwischen den Spendern festgestellt [267].

Die beste Vergleichbarkeit mit der vorliegenden Untersuchung findet sich in der Studie von Berg et al., welche die mRNA-Expression diverser Arzneistofftransporter in sieben COPD-Patienten und drei gesunden Probanden untersuchte (siehe Tabelle B.3) [270]. Dabei wurde die Expression von OCT3, OCTN1 und MRP1 als moderat eingestuft [270]. OCTN2, MATE1, MDR1 und MRP5 zeigten jeweils eine geringe mRNA-Expression, OCT1 wurde sehr wenig exprimiert und OCT2 war weder im peripheren Lungengewebe noch in den zentralen Atemwegen detektierbar [270]. Hiernach stimmten die relativen Transporter-Expression im Allgemeinen mit den eigenen Ergebnissen überein.

In der vorliegenden Studie zeigte ebenfalls OCT2 das geringste Expressions-Niveau in den untersuchten Lungengewebsproben. Dabei wurden nur 56 Proben in die Auswertung einbezogen, da in 23 Proben keine oder nur eine unzureichende Detektion möglich war (siehe *Experimenteller Teil 5.6*). Eine Untersuchung der Genexpression der organischen Kationentransporter in humanen Tracheen und Bronchien an vier Spendern zeigt ebenfalls eine kaum detektierbare mRNA-Expression von OCT2 [85]. Überdies korrelieren diese Beobachtungen aus humanem Lungengewebe mit Erkenntnissen aus Bronchial- und Alveolar-Zellkulturmodellen. In den Zelllinien Calu-3, 16HBE14o-, hBEpC, BEAS-2B, A549 und NCI-H441 konnte OCT2 auf mRNA-Ebene nicht detektiert werden [22, 232, 274]. Auch in der vorliegenden Untersuchung wurde in Calu-3-Zellen für OCT2 kein ausreichendes Signal zur Vermessung mittels RT-qPCR erreicht (siehe *Experimenteller Teil 3.4*). Des Weiteren wurde bei der Betrachtung der relativen Transporter-Expression für OCT3 das höchste Expressions-Niveau festgestellt. Berg et al. klassierten OCT3 ebenfalls zu den am höchsten exprimierten SLC-Transportern im humanen Lungengewebe [270]. Auch in den Zelllinien Calu-3, 16HBE14o- und A549 konnten für OCT3, verglichen zu anderen organischen Kationentransportern, hohe mRNA- und Protein-Expressionen gezeigt werden [22, 87]. Die in der vorliegenden Studie detektierten Expressions-Niveaus der Arzneistofftransporter gehen damit sehr gut mit bisherigen Untersuchungen an Zelllinien und humanem Lungengewebe konform. Im Gegensatz zu anderen organischen Kationentransportern wird OCT3 auch in

den glatten Muskelzellen der Atemwege und in bronchialen Blutgefäßen exprimiert [86]. Da die analysierten Gewebeproben aufgrund ihrer Entnahme-Methode nicht ausschließlich Epithelzellen, sondern möglicherweise auch Blutgefäße und Muskelgewebe beinhalten, könnte dies ein Grund für die festgestellte hohe Genexpression im Lungengewebe sein. Schließlich ist festzuhalten, dass in der vorliegenden Untersuchung erstmals die mRNA-Expression von Arzneistofftransportern im humanen Lungengewebe anhand einer großen Anzahl an Gewebeproben nachgewiesen und analysiert wurde und somit eine verlässliche Aussage zu deren relativem Expressions-Niveau getroffen werden konnte.

### **3.5.2 Geschlechts- und altersspezifische Unterschiede in der Genexpression der untersuchten Arzneistofftransporter**

Trotz der hohen Anzahl an untersuchten Lungengewebsproben konnten zwischen den Geschlechtern keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Genexpression von Arzneistofftransportern festgestellt werden. Lediglich bei differenzierter Betrachtung der Transporter-Expression in Proben von Patienten, welche bei Operation jünger als 50 Jahre alt waren, wurden Variationen beobachtet: MDR1 schien tendenziell im Lungengewebe männlicher Patienten höher exprimiert zu werden, wohingegen OCT1, OCT3 und MATE1 im Lungengewebe weiblicher Patienten stärker exprimiert wurden (siehe Abbildung B.19 A). Aufgrund der geringen Stichprobenzahl in dieser Altersgruppe konnte allerdings keine statistische Signifikanz der Unterschiede nachgewiesen werden. Möglicherweise sind die tendenziellen Expressions-Unterschiede zwischen Männern und Frauen in der Patientengruppe der unter 50-Jährigen durch den Hormonstatus dieser Patienten bedingt. Prämenopausale Frauen weisen höhere Estradiol-Plasmaspiegel auf als Frauen nach der Menopause (siehe 2.1.1) und differieren damit hinsichtlich der Hormonspiegel klarer von gleichaltrigen Männern. Da die Genexpression von Transportern möglicherweise durch den hormonellen Einfluss reguliert wird (siehe 2.2), könnten stark unterschiedliche Hormonspiegel in Unterschieden der Transporter-Expression resultieren.

Generell liegen nur wenige Studien zur unterschiedlichen Expression von Arzneistofftransporter in Männer und Frauen vor [275]. Für MDR1 wurde in der Leber eine höhere mRNA-Expression in Männern verglichen zu Frauen festgestellt [257], was gut mit der in der vorliegenden Untersuchung ermittelten höheren MDR1-Genexpression in Lungengewebe von männlichen Spendern korreliert. Allerdings wurde auf Protein-Ebene keine erhöhte hepatische MDR1-Genexpression in Männern oder Frauen detektiert [276]. Die Untersuchung von Lungengewebe aus drei männlichen und vier weiblichen Spendern zeigte für beinahe alle detektierten Arzneistofftransporter, darunter MDR1, MRP5, OCT1 und OCTN1 eine tendenziell höhere Protein-Expression in Frauen, lediglich MRP1 war in Männern höher exprimiert [267]. Diese Tendenz konnte in der vorliegenden Studie nicht beobachtet werden.

Die Studienlage zur geschlechtsspezifischen Transporter-Expression in Tieren ist ergiebiger, allerdings können Erkenntnisse bezüglich molekularer Transportmechanismen nicht ohne weiteres auf andere Spezies übertragen werden [197, 277].

Joseph et al. analysierten die Genexpression diverser Transporter in 95 humanen Nierengewebsproben, wobei sie weder statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Geschlechtern noch zwischen Patienten, jünger als 50 Jahren und respektive 50 Jahren und älter, ermitteln konnten [278]. Dahingegen offenbarte eine Subgruppen-Analyse signifikant höhere Expressionen einiger Transporter, darunter OCT2, in Frauen unter 50 Jahren verglichen zu Frauen ab 50 Jahren [278]. Auch zwischen Frauen unter 50 Jahren und Männern unter 50 Jahren wurden signifikante Expressions-Unterschiede entdeckt [278]. Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass nicht alleinig Geschlecht oder Alter für eine veränderte Genexpression von Arzneistofftransportern verantwortlich sind, sondern mehrere Faktoren zusammenwirken. In der vorliegenden Untersuchung wurden ebenfalls differenzierte Betrachtungen hinsichtlich Alter und Geschlecht durchgeführt, um den genaueren Einfluss dieser Komponenten zu untersuchen. Kritisch könnte dabei die Gruppierung der Patienten in Altersgruppen zu sehen sein, da Patientinnen anhand ihres Alters als prä- oder postmenopausal eingestuft wurden. Es wird davon ausgegangen, dass die Menopause bei Frauen zwischen 45 und 55 Jahren, im Mittel mit 51 Jahren, eintritt [248, 279]. Eine neuere Kohortenstudie beobachtet allerdings in Europa eine Verschiebung des Eintritts der Menopause ins höhere Alter (im Mittel mit 54 Jahren) [280]. Aufgrund dieser Angaben wurde in der vorliegenden Arbeit die Altersgrenze, zur Einordnung der Patientinnen in die Gruppe der prämenopausalen Frauen, bei 50 Jahren gesetzt und Frauen ab 60 Jahren wurden als postmenopausal eingestuft. Da im Alter zwischen 50 und 60 Jahren keine klare Aussage hinsichtlich der Menopause erfolgen konnte, wurden diese Patientinnen in eine weitere Altersklasse gruppiert. Genauere Angaben zum Eintritt der Menopause wären wünschenswert gewesen und hätten eventuell bei Rekrutierung der Patientinnen erfragt werden können. Obgleich Männer keiner drastischen Hormonspiegel-Änderung ausgesetzt sind, erfolgte die Einteilung der männlichen Patienten in Altersgruppen analog zu den weiblichen Patientinnen.

Die Analyse der altersspezifischen Unterschiede in der Genexpression der Arzneistofftransporter im humanen Lungengewebe zeigte nur wenige statistisch signifikante Einzelergebnisse (siehe 3.4.4). Die MDR1-Expression im Lungengewebe war in Männern unter 50 Jahren statistisch signifikant höher verglichen mit Männern von 50 – 60 Jahren (siehe Abbildung B.20 C). Auch der Vergleich von Männern unter 50 Jahren mit Männern älter als 60 Jahren zeigte eine höhere, wenn auch nicht statistisch signifikante MDR1-Expression in der jüngeren Patientengruppe (siehe Abbildung B.21 C). Dieser Unterschied war allerdings zwischen 50 – 60-jährigen männlichen Patienten und über 60-Jährigen nicht mehr zu beobachten. Eine Untersuchung, welche Differenzen in der Transporter-Expression zwischen Kindern und

Erwachsenen nachging, stellte eine reduzierte hepatischen Expression von MDR1 in Kleinkindern fest [281]. Möglicherweise könnten geringere Testosteron-Spiegel im frühen Kindesalter sowie im hohen Alter zu einer reduzierten MDR1-Expression führen, was auch ein Erklärungsansatz für die in der vorliegenden Untersuchung detektierten Unterschiede sein könnte. Ferner war OCT1 in der Altersgruppe der 50 – 60-Jährigen verglichen mit Patienten über 60 Jahren sowohl in allen Patienten als auch nur in Männern statistisch signifikant geringer exprimiert. Diese geringere OCT1-Expression in jüngeren Patienten und respektive jüngeren Männern konnte tendenziell auch bei Vergleich der Altersgruppen der unter 50-Jährigen mit den über 60-Jährigen erkannt werden, jedoch nicht bei Vergleich der unter 50-Jährigen mit 50 – 60-Jährigen.

Die klinische Relevanz der gefundenen Unterschiede ist mit Vorsicht zu bewerten, da die Differenzen in der Transporter-Expression allesamt weniger als zweifach variierten. Es wurden bereits zahlreiche potentielle molekulare und physiologische Faktoren für geschlechtsspezifische Unterschiede der Pharmakokinetik von Arzneistoffen identifiziert, von welchen nur einige tatsächlich in einer deutlich veränderten Pharmakokinetik in Frauen resultieren [252]. Zusätzlich muss erwähnt werden, dass eine Vielzahl von geschlechtsspezifischen Unterschieden in der Pharmakokinetik zu klinisch nicht relevanten pharmakodynamischen Unterschieden führen [252, 282]. Der Effekt von interindividuellen Variationen beispielsweise durch Polymorphismen der metabolisierenden Enzyme wird als wichtiger eingeordnet, was eine Erklärung dafür sein kann, dass es bis dato kaum Therapieregime mit angepasster Dosierung für Frauen gibt [252]. Vor allem hinsichtlich der klinischen Einnahmepraxis sollte der Effekt von pharmakokinetischen Unterschieden somit nicht überschätzt werden [252].

### 3.5.3 Korrelierende Genexpression von Arzneistofftransportern

Der Transportprozess über zelluläre Barrieren, hier Bronchialepithelzellen, kann als vektorieller Transport angesehen werden [18], da die an der apikalen Membran angesiedelten Uptake-Transporter und basolaterale Efflux-Transporter (siehe Abbildung A.8) gegebenenfalls zusammenwirken. So zum Beispiel interagieren organische Kationentransporter, welche die Aufnahme organischer Kationen in Zellen vermitteln, und Efflux-Transporter wie MDR1 oder MATE1 [18]. In der Placenta von Ratten zeigten der Uptake-Transporter OCT3 und der Efflux-Transporter MATE1 eine aufeinander abgestimmte Transport-Aktivität [283, 284]. In doppelt stabil transfizierten Zellen konnte ein funktionelles Zusammenspiel der OCT1/OCT2-vermittelten Aufnahme und des MATE1-bedingten Efflux von organischen Kationen beobachtet werden [285]. In wieweit die Expression oder Aktivität von Uptake- und Efflux-Transportern im humanen Lungengewebe voneinander abhängt wurde, nach unserem Wissensstand, bisher nicht untersucht. In der vorliegenden Untersuchung wurden die individuellen Expressionen der acht untersuchten Transporter aus 79 Gewebeproben

hinsichtlich ihrer korrelierenden Expression untereinander überprüft, indem die jeweiligen x-fache Abweichungen vom Mittelwert aus allen Proben einer Korrelationsanalyse unterzogen wurden (siehe 3.4.5). Diese auf den Mittelwert relativierte Auswertung war notwendig, da über die gewählte Methodik der RT-qPCR keine absolute Quantifizierung der Transporter-Expression erfolgen konnte, sondern nur relative Aussagen getroffen werden konnten. Die detektierten signifikanten Korrelationen der mRNA-Expression zwischen OCTN2 und MRP1 sowie zwischen OCTN2 und MRP5 (siehe 3.4.5) decken sich mit dem vermuteten Zusammenspiel von Uptake- und Efflux-Transportern auf apikaler und respektive basolateralen Seite von Bronchialepithelzellen. Interessanterweise wurde aber auch eine statistisch signifikant korrelierende Expression zwischen OCTN1 und OCTN2, zwischen MRP1 und MATE1 sowie zwischen MRP1 und MDR1 festgestellt, obwohl sich diese Transporter in ihrer funktionellen Rolle und Substratspezifität ähneln (siehe *Einleitung* 1.3 und 1.4). Aufgrund des teilweise überlappenden Substratspektrums könnte die Identifizierung von funktionell zusammengehörigen Transportern durchaus wichtig sein um pharmakokinetische Varianten zu erkennen [275].

Nur wenige Studien adressierten bislang einen direkten Zusammenhang zwischen pharmakokinetischen Parametern und der Genexpression von Arzneistofftransportern. Landowski et al. konnten eine Korrelation der Expressionsintensität unterschiedlicher Transporter, darunter MDR1, MRP1 und MRP5, in duodenalem Biopsie-Gewebe mit der AUC der Virustatika Valaciclovir und Aciclovir nach oraler Einnahme beobachten und vermuteten eine Beteiligung dieser Transporter am Efflux der beiden Substanzen [286]. Joy et al. untersuchten das Expressionsverhalten von metabolisierenden Enzymen und Transportern in Leukozyten und konnten dabei zwischen der MRP2-Genexpression und der Clearance des Zytostatikums Cyclophosphamid eine negative Korrelation feststellen [287]. Daraus wurde für Patienten eine modulierte Exposition mit pharmakologisch aktiven Substanzen durch veränderte Transporter-Expressionen gemutmaßt [287]. Mit dem ex vivo Modell der humanen perfundierten Lunge (siehe *Experimenteller Teil* 2.3) war die einzigartige Möglichkeit gegeben, pharmakokinetische Parameter inhalativ verabreichter Arzneistoffe zu ermitteln und die Lungengewebsproben anschließend auf individuelle molekularbiologische Eigenschaften zu untersuchen. Erstmals wurde in dieser Studie der Zusammenhang zwischen der individuellen Genexpression von Arzneistofftransportern im Lungengewebe und der individuellen Pharmakokinetik von Wirkstoffen nach pulmonaler Applikation erforscht. Dazu wurden die am humanen Lungen-Perfusions-Modell (LPM) detektierten  $AUC_{0-60 \text{ min}}$ -Werte von Ipratropiumbromid in Korrelation mit der Transporter-Expression in den jeweiligen Lungengewebsproben betrachtet. Die dabei ermittelte, statistisch signifikante Korrelation zwischen der MRP5-Expression und der  $AUC_{0-60 \text{ min}}$  könnte eine Beteiligung von MRP5 am Transport von Ipratropiumbromid (IB) bedeuten. Bislang wurde nicht untersucht, ob IB zu den Substraten von MRP5 zählt. Zu diesen gehören allerdings hauptsächlich organischen Anionen, sowie Nukleotid- und Purin-Analoga (siehe

*Einleitung* 1.3.3), sodass Ipratropium als dauerhaft positiv geladenes Molekül nicht augenscheinlich zu den MRP5-Substraten zählt. Da die konstatierte Wechselbeziehung negativer Art war, wäre die daraus resultierende Folgerung, dass durch eine höhere MRP5-Expression weniger IB in den Perfusionspuffer umverteilt wurde. MRP5 agiert als Efflux-Transporter, wodurch im Umkehrschluss eine Lokalisation des Transporters auf der apikalen Seite von Bronchialepithelzellen geschlussfolgert werden müsste. Dieser Erklärungsansatz scheint möglich, da die Lokalisation von MRP5 in Epithelzellen der humanen Lunge bisher nicht eindeutig geklärt ist (siehe *Einleitung* 1.5). Auch die mRNA-Expression von OCTN2 wies eine deutliche, aber nicht statistisch signifikante, negative Korrelation mit der  $AUC_{0-60 \text{ min}}$  nach IB-Applikation auf. Somit kann auch hier abgeleitet werden, dass bei höherer OCTN2-Genexpression weniger IB in den Perfusionspuffer umverteilt wurde. Da OCTN2 als bidirektionaler Transporter auf der apikalen Seite von Bronchialepithelzellen identifiziert wurde (siehe *Einleitung* 1.5), könnte gefolgert werden, dass OCTN2 den Efflux von IB aus Bronchialepithelzellen vermittelt. IB wurde bereits als Substrat von OCTN2 bestimmt, wobei jedoch von einer zellulären Aufnahme des Anticholinergikums durch OCTN2 ausgegangen wurde [95]. Damit erscheinen die in dieser Untersuchung ermittelten Wechselbeziehungen zwischen der Pharmakokinetik von IB und der OCTN2-Expression in Lungengewebsproben im Widerspruch zu bisherigen Erkenntnissen zu stehen.

Wie bereits erwähnt, ist ein funktioneller Synergismus mehrerer Transporter und ein daraus resultierender pharmakokinetischer Zusammenhang durchaus wahrscheinlich, weswegen auch unterschiedliche Kombinationen von Transportern auf eine korrelierende Genexpression mit der IB-Pharmakokinetik getestet wurden. Dies erfolgte, indem der Mittelwert aus den jeweiligen Expressionsunterschieden gebildet wurde und mit der  $AUC_{0-60 \text{ min}}$  auf eine lineare Korrelation überprüft wurde. Diese simplifizierte Prüfung einer synergistischen Aktivität setzte allerdings voraus, dass die untersuchten Transporter jeweils im gleichen Ausmaß an dem Transport von IB beteiligt waren. Die ungleich hohen Expressions-Niveaus der Transporter im Lungengewebe machten diese Annahme allerdings disputabel, sodass nur vorsichtige Rückschlüsse aus diesen Ergebnissen gezogen werden können. Wie schon bei Betrachtung der einzelnen Transporter, zeigte auch die Kombination von OCTN2 und MRP5 eine signifikante Korrelation der mRNA-Expression mit der  $AUC_{0-60 \text{ min}}$  von IB, was die Beteiligung dieser beiden Transporter am IB-Transport bekräftigte.

Resümierend wurde in der vorliegenden Studie erstmalig die Genexpression wichtiger Arzneistofftransporter im humanen Lungengewebe auf breiter Basis untersucht. Die Analyse von 79 Lungengewebsproben ergab dabei, dass OCT3 unter den untersuchten Transportern das höchste mRNA-Expressions-Niveau zeigte. OCT2 wurde in den individuellen Lungengewebsproben nur in geringem Ausmaß gefunden, in manchen Proben



konnte OCT2 auf mRNA-Ebene nicht detektiert werden. Aufgrund der hohen Expression, ist eine maßgebliche Beteiligung von OCT3 an Transportvorgängen von Xenobiotika im Lungengewebe wahrscheinlich. Ferner wurden trotz der großen Anzahl an untersuchten Gewebeprobe keine statistisch signifikanten geschlechtsspezifischen Unterschiede der Transporter-Expression gefunden. Lediglich in der Patientengruppe der unter 50-Jährigen wurden tendenzielle Unterschiede zwischen den Geschlechtern festgestellt. Auch die Auswertung hinsichtlich altersspezifischer Unterschiede ergab nur wenige statistisch signifikante Einzelergebnisse. MDR1 war in Männern unter 50 Jahren höher exprimiert als in Männern von 50 – 60 Jahren. In der Altersgruppe der über 60-Jährigen war OCT1 sowohl in allen Patienten als auch nur in Männern höher exprimiert verglichen mit Patienten von 50 - 60 Jahren. Die Analyse der direkten Wechselbeziehungen zwischen pharmakokinetischen Parametern, gewonnen am humanen Lungen-Perfusions-Modell, und individuellen Genexpressions-Profilen von Arzneistofftransportern im humanen Lungengewebe war in dieser Form neu. Interessanterweise konnte eine statistisch signifikante negative Korrelation zwischen der mRNA-Expression von MRP5 und der  $AUC_{0-60 \text{ min}}$  von Ipratropiumbromid gezeigt werden. Unter der Annahme synergistisch agierender Transporter wurde auch für die Kombination von OCTN2 und MRP5 eine signifikante Korrelation zur  $AUC_{0-60 \text{ min}}$  von Ipratropiumbromid ermittelt, was den Rückschluss erlauben könnte, dass vorrangig MRP5 und OCTN2 an den Umverteilungsprozessen von Ipratropiumbromid beteiligt sind. Um diese Vermutung zu verifizieren bedarf es jedoch genauerer immunhistochemischer Untersuchungen und Uptake-Versuche mit stabil transfizierten Zellen, um die einerseits die Lokalisation von MRP5 im Bronchialepithel zu bestimmen und andererseits Ipratropiumbromid als Substrat von MRP5 zu identifizieren.

## 4 Unterschiede in der Protein-Expression von Arzneistofftransportern in humanem Lungengewebe

### 4.1 Hintergrund

Generell werden Gene exprimiert, indem durch *Transkription* mRNA aus DNA generiert wird und anschließend Proteine aus mRNA gebildet werden (*Translation*). Vereinfacht ausgedrückt hängen Veränderungen der Protein-Konzentration allgemein von der Konzentration der entsprechenden mRNA-Sequenz, von der Effizienz der Translation und vom Abbau bereits synthetisierter Proteine ab [288]. Transkription und mRNA-Stabilität beeinflussen zwar die mRNA-Konzentration, formal aber nicht das Verhältnis von Protein zu mRNA [288]. Wie viele Protein-Moleküle tatsächlich durch ein mRNA-Molekül präsentiert werden ist hauptsächlich von der Rate der Translation und der Protein-Degradation abhängig [288]. Unter *Translations-Effizienz* wird die Anzahl der Protein-Moleküle, die pro mRNA-Molekül und Zeiteinheit vollständig synthetisiert werden, verstanden [289]. Die Translation in Eukaryoten besteht aus den Teilschritten der Initiation, der Elongation und der Termination. Zumeist findet die *Initiation* der Translation an der 5'-Cap-Struktur der mRNA-Sequenz statt, indem sich ein Ribosom an den mRNA-Strang anlagert [288]. Ribosomen erkennen das Startcodon (meist AUG) auf der mRNA in unmittelbarer Nähe einer in eukaryotischen Lebewesen konservierten Basenfolge, welche Kozak-Sequenz genannt wird [288, 290]. Der Initiations-Schritt kann durch mehrere komplexe Mechanismen reguliert werden, wie etwa durch falsche Bindung des Ribosoms, Sekundärstrukturen des mRNA-Strangs und Variationen in der Kozak-Sequenz [288, 291]. Unter *Elongation* versteht man die Verlängerung des wachsenden Peptids durch weitere Aminosäuren, welche von Aminoacyl-tRNA übertragen werden. Die Elongations-Rate wird von veränderten Initiations-Raten, von der Art der Codons sowie von der Häufigkeit der jeweiligen tRNA affiziert [288]. Des Weiteren spielt die Phosphorylierung von Elongationsfaktoren eine Rolle in der Regulation der Elongation [291]. Ein weiteres Kriterium für die translationale Effizienz ist die zelluläre Konzentration von Ribosomen oder auch die Auslastung der Ribosomen, welche die spezifische Anreicherung von mRNA auf Ribosomen darstellt [289]. Auch prätranslationale Prozesse können die Effektivität der Proteinbiosynthese beeinflussen, beispielsweise korreliert die Länge der mRNA-Sequenz und des Poly(A)-Endes mit der Effizienz der Translation [288]: Je kürzer die mRNA-Struktur, je länger das Poly(A)-Ende und je stabiler die mRNA, desto effizienter ist die Elongation [292, 293]. MicroRNA begründen einen weiteren spezifischen Regulationsmechanismus der Proteinbiosynthese, da sie die Proteinmenge durch mRNA-Destabilisierung oder durch Translationshemmung beeinflussen können [294]. Die *Degradation* intrazellulärer Proteine ist ein spezifischer, individuell regulierter Prozess und umfasst den lysosomalen Abbau sowie die Ubiquitin-vermittelte Proteolyse [288, 295]. Der Proteinabbau in Lysosomen wird auch als *Autophagozytose* bezeichnet [295]. Einen Erklä-

rungsansatz für den kontrollierten Proteinabbau bietet die Separierung der Proteasen von ihren Substraten durch die Membran der Lysosomen [295]. Der Prozess der Ubiquitin-vermittelten Proteolyse beinhaltet die kovalente Bindung von mehreren Ubiquitin-Molekülen an selektierte Proteine und deren anschließenden Abbau durch Proteasome [288]. Das Proteasom ist ein Proteinkomplex, bestehend aus einer 20S-Untereinheit mit multikatalytischer Protease-Aktivität und zwei regulierenden 19S-Untereinheiten [295]. Die Regulation der Degradation findet oftmals während des selektiven und limitierenden Schritts der Bindung von Ubiquitin-Molekülen an das Protein statt, welcher durch die Ubiquitin-Ligase E3 vermittelt wird [288]. Der dabei entstandene Poly-Ubiquitin-Strang fungiert als Degradations-Signal für das Proteasom [295]. Weitere Degradations-Signale werden in der Protein-Sequenz selbst ausgebildet, wie etwa PEST-Sequenzen, welche reich an den Aminosäuren Prolin (P), Glutamat (E), Serin (S) und Threonin (T) sind und mit einem schnellen Proteinabbau einhergehen [288, 296]. Unter dem Aspekt der offensichtlich komplexen biologischen Regulation ist zumeist nicht von einer direkten Korrelation der mRNA-Konzentration mit der Protein-Konzentration auszugehen [294]. Viele Publikationen zeigen, dass zwischen der Protein- und mRNA-Menge nur eine schwache Korrelation vorliegt, die keine adäquate Stellvertretung der beiden Parameter untereinander zulässt [289, 294]. Trotzdem werden mRNA-Expressions-Analysen und die möglichen Rückschlüssen daraus optimistisch betrachtet, da gerade Gene mit variierendem mRNA-Niveau signifikant mit dem jeweiligen Protein-Niveau korrelierten [297, 298].

## 4.2 Fragestellung

Neben der, bereits im vorhergehenden Kapitel beschriebenen Analyse der Arzneistofftransporter-Expression auf mRNA-Ebene, sollte auch die Protein-Expression im humanen Lungengewebe im Hinblick auf individuelle Unterschiede untersucht werden. Dabei stellte sich erneut die Frage, inwieweit die individuelle Expression von Arzneistofftransporter-Proteinen in Lungengewebsproben mit korrelierenden pharmakokinetischen Parametern pulmonal applizierter Arzneistoffe einherging. Dazu sollten ebenfalls die am humanen Lungen-Perfusions-Modell gewonnenen Werte zur Pharmakokinetik von Ipratropiumbromid herangezogen und mit der Protein-Expression eines Transporters aus den jeweiligen Gewebeproben hinsichtlich eines Zusammenhangs überprüft werden. Da die Korrelation zwischen mRNA- und Protein-Menge von diversen biologischen Regulationsmechanismen aber auch technischen Faktoren abhängt [289], kam außerdem die Frage auf, ob die bereits ermittelte mRNA-Expression von Arzneistofftransportern im Lungengewebe in einem Zusammenhang mit der jeweiligen Protein-Expression standen. Exemplarisch sollte OCT3 untersucht werden, da dieser organische Kationentransporter im Lungengewebe das höchste mRNA-Expressions-Niveau unter den untersuchten Transportern hatte (siehe 3.4.2).

### 4.3 Prinzip der Bestimmung der OCT3-Protein-Expression in humanem Lungengewebe

Um die Expression von OCT3 auf Protein-Ebene zu untersuchen wurden die zwölf humanen Lungengewebsproben aus den Versuchen am Lungen-Perfusions-Modell (Thoraxzentrum Bezirk Unterfranken, Münnerstadt) verwendet (siehe *Experimenteller Teil 6.2*). Aus den auf eine vergleichbare Ausgangsmenge normalisierten Proben wurden die Membranproteine unter Verwendung des Detergens N-Octyl- $\beta$ -D-thioglucoopyranosid isoliert (siehe *Experimenteller Teil 6.3*). Die semiquantitative Analyse der OCT3-Protein-Menge in den Lungengewebsproben, normalisiert auf eine einheitliche Menge Gesamt-Protein, erfolgte durch die Technik des Western Blots (siehe *Experimenteller Teil 6.4*). Die Detektion erfolgte über die Messung der Chemilumineszenz nach katalytischer Reaktion des sekundären, an HRP (horseradish peroxidase = Meerrettich-Peroxidase) konjugierten Antikörpers mit Luminol und Natriumperoxid (siehe *Experimenteller Teil 6.4.3*).

### 4.4 Ergebnisse der Untersuchungen zur OCT3-Protein-Expression in humanem Lungengewebe

#### 4.4.1 Individuelle OCT3-Protein-Expression

Die Charakteristika der zwölf verwendeten humanen Lungengewebsproben wurden bereits in Tabelle B.1 ausführlich dargestellt. Es handelte sich dabei um die direkt nach einer erfolgreichen Perfusion am Lungen-Perfusions-Modell (LPM) entnommenen Proben. Nach Auswertung der Banden der entsprechenden Höhe (61 kDa, siehe Abbildung B.26) auf den Membranen mittels Image J Software erfolgte die Darstellung der durch Chemilumineszenz detektierten OCT3-Protein-Expression in Relation zum Mittelwert der zwölf Proben (siehe Tabelle B.4).

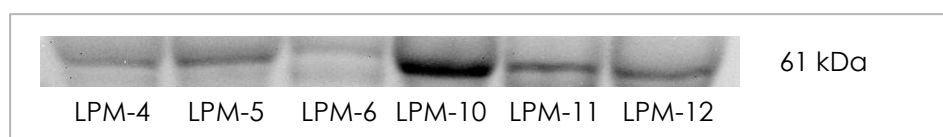


Abbildung B.26: Exemplarische Darstellung einer entwickelten Western-Blot-Membran zur Detektion von OCT3 (61 kDa) aus Protein-Lösungen von sechs unterschiedlichen Lungengewebsproben (LPM-Experimente 4 – 6 und 10 – 12).

Die deutlich stärksten Banden auf den entwickelten Membranen und somit die stärkste OCT3-Protein-Expression zeigten dabei die Gewebeproben der LPM-Experimente 1 und 2 (284,2 % und 267,7 %), welche beide eine über 2,5-fach stärkere Signalintensität, ver-

glichen zum Mittelwert aller gemessener Proben, aufwiesen. Mit Abstand die schwächste Bande und damit die geringste OCT3-Protein-Expression konnte in der Gewebeprobe aus dem LPM-Experiment 9 detektiert werden. Verglichen zum Mittelwert aller untersuchten Proben wurde hier lediglich 32,4 % Signal-Intensität und damit eine um mehr als 3-fach geringere Expression festgestellt.

Tabelle B.4: Individuelle OCT3-Protein-Expression der zwölf untersuchten humanen Lungengewebeproben, dargestellt als x-fache Expression verglichen zum Mittelwert der zwölf Proben, prozentualer Wert verglichen zum Mittelwert der zwölf Proben und ordinaler Rang.

LPM-Experiment-Nr.	Gewebe-Nr.	Protein-Expression [x-fach verglichen zum MW]	Protein-Expression [% verglichen zum MW]	Protein-Expression [ordinaler Rang]
1	9	2,842	284,2	1
2	12	2,677	267,7	2
3	13	1,598	159,8	3
4	14	0,614	61,4	8
5	16	0,715	71,5	7
6	18	0,540	54,0	11
7	21	0,563	56,3	9
8	25	0,532	53,2	10
9	27	0,324	32,4	12
10	31	1,107	110,7	4
11	32	0,848	84,8	6
12	33	0,909	90,9	5

#### 4.4.2 Individuelle OCT3-Protein-Expression in Relation zur Pharmakokinetik am LPM

Um einen Zusammenhang der individuellen OCT3-Protein-Expression mit der am LPM gemessenen Verteilung von Ipratropiumbromid (IB) aus dem Lungengewebe in die Perfusionsflüssigkeit zu untersuchen, wurde eine Pearson-Korrelationsanalyse der ermittelten  $AUC_{0-60 \text{ min}}$  und der jeweiligen detektierten individuellen Protein-Expression aus der entsprechenden Gewebeprobe durchgeführt. Wie schon unter 3.4.6 erläutert, wurden aufgrund der unterschiedlichen applizierten IB-Dosen allerdings nur die LPM-Experimente 4 – 12 in die Analyse eingeschlossen. Es konnte eine signifikante Korrelation ( $r = 0,7499$ ;  $p = 0,02$ ; zweiseitiger Student-t-Test) der individuellen Protein-Expression mit der ermittelten  $AUC_{0-60 \text{ min}}$  festgestellt werden (siehe Abbildung B.27).

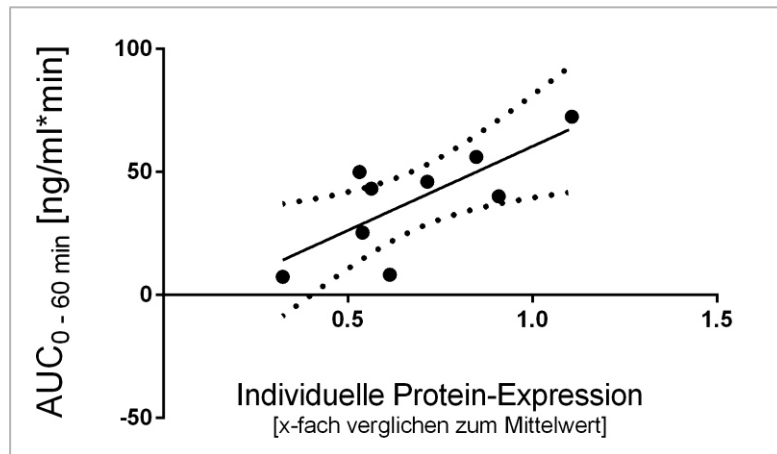


Abbildung B.27: Korrelation der individuellen OCT3-Protein-Expression in der jeweiligen humanen Lungengewebsprobe mit der am LPM gemessenen  $AUC_{0-60 \text{ min}}$  von Ipratropiumbromid:  $r = 0,7499$ ;  $p = 0,02$ ; zweiseitiger Student-t-Test; 95 % Konfidenz-Bande (= confidence band);  $n = 9$ .

#### 4.4.3 Individuelle OCT3-Protein-Expression in Relation zur individuellen OCT3-Genexpression

Auch ein eventueller Zusammenhang der individuellen OCT3-Protein-Expression mit der individuellen OCT3-Genexpression (siehe 3.4.5) wurde mittels Pearson-Korrelationsanalyse analysiert (Abbildung B.28). Dabei repräsentierten die individuellen Einzelwerte der OCT3-mRNA-Expression wiederum die x-fache Abweichung vom Mittelwert aller 79 untersuchten Gewebeproben, normalisiert auf das jeweilige geometrische Mittel der drei verwendeten Referenz-Gene (siehe *Experimenteller Teil* 4.6.3). Es konnte keine signifikante Korrelation der RNA-Expression mit der Protein-Expression festgestellt werden ( $r = -0,1340$ ;  $p = 0,6779$ ; zweiseitiger Student-t-Test).

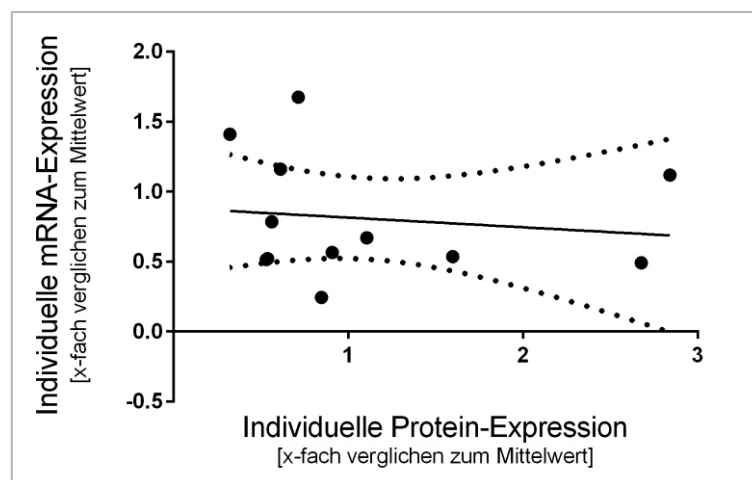


Abbildung B.28: Korrelation der individuellen OCT3-Protein-Expression in der jeweiligen humanen Lungengewebsprobe mit der individuellen OCT3-mRNA-Expression:  $r = -0,1340$ ;  $p = 0,6779$ ; zweiseitiger Student-t-Test; 95 % Konfidenz-Bande (= confidence band);  $n = 12$ .

## 4.5 Diskussion

Prinzipiell können uneinheitlich durchgeführte Arbeitsschritte während eines Western-Blot-Experiments, wie die Beladung des Gels oder der Protein-Transfer, zu Variationen der Signalintensität von Proteinbanden führen, weshalb die Signale der Banden oftmals auf Referenz-Gene oder die Gesamt-Protein-Menge normalisiert werden [299]. Die adäquate Wahl von Referenz-Genen spielt, wie für die Genexpressions-Analyse (siehe *Einleitung* 2.3.3), auch bei der relativen Quantifizierung von Proteinen eine immense Rolle [300]. Häufig verwendete Referenz-Gene, wie ACTB und GAPDH, zeigten jedoch zum Teil deutliche Schwankungen hinsichtlich ihrer Protein-Expression zwischen verschiedenen Proben [300, 301]. Damit erscheinen sie für eine korrekte Normalisierung als unzuverlässig, weshalb in der vorliegenden Untersuchung von dem Einsatz von Referenz-Genen abgesehen wurde. Die Normalisierung auf die Gesamt-Protein-Menge wird derzeit als die vorteilhaftere Methode angesehen [299, 302]. Da in der hier diskutierten Untersuchung die Proben bereits auf die Gesamt-Protein-Menge normalisiert auf das Gel geladenen wurden, wurde auf eine weitere Normalisierung auf die Gesamt-Protein-Menge verzichtet. Trotz intensiver Optimierung von Antikörper-Konzentrationen, Blockier- und Inkubationszeiten sowie Waschschritten, wurden in den hier diskutierten Experimenten multiple Banden detektiert. Denkbar wäre, dass durch inadäquate Lagerung oder Probenaufarbeitung eine Degradation des OCT3-Proteins oder eine unvollständige Isolierung des OCT3-Proteins aus der Membran stattgefunden hatte. Beide Mechanismen würden jedoch nur in Protein-Fragmenten mit geringerer molekularer Masse resultieren, nicht, wie beobachtet, auch in Banden für Proteine mit größerer Molekularmasse. Auch posttranslationale Modifikationen oder alternative Splice-Varianten des Proteins könnten vom Antikörper erkannt werden [299], allerdings wurden, nach unserem Wissenstand, bisher keine dieser Modifikationen und Varianten für OCT3 beschrieben. Schließlich kann auch der Antikörper für unspezifische Banden verantwortlich sein, indem er mit anderen Proteinen interagiert [299]. Falls die unspezifischen Banden jedoch in genügend großem Abstand zur anvisierten Bande auftreten, können die Antikörper trotzdem verwendet werden [299], was in der vorliegenden Untersuchung gemacht wurde.

Die detektierte Signal-Intensität der OCT3-Banden auf den Membranen variierte zwischen den untersuchten, individuellen Lungengewebsproben beinahe 10-fach (siehe 4.4.1). In Gewebeproben aus der humanen Leber zeigte OCT3 auf mRNA-Ebene bereits eine deutlich unterschiedliche Expression zwischen Individuen [303]. Auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten auf starke interindividuelle Unterschiede der OCT3-mRNA-Expression im Lungengewebe hin (siehe 3.4.2), sodass die hier beobachteten Expressionsunterschiede auf Protein-Ebene nicht überraschten. Diese zwischen den Individuen stark variierende OCT3-Expression im Lungengewebe könnte unter Umständen sogar zu einer unterschiedlichen Pharmakokinetik pulmonal applizierter Arzneistoffe *in vivo* führen.

Wie eingangs beschrieben, unterliegt das Verhältnis zwischen Transkription und Translation keiner einfachen linearen Beziehung [289]. Durch die Detektion von mRNA-Mengen werden nur die ersten Schritte einer langen Abfolge von regulatorischen Prozessen beobachtet [294]. In der vorliegenden Untersuchung konnte keine direkte Korrelation der relativen OCT3-mRNA-Menge mit der relativen OCT3-Protein-Mengen in den jeweiligen Lungengewebsproben detektiert werden. In Pflanzen und Tieren, sowie auch in Menschen existieren nur wenige Daten zur korrelierenden Expression von mRNA und Protein [288]. Chen et al. untersuchten die Expression von 98 Genen, darunter jedoch keine Arzneistofftransporter, auf mRNA- und Protein-Ebene in 85 Lungengewebsproben [304]. Dabei zeigten lediglich 21 der 98 Gene eine statistisch signifikante Korrelation zwischen der Protein- und der mRNA-Expression [304]. Dies impliziert, dass nur eine individuelle Überprüfung zwischen der jeweiligen mRNA- und Protein-Menge eine definitive Aussage bezüglich potentieller Expressions-Zusammenhänge erlaubt. Aus den hier gewonnen Erkenntnissen zur OCT3-Protein-Expression lassen sich somit im Summe keine Rückschlüsse zur Übertragbarkeit der Ergebnisse aus den Genexpressions-Untersuchungen von anderen Arzneistofftransportern im humanen Lungengewebe auf die Protein-Ebene ziehen. Eine Überlegung wäre es, die Protein-Expression dieser Transporter in einem künftigen Projekt mittels Massenspektrometrie zu quantifizieren. Diese Methode ist dem traditionellen Western Blot hinsichtlich Selektivität, Geschwindigkeit, einfacher Handhabung, Qualität der Daten und Reproduzierbarkeit überlegen und wird inzwischen als Gold-Standard der Protein-Quantifizierung betrachtet [305].

Interessanterweise zeigte die individuelle OCT3-Protein-Expression in den Gewebeproben eine signifikante, positive Korrelation mit der am LPM gemessenen  $AUC_{0-60 \text{ min}}$  von Ipratropiumbromid (siehe 4.4.2). Daraus konnte geschlussfolgert werden, dass eine höhere Expression von OCT3 im Lungengewebe mit einer höheren Verteilung von IB in die Perfusionsflüssigkeit verbunden war. Erstmals wurde durch die vorliegende Untersuchung somit ein Zusammenhang zwischen pharmakokinetischen Eigenschaften inhalativer Wirkstoffe und der molekularbiologischen Beschaffenheit in den entsprechenden Gewebeproben gezeigt. Da OCT3 vorrangig an der luminalen Zellmembran des Bronchialepithels die Aufnahme von Substanzen vermittelt (siehe *Einleitung* 1.5), kann für OCT3 eine potentielle Beteiligung an der Absorption von IB aus dem luminalen Bereich der humanen Lunge abgeleitet werden. In Experimenten mit stabil transfizierten Zellen wurde IB bisher allerdings nicht als Substrat von OCT3 identifiziert [94]. Dagegen wurde in der vorliegenden Studie für OCT3 unter den untersuchten Arzneistofftransportern im humanen Lungengewebe das höchste Expressions-Niveau ermittelt (siehe 3.4.2). Dies ließ bereits eine Schlüsselrolle von OCT3 an den Transportvorgängen im Bronchialepithel vermuten, was durch die hier nachgewiesene Korrelation der OCT3-Protein-Expression mit pharmakokinetischen Eigenschaften von Ipratropiumbromid bekräftigt wurde. Zur Verifizierung der OCT3-Beteiligung



am Transport von Ipratropiumbromid sollten daher weitere Versuche mit stabil transfizierten Zellen durchgeführt werden (siehe 5.2).

Erneut wurde durch die vorliegende Studie die besondere Möglichkeit des humanen Lungen-Perfusions-Modells deutlich, pharmakokinetische Daten pulmonal applizierter Arzneistoffe in direkte Relation zu molekularbiologischen Erkenntnissen zu setzen. Demgegenüber ermöglichen es Pharmakokinetik-Studien *in vivo* nicht, durch anschließende Untersuchung der Gewebeproben den Ursprung pharmakokinetischer Aspekte auf molekularbiologischer Ebene zu erforschen. Wie bereits gezeigt wurde, spiegelt das *ex vivo* Modell der menschlichen Lunge die Situation *in vivo* realistischer wieder als Zellkulturmodelle [149]. Die vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten des etablierten *ex vivo* Modells der perfundierten humanen Lunge (siehe 1.1.2) werden somit mit der vorliegenden Arbeit um die Ebene der Erforschung molekularbiologischer Eigenschaften erweitert. Künftige Studien könnten daher den Zusammenhang zwischen pharmakokinetischen Parametern von pulmonal applizierten Substanzen und der Expression von beispielsweise weiteren Transportern oder Enzymen des Metabolismus auf mRNA- oder Protein-Ebene untersuchen.

## 5 Zelluläre Aufnahme von [<sup>3</sup>H]-Ipratropiumbromid in stabil transfizierte Zellen

### 5.1 Hintergrund

Die Transfektion von Zellen ist ein probates gentechnisches Mittel zur Erforschung der Funktion und Struktur von Genen und Proteinen [306, 307]. Unter *Transfektion* versteht man das Einbringen von fremden Nukleinsäuren (RNA oder DNA) in Wirtszellen, mit dem Ziel, genetisch modifizierte Zellen zu generieren [306]. Dabei wird zwischen stabiler und transienter Transfektion unterschieden. Die *stabile Transfektion* beinhaltet den dauerhaften Einbau des genetischen Materials in das Genom der Wirtszelle und die nachfolgende transgene Expression, sogar nach der Zellreplikation [306]. Unter *transienter Transfektion* versteht man das Einschleusen von genetischem Material in die Zelle ohne dessen chromosomale Integration, was nur eine temporäre Expression der transfizierten Gene zur Folge hat [306]. Es existieren eine Vielzahl an unterschiedlichen Transfektions-Methoden, welche idealerweise eine hohe Effizienz, eine geringe Zelltoxizität sowie nur geringe Auswirkungen auf die normale Zellphysiologie aufweisen sollten [306]. Die häufigste angewandte Methode in der klinischen Forschung ist die Transfektion über virale Vektoren, die auch *Transduktion* genannt wird [306]. In der *Geneherapie*, bei welcher der Transfer von Nukleinsäuren zur Heilung einer Krankheit oder zur Verbesserung der Symptomatik eingesetzt wird, kommen virale Vektoren auch *in vivo* zum Einsatz [308]. Die bekanntesten DNA-Vektoren basieren auf Adenoviren und Adeno-assoziierten Viren [308]. Retrovirale Vektoren werden hauptsächlich vom murinen Leukämievirus MLV abgeleitet oder gehören der neuen Generation retroviraler Vektoren an, welche auf Lentiviren basieren [308]. Neben viralen Vektoren kommen auch Plasmide als Vektoren zum Einsatz [307]. Weitere Transfektions-Methoden bedienen sich chemischer Substanzen, darunter Calcium-Phosphat, kationische Polymere und kationische Lipide [306, 307]. Diese weit verbreiteten Methoden haben beruhen darauf, dass positiv geladene Substanzen mit negativ geladenen Nukleinsäuren Komplexe ausbilden, welche wiederum an die negativ geladene Zellmembran anlagern und vermutlich über Endozytose in die Zellen aufgenommen werden [306]. Daneben existieren physikalische Methoden, wie beispielsweise die Mikroinjektion, die Elektroporation, die Transfektion mit magnetischen Nanopartikeln sowie die Laser-vermittelte Transfektion, um Zellen mit Nukleinsäuren zu transfizieren [306, 307]. Die Effizienz der Transfektion hängt dabei unter anderem auch von der Wahl der Wirtszelle ab. Neben der CHO-Zelllinie (Chinese hamster ovary cells = Zelllinie aus Ovarien des chinesischen Hamsters), welche die meist verwendete Zelllinie zur Produktion von rekombinanten Proteinen ist, kommen auch HEK293-Zellen (human embryonic kidney cells = humane embryonale Nierenzellen) häufig zum Einsatz [309, 310]. Als adhärenz wachsende Epithelzellen sind HEK293-Zellen einfach und schnell zu kultivieren, viele unterschiedliche

Transfektions-Methoden können mit einer hohen Effizienz angewandt werden und die Translation von Proteinen sowie die Ausbildung deren Tertiärstruktur erfolgt zuverlässig [310].

## 5.2 Fragestellung

In der vorliegenden Untersuchung zeigte OCT3 unter den untersuchten Arzneistofftransportern das höchste mRNA-Expressions-Niveau im humanen Lungengewebe (siehe 3.4.2). Des Weiteren konnte eine positive Korrelation zwischen der individuellen OCT3-Protein-Expression im Lungengewebe und der  $AUC_{0-60\text{min}}$  von Ipratropiumbromid (IB) nach pulmonaler Applikation am humanen Lungen-Perfusions-Modell (LPM) beobachtet werden (siehe 4.4.2). Infolge dieser Beobachtungen wurde eine Beteiligung von OCT3 an der Aufnahme von IB aus dem luminalen Lungenbereich vermutet, da OCT3 hauptsächlich in der apikalen Zellmembran des Bronchialepithels als Uptake-Transporter agiert (siehe *Einleitung* 1.5). Allerdings wurden in Experimenten mit stabil transfizierten Zellen bisher lediglich die organischen Kationentransporter OCT1, OCT2 sowie OCTN1 und OCTN2 als Transporter für IB identifiziert, OCT3 wurde dagegen kein Transport von IB zugeschrieben [94, 95]. Demgegenüber stehen wiederum Erkenntnisse aus der vorliegenden Untersuchung am LPM, dass OCTN1 und OCTN2 nur eine untergeordnete Rolle bei der Umverteilung von IB in den Perfusionspuffer gespielt haben, da eine kompetitive Inhibition dieser beiden Transporter durch L-Carnitin zu keiner deutlich reduzierten  $AUC_{0-60\text{min}}$  von IB geführt haben (siehe 1.5.3). Da ferner OCT2 im humanen Lungengewebe nur ein äußerst geringes Expressions-Niveau aufwies (siehe 3.4.2), wurden die organischen Kationentransporter OCT1 und OCT3 als hauptverantwortliche Transporterproteine für die Aufnahme von IB aus dem luminalen Bereich der Lunge angenommen. Diese Hypothese sollte durch die Untersuchung der zellulären Aufnahme von Tritium-markiertem Ipratropiumbromid (<sup>3</sup>H-IB) in mit humaner cDNA der Transporter OCT1 und OCT3 stabil transfizierten HEK293-Zellen (HEK-h-OCT1 und HEK-h-OCT3) geprüft werden. Vergleichend dazu sollte die Aufnahme eines weiteren inhalativ applizierten Bronchodilatators in HEK-h-OCT1 und HEK-h-OCT3 untersucht werden. Dafür wurde Tritium-markiertes Salbutamol (<sup>3</sup>H-SB) ausgewählt, da Salbutamol bereits als Substrat von OCT1, nicht aber von OCT3 identifiziert wurde [100]. Darüber hinaus war ein eventueller inhibitorischer Effekt von  $\beta$ -Estradiol auf die zelluläre Aufnahme von <sup>3</sup>H-IB in die beiden stabil transfizierten Zelllinien Gegenstand der Forschung, da das weibliche Sexualhormon als Inhibitor von OCT1 und OCT3 konstatiert wurde [311] und demzufolge geschlechtsspezifische Auswirkungen auf die Pharmakokinetik von Substraten der beiden Transporter haben könnte.

### 5.3 Prinzip der Bestimmung der zellulären Aufnahme von [<sup>3</sup>H]-Ipratropiumbromid ([<sup>3</sup>H]-IB)

Die in der Arbeitsgruppe von Prof. Kathleen M. Giacomini (UCSF, San Francisco, USA) etablierten stabil transfizierten Zelllinien HEK-h-OCT1 und HEK-h-OCT3 [43, 44, 48] sowie die Kontroll-Zelllinie HEK-MOCK mit leerem Vektor wurden vor Durchführung der Versuche hinsichtlich ihrer Transporter-Überexpression verifiziert. Dazu wurde aus den Zellen RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben, diese mittels RT-qPCR analysiert und auf die Expression der drei Referenz-Gene ACTB, GAPDH und 18 S RNA normalisiert (siehe *Experimenteller Teil 7.3*). In Vorbereitung auf die Versuchsdurchführung wurden die Zellen jeweils in einer definierten Anzahl pro Well ausgesät und nach circa 24 Stunden im Hinblick auf Adhärenz, Konfluenz und morphologische Gleichförmigkeit mikroskopisch beurteilt (siehe *Experimenteller Teil 7.2*). Die Inkubation der Zellen mit [<sup>3</sup>H]-IB fand jeweils mit zwei unterschiedlichen Verdünnungen (3 nM und 0,3 nM) der Stammlösung über vier Inkubationszeiten (3 - 30 min) statt (siehe *Experimenteller Teil 7.4.1* und *7.4.2*). Analog erfolgte die Inkubation der Zellen mit 17 µM [<sup>3</sup>H]-SB über zwei Inkubationszeiten (10 min und 30 min) (siehe *Experimenteller Teil 7.5*). Die Versuche zum inhibitorischen Effekt von β-Estradiol auf die zelluläre Aufnahme von [<sup>3</sup>H]-IB wurden über eine Inkubationszeit von 10 min durchgeführt (siehe *Experimenteller Teil 7.6*). Dazu wurden die Zell-Monolayer mit unterschiedlich konzentrierten β-Estradiol-Lösungen vorinkubiert und anschließend zusammen mit [<sup>3</sup>H]-IB in der entsprechenden β-Estradiol-Lösung inkubiert. Nach Ende der Inkubationsversuche wurden die Zellen jeweils lysiert und die Proben anschließend mittels Szintillationszähler vermessen (siehe *Experimenteller Teil 7.4.3*). Die Auswertung erfolgte normiert auf den Proteingehalt der Proben (siehe *Experimenteller Teil 7.4.4*).

### 5.4 Ergebnisse der Untersuchungen zur zellulären Aufnahme von [<sup>3</sup>H]-Ipratropiumbromid ([<sup>3</sup>H]-IB)

#### 5.4.1 Expression der Transporter-Gene in stabil transfizierten Zellen

Die mRNA-Expression der Transporter OCT1 und OCT3 wurde in HEK-h-OCT1, HEK-h-OCT3 sowie in HEK-MOCK gemessen und auf die Expression der drei Referenz-Gene ACTB, GAPDH und 18 S RNA normalisiert ( $\Delta C_T$ -Werte). In den jeweiligen Zelllinien waren die stabil transfizierten Transporter wesentlich höher exprimiert, was sich in deutlich geringeren  $\Delta C_T$ -Werten verglichen zu den Kontroll-Zelllinien zeigte (Abbildung B.29).

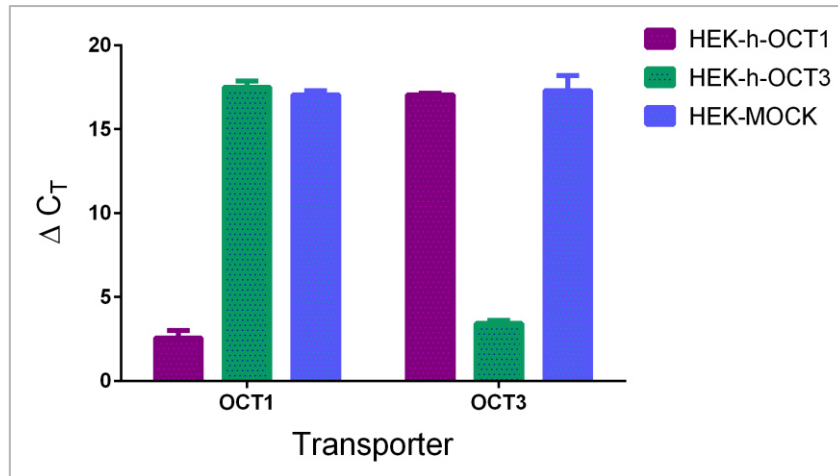


Abbildung B.29: mRNA-Expressions-Profile der Transporter OCT1 und OCT3 in den Zelllinien HEK-h-OCT1 (lila), HEK-h-OCT3 (türkis) und HEK-MOCK (blau). Dargestellt sind die auf drei Referenz-Gene (ACTB, GAPDH und 18 S RNA) normalisierten  $\Delta C_T$  Werte (MW  $\pm$  SD, n = 3).

#### 5.4.2 Aufnahme von [<sup>3</sup>H]-IB in HEK-h-OCT1 Zellen

Sowohl nach Inkubation mit Inkubationspuffer 1 (3 nM, Abbildung B.30 A) als auch nach Inkubation mit Inkubationspuffer 2 (0,3 nM, Abbildung B.30 B) konnte zu allen Zeitpunkten eine signifikant höhere [<sup>3</sup>H]-IB-Aufnahme in HEK-h-OCT1 verglichen zu HEK-MOCK festgestellt werden (einfaktorielle ANOVA mit Tukey's Post-Hoc-Test, p < 0,05). Vor allem in den ersten zehn Minuten wurde ein ausgeprägter Anstieg der aufgenommenen [<sup>3</sup>H]-IB-Menge in die Zelllinie beobachtet.

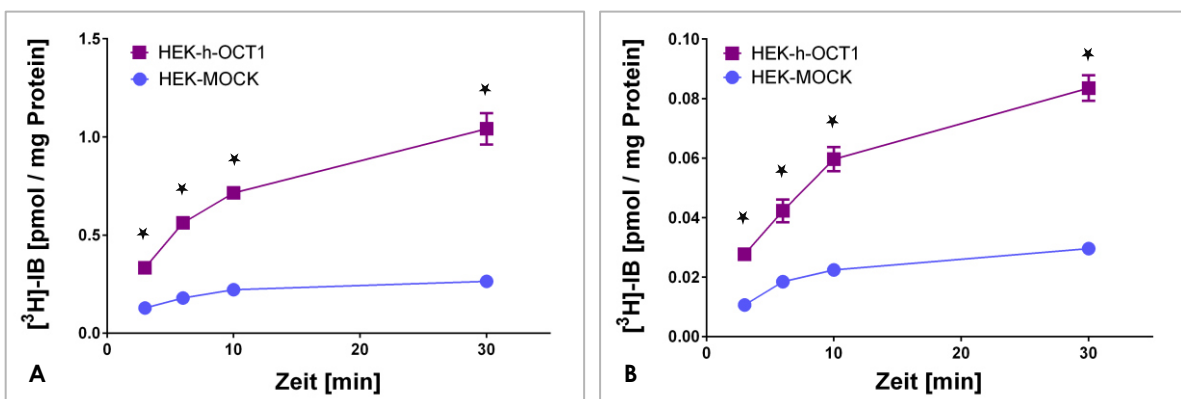


Abbildung B.30: Zeitlicher Verlauf der zellulären Aufnahme von [<sup>3</sup>H]-Ipratropiumbromid ([<sup>3</sup>H]-IB) in HEK-h-OCT1 (lila) verglichen zur zellulären Aufnahme in HEK-MOCK (blau). Dargestellt sind die Kurvenverläufe der zellulären Aufnahme [pmol] normalisiert zur gemessenen Proteinmenge [mg] nach Inkubation mit **A**: Inkubationspuffer 1 (3 nM) und **B**: Inkubationspuffer 2 (0,3 nM) (n = 3, MW  $\pm$  SD). \* Zu allen Zeitpunkten signifikante Unterschiede (einfaktorielle ANOVA mit Tukey's Post-Hoc-Test, p < 0,05).

Die zelluläre  $[^3\text{H}]$ -IB-Aufnahme in HEK-h-OCT1 war zu allen Zeitpunkten mehr als 2,5-fach höher als die Aufnahme in HEK-MOCK. Zum Zeitpunkt 30 min erreichte die zelluläre Aufnahme von  $[^3\text{H}]$ -IB jeweils ihr beobachtetes Maximum und war dabei sogar 3,9-fach (3 nM) und 2,8-fach (0,3 nM) höher im Vergleich zur Aufnahme in HEK-MOCK. Die maximalen Werte der  $[^3\text{H}]$ -IB-Aufnahme zum Zeitpunkt 30 min erreichten in HEK-h-OCT1 Werte von  $1,042 \pm 0,080$  pmol/mg Protein (3 nM) und  $0,084 \pm 0,004$  pmol/mg Protein (0,3 nM).

### 5.4.3 Aufnahme von $[^3\text{H}]$ -IB in HEK-h-OCT3 Zellen

Die zelluläre Aufnahme von  $[^3\text{H}]$ -IB in die stabil transfizierten HEK-h-OCT3-Zellen war ebenfalls zu allen Zeitpunkten für beide Inkubationspuffer (3 nM  $[^3\text{H}]$ -IB, Abbildung B.31 A und 0,3 nM  $[^3\text{H}]$ -IB, Abbildung B.31 B) signifikant höher (einfaktorielle ANOVA mit Tukey's Post-Hoc-Test,  $p < 0,05$ ) verglichen mit der Aufnahme in HEK-MOCK. Ausgenommen davon ist der Zeitpunkt 10 min nach Inkubation mit 0,3 nM  $[^3\text{H}]$ -IB (Inkubationspuffer 2), da hierbei für die zelluläre Aufnahme in HEK-h-OCT3 lediglich ein Einzelwert zur Auswertung herangezogen werden konnte (siehe *Experimenteller Teil 7.4.4* und *Tabellarischer Anhang 7.3.2*). Auch für die  $[^3\text{H}]$ -IB-Aufnahme in HEK-h-OCT3 zeigte sich ein deutlicher Anstieg während der ersten zehn Minuten und ein Maximum nach 30 Minuten für beide Inkubationskonzentrationen. Die maximalen Werte betragen dabei  $0,879 \pm 0,036$  pmol/mg Protein (3 nM) und  $0,067 \pm 0,004$  pmol/mg Protein (0,3 nM). Die Aufnahme von  $[^3\text{H}]$ -IB in HEK-h-OCT3 war zu allen Zeitpunkten mehr als doppelt so hoch wie die Aufnahme in HEK-MOCK, zum Zeitpunkt 30 min war die Aufnahme 2,9-fach (Inkubationspuffer 1) und 2,1-fach (Inkubationspuffer 2) erhöht im Vergleich zu HEK-MOCK.

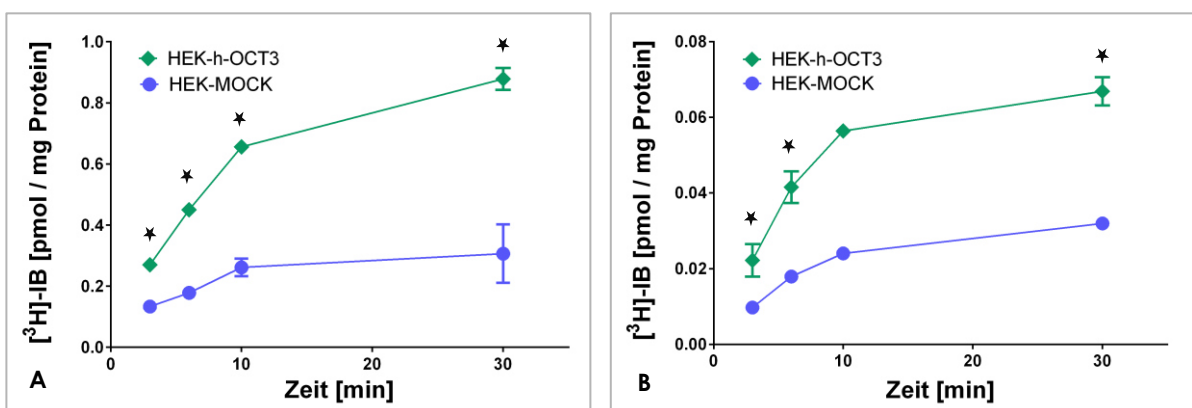


Abbildung B.31: Zeitlicher Verlauf der zellulären Aufnahme von  $[^3\text{H}]$ -Ipratropiumbromid ( $[^3\text{H}]$ -IB) in HEK-h-OCT3 (türkis) verglichen zur zellulären Aufnahme in HEK-MOCK (blau). Dargestellt sind die Kurvenverläufe der zellulären Aufnahme [pmol] normalisiert zur gemessenen Proteinmenge [mg] nach Inkubation mit **A**: Inkubationspuffer 1 (3 nM) und **B**: Inkubationspuffer 2 (0,3 nM) ( $n = 3$ ,  $MW \pm SD$ ). \* Zu allen Zeitpunkten signifikante Unterschiede (einfaktorielle ANOVA mit Tukey's Post-Hoc-Test,  $p < 0,05$ ), ausgenommen Inkubationspuffer 2, Zeitpunkt 10 min, da  $n = 1$  für die Aufnahme in HEK-h-OCT3.

Überdies konnte durch den Vergleich der zellulären Aufnahme nach Inkubation mit unterschiedlichen [<sup>3</sup>H]-IB-Konzentrationen für beide stabil transfizierten Zelllinien eine Proportionalität zwischen der eingesetzten [<sup>3</sup>H]-IB-Menge und dem Ausmaß der zellulären Aufnahme erkannt werden (Abbildung B.32). Für eine bessere Vergleichbarkeit wurden dazu jeweils die Mittelwerte der Aufnahme in HEK-MOCK von den Mittelwerten der Aufnahme in die stabil transfizierten Zellen subtrahiert und damit normalisiert ( $\Delta$  MW [pmol/mg Protein]). Die so berechneten Werte waren für beide untersuchten Zelllinien zu allen Zeitpunkten in etwa 10-fach erhöht nach Inkubation mit dem 10-fach höher konzentrierten Inkubationspuffer. Die maximalen Werte nach 30 min lagen für HEK-h-OCT1 bei 0,777 pmol/mg Protein (3 nM) und 0,054 pmol/mg Protein (0,3 nM), für HEK-h-OCT3 bei 0,572 pmol/mg Protein (3 nM) und 0,035 pmol/mg Protein (0,3 nM).

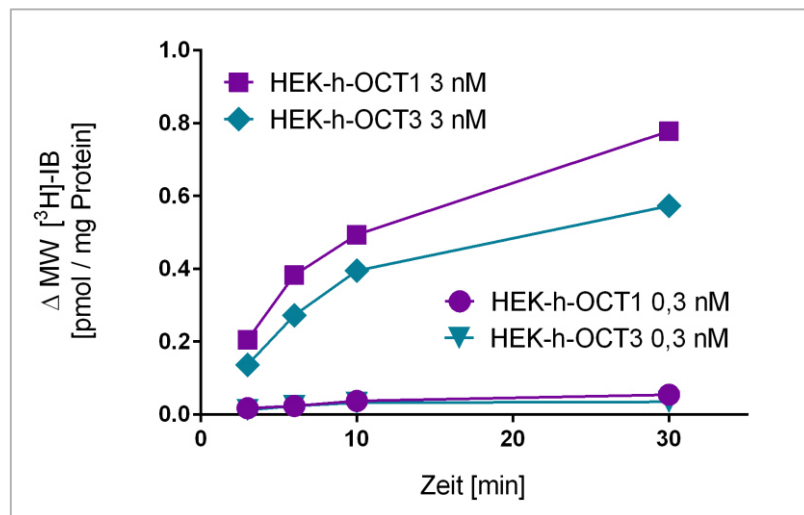


Abbildung B.32: Zeitlicher Verlauf der zellulären Aufnahme von [<sup>3</sup>H]-Ipratropiumbromid ([<sup>3</sup>H]-IB) in HEK-h-OCT1 (lila) und HEK-h-OCT3 (türkis), nach Inkubation mit Inkubationspuffer 1 (3 nM, Quadrat und Raute) und Inkubationspuffer 2 (0,3 nM, Kreis und Dreieck). Dargestellt sind die Werte der [<sup>3</sup>H]-IB-Aufnahme [pmol] normalisiert auf die gemessenen Proteinmenge [mg] als Differenzen der Mittelwerte ( $\Delta$  MW) zur zellulären Aufnahme in HEK-MOCK.

#### 5.4.4 Aufnahme von [<sup>3</sup>H]-Salbutamol ([<sup>3</sup>H]-SB) in HEK-h-OCT1 und HEK-h-OCT3 Zellen

Die zelluläre Aufnahme von [<sup>3</sup>H]-SB in HEK-h-OCT1 und HEK-h-OCT3 wurde nur für eine Konzentration (17  $\mu$ M) zu zwei Zeitpunkten untersucht. Dabei wurde an beiden Zeitpunkten eine signifikant höhere [<sup>3</sup>H]-SB-Aufnahme in die beiden stabil transfizierten Zelllinien verglichen zu HEK-MOCK festgestellt (einfaktorielle ANOVA mit Tukey's Post-Hoc-Test,  $p < 0,05$ , siehe Abbildung B.33). Allerdings war das Ausmaß der [<sup>3</sup>H]-SB-Aufnahme in HEK-h-OCT3 geringer als die Aufnahme in HEK-h-OCT1. Nach 10 min war die Aufnahme von [<sup>3</sup>H]-SB in HEK-h-OCT1, verglichen mit HEK-MOCK, 2,4-fach erhöht, nach 30 min sogar 2,7-fach. Da-

gegen war die [ $^3\text{H}$ ]-SB-Aufnahme in HEK-h-OCT3 zu beiden Zeitpunkten lediglich 1,6-fach höher im Vergleich zu HEK-MOCK. Die maximalen Werte der zellulären [ $^3\text{H}$ ]-SB-Aufnahme zum Zeitpunkt 30 min betragen für HEK-h-OCT1  $1,366 \pm 0,119$  pmol/mg Protein, dagegen für HEK-h-OCT3 nur  $0,798 \pm 0,040$  pmol/mg Protein.

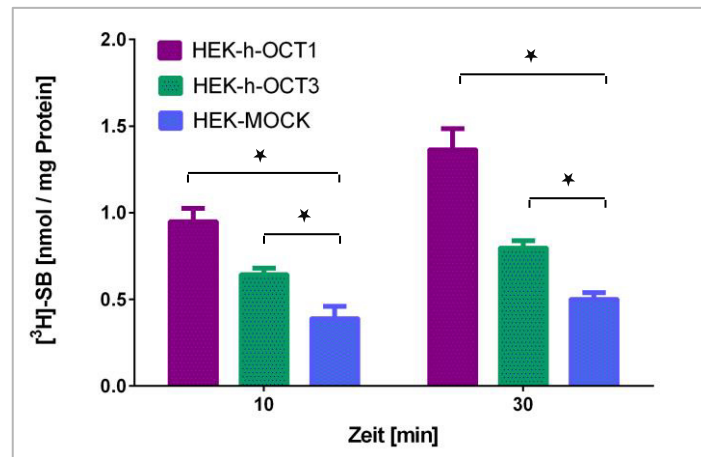


Abbildung B.33: Zelluläre Aufnahme von [ $^3\text{H}$ ]-Salbutamol ([ $^3\text{H}$ ]-SB) in HEK-h-OCT1 (lila), HEK-h-OCT3 (türkis) und HEK-MOCK (blau). Dargestellt ist die zelluläre Aufnahme [pmol] normalisiert auf die gemessene Proteinmenge [mg] nach Inkubation mit [ $^3\text{H}$ ]-SB über 10 min und 30 min (MW  $\pm$  SD, n = 3). \* Zu beiden Zeitpunkten signifikante Unterschiede zwischen der Aufnahme in HEK-h-OCT1 bzw. HEK-h-OCT3 verglichen zu HEK-MOCK (einfaktorielle ANOVA mit Tukey's Post-Hoc-Test, p < 0,05).

#### 5.4.5 Inhibition der [ $^3\text{H}$ ]-IB Aufnahme durch $\beta$ -Estradiol

Die Untersuchung eventueller inhibitorischer Einflüsse von  $\beta$ -Estradiol auf die zelluläre Aufnahme von [ $^3\text{H}$ ]-IB in HEK-h-OCT1 ergab nach gleichzeitiger Inkubation der [ $^3\text{H}$ ]-IB-Lösung (0,3 nM) mit unterschiedlich konzentrierten Estradiol-Lösungen signifikant niedrigere Werte (einfaktorielle ANOVA mit Tukey's Post-Hoc-Test, p < 0,05) verglichen zur Inkubation ohne Estradiol-Lösung (Abbildung B.34). Die prozentuale Reduktion der zellulären [ $^3\text{H}$ ]-IB-Aufnahme lag nach 10 min Inkubation bei 22,6 % ( $10^{-5}$  M Estradiol), bei 47,9 % ( $10^{-6}$  M Estradiol) und bei 23,6 % ( $10^{-9}$  M Estradiol).



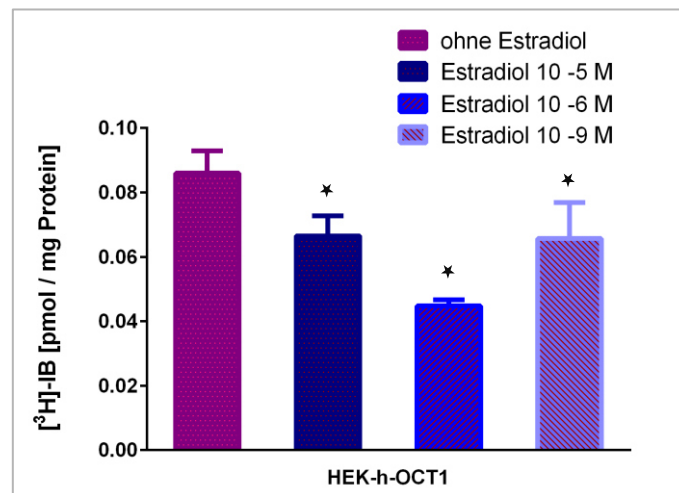


Abbildung B.34: Inhibitorischer Einfluss von  $\beta$ -Estradiol auf die zelluläre Aufnahme von [<sup>3</sup>H]-Ipratropiumbromid ([<sup>3</sup>H]-IB) in HEK-h-OCT1. Dargestellt ist die zelluläre Aufnahme [pmol] normalisiert auf die gemessene Proteinmenge [mg] nach Inkubation mit 0,3 nM [<sup>3</sup>H]-IB sowie unterschiedlich konzentrierter  $\beta$ -Estradiol-Lösungen (MW  $\pm$  SD, n = 3). \* Jeweils signifikante Unterschiede zwischen Inkubation mit Estradiol (10<sup>-5</sup> M, 10<sup>-6</sup> M, 10<sup>-9</sup> M) und Inkubation ohne Estradiol (einfaktorielle ANOVA mit Tukey's Post-Hoc-Test, p < 0,05).

## 5.5 Diskussion

In HEK-h-OCT1 konnte, verglichen zu HEK-MOCK, eine bis zu 3,9-fach höhere zelluläre Aufnahme des Tritium-markierten Ipratropiumbromids ([<sup>3</sup>H]-IB) beobachtet werden, womit die eigenen Ergebnisse im Einklang mit bereits publizierten Daten stehen: Nakanishi et al. zeigten eine 5,7-fach stärkere [<sup>3</sup>H]-IB-Aufnahme in HEK-h-OCT1 verglichen zu HEK-MOCK [94]. Dabei wurden nach einer Inkubation mit [<sup>3</sup>H]-IB (10 nM) über eine Minute etwa 0,15 pmol/mg Protein in HEK-h-OCT1 aufgenommen [94]. Dieser Wert korreliert bestens mit den hier diskutierten Ergebnissen, die nach Inkubation mit [<sup>3</sup>H]-IB (3 nM) über drei Minuten im Mittel eine Aufnahme von 0,334 pmol/mg Protein in HEK-hOCT1 aufwies (siehe *Tabellarischer Anhang 7.3.1*). Eine Beteiligung von OCT1 an der zellulären Aufnahme von Ipratropiumbromid *in vivo* erscheint daher ebenfalls sehr wahrscheinlich.

Interessanterweise wurde in der vorliegenden Studie auch für die [<sup>3</sup>H]-IB-Aufnahme in HEK-h-OCT3 statistisch signifikante, höhere Werte verglichen zu HEK-MOCK festgestellt, womit erstmals auch für OCT3 eine Beteiligung an der zellulären Aufnahme von Ipratropiumbromid nachgewiesen werden konnte. Nakanishi et al. konstatierten dagegen für OCT3 nur eine geringe [<sup>3</sup>H]-IB-Transport-Aktivität [94]. In beiden Untersuchungen wurde die mRNA-Expression in den stabil transfizierten Zelllinien zur Verifizierung der Transfektion herangezogen. Verglichen zu den Kontroll-Zelllinien konnte in der vorliegenden Studie für OCT1 und OCT3 jeweils eine etwa 2<sup>14</sup>-fach höhere mRNA-Expression in der entsprechen-

den stabil transfizierten Zelllinie festgestellt werden. Auch Nakanishi et al. berichteten eine deutliche Überexpression an mRNA für OCT1 (etwa  $2^{10}$ -fach) und respektive OCT3 (etwa  $2^9$ -fach) in ihren stabil transfizierten Zelllinien [94]. Zwar kann aus der ermittelten mRNA-Expression keine direkte korrelierende Aussage zur Protein-Expression und -Funktionalität getroffen werden (siehe 4.1), jedoch kann bei so eindeutigen Unterschieden in der mRNA-Expression von einer Überexpression der entsprechenden Transporterproteine in den jeweiligen Zelllinien ausgegangen werden. Ein weiterer Hinweis für die deutliche Überexpression der beiden Transporter auf Protein-Ebene findet sich, für die vorliegende Studie, in der Proportionalität der zellulären [ $^3\text{H}$ ]-IB-Aufnahme. Weder für HEK-h-OCT1 noch für HEK-h-OCT3 wurde eine Sättigung nach Inkubation mit 3 nM [ $^3\text{H}$ ]-IB, im Vergleich zu 0,3 nM [ $^3\text{H}$ ]-IB, beobachtet. Somit wurde die funktionelle Überexpression von OCT1 und OCT3 in den beiden verwendeten stabil transfizierten Zelllinien für die vorliegende Untersuchung indirekt bestätigt. Da darüber hinaus in HEK-h-OCT1 und HEK-h-OCT3 vergleichbar hohe intrazelluläre [ $^3\text{H}$ ]-IB-Mengen detektiert wurden, kann vermutet werden, dass beide Transporter, OCT1 und OCT3, ein ähnlich starkes Ausmaß auf die zelluläre [ $^3\text{H}$ ]-IB-Aufnahme aufweisen. Damit kann aus den vorliegenden Ergebnissen sowohl für OCT1 als auch erstmalig für OCT3 eine Beteiligung an der Absorption von Ipratropiumbromid nach pulmonaler Applikation abgeleitet werden.

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass auch Tritium-markiertes Salbutamol ([ $^3\text{H}$ ]-SB) vermehrt in die beide stabil transfizierten Zelllinien HEK-h-OCT1 und HEK-h-OCT3, verglichen zu HEK-MOCK, aufgenommen wurde. Salomon et al. stellten für OCT1 bereits eine Beteiligung an der Aufnahme von [ $^3\text{H}$ ]-SB fest [100]. Wie auch in der vorliegenden Arbeit war dabei die Aufnahme in HEK-h-OCT1 zu allen Zeitpunkten mehr als zweifach höher im Vergleich zu HEK-MOCK [100]. Nach fünf Minuten Inkubation mit [ $^3\text{H}$ ]-SB (10  $\mu\text{M}$ ) konnten circa 0,5 nmol/mg Protein in HEK-h-OCT1-Zellen detektiert werden [100]. Dieser Wert lag wiederum sehr gut im Einklang mit den eigenen Ergebnissen, die nach zehn Minuten Inkubation mit [ $^3\text{H}$ ]-SB (17  $\mu\text{M}$ ) eine Aufnahme von 0,95 nmol/mg Protein in HEK-h-OCT1 aufwiesen (siehe *Tabellarischer Anhang 7.5*). Die vorliegende Untersuchung bestätigt somit die Beteiligung von OCT1 am Transport von [ $^3\text{H}$ ]-SB.

OCT3 wurde bislang nicht im Hinblick auf den Transport von Salbutamol untersucht. Obwohl die [ $^3\text{H}$ ]-SB-Aufnahme in HEK-h-OCT3 weniger stark ausgeprägt war als in HEK-h-OCT1, war eine statistisch signifikante OCT3-vermittelte Aufnahme von [ $^3\text{H}$ ]-SB zu registrieren. In der vorliegenden Arbeit wurde damit erstmalig auch für OCT3 eine Beteiligung an der zellulären Aufnahme von Salbutamol erwiesen. Bisherige Untersuchungen zur Transporter-vermittelten pulmonalen Absorption von Salbutamol vermuteten OCTN1 und OCTN2 als hauptverantwortliche Transporter für die zelluläre Aufnahme von Salbutamol [85, 87, 99]. Dabei kam das kationische Fluorophor 4-[4-(Dimethylamino)-styryl]-N-methylpyridinium (ASP+) als Modells substrat für organischen Kationen-Transport zum Einsatz [85, 87], welches

allerdings nicht als selektives Substrat für einen der organischen Kationentransporter gilt und somit eine absolute Aussage zu den Transport-Mechanismen nicht ermöglichte. Eine Untersuchung von Gnadet et al. am humanen Lungen-Perfusions-Modell unterstützte die Hypothese der OCTN1/2-vermittelten Aufnahme von Salbutamol, da die Applikation des kompetitiven OCTN1/2-Inhibitors L-Carnitin die Umverteilung von Salbutamol in den Perfusionspuffer reduzierte [99]. Die in der vorliegenden Untersuchung ermittelten Ergebnisse ließen damit den Schluss zu, dass Salbutamol ein Substrat von OCT1 und OCT3 ist, wenn auch wahrscheinlich weitere organische Kationentransporter an der pulmonalen Absorption beteiligt sind.

Das weibliche Sexualhormon  $\beta$ -Estradiol wurde als potenter Inhibitor von OCT1 und OCT3 identifiziert [53, 311]. In  $10^{-5}$  M und  $10^{-6}$  M Konzentration konnte eine inhibitorische Wirkung von  $\beta$ -Estradiol auf die Aufnahme des Modell-Substrates 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>) in HEK-h-OCT1 und HEK-h-OCT3 Zellen beobachtet werden [53, 311]. Neben diesen beiden Konzentrationen wurde in der vorliegenden Untersuchung auch eine  $10^{-9}$  M  $\beta$ -Estradiol-Lösung eingesetzt, da diese Konzentration in etwa der physiologisch vorliegenden Estradiol-Konzentration in prämenopausalen Frauen entsprach (siehe 2.1.1) [194]. Alle drei Estradiol-Konzentrationen verringerten statistisch signifikant die zelluläre Aufnahme von [<sup>3</sup>H]-IB in HEK-h-OCT1, verglichen zur Kontrolle ohne Estradiol-Inkubation. Zum ersten Mal wurde somit eine Inhibition der OCT1-vermittelten zellulären Aufnahme von Ipratropiumbromid durch  $\beta$ -Estradiol gezeigt. Dabei wurde allerdings nicht, wie eventuell zu erwarten gewesen wäre, eine der Estradiol-Konzentration proportionale Reduktion der [<sup>3</sup>H]-IB-Aufnahme festgestellt. Nach Inkubation mit  $10^{-6}$  M Estradiol-Lösung war die zelluläre Aufnahme von [<sup>3</sup>H]-IB beinahe um die Hälfte reduziert, wohingegen die Inkubation mit  $10^{-5}$  M Estradiol-Lösung und  $10^{-9}$  M Estradiol-Lösung in einer etwa vergleichbaren Reduktion der [<sup>3</sup>H]-IB-Aufnahme um ein Viertel resultierte (siehe 5.4.5). Da die Experimente mit stabil transfizierten Zellen im Rahmen eines zeitlich begrenzten Forschungsaufenthalts an der University of California, San Francisco stattfanden, konnten keine weiterführenden Untersuchungen zur inhibitorischen Wirkung von  $\beta$ -Estradiol auf die Aufnahme von [<sup>3</sup>H]-IB und auch [<sup>3</sup>H]-SB in weiteren Konzentrationen und Inkubationszeiten durchgeführt werden. Nichtsdestotrotz kann aus der beobachteten Inhibition durch  $\beta$ -Estradiol *in vitro* über eine prinzipiell mögliche Auswirkung auf die Gegebenheiten *in vivo* spekuliert werden, da die untersuchten Estradiol-Konzentrationen unter anderem im physiologischen Bereich lagen. Auch Progesteron wurde als Inhibitor des OCT1- und OCT3-vermittelten Transports beschrieben [311], wodurch sich die Inhibition der beiden Transporter *in vivo* potenzieren und Auswirkungen auf die pulmonale Absorption des Ipratropiumbromids haben könnte. Da eine Untersuchung der Pharmakokinetik von Ipratropiumbromid *in vivo* nur für zehn gesunde männliche Probanden beschrieben wurde [171], sind keine pharmakokinetischen Daten, die Unterschiede zwischen den Geschlechtern aufzeigen könnten, verfügbar. Somit

bleibt die Auswirkung der Inhibition von Transporterproteinen durch Sexualhormone *in vivo* spekulativ.

Resümierend aus den Untersuchungen mit stabil transfizierten Zellen konnte für die zelluläre Aufnahme von [<sup>3</sup>H]-IB eine OCT1-Beteiligung bestätigt werden und erstmals auch ein Beitrag von OCT3 nachgewiesen werden. Da OCT3 darüber hinaus im humanen Lungengewebe unter den untersuchten Transportern das höchste Expressions-Niveau zeigte, ist dieser Transporter vermutlich auch maßgeblich an der pulmonalen Absorption von Ipratropiumbromid *in vivo* beteiligt. Die beobachtete Inhibition der [<sup>3</sup>H]-IB-Aufnahme durch  $\beta$ -Estradiol ließ vermuten, dass auch *in vivo* eine geschlechtsspezifische Inhibition der Transporter stattfinden könnte, die unter Umständen in einer zwischen Mann und Frau variierenden Pharmakokinetik von Substraten dieser Transporter resultieren könnte. Des Weiteren konnte auch für [<sup>3</sup>H]-SB eine zelluläre Aufnahme vermittelt durch OCT1 bestätigt und für OCT3 erstmals gezeigt werden. Aufgrund struktureller Ähnlichkeiten wäre es durchaus möglich, dass auch weitere Bronchodilatoren Substrate dieser beiden Transporter sind, wie es schon für Tiotropiumbromid gezeigt wurde [94]. Daraus wird die Bedeutung von Arzneistofftransportern für die inhalative Arzneimitteltherapie, zum Beispiel von *Asthma bronchiale* oder *COPD*, erkennbar.





---

## **C Experimenteller Teil**

# 1 Entwicklung und Validierung der Ipratropiumbromid-Analytik

## 1.1 Verwendete Reagenzien, Geräte und Materialien

### 1.1.1 Substanzen

Ipratropiumbromid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Butylscopolaminbromid	
Salbutamolsulfat	GlaxoSmithKline, Stevenage, England
Ipratropium-d7-bromid	BIOZOL, Eching

### 1.1.2 Sonstige Reagenzien

Wasser, LC-MS-grade	VWR, Ismaning
Methanol, LC-MS-grade	
Acetonitril, LC-MS-grade	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ameisensäure 50 %, LC-MS-grade	
Magnesiumsulfat	
Natriumacetat	
Natriumchlorid	
Natriumcitratdihydrat	
Natriumcitratsesquihydrat	
Bondensil-PSA	Agilent Technologies, Waldbronn

### 1.1.3 LC-MS/MS-System

Alle technischen Bestandteile des LC-MS/MS-Systems und die Software zur Akquirierung und Analyse der Daten wurden von Agilent Technologies in Waldbronn erworben:

Analytische Säule	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 4,6 mm x 150 mm, 5 µm
Autosampler	Agilent 1200 System, Modell HIP-ALS SL+ G1316B
Pumpe	Agilent 1200 System, Modell BinPumpSL G1379B
Degaser	Agilent 1200 System, Modell G1312B
Säulenofen	Agilent 1200 System, Modell TCC SL G1316B
Massenspektrometer, Tripel Quadrupol	G 6460 TripleQuad LC/MS
Software zur Daten-Akquirierung	Agilent MassHunter Workstation Acquisition, Data Acquisition for Triple Quad B.04.01
Software zur Daten-Analyse	MassHunter Workstation Software, Qualitative Analysis Version B.05.00



### 1.1.4 Sonstige Geräte

Zentrifuge, Kendro Megafuge 1.0 R	Heraeus, Hanau
Zentrifuge, Microfuge 22 R	Beckmann Coulter, Krefeld
Zentrifuge, 5702	Eppendorf, Hamburg
Pipette 10-100 µl, Eppendorf Research® plus	
Pipette 100-1000 µl, Eppendorf Research® plus	
Feinwaage, AB204-S/PH	Mettler Toledo, Greifensee, Schweiz
Analysenwaage, CPA 22D	Sartorius, Göttingen
Vortex 2 Genie	VWR, Ismaning
Multi-Tube Vortexer	
Schüttler, UNIMAX 1010	Heidolph Instruments, Schwabach

### 1.1.5 Materialien

Oasis® WCX 1cc 30 mg 30 µm Kartusche	Waters, Eschborn
Spitzkolben aus Glas, 5 ml, NS 14,5/23	WITEG Labortechnik, Wertheim
Schraubröhre 15 ml, 120 x 170 mm, Spitzboden, aus Polypropylen, steril	Sarstedt, Nümbrecht
Reagiergefäß 1,5 ml, aus Polypropylen, mit anhängendem Deckel	
2 ml Vial	Phenomenex, Aschaffenburg

## 1.2 LC-MS/MS-Methode

Um Ipratropiumbromid (IB), Ipratropium-d7-bromid (7DIB), Butylscopolaminbromid (BSAB) und Salbutamolsulfat (SB) zu detektieren wurde das in 1.1.3 genannte LC-MS/MS-System verwendet. Das Injektionsvolumen betrug dabei jeweils 20 µl. Zur Auftrennung der Substanzen mittels Flüssigchromatographie diente ein Gemisch aus 0,1 % (V/V) Ameisensäure in Wasser (Fließmittel A) und Acetonitril (Fließmittel B) als mobile Phase. Bei einem Fluss von 1 ml/min und einem linearen Gradienten-Verlauf über 4 min, wie in Tabelle C.1 dargestellt, wurden die Analyten von der auf 20 °C temperierten Säule eluiert. Die Retentionszeiten lagen für IB und 7DIB bei 3,3 min, für BSAB bei 3,4 min und für SB bei 2,8 min.

Tabelle C.1: Zeitlicher Verlauf der Zusammensetzung der mobilen Phase bestehend aus Fließmittel A (FM A: 0,1 % (V/V) Ameisensäure in Wasser) und Fließmittel B (FM B: Acetonitril) während eines LC-MS/MS-Laufes über 8 min.

Zeit nach Injektion [min]	Anteil FM A [%]	Anteil FM B [%]	Ablauf
0	99	1	Linearer Elutionsgradient
4	1	99	
5	1	99	Spülen der Säule
6	99	1	Umspülen auf Ausgangsbedingungen
8	99	1	Äquilibrieren der Säule

Um die Substanzen massenspektrometrisch detektieren zu können wurde der Tripel Quadrupol im *Multiple-Reaction-Monitoring* (MRM) –Scan-Modus betrieben. Die Analyten mussten dabei in die Gasphase überführt und ionisiert werden. Es wurde Stickstoff mit einer Temperatur von 300 °C und einem Fluss von 5 ml/min mit einem Druck von 45 psi zur Vernebelung eingesetzt. Die Elektrospray-Ionisation (ESI) erfolgte im Positiven bei einer angelegten Kapillarspannung von 2500 V und einer Sprühdüsen- (Nozzle-) Spannung von 500 V. Die Mantelgastemperatur lag bei 250 °C mit einem Fluss von 11 ml/min. Im Massen-selektor wurden die Ionen nach ihrem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis ( $m/z$ ) getrennt. Für IB wurde der Massenübergang mit einem  $m/z$  von 332  $\rightarrow$  166 zur Quantifizierung herangezogen, entsprechend war für 7DIB der Übergang 339  $\rightarrow$  173, für BSAB der Übergang 360  $\rightarrow$  138 und für SB der Übergang 240  $\rightarrow$  148 geeignet. Die weiteren in Tabelle C.2 aufgeführten Massenübergänge wurden ergänzend zur Qualifizierung genutzt.

Tabelle C.2: Substanzspezifische Übergänge (Mutterion  $\rightarrow$  Tochterion) und optimierte Parameter (MS 1-/2- Auflösung, Fragmentorspannung und Kollisionsenergie) zur massenspektrometrischen Detektion. \*Quantifier

Analyt	Mutterion [m/z]	MS 1- Auflösung	Tochterion [m/z]	MS 2- Auflösung	Fragmentorspannung [V]	Kollisionsenergie [V]
IB	332	Wide	166*	Widest	180	25
		Wide	124	Widest	180	33
7DIB	339	Unit	173*	Wide	180	25
		Unit	131	Wide	180	33
BSAB	360	Unit	138*	Wide	180	25
		Unit	194	Wide	180	33
SB	240	Unit	222	Wide	100	5
		Unit	148*	Wide	100	17

Die Scan-Zeit für einen Massenübergang (Dwell time) lag dabei jeweils bei 200 ms, die Beschleunigungs-Spannung (Cell Accelerator Voltage) bei 7 V.

### 1.3 Auswahl des Internen Standards

Als potentielle Kandidaten für den Internen Standard (IS) zur Ipratropiumbromid-Analytik wurden zum einen strukturell ähnliche Substanzen wie das siebenfach deuterierte Ipratropiumbromid (7DIB) und das Spasmolytikum Butylscopolaminbromid (BSAB) als sinnvoll erachtet. Zum anderen wurde Salbutamol-sulfat (SB) in Betracht gezogen, da es in pharmazeutischen Präparaten in Kombination mit IB formuliert wird. Die Strukturformeln des Ipratropiumbromids (IB) und der drei ausgewählten Substanzen 7DIB, BSAB und SB sind in Abbildung C.1 dargestellt.

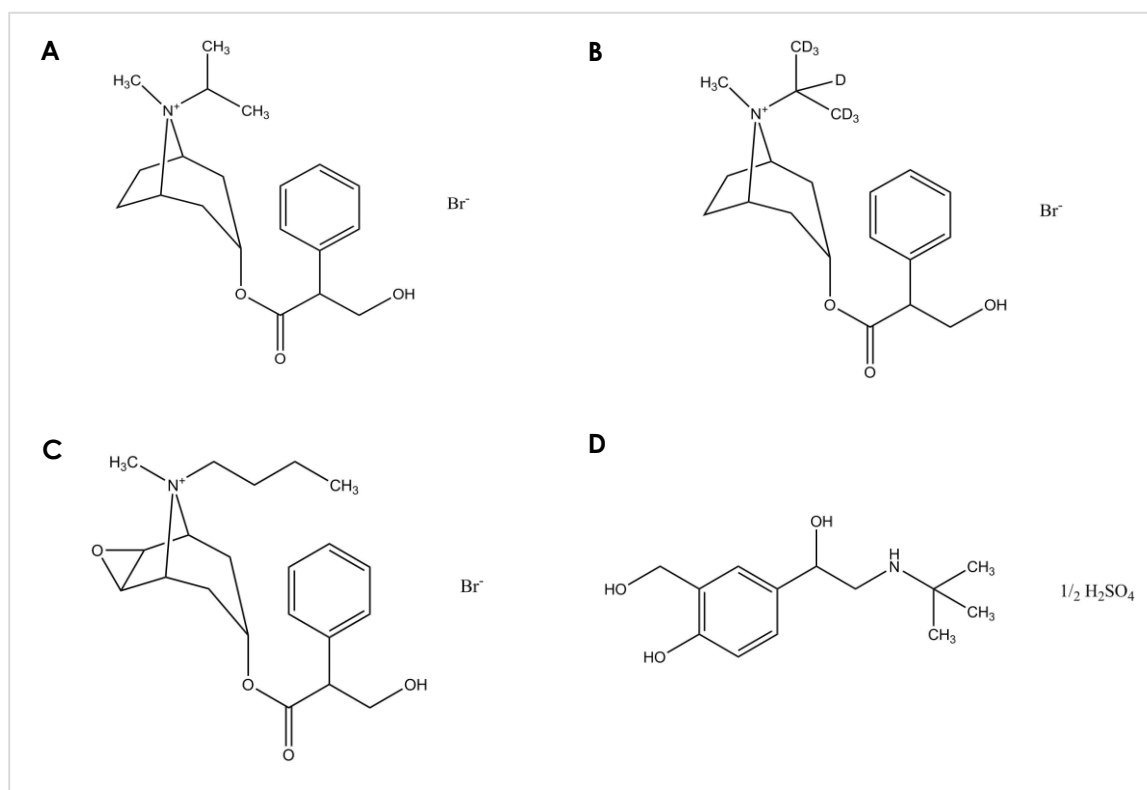


Abbildung C.1: Strukturformeln von Ipratropiumbromid (A), Ipratropium-d7-bromid (B), Butylscopolaminbromid (C) und Salbutamol-Hemisulfat (D).

Für jede der drei Substanzen wurde eine methanolische Stammlösung von 1 mg/ml hergestellt. Durch entsprechende Verdünnung mit Methanol wurden Lösungen von 0,2 ng/μl erstellt (IS-Lösungen). 50 μl dieser Lösungen wurden jeweils zu 1 ml Probenlösung

pipettiert, womit in jeder Probenlösung 10 ng des IS vorlagen (Tabelle C.3). Entsprechend der IS-Lösungen wurden auch Kalibrierlösungen von IB in unterschiedlichen Konzentrationen hergestellt und jeweils 50 µl dieser Lösungen zu den Probenlösungen pipettiert (Tabelle C.3) um sicherzustellen, dass der IS bei variierenden IB-Konzentrationen an den Kalibrierpunkten reproduzierbar detektiert werden konnte. Aufgrund von Volumenkontraktion bei der Mischung einer methanolischen mit einer wässrigen Lösung ist das exakte Endvolumen theoretisch nur in Abhängigkeit der Temperatur ermittelbar. Zur Vereinfachung werden in diesem Kapitel Konzentrations-Niveaus angegeben, welches jeweils die Substanzmenge [ng] bezogen auf 1 ml Ausgangs-Probenlösung beschreibt, ohne das Volumen der methanolischen Kalibrierlösungen zu berücksichtigen.

Tabelle C.3: Konzentrationen der IB-Kalibrierlösungen und der IS-Lösungen (jeweils 50 µl wurden zu 1 ml Probenlösung zugegebenen) sowie die Konzentrations-Niveaus von IB und IS in den Probenlösungen der vier Kalibrierpunkte (KP).

Kalibrierpunkt	IB-Kalibrierlösung [ng/µl]	IS-Lösung [ng/µl]	IB-/ IS-Konzentrations-Niveau [ng/ml]
<b>KP 0</b>	0	0,2	<b>0 / 10</b>
<b>KP 0,1</b>	0,002	0,2	<b>0,1 / 10</b>
<b>KP 5</b>	0,1	0,2	<b>5 / 10</b>
<b>KP 10</b>	0,2	0,2	<b>10 / 10</b>

Als Probenmatrix diente dafür jeweils dieselbe Blank-Lösung (siehe 2.4.5) einer Perfusion am Lungen-Perfusions-Modell, welche aufgrund unzureichender Ventilation des Lungenlappens nicht durchgeführt werden konnte. Die vier vorbereiteten Probenlösungen wurden jeweils mit sechs unterschiedlichen Extraktionsmethoden (detaillierte Beschreibung siehe 1.4) aufgearbeitet und per LC-MS/MS-Analytik vermessen um zu beurteilen, unter welchen Bedingungen der potentielle Interne Standard konstant extrahiert wird.

Probenlösungen mit 7DIB als Internen Standard wiesen nach Aufarbeitung mit nahezu allen Extraktionsmethoden größere Peakflächen auf im Vergleich zu Probenlösungen mit BSAB und SB als Internen Standard (Abbildung C.2). Weiterhin konnten mit Ausnahme von Methode 1 (WCX) keine gravierenden Streuungen zwischen den Probenlösungen unterschiedlichen IB-Gehalts festgestellt werden. Da 7DIB zusätzlich den Vorteil hatte, zur gleichen Retentionszeit wie IB detektiert werden zu können, wurde 7DIB als Interner Standard zur IB-Analytik verwendet.

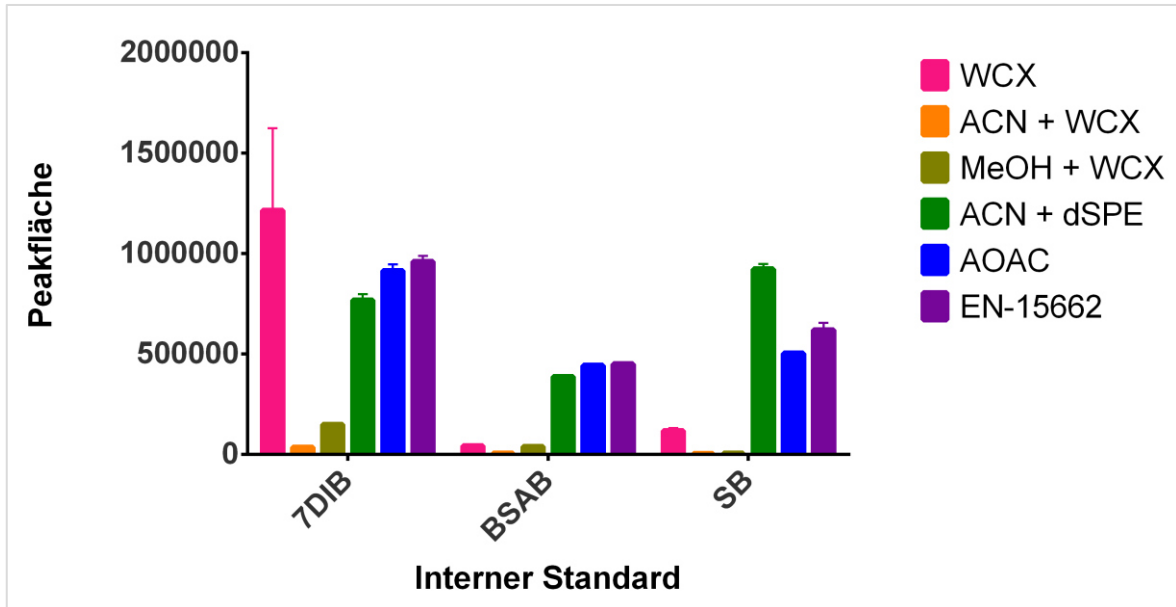


Abbildung C.2: Durch LC-MS/MS-Analytik ermittelte Peakflächen ( $MW \pm SD$ ,  $n = 4$ ) von Ipratropium-d7-bromid (7DIB), Butylscopolaminbromid (BSAB) und Salbutamolsulfat (SB) nach Aufarbeitung mit unterschiedlichen Extraktionsmethoden: **Methode 1**: Festphasenextraktion mit schwacher Kationenaustauscher (WCX) – Säule (rosa); **Methode 2**: Proteinfällung mit Acetonitril (ACN) + anschließende Festphasenextraktion mit WCX-Säule (orange); **Methode 3**: Proteinfällung mit Methanol (MeOH) + anschließende Festphasenextraktion mit WCX-Säule (hellgrün); **Methode 4**: Proteinfällung mit ACN + anschließende dispersive Festphasenextraktion (dSPE) (dunkelgrün); **Methode 5**: QuEChERS AOAC (blau); **Methode 6**: QuEChERS EN-15662 (lila).

## 1.4 Vergleich von Ipratropiumbromid (IB)-Extraktionsmethoden aus Lungen-Perfusions-Modell-Proben

Zur Beurteilung, welche Methode die geeignetste zur Extraktion von IB aus Lungen-Perfusions-Modell (LPM)-Proben war, wurden sechs Methoden hinsichtlich ihrer Linearität und Reproduzierbarkeit verglichen. Die Probenlösung wurde jeweils nach bereits in Tabelle C.3 dargestelltem Schema mit unterschiedlichen Konzentrationen an IB und dem jeweiligen Internen Standard (siehe 1.3) versetzt. Insgesamt wurden dadurch pro Aufarbeitungsmethode drei Kalibriergeraden mit je vier Kalibrierpunkten erstellt. Es wurde dabei, wie in Abbildung C.3 schematisch dargestellt, jeweils folgendermaßen verfahren:

1 ml Probenlösung wurde in eine 15 ml – Röhre überführt, mit jeweils 50  $\mu$ l IB-Kalibrierlösung und 50  $\mu$ l IS-Lösung versetzt und 3 Sekunden auf dem Vortex vermischt.

**Methode 1:** Festphasenextraktion (SPE) mit einer schwachen Kationenaustauscher (WCX) – Säule

Die WCX-Säule wurde nacheinander mit 1 ml Methanol und 1 ml Wasser konditioniert und anschließend mit 1 ml der vorbereiteten Probenlösung beladen. Anionische sowie nicht-geladene Substanzen wurden mit 1 ml Ammoniak 5 % und 1 ml Methanol von der Säule gewaschen. Nach jeder Zugabe wurde die Säule für 1 min bei 700 x g und Raumtemperatur (RT) zentrifugiert um den Durchlauf der Flüssigkeit zu beschleunigen. Zuletzt wurde die WCX-Säule in ein frisches 15 ml – Reagiergefäß platziert und die Analyten wurden mit 1 ml Ameisensäure 2 % durch Zentrifugieren von der Säule eluiert.

**Methode 2:** Proteinfällung mit Acetonitril (ACN) und anschließende Festphasenextraktion (SPE) mit einer WCX-Säule

Zu der vorbereiteten Probenlösung wurden 3 ml ACN pipettiert und für 20 s mittels Vortex vermischt. Die somit ausgefällten Proteine und zellulären Bestandteile wurden anschließend durch 5 min Zentrifugieren bei 4 °C und 3300 x g abgetrennt. 3 ml des Überstandes wurden nacheinander auf eine konditionierte WCX-Säule geladen. Die Elution der Analyten erfolgte wie unter Methode 1 beschrieben.

**Methode 3:** Proteinfällung mit Methanol (MeOH) und anschließende Festphasenextraktion (SPE) mit einer WCX-Säule

Zu der vorbereiteten Probenlösung wurden 3 ml MeOH pipettiert und für 20 s mittels Vortex vermischt. Die dabei ausgefällten Proteine und zellulären Bestandteile wurden anschließend durch 5 min Zentrifugieren bei 4 °C und 3300 x g abgetrennt. 3 ml des Überstandes wurden nacheinander auf eine konditionierte WCX-Säule geladen. Die Elution der Analyten erfolgte wie unter Methode 1 beschrieben.

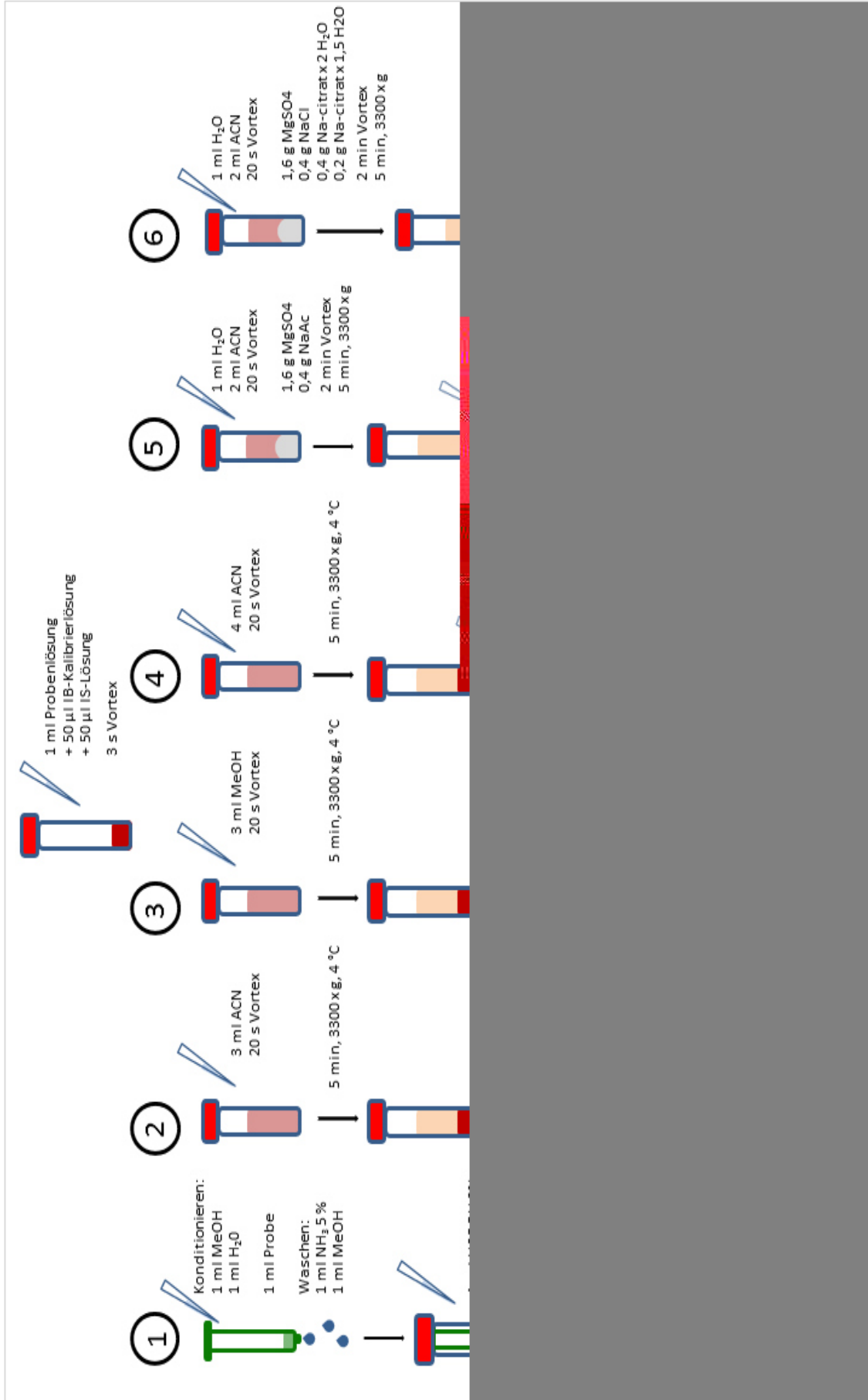


Abbildung C.3: Schematische Darstellung der unterschiedlichen Ipratropiumbromid (IB)-Extraktionsmethoden: **1:** Festphasenextraktion mit WCX – Säule; **2:** Proteinfällung mit ACN + anschließende Festphasenextraktion mit WCX-Säule; **3:** Proteinfällung mit MeOH + anschließende Festphasenextraktion mit WCX-Säule; **4:** Proteinfällung mit ACN + anschließende dSPE; **5:** QuEChERS AOAC; **6:** QuEChERS EN-15662. \* bei Methode 4: 2 ml Überstand

**Methode 4:** *Proteinfällung mit Acetonitril (ACN) und anschließende dispersive Festphasenextraktion (dSPE)*

Durch Zugabe von 4 ml ACN wurden, wie unter Methode 2 beschrieben, die Proteine aus der Probenlösung gefällt und abzentrifugiert. 4 ml des Überstandes wurden in ein neues, mit 100 mg PSA (primary and secondary amine exchange materials) und 500 mg Magnesiumsulfat befülltes 15 ml – Reagiergefäß überführt. Durch das Durchmischen der Probe mit den Salzen für 1 min auf dem Multi-Tube Vortexer, wurden sowohl primäre und sekundäre Amine gebunden als auch Wasser adsorbiert und die Probe somit aufgereinigt. Nach Zentrifugieren für 5 min bei 3000 x g (RT) wurden 2 ml des Überstandes weiter verwendet.

**Methode 5:** *QuEChERS AOAC-Methode*

In Anlehnung an die QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged and safe) AOAC-Methode [312, 313] wurde die vorbereitete Probenlösung mit 1 ml Wasser und 2 ml ACN versetzt und für 20 s mittels Vortex gemischt. Anschließend wurden 1,6 g Magnesiumsulfat und 0,4 g Natriumacetat hinzugegeben und für 2 min auf dem Multi-Tube Vortexer durchmischt. Nach 5 min Zentrifugieren bei 3000 x g (RT) wurden 1,5 ml Überstand in ein neues, mit 40 mg PSA und 200 mg Magnesiumsulfat befülltes 15 ml – Reagiergefäß überführt. Erneut wurde für 1 min auf dem Multi-Tube Vortexer durchmischt und anschließend 5 min bei 3000 x g (RT) zentrifugiert. 1 ml des Überstandes wurde weiter verwendet.

**Methode 6:** *QuEChERS EN-15662-Methode*

Modifiziert nach der QuEChERS EN-15662-Methode [314] wurde die vorbereitete Probenlösung mit 1 ml Wasser und 2 ml ACN versetzt und für 20 s mittels Vortex gemischt. Anschließend wurden 1,6 g Magnesiumsulfat, 0,4 g Natriumchlorid, 0,4 g Natriumcitratdihydrat und 0,2 g Natriumcitratdesquihydrat hinzugegeben und für 2 min auf dem Multi-Tube Vortexer durchmischt. Nach 5 min Zentrifugieren bei 3000 x g (RT) wurden 1,5 ml Überstand in ein neues, mit 40 mg PSA und 200 mg Magnesiumsulfat befülltes 15 ml – Reagiergefäß überführt. Erneut wurde für 1 min auf dem Multi-Tube Vortexer durchmischt und anschließend 5 min bei 3000 x g (RT) zentrifugiert. 1 ml des Überstandes wurde weiter verwendet.

Im Anschluss an alle Extraktionen wurde die Probe konzentriert, indem 1 ml Eluat oder Überstand (Ausnahme Methode 4: 2 ml) in ein Glas-Spitzkolben überführt und bei Raumtemperatur für 1 h unter einem Stickstoffstrom evaporiert wurde. Nach vollständiger Verdampfung der flüssigen Komponenten wurde der Probe 300 µl MeOH + H<sub>2</sub>O (1 + 9 (V/V)) hinzugegeben, der Inhalt des Spitzkolbens für 20 s mittels Vortex vermischt und anschlie-





Die Linearität von Methode 3, 4, 5 und 6 konnte durch einen Korrelationskoeffizient  $> 0,99$  bestätigt werden, wohingegen die Linearität von Methode 1 und 2 nur unzureichend gegeben war. Die Analyse der unterschiedlichen Extraktionsmethoden ergab weiterhin, dass sowohl Methode 2 (ACN + WCX) als auch Methode 3 (MeOH + WCX) eine ungenügend hohe Effizienz der Extraktion aufwiesen, was durch wesentlich geringere Peakflächen deutlich wurde (siehe Abbildung C.4). Methode 1 (WCX) zeigte zu starke Streuungen der Peakflächen um als reproduzierbare Extraktionsmethode verwendet werden zu können (siehe Abbildung C.4). Als prinzipiell sehr gut geeignete Extraktionsmethoden zur Detektion von IB aus LPM-Proben erwiesen sich Methode 4, Methode 5 und Methode 6.

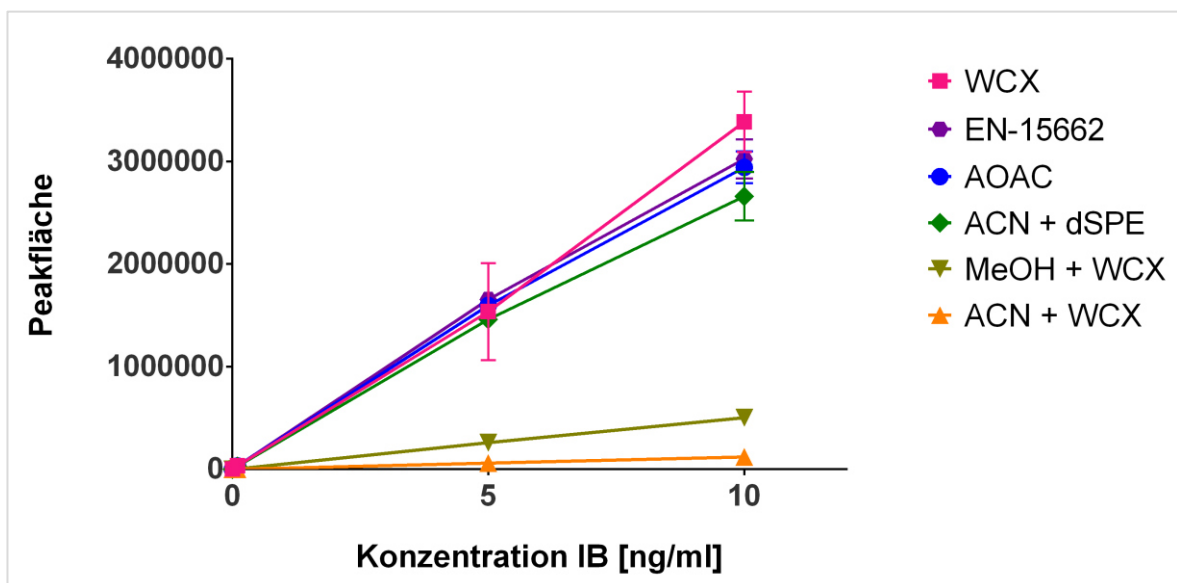


Abbildung C.4: Peakflächen der LC-MS/MS-Analytik von Ipratropiumbromid (IB) ( $MW \pm SD$ ,  $n = 3$ ) nach Aufarbeitung der IB-Konzentrationen 0 ng/ml, 0,1 ng/ml, 5 ng/ml und 10 ng/ml mit unterschiedlichen Extraktionsmethoden: **Methode 1**: Festphasenextraktion mit schwacher Kationenaustauscher (WCX) – Säule (rosa); **Methode 2**: Proteinfällung mit Acetonitril (ACN) + anschließende Festphasenextraktion mit WCX-Säule (orange); **Methode 3**: Proteinfällung mit Methanol (MeOH) + anschließende Festphasenextraktion mit WCX-Säule (hellgrün); **Methode 4**: Proteinfällung mit ACN + anschließende dispersive Festphasenextraktion (dSPE) (dunkelgrün); **Methode 5**: QuEChERS AOAC (blau); **Methode 6**: QuEChERS EN-15662 (lila).

Da der materielle und zeitliche Aufwand bei Methode 4 im Vergleich zu Methode 5 und Methode 6 deutlich geringer war und zudem keine eindeutige Überlegenheit einer der drei Methoden vorlag, wurden die künftigen Analysen mittels Proteinfällung mit ACN und anschließender dSPE (Methode 4) durchgeführt.

## 1.5 Validierung der Ipratropiumbromid (IB)-Analytik

Die Validierung der Extraktionsmethode (Methode 4, siehe 1.4) und der LC-MS/MS-Methode fand in Anlehnung an die Leitlinie der EMA (European Medicines Agency) zur Validierung bioanalytischer Methoden [177] sowie an die ICH-Leitlinie zur Validierung analytischer Verfahren [176] statt. Dazu diente die schon zur Entwicklung der Methode verwendete Probenlösung, die Blank-Lösung einer nicht durchgeführten Perfusion am LPM (siehe 1.3). Als Interner Standard (IS) wurden 2,5 ng Ipratropium-d7-bromid (7DIB) pro 1 ml Probenlösung eingesetzt. Die Proben wurden dabei jeweils durch Proteinfällung mit ACN und anschließender dispersiver Festphasenextraktion aufgearbeitet. Die Vermessung erfolgte mit der in 1.2 beschriebenen LC-MS/MS-Methode. Zur quantitativen Analyse wurden mithilfe der MassHunter Software die Peakflächen integriert und anschließend der Quotient aus der IB-Peakfläche zur Peakfläche des IS gebildet.

### 1.5.1 Selektivität

Um unterschiedliche Analyten parallel aus Proben quantifizieren zu können, musste gewährleistet sein, dass dies ohne störenden Einfluss durch Komponenten der Probenmatrix erfolgte. Da bei der LC-MS/MS-Analytik per se substanzspezifische Übergänge detektiert werden ist die Selektivität prinzipiell nahezu sichergestellt. Zusätzlich wurde jede Blank-Lösung aus LPM-Versuchen hinsichtlich eventueller Signale bei den entsprechenden Übergängen von IB und 7DIB untersucht, indem statt einer Kalibrierlösung 50 µl MeOH vor der Aufarbeitung zu der Probe hinzugegeben wurde (= Leerprobe). Kein Signal nach Injektion der Leerprobe ließ auf eine selektive Detektion von IB (Abbildung C.5 A) und 7DIB (siehe Abbildung C.5 B) schließen.

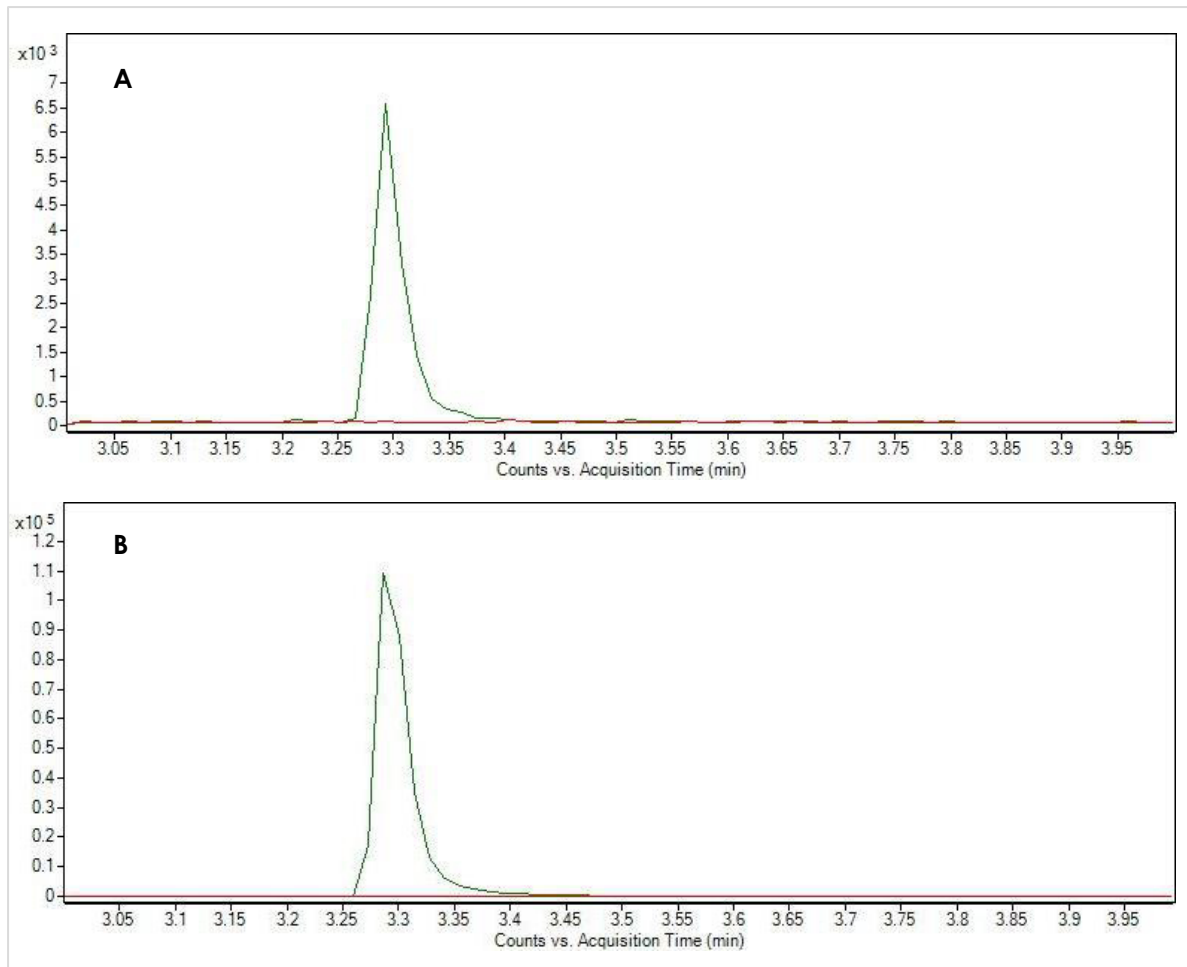


Abbildung C.5: **A:** Beispielhaftes Chromatogramm der Ipratropiumbromid (IB)-Detektion beim Übergang  $332\text{ m/z} \rightarrow 166\text{ m/z}$  aus einer Lösung von  $0\text{ ng/ml}$  IB (rot) und aus einer Lösung von  $0,05\text{ ng/ml}$  IB (grün); **B:** Beispielhaftes Chromatogramm der Ipratropium-d7-bromid (7DIB)-Detektion beim Übergang  $339\text{ m/z} \rightarrow 173\text{ m/z}$  aus einer Lösung von  $0\text{ ng/ml}$  7DIB (rot) und aus einer Lösung von  $2,5\text{ ng/ml}$  7DIB (grün). Kein Signal bei Detektion der Leerprobe ( $0\text{ ng/ml}$ ) ließ auf eine selektive Detektion von IB schließen.

### 1.5.2 Linearität

Um die Linearität der analytischen Methode sicher zu stellen, wurden je dreimal  $1\text{ ml}$  der Probenlösung nach dem Schema in Tabelle C.5 mit  $50\text{ }\mu\text{l}$  einer methanolischen Kalibrierlösung in acht verschiedenen IB-Konzentrationen versetzt. Die Kalibriergerade bestand demnach aus acht Kalibrierpunkten im Triplikat im erwarteten Konzentrationsbereich der LPM-Proben von  $0 - 5\text{ ng/ml}$  IB. Die lineare Regressionsanalyse der Peakflächen-Verhältnisse von IB zu 7DIB erfolgte mittels GraphPad Prism® Software unter Berücksichtigung der Formel 5. Die Steigung  $a$  der Geradengleichung wurde als  $1,005$  (95 %-Konfidenzintervall:  $0,9933 - 1,017$ ) bestimmt, der  $y$ -Achsenabschnitt  $b$  betrug  $0,0009728$  (95 %-Konfidenzintervall:  $-0,02387 - 0,02581$ ) und die Linearität wurde mit einem Korrelationskoeffizient  $r$  von  $0,9996$  bestätigt.

Tabelle C.5: Konzentrationen der IB / 7DIB – Kalibrierlösungen (jeweils 50 µl wurden zu 1 ml Probenlösung zugegebenen) und die Konzentrations-Niveaus von IB und 7DIB in den Probenlösungen der acht Kalibrierpunkte (KP).

Kalibrierpunkt	IB / 7DIB - Konzentration der Kalibrierlösung [ng/µl]	IB / 7DIB – Konzentrations-Niveau [ng/ml]
KP 0	0 / 0,05	0 / 2,5
KP 0,01	0,0002 / 0,05	0,01 / 2,5
KP 0,05	0,001 / 0,05	0,05 / 2,5
KP 0,25	0,005 / 0,05	0,25 / 2,5
KP 0,5	0,01 / 0,05	0,5 / 2,5
KP 1	0,02 / 0,05	1 / 2,5
KP 3	0,06 / 0,05	3 / 2,5
KP 5	0,1 / 0,05	5 / 2,5

### 1.5.3 Richtigkeit und Präzision

Die Richtigkeit einer analytischen Methode beschreibt die Annäherung der bestimmten Konzentration einer Probe an die nominale Konzentration einer Probe und kann dementsprechend nach Formel 6 bestimmt werden. Die Präzision dabei ist die prozentuale relative Standardabweichung. [315]

$$\text{Richtigkeit (\%)} = \frac{\sum_{i=1}^n [\text{bestimmte Konzentration}]}{n * [\text{eingesetzte Konzentration}]} * 100$$

Formel 6

Diese beiden Parameter wurden bestimmt indem vier Qualitätskontrolllösungen in definierten Konzentrationen hergestellt und 50 µl davon nach dem in Tabelle C.6 dargestellten Schema zu je 1 ml Probenlösung hinzugegeben wurden. Die unterschiedlich gewählten IB-Konzentrations-Niveaus 0,05 ng/ml, 0,25 ng/ml, 1 ng/ml und 3 ng/ml lagen dabei im unteren, mittleren und oberen Bereich der Kalibriergerade. Die Qualitätsproben zur Bestimmung der Intraday-Variation wurden jeweils drei Mal am selben Tag, die Qualitätsproben zur Bestimmung der Interday-Variation jeweils an drei aufeinander folgenden Tagen aufgearbeitet und vermessen. Zur Bestimmung der Konzentration dieser Qualitätsproben wurde die durch lineare Regression erhaltene, bereits in Abschnitt 1.5.2 beschriebene Kalibriergerade aus acht Kalibrierpunkten herangezogen.

Tabelle C.6: Konzentrationen der IB / 7DIB – Qualitätskontrolllösungen (jeweils 50 µl wurden zu 1 ml Probenlösung zugegeben) sowie die Konzentrations-Niveaus von IB und 7DIB in den Probenlösungen der vier Qualitätsproben (QP) zur Bestimmung von Richtigkeit und Präzision.

Qualitäts- probe	IB / 7DIB - Konzentration der Qualitätskontrolllösung [ng/µl]	IB / 7DIB - Konzentrations- Niveau [ng/ml]
QP 0,05	0,001 / 0,05	0,05 / 2,5
QP 0,25	0,005 / 0,05	0,25 / 2,5
QP 1	0,02 / 0,05	1 / 2,5
QP 3	0,06 / 0,05	3 / 2,5

Wie in Tabelle C.7 gezeigt ist, lagen somit sowohl die Werte der Richtigkeit (85-115 %) als auch die der Präzision (< 15 %) im geforderten Bereich [179].

Tabelle C.7: Intraday (n = 3) und Interday (n = 3) Präzision und Richtigkeit der IB-Analytik an den Konzentrations-Niveaus 0,05 ng/ml, 0,25 ng/ml, 1 ng/ml und 3 ng/ml.

Qualitäts- probe	Intraday Richtigkeit (%)	Intraday Präzision (%)	Interday Richtigkeit (%)	Interday Präzision (%)
QP 0,05	98,0	1,4	98,8	2,5
QP 0,25	97,2	1,3	97,6	0,7
QP 1	93,8	0,7	95,7	2,3
QP 3	96,4	0,7	97,7	1,2

#### 1.5.4 Bestimmungsgrenze

Zur Ermittlung und Verifizierung der Bestimmungsgrenze (LLOQ = lower limit of quantification) wurde eine Qualitätskontrolllösung mit 0,0002 ng/µl IB und 0,05 ng/µl 7DIB hergestellt. Zu 1 ml Probenlösung wurden 50 µl dieser Qualitätskontrolllösung hinzugegeben, die resultierende Endkonzentration in der Qualitätsprobe QP 0,01 betrug 0,01 ng/ml IB und 2,5 ng/ml 7DIB. Wie in 1.5.3 beschrieben wurde die Qualitätsprobe an drei aufeinander folgenden Tagen und dreimal an einem Tag aufgearbeitet und deren Präzision und Richtigkeit bestimmt (siehe Tabelle C.8).

Tabelle C.8: Intraday (n = 3) und Interday (n = 3) Präzision und Richtigkeit der IB-Bestimmungsgrenze (LLOQ) von 0,01 ng/ml.

Qualitäts- probe	Intraday Richtigkeit (%)	Intraday Präzision (%)	Interday Richtigkeit (%)	Interday Präzision (%)
QP 0,01	119,0	4,1	114,2	7,4

Die geforderten Werte einer Richtigkeit von 80 – 120 % und einer Präzision, dargestellt als relative Standardabweichung, von < 20 % [179] wurden erreicht und es konnte damit für IB ein LLOQ von 0,01 ng/ml bestimmt werden. Zusätzlich konnte anhand der Chromatogramme am LLOQ festgestellt werden, dass das mittels MassHunter Workstation Software berechnete (AutoRMS) Signal-Rausch-Verhältnis (SNR = signal to noise ratio) immer mindestens 5-fach größer war als das SNR der jeweiligen Leerprobe (0 ng/ml) (siehe Abbildung C.6).

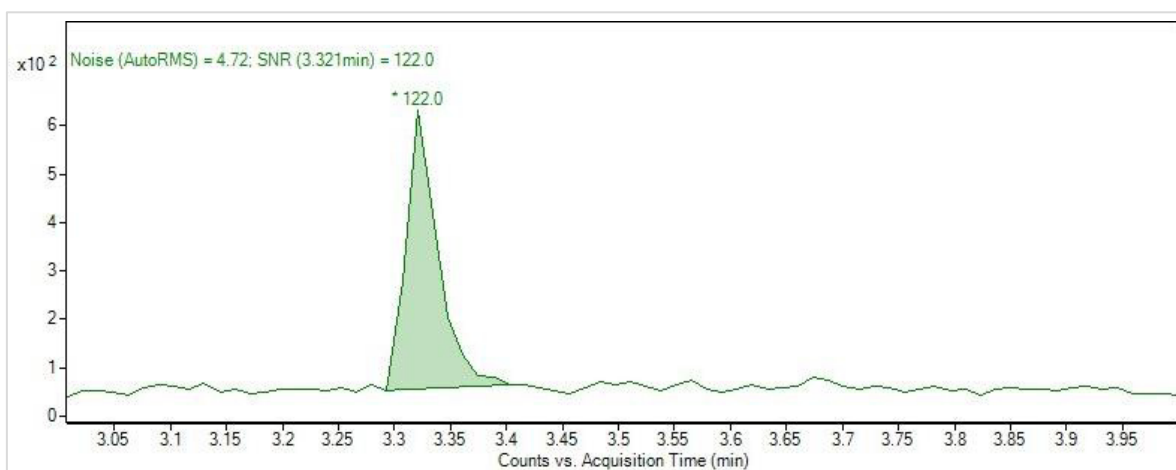


Abbildung C.6: Beispielhaftes Chromatogramm der Ipratropiumbromid (IB)-Bestimmungsgrenze (LLOQ) von 0,01 ng/ml beim Übergang 339 m/z → 173 m/z. Das mittels MassHunter Workstation Software berechnete Signal-Rausch-Verhältnis (AutoRMS) betrug hier 122,0.

### 1.5.5 Wiederfindung, Matrixeffekt und Prozesseffizienz

Die Wiederfindung, der Matrixeffekt und die Extraktionseffizienz der detektierten Substanzen IB und 7DIB konnte durch drei unterschiedlich behandelte Sätze an Proben bestimmt werden [180]. Jeder Satz an Proben umfasste vier nominale Konzentrations-Niveaus (0,05 ng/ml, 0,25 ng/ml, 1 ng/ml und 3 ng/ml), welche wiederum im Triplikat untersucht wurden. Insgesamt wurden somit 36 Einzelproben zur Bestimmung herangezogen.

Der erste Satz an Proben (Kalibrierpunkte) bestand aus Probenlösungen (jeweils 1 ml), welchen analog zur Bestimmung der Linearität (siehe 1.5.2) vor Extraktion 50 µl der entsprechenden Kalibrierlösung zugegeben wurde. Die Konzentrations-Niveaus von IB und 7DIB in den Probenlösungen vor Aufarbeitung sind in Tabelle C.9 dargestellt. Diese Probenlösungen wurden anschließend wie unter 1.4 beschrieben extrahiert und vermessen. Durch die Extraktionsschritte (Eindampfen bis zur Trockne und Wiederaufnahme in 300 µl MeOH + H<sub>2</sub>O (1 + 9 (V/V))) fand eine theoretische maximale 3<sup>1/3</sup>-fache Konzentration von IB und 7DIB statt (siehe Tabelle C.9).

Tabelle C.9: Konzentrations-Niveaus von IB und 7DIB in den Probenlösungen (vor Extraktion) und theoretische Konzentrationen (nach Extraktion) der Kalibrierpunkte (KP).

Kalibrierpunkt	Konzentrations-Niveau der Probenlösung vor Extraktion IB / 7DIB [ng/ml]	Theoretische Konzentration nach Extraktion IB / 7DIB [ng/ml]
KP 0,05	0,05 / 2,5	0,166 / 8,33
KP 0,25	0,25 / 2,5	0,833 / 8,33
KP 1	1 / 2,5	3,33 / 8,33
KP 3	3 / 2,5	10 / 8,33

Der zweite Satz an Proben (Post-Spike-Lösungen) enthielt IB und 7DIB im reinen Lösungsmittel der Wiederaufnahme (MeOH + H<sub>2</sub>O (1 + 9 (V/V))). Die Konzentration der Analyten in den Post-Spike-Lösungen (dargestellt in Tabelle C.10) richtete sich nach der entsprechenden theoretischen Konzentrationen der Kalibrierpunkte nach Extraktion. Diese Proben wurden direkt ohne Aufarbeitung vermessen.

Tabelle C.10: Konzentrationen der Post-Spike-Lösungen und der Post-Spike-Proben (PSP).

Post-Spike-Probe	Konzentration der Post-Spike-Lösung IB / 7DIB [ng/ml]	Konzentration der Post-Spike-Probe IB / 7DIB [ng/ml]
PSP 0,05	0,166 / 8,33	0,166 / 8,33
PSP 0,25	0,833 / 8,33	0,833 / 8,33
PSP 1	3,33 / 8,33	3,33 / 8,33
PSP 3	10 / 8,33	10 / 8,33

Der dritte Satz an Proben (Post-Spike-Proben) umfasste Probenlösungen (je 1 ml), zu welchen statt einer Kalibrierlösung lediglich 50 µl MeOH hinzugefügt wurden. Anschließend wurde wie unter 1.4 beschrieben extrahiert, allerdings wurden die Proben nach dem Eindampfen bis zur Trockne statt in reinem Lösungsmittel in den entsprechend Post-Spike-Lösung aufgenommen (Konzentrationen siehe Tabelle C.10) und vermessen.

Indem die Peakflächen der Analyten zueinander ins Verhältnis gesetzt wurden, ließen sich die Validierungsparameter *Wiederfindung*, *Matrixeffekt* und *Prozesseffizienz* nach den Formeln 7 – 9 ermitteln [180, 316].

$$Wiederfindung [\%] = \frac{Peakfläche_{Kalibrierpunkt}}{Peakfläche_{Post-Spike-Probe}} * 100$$

Formel 7



$$\text{Matrixeffekt [\%]} = \frac{\text{Peakfläche}_{\text{Post-Spike-Probe}}}{\text{Peakfläche}_{\text{Post-Spike-Lösung}}} * 100$$

Formel 8

$$\text{Prozesseffizienz [\%]} = \frac{\text{Peakfläche}_{\text{Kalibrierpunkt}}}{\text{Peakfläche}_{\text{Post-Spike-Lösung}}} * 100$$

Formel 9

Die Werte der Wiederfindung, der Prozesseffizienz und des Matrixeffekts der beiden Analyten IB und 7DIB sind für die vier untersuchten Konzentrations-Niveaus (0,05 ng/ml, 0,25 ng/ml, 1 ng/ml, 3 ng/ml) in Tabelle C.11 dargestellt. Im Mittel ließ sich für IB eine Wiederfindung von  $58,5 \pm 1,8$  %, ein Matrixeffekt von  $79,3 \pm 0,9$  % und eine Prozesseffizienz von  $46,4 \pm 1,1$  % berechnen. Die Wiederfindung von 7DIB betrug im Mittel  $48,8 \pm 0,1$  %, der Matrixeffekt  $79,0 \pm 0,5$  % und die Prozesseffizienz lag bei  $38,6 \pm 0,3$  %.

Tabelle C.11: Wiederfindung (%), Matrixeffekt (%) und Prozesseffizienz (%) der beiden Analyten IB ( $n = 3$ ) und 7DIB ( $n = 3$ ) an vier unterschiedlichen Konzentrations-Niveaus (MW  $\pm$  SD).

Analyt	Konzentrations-Niveau [ng/ml]	Wiederfindung (%)	Matrixeffekt (%)	Prozesseffizienz (%)
<b>IB</b>	0,05	$56,7 \pm 1,9$	$80,0 \pm 3,8$	$45,4 \pm 2,6$
	0,25	$59,1 \pm 2,1$	$78,5 \pm 0,9$	$46,4 \pm 1,4$
	1	$61,5 \pm 1,2$	$78,4 \pm 1,8$	$48,2 \pm 0,7$
	3	$56,7 \pm 1,0$	$80,4 \pm 2,0$	$45,6 \pm 0,5$
<b>7DIB</b>	0,05	$48,7 \pm 0,6$	$78,1 \pm 1,0$	$38,0 \pm 1,0$
	0,25	$48,8 \pm 1,9$	$79,3 \pm 1,3$	$38,7 \pm 0,9$
	1	$49,0 \pm 1,1$	$78,9 \pm 1,0$	$38,6 \pm 0,5$
	3	$48,9 \pm 1,1$	$79,5 \pm 2,5$	$38,9 \pm 0,7$

Die Wiederfindung eines Analyten beschreibt hier die Effizienz der Extraktionsmethode, die Prozesseffizienz dagegen beinhaltet die Gesamteffizienz einer analytischen Methode inklusive Extraktion und Vermessung. Bei der LC-MS/MS-Analytik ist zusätzlich der Matrixeffekt von Bedeutung. Dieser Effekt resultiert aus co-eluierenden Matrixkomponenten, welche die Ionisation des Analyten beeinflussen und in den meisten Fällen zu einer Ionensuppression führen [183]. Da zur Bestimmung der IB-Konzentrationen in LPM-Proben jeweils eine individuelle Kalibriergerade basierend auf derselben Probenmatrix angefertigt wurde (siehe 2.5.2), musste der hier ermittelte Matrixeffekt nicht weiter in die Berechnung der Konzentrationen mit einbezogen werden.

### 1.5.6 Stabilität

Zur Ermittlung der Stabilität wurden exemplarisch drei Blank-Lösungen (siehe 2.4.5) aus den Lungen-Perfusions-Experimenten 7, 8 und 9 herangezogen. Jeweils 1 ml davon wurde mit 100 ng IB (10 ng/ $\mu$ l IB, 10  $\mu$ l) versetzt und für 2 h bei 37 °C auf einem Schüttler inkubiert. Dabei entsprachen 2 h der maximalen Dauer eines Experimentes am Lungen-Perfusions-Modell. Anschließend wurden 50  $\mu$ l der Kalibrierlösung 0 (0 ng/ $\mu$ l IB, 2,5 ng/ $\mu$ l 7DIB) hinzugegeben und die Proben wurden wie unter 1.4 beschrieben aufgearbeitet. In einem zweiten Ansatz wurde ebenfalls drei Mal jeweils 1 ml Blank-Lösung mit 100 ng IB versetzt, jedoch ohne Inkubation direkt mit 50  $\mu$ l der Kalibrierlösung 0 versetzt und aufgearbeitet.

Nach der Vermessung der Proben wurden die Peakflächen-Verhältnisse (IB / 7DIB) der jeweiligen Proben (mit / ohne Inkubation) anhand des Kolmogorow-Smirnow-Test auf Normalverteilung überprüft ( $p = 0,3243$ , keine signifikante Abweichung von einer Normalverteilung). Durch einen zweiseitigen, gepaarten Student-t-Test (GraphPad PRISM® Software) wurde kein statistischer Unterschied zwischen den Proben mit und ohne Inkubation festgestellt ( $p = 0,6695$ ), es konnte somit von der Stabilität von IB in den LPM-Proben ausgegangen werden.

## 2 Pharmakokinetik von Ipratropiumbromid untersucht am humanen Lungen-Perfusions-Modell

### 2.1 Verwendete Reagenzien, Geräte und Materialien

#### 2.1.1 Substanzen

Ipratropiumbromid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
L-Carnitin-Hydrochlorid	
Ipratropium-d7-bromid	BIOZOL, Eching
Salbutamolsulfat	GlaxoSmithKline, Stevenage, England

#### 2.1.2 Applikationslösungen

Ipratropiumbromid (IB) zur Applikation an den humanen Lungenlappen wurde als Fertigpräparat Atrovent® N Dosier-Aerosol (Boehringer Ingelheim Pharma, Ingelheim am Rhein) in einer öffentlichen Apotheke erworben. Die darin enthaltene IB-Lösung in wasserfreiem Ethanol wurde durch ein handelsübliches Druckgas-Dosier-Aerosol in einer nominalen Menge von 20 µg IB pro Aerosolstoß appliziert [169].

Um L-Carnitin-Hydrochlorid (CAR) am Lungen-Perfusions-Modell (LPM) zu verabreichen, wurde eine wässrige 155 mM Lösung verwendet. Die CAR-Lösung wurde jeweils am Tag vor der geplanten Perfusion frisch hergestellt und über Nacht bei 4 – 8 °C gelagert. Dazu wurde die Substanz entsprechen eingewogen und in Millipore®-Wasser gelöst.

#### 2.1.3 Sonstige Reagenzien

Bovines Serumalbumin (BSA) Typ H1	GERBU Biotechnik, Heidelberg
Kaliumchlorid	Grüssing, Filsum
Kaliumdihydrogenphosphat	
Glucose Monohydrat	
Magnesiumsulfat Hexahydrat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natriumchlorid	
Natriumcarbonat	
Magnesiumsulfat	
Acetonitril, LC-MS-grade	
Ameisensäure 50 %, LC-MS-grade	
Calciumchlorid Dihydrat	ACROS Organics, Geel, Belgien
Bondensil-PSA	Agilent Technologies, Waldbronn

Wasser, LC-MS-grade	VWR, Ismaning
Methanol, LC-MS-grade	
Kohlenstoffdioxid in Gasflasche, 50 L	Linde, München

Das Millipore®-Wasser wurde aus einer hauseigenen Wasseraufbereitungsanlage Milli-Q® Synthesis (Merck Millipore, Darmstadt) gewonnen. Heparin-Natrium-5000-ratiopharm® (Ratiopharm, Ulm) wurde von einer öffentlichen Apotheke bezogen, eine Lösung mit Penicillin G (10000 U/ml) und Streptomycin (10000 µg/ml) in Wasser für Injektionszwecke wurde von Biochrom (Berlin) erworben.

#### 2.1.4 Perfusionspuffer

Für jede geplante Perfusion wurden 2 L Perfusionspuffer am Vortag der Perfusion nach Gnadl et al. [150] in den folgenden Endkonzentrationen hergestellt:

Bovines Serumalbumin (BSA) Typ H1	5 % (m/V)
Kaliumchlorid	3,5 mM
Kaliumdihydrogenphosphat	2,5 mM
Magnesiumsulfat Hexahydrat	1,18 mM
Calciumchlorid Dihydrat	2,5 mM
Natriumchlorid	85 mM
Glucose Monohydrat	5,5 mM

Dazu wurden bovines Serumalbumin und die Salze entsprechend eingewogen und in circa 70 % des Endvolumens mit Millipore®-Wasser gelöst. Vor der Zugabe von Heparin-Natrium 2500 U/L und Penicillin/Streptomycin 10000 U/L / 10000 µg/L wurde der pH mit 10-prozentiger Natriumcarbonat-Lösung auf circa 7,0 eingestellt, um eine Stabilität der Antibiotika und des Heparins zu gewährleisten. Anschließend wurde das Volumen ad 90 % mit Millipore®-Wasser ergänzt und der pH auf 7,4 adjustiert. Der letzte Schritt beinhaltete das Auffüllen auf 100 % des Volumens mit Millipore®-Wasser und die Umfüllung in Glasflaschen zu 1,5 L und 0,5 L. Die Lagerung erfolgte über Nacht bei 4 – 8 °C.

#### 2.1.5 LC-MS/MS-System

Zur Quantifizierung des IB-Gehaltes in den am humanen Lungen-Perfusions-Modell (LPM) gewonnenen Proben wurde das in 1.1.3 beschriebene LC-MS/MS-System verwendet.

### 2.1.6 Sonstige Geräte

Feinwaage, AB204-S/PH	Mettler Toledo, Greifensee, Schweiz
FiveGo™ pH-Meter mit pH-Elektrode LE438	
Analysenwaage, CPA 22D	Sartorius, Göttingen
VarioMag® Elektronikrührer mono	H + P Labortechnik, Oberschleißheim
Beatmungsgerät Evita 4	Dräger Medical, Lübeck
VentView Software Version 01.01	
Notebook, Latitude D436	Dell, Round Rock, USA
Kompressor, Elektra Beckum Power 150	Elektra Beckum – Purkart Systemkomponenten, Großröckerswalde
Fisons DC3, Thermostat für Wasserbad	Haake, Karlsruhe,
Pumpe Ecoline VC-280	Idex, Wertheim
Pumpe MCP mit Pro-280 Pumpenkopf	
Invasives Blutdruckmesssystem, CODAN Xtrans®	CODAN Medizinische Geräte, Lensahn
Multiparameter Monitor, Siemens SC 9000	Siemens Healthcare, Erlangen
Inhalationsgerät PARI Boy® SX mit PARI LC SPRINT Düsenaufsatz	PARI, Starnberg
Gefrierschrank profi line, -20 °C,	Liebherr, Biberach an der Riß
Gefrierschrank HERAfreez, -80 °C	Heraeus, Hanau
Zentrifuge, Kendro Megafuge 1.0 R	
Zentrifuge, Microfuge 22 R	Beckmann Coulter, Krefeld
Zentrifuge, 5702	Eppendorf, Hamburg
Pipetten, Eppendorf Research® plus 0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl	
Vortex 2 Genie	VWR, Ismaning
Multi-Tube Vortexer	

### 2.1.7 Materialien

Einweg-Skalpell, steril	megro, Wesel
Nahtmaterial PROLENE und VICRYL	Ethicon, Norderstedt
Silikon-Schlauch für Bronchus, Ø 8 mm, Wanddicke 2 mm	WITEG Labortechnik, Wertheim
Spitzkolben aus Glas, 5 ml, NS 14,5/23	
PVC-Einmalkatheter mit Nelatonspitze, 40 cm, Charrière (CH) 10-18	B. Braun, Melsungen
LS-4-Verbinder zur Simultaninfusion	
Verlängerungsleitung für Infusionssysteme, 30 cm	
Dreiwegehahn Discifix®-3	
Oxygenator Quadrox-i adult	Maquet, Rastatt

Verbindungsstück mit Luer-Kupplung, Ø 6 mm	neoLab, Heidelberg
Verbindungsstück beidseitig, Ø 6 – 8 mm	
Plastik-Schlauch für Pumpe, Tygon® ST Standard Typ C; Ø 6,4 mm, Wanddicke 1,6 mm	Ismatec, Wertheim
Pasteur-Pipette, 3,5 ml, 151 mm	VWR, Ismaning
Serologische Pipette, steril, 10 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Schraubröhre 15 ml, 120 x 17 mm, Spitzboden, aus Polypropylen, steril	
Mikro-Schraubröhre 2 ml, aus Polypropylen, steril	
Schraubröhre 50 ml, 115 x 28 mm, aus Polypropylen, steril	
Reagiergefäß 1,5 ml, aus Polypropylen, mit anhängendem Deckel	
Parafilm M®	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA
2 ml Vial	Phenomenex, Aschaffenburg

Flüssiger Stickstoff und Trockeneis zur Lagerung wurde in Großmengen von Linde (München) bezogen.

## 2.2 Humanes Lungengewebe

Zur Untersuchung der Pharmakokinetik von Ipratropiumbromid nach Applikation am humanen Lungen-Perfusions-Modell wurden Lungenlappen von insgesamt zwölf Patienten verwendet. Die Patienten wurden im Thoraxzentrum Bezirk Unterfranken (Münnerstadt) rekrutiert und operiert. In die Studie eingeschlossen wurden Patienten ab 18 Jahren, die an einem resektablen Bronchialkarzinom litten und welchen im Rahmen der Behandlung ein oder mehrere Lungenlappen entnommen werden mussten. Als Ausschlusskriterien wurden ‚Pneumonie‘, ‚andere infektiöse Erkrankungen‘ wie beispielsweise Tuberkulose oder Hepatitis C sowie ein ‚zentral sitzendes Bronchialkarzinom mit nachgeschalteter Atelektase oder hypoxischen Lungenarealen‘ definiert. Des Weiteren durften die Patienten in der Woche vor der Operation nicht mit einem Beta-2-Sympathomimetikum oder einem Anticholinergikum behandelt worden sein um die Beobachtungen bezüglich der Pharmakokinetik des Ipratropiumbromids nicht zu beeinflussen. Die Patienten wurden durch den jeweiligen behandelten Arzt sorgfältig aufgeklärt, erhielten zusätzlich schriftliche Informationen zum Hintergrund und zur Durchführung der Studie und gaben vor der Operation ihr schriftliches Einverständnis entsprechend der Deklaration von Helsinki [317]. Das Studienprotokoll wurde

von der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg geprüft und genehmigt.

Nach Versuchsende wurden den Lungenlappen jeweils circa 5 g Gewebe aus dem peripheren, tumorfreien Lungenparenchym entnommen. Bei dieser Entnahme wurde sichergestellt, dass es jeweils zu keiner Beeinträchtigung der anschließenden Begutachtung des Tumorgewebes durch den Pathologen kam.

## 2.3 Versuchsaufbau des Lungen-Perfusions-Modells

Der Aufbau des Lungen-Perfusions-Modells wurde nach *Lindner et al.* [147] modifiziert und ist in Abbildung C.7 dargestellt.

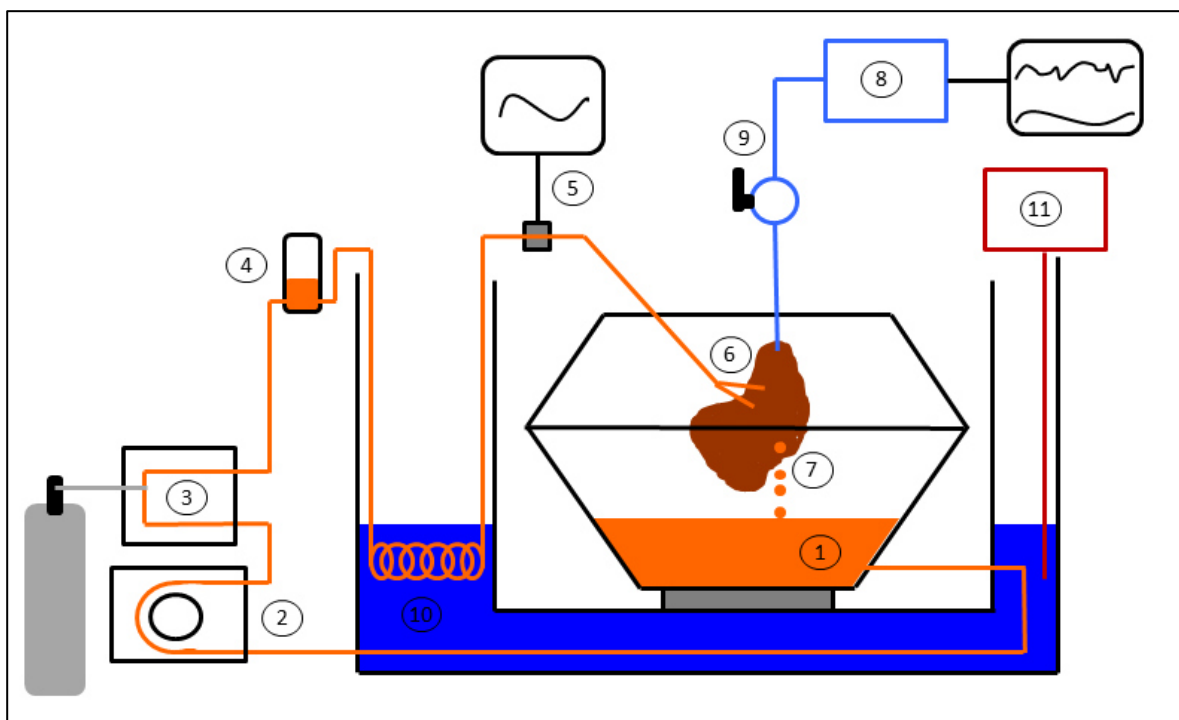


Abbildung C.7: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zum Lungen-Perfusions-Modell: Aus dem Reservoir (1) wurde über eine Pumpe (2), einen Oxygenator (3) mit potentieller CO<sub>2</sub>-Zufuhr, eine Luftfalle (4) sowie ein invasives Blutdruckmesssystem (5) die Perfusionsflüssigkeit in den katheterisierten Lungenlappen (6) gepumpt, das Perfusat trat am venösen Ausgang (7) wieder aus. Die Ventilation des Lungenlappens erfolgte über ein Beatmungsgerät (8), das an ein externes Notebook angeschlossen war. Über die Applikationshilfe (9) konnten Substanzen direkt in die Luftströmung appliziert werden. Die Temperaturierung der Perfusionsflüssigkeit erfolgte über eine Glas-Spirale im Wasserbad (10), welches über ein Thermostat (11) auf 37 °C erwärmt wurde.

Mit einem halboffenen Perfusionskreislauf sollte der physiologische Blutkreislauf nachgestellt werden. In ein Reservoir wurden dabei genau 1,5 L des am Tag zuvor hergestellten Perfusionspuffers (siehe 2.1.4) gefüllt. Durch ständiges Rühren unter Zuhilfenahme eines Magnetrührers war eine homogene Verteilung der gelösten Substanzen im Reservoir sichergestellt. Eine Pumpe beförderte die Perfusionsflüssigkeit vom Reservoir zu einem Oxygenator, der bei Bedarf zum Adjustieren des pH-Wertes Kohlenstoffdioxid ( $\text{CO}_2$ ) in Gas-Form in die Perfusionsflüssigkeit einspeisen konnte. Anschließend wurde die Perfusionsflüssigkeit in eine Luftfalle aus Glas gepumpt, die verhindern sollte, dass in dem Perfusat gelöste Luftblasen in die Gefäße des Lungenlappens gelangen und dort einen embolischen Verschluss auslösen konnten. Über eine Glas-Spirale in einem Wasserbad, das kontinuierlich auf 37 °C temperiert wurde, wurde auch die Perfusionsflüssigkeit entsprechend erwärmt und gelangte anschließend an ein invasives Blutdruckmesssystem, das an einen Multiparameter-Monitor angeschlossen war. Eine kontinuierliche Beobachtung des Druckes innerhalb des Perfusionskreislaufes war somit sichergestellt. Schließlich wurde die Perfusionsflüssigkeit über katheterisierte Arterien in den Lungenlappen gepumpt und nach erfolgreicher Perfusion des Gewebes trat das Perfusat am geöffneten venösen Ausgang des Lungenlappens aus und konnte wieder im Reservoir gesammelt werden. Die Anzahl der katheterisierten Arterien variierte dabei zwischen 1 und 4, je nach Art des Lungenlappens. Zum Teil wurden statt einem Lungenlappen auch zwei oder drei der insgesamt fünf im menschlichen Körper vorhandenen Lungenlappen perfundiert, was allerdings keinerlei Auswirkungen auf den Ablauf der Perfusion hatte.

Um eine adäquate Belüftung des Lungenlappens sicherzustellen wurde der jeweilige Lappenbronchus, im Fall der Perfusion von mehreren Lappen gegebenenfalls der entsprechende Hauptbronchus, über einen luftdicht angenähten Silikonschlauch beatmet. Dazu wurde ein externer Kompressor an das Evita 4 Beatmungsgerät angeschlossen, welches wiederum die definierte Luftabgabe an den Lungenlappen reglementierte. Zwischen das Beatmungsgerät und den Lungenlappen wurde ein Glas-Spacer installiert, welcher als Applikationshilfe fungierte, indem über eine dritte Öffnung Substanzen direkt in die Luftströmung appliziert werden konnten. Beispielsweise konnten handelsübliche Druckgas-Dosier-Aerosole über ein Verbindungsstück luftdicht an den Glas-Spacer angeschlossen und somit Arzneistoff-Formulierungen verabreicht werden. Die Ventilationsparameter konnten durch Verknüpfung eines Notebooks mit dem Beatmungsgerät während des ganzen Versuches mittels der Software VentView aufgezeichnet werden.



## **2.4 Durchführung der Untersuchungen am humanen Lungen-Perfusions-Modell (LPM)**

### **2.4.1 Versuchsvorbereitungen und Präparation des Lungenlappens**

Die Versuche wurden jeweils direkt in einem separaten Raum des Thoraxzentrums Bezirk Unterfranken in MÜNNERSTADT durchgeführt, um den zeitlichen Abstand zwischen der Entnahme des Lungengewebes und der Reventilation möglichst gering zu halten. Zum gleichen Zweck wurden bereits alle Vorbereitungen des Experiments während der Operation des Patienten getroffen: Das System wurde aufgebaut, indem alle Bestandteile (Reservoir, Pumpe, Oxygenator, Luftfalle, Glas-Spirale im Wasserbad und Druckmesssystem) über Plastikschläuche zu einem halboffenen Kreislauf verbunden wurden. 1,5 L Perfusionspuffer wurden in das Reservoir gefüllt und die Zirkulation der Flüssigkeit gestartet, um eine Erwärmung auf 37 °C vor Beginn des Experimentes zu gewährleisten. Zusätzlich wurde in das Reservoir eine pH-Elektrode eingebracht, die eine jederzeitige Kontrolle und eventuelle Adjustierung des pH-Wertes der Perfusionsflüssigkeit ermöglichte.

Um auch eine möglichst schnelle Wieder-Beatmung des Lungenlappens zu ermöglichen wurde bereits vor Beginn der LPM-Versuche der Kompressor an das Beatmungsgerät angeschlossen, die entsprechenden Ventilationsparameter eingestellt und das Notebook zur Datenaufzeichnung mit dem Beatmungsgerät verknüpft. Des Weiteren wurde die Applikationslösung vorbereitet indem das Atrovent® N Dosier-Aerosol einmal, wie laut Fachinformation [169] empfohlen, in die Luft ausgelöst und anschließend luftdicht an den Glas-Spacer angebracht wurde. Im Falle der zuvor stattfindenden Applikation der L-Carnitin-Lösung mittels des Inhalationsgeräts PARI-Boy® wurde dieser ebenfalls vorbereitet und die CAR-Lösung in den Vernebler gefüllt. Der Vernebler wurde anschließend luftdicht an den Glas-Spacer fixiert und nach der CAR-Applikation gegen das Atrovent® N Dosier-Aerosol ausgetauscht.

Unmittelbar nach der erfolgreichen Entnahme des Lungenlappens durch das Operations-Team wurde der Lungenlappen in den Versuchsraum gebracht und mit der Präparation begonnen. Zunächst musste sichergestellt werden, dass sich keine Sekrete oder Blutgerinnsel in den oberen Atemwegen befanden, damit es zu keiner anschließenden Blockade der Beatmung kam. Als erster Präparationsschritt wurde ein circa 20 cm langes Stück eines Silikon-Schlauches möglichst luftdicht in den Haupt- oder Lappenbronchus genäht (siehe Abbildung C.8). Dabei musste berücksichtigt werden, dass während der Perfusion das gesamte Gewicht des Lungenlappens über diese Aufhängung getragen werden musste.

Der nächste Schritt beinhaltete die Öffnung aller arteriellen Zugänge und venösen Ausgänge, die zuvor zur Resektion vom Chirurgen vernäht wurden. Die arteriellen Eingänge wurden mit Einmalkathetern passender Größe (Charrière (CH) 10 – 18) katheterisiert

und anschließend vernäht (siehe Abbildung C.8). Je nach Art und Lage des Lungenlappens wurden 1 – 4 Arterien zur Perfusion herangezogen.

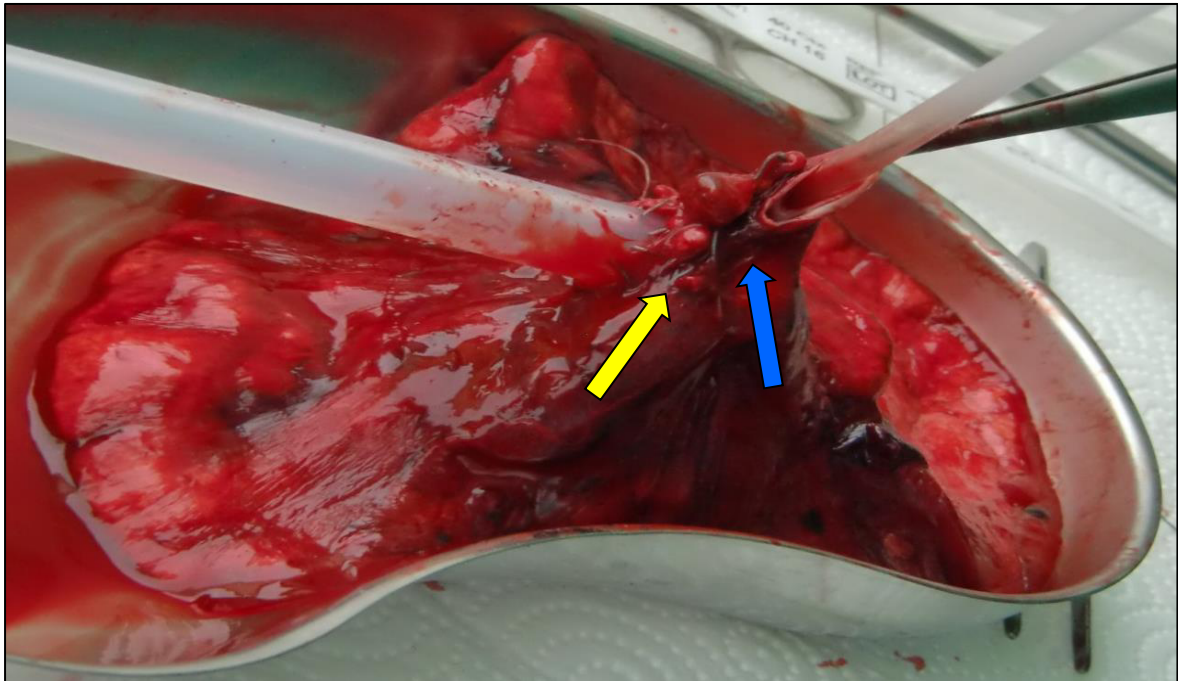


Abbildung C.8: Bild eines Lungenlappens bei der Präparation. Zu erkennen ist der bereits an den Bronchus angenähte Silikonschlauch (gelber Pfeil) und ein noch nicht vernähter arterieller Zugang mit Katheter (blauer Pfeil).

Die Katheter wurden zunächst über einen LS-4-Verbinder mit einer externen Pumpe verknüpft. Der Lungenlappen wurde nun mit 0,5 L Perfusionspuffer perfundiert, um zu sicherzustellen, dass das Perfusat den Lungenlappen am venösen Ausgang wieder verlässt. Zusätzlich konnte man anhand der Entfärbung des Gewebes, hervorgerufen durch das partielle Auswaschen des Blutes, erkennen, ob alle Teile des Lungenlappens von der Perfusionsflüssigkeit erreicht wurden.

Nach Fertigstellung der Präparation wurde das Gewicht des Lungenlappens ermittelt und der Lungenlappen in das System eingebaut. Die durchschnittliche Zeit von der Entnahme des Lungengewebes bis zur Fertigstellung der Präparation betrug  $65 \pm 15$  min (MW  $\pm$  SD).

### 2.4.2 Perfusions- und Ventilationsparameter

Zu Beginn der Perfusion wurde das Lungenlappen-Präparat für 5 min perfundiert um eine Äquilibration des Systems zu ermöglichen. Die Flussrate der Perfusionsflüssigkeit wurde dem Präparat dabei so angepasst, dass der Perfusionsdruck optimaler Weise in einem Bereich von 20-40 mmHg lag. Als weiterer Perfusionsparameter wurde der pH-Wert des Perfusionspuffers während der Perfusion in geeigneten Abständen bestimmt. Gegebenenfalls konnte er durch die Zugabe von CO<sub>2</sub> über den Oxygenator oder durch die Zugabe von einer Natriumcarbonat-Lösung direkt in die Perfusionsflüssigkeit reguliert werden. Die mittleren Werte der Perfusionsparameter sind in Tabelle C.12 aufgeführt.

Tabelle C.12: Mittelwerte und Standardabweichungen der Perfusionsparameter Flussrate, Perfusionsdruck und pH-Wert aus 12 Perfusionen.

Perfusionsparameter	Mittelwert	Standardabweichung
Flussrate	111,5 ml/min	10,1 ml/min
Perfusionsdruck	30,5 mmHg	9,5 mmHg
pH-Wert	7,54	0,12

Die Beatmung der präparierten Lungenlappen erfolgte im BiPAP (Biphasic Positive Airway Pressure) – Modus, wobei abwechselnd ein hoher Druck zur Inspiration und ein niedriger Druck zur Expiration generiert wurde. Dazu wurde die Atemfrequenz auf 15/min festgelegt, mit einer Inspirationszeit ( $T_{\text{insp}}$ ) von 1,7 s und einer dementsprechenden Expirationszeit ( $T_{\text{exp}}$ ) von 2,3 s. Weiterhin wurden zu Beginn der Ventilation sowohl der positive end-expiratorische Druck (PEEP) auf 1 mbar als auch der maximale Druck ( $P_{\text{Peak}}$ ) auf 20 mbar eingestellt. Als *positiver end-expiratorischer Druck* (PEEP) wird dabei der Druck bezeichnet, der am Ende der Expirationsphase in der Lunge vorliegt. Der PEEP dient hauptsächlich dazu, die Ausbildung von Lungenatelektasen zu verhindern [318].

In Abhängigkeit von der Größe, dem Gewicht und der Art der Lungenlappen-Präparation stellten sich nach einigen Minuten Beatmung weitere Ventilationsparameter, wie das Atemminutenvolumen, das expiratorische Tidalvolumen sowie die Lungen-Compliance und die Resistance ein. Unter der Compliance versteht man die Dehnbarkeit der Lunge, die als Veränderung des Lungenvolumens in Bezug auf den notwendigen inspiratorischen Druck definiert ist [318]. Resistance beschreibt den Flusswiderstand der Lunge, der sich bei Verringerung des Durchmessers der Luftwege stark erhöhen kann [318]. Diese Parameter wurden während der gesamten Perfusion aufgezeichnet um eventuelle Unregelmäßigkeiten während der Beatmung erkennen zu können. Die Mittelwerte der Ventilationsparameter sind in Tabelle C.13 dargestellt.

Tabelle C.13: Mittelwerte und Standardabweichungen der Ventilationsparameter aus 11 Perfusionen. Bei einer Perfusion konnten die Daten wegen eines Software-Fehlers nicht aufgezeichnet werden. PEEP = positiver end-expiratorischer Druck;  $P_{Peak}$  = maximaler Druck.

Ventilationsparameter	Mittelwert	Standardabweichung
PEEP	1,02 mbar	0,06 mbar
$P_{Peak}$	20,24 mbar	0,43 mbar
Atemminutenvolumen	4,40 L/min	2,32 L/min
expiratorisches Tidalvolumen	0,302 L	0,125 L
Compliance	22,1 mL/mbar	11,6 mL/mbar
Resistance	43,7 mbar/L/s	12,3 mbar/L/s

### 2.4.3 Applikation von Ipratropiumbromid (IB)

Nachdem konstante Perfusions- und Ventilationsparameter erreicht wurden, konnte mit der Applikation von IB aus dem Atrovent® N Dosier-Aerosol begonnen werden. Wichtig war es darauf zu achten, das Dosier-Aerosol vor Beginn der Inspirations-Phase auszulösen, um eine möglichst hohe Deposition des Aerosols in den Atemwegen erzielen zu können. Pro Hub wurde eine Nominalmenge von 20 µg IB freigesetzt [169]. Zwischen zwei Auslösungen wurde ein Abstand von 2 – 3 Atemzyklen gewahrt. Es wurden drei Perfusionen mit Applikation von 100 µg IB Nominalmenge und sechs Perfusionen mit 40 µg IB Nominalmenge durchgeführt.

Nach Ende der Perfusion wurden das Dosieraerosol, die Verbindungsstücke, der Glas-Spacer sowie die Silikonschlauch-Verbindungen zum Bronchus sorgfältig mit Parafilm umhüllt, um am darauffolgenden Tag die tatsächlich deponierte Dosis bestimmen zu können.

### 2.4.4 Applikation von L-Carnitin (CAR) mit anschließender Applikation von Ipratropiumbromid (IB)

Zur Untersuchung einer potentiellen Inhibition der Verteilung von IB in die Perfusionsflüssigkeit wurden zusätzlich drei Experimente mit vorheriger Vernebelung einer CAR-Lösung und anschließender IB-Applikation durchgeführt. Die Vernebelung der 155 mM CAR-Lösung (Konzentration  $c = 25$  mg/ml, siehe 2.1.2) erfolgte mit Hilfe des Inhalationsgerät PARI Boy® SX mit PARI LC SPRINT Vernebler mit blauem Düsenaufsatz, der einen medianen Massendurchmesser der Aerosol-Tröpfchen von 3,5 µm mit einer totalen *Output Rate* von 600 mg/min generierte [319]. Die Applikation verlief über 10 Minuten ( $t$ ), indem die Unterbrecher-Taste am Vernebler jeweils vom Ende der Expirationszeit ( $T_{exp}$ ) bis zum Ende der Inspirationszeit ( $T_{insp}$ ) betätigt wurde und somit das CAR-Aerosol direkt in die Luftströmung appliziert wurde. Unter der Annahme, dass die wässrige CAR-Lösung eine

Dichte ( $\rho$ ) von 1 g/ml aufwies, konnte die verabreichte CAR-Dosis mit Formel 10 näherungsweise berechnet werden.

$$Dosis_{CAR} = t * \frac{T_{insp}}{(T_{insp} + T_{exp})} * Output\ Rate * \frac{c}{\rho}$$

Formel 10

Dementsprechend belief sich die applizierte CAR-Dosis näherungsweise auf 63,75 mg. Die Applikation von IB erfolgte nach Austausch des PARI LC SPRINT Verneblers gegen das Atrovent® N Dosier-Aerosol an der Applikationshilfe wie in 2.4.3 beschrieben.

### 2.4.5 Probengewinnung

Unmittelbar vor IB-Applikation wurden aus dem Reservoir 20 ml des bereits durch die Lungenlappen-Präparation zirkulierten Puffers als Blank-Lösung (Leerwertkontrolle der Matrix) entnommen und mit auf Raumtemperatur (RT) temperierten frischen Perfusionspuffer ersetzt. Die Blank-Lösung diente als Grundlage für die spätere Herstellung der individuellen Kalibriergerade (siehe 2.5.2). Neben den Bestandteilen des Perfusionspuffers (Zusammensetzung siehe 2.1.4) enthielt jede Blank-Lösung individuelle Anteile an in der Präparation verbliebenem Donor-Blut sowie aus dem perfundierten Lungengewebe freigesetzte Biomoleküle, wie beispielsweise Prostaglandin E<sub>2</sub> [150].

Die weitere Probenentnahme erfolgte direkt aus dem venösen Ausgang mit Hilfe einer Pasteur-Pipette zum Einmalgebrauch. Zu folgenden Zeitpunkten wurden jeweils 6 ml des Perfusats entnommen und das Volumen direkt im Anschluss mit frischem Perfusionspuffer (RT) ersetzt:

-2 min	6 min	20 min	35 min	60 min
0 min	10 min	25 min	40 min	80 min
3 min	15 min	30 min	50 min	

Der Zeitpunkt *-2 min* markierte dabei den Start der IB-Applikation, der Zeitpunkt *0 min* das Ende der IB-Applikation. Nicht alle Perfusionen konnten bis zum Zeitpunkt *80 min* durchgeführt werden, da es während der Durchführung zu Ödem-Bildungen im Gewebe kam. Fünf der zwölf Perfusionen wurden aus diesem Grund bereits nach 60 min beendet. Die entnommenen Perfusions-Proben wurden direkt zu 1,5 ml aliquotiert und zum Transport auf Trockeneis gestellt. Nach Beendigung der Perfusionen wurden den Lungenlappen jeweils

zwei Gewebestücke (circa 5 g) aus den tumorfreen Lungen-Arealen entnommen und ebenfalls zum Transport auf Trockeneis gelagert. Unmittelbar nach der Rückkehr ins Institut wurden alle Proben mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und im Anschluss bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

## 2.5 Probenaufarbeitung und Vermessung mittels LC-MS/MS-Analytik

### 2.5.1 Probenaufarbeitung von Lungen-Perfusions-Modell (LPM)-Proben

Wie bereits unter 1.4 beschrieben, wurde zur Aufarbeitung der Proben aus den Experimenten am LPM eine Proteinfällung mittels Acetonitril (ACN) und anschließend eine dispersive Festphasenextraktion (dSPE) verwendet (Methode 4). Der genaue Ablauf der Probenaufarbeitung ist in Abbildung C.9 dargestellt:

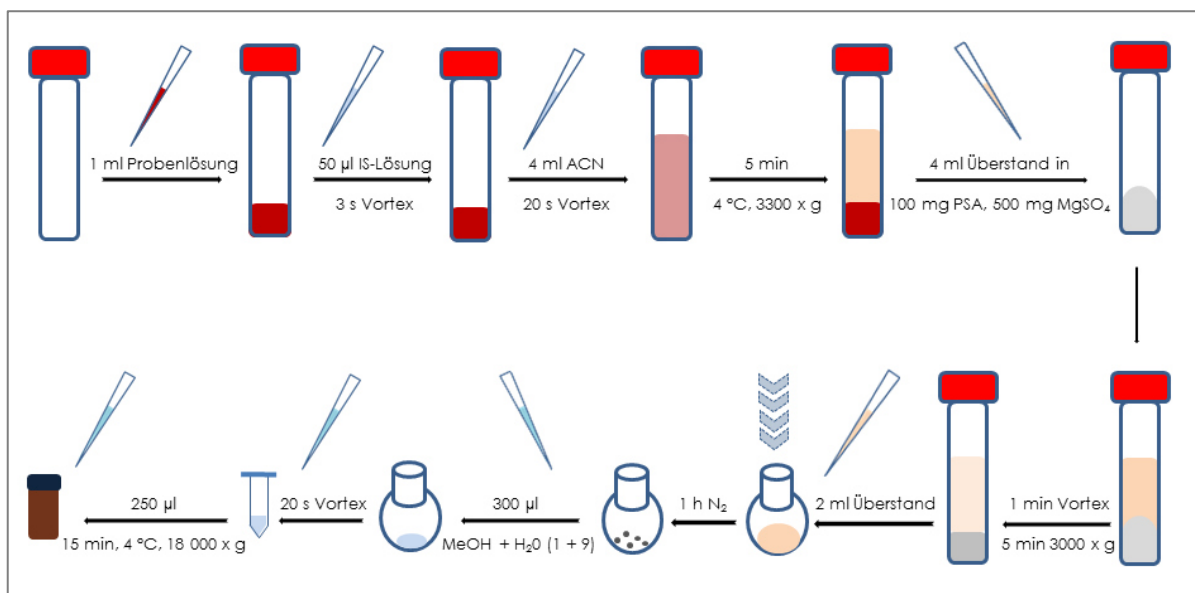


Abbildung C.9: Schematische Darstellung der Probenaufarbeitung von LPM-Proben: Zu 1 ml Probenlösung wurden 50 µl Interner Standard (IS)-Lösung pipettiert, nach Proteinfällung mit 4 ml ACN und anschließendem Zentrifugieren wurden 4 ml des Überstandes mit 100 mg PSA und 500 mg Magnesiumsulfat durchmischt und erneut zentrifugiert. 2 ml des Überstandes wurden 1 h bei Raumtemperatur unter einem Stickstoffstrom eingedampft und mit 300 µl MeOH + H<sub>2</sub>O (1 + 9 (V/V)) wieder aufgenommen. Nach erneutem Zentrifugieren wurden 250 µl des Überstandes in ein 2 ml Vial zur Vermessung überführt.

Je 1 ml der zu verschiedenen Zeitpunkten am venösen Ausgang entnommenen Proben wurde in eine 15 ml – Röhre überführt und mit 50 µl einer methanolischen Ipratropium-d7-

bromid (7DIB)-Lösung (0,05 ng/ $\mu$ l) versetzt und vermischt. 7DIB fungierte dabei als Interner Standard in der Probenlösung bei einem Konzentrations-Niveau von 2,5 ng/ml (siehe 1.3). Durch Zugabe von 4 ml ACN und anschließender Zentrifugation (5 min, 4 °C, 3300 x g) wurden störende Proteine aus der Probenlösung entfernt. 4 ml des resultierenden Überstandes wurden in eine neue, mit 100 mg PSA und 500 mg Magnesiumsulfat befüllte 15 ml – Röhre überführt. Durch das Durchmischen der Probe mit den Salzen für 1 min auf dem Multi-Tube Vortexer, wurden sowohl primäre und sekundäre Amine gebunden, als auch Wasser adsorbiert und die Probe somit für die Analytik aufgereinigt. Nach Zentrifugation für 5 min bei 3000 x g (RT) wurden 2 ml des Überstandes weiter verwendet und in einen Spitzkolben aus Glas überführt. Für 1 h wurde bei Raumtemperatur unter einem Stickstoffstrom evaporiert bis zur vollständigen Verdampfung der flüssigen Komponenten. Der Probe wurden 300  $\mu$ l MeOH + H<sub>2</sub>O (1 + 9 (V/V)) hinzugefügt, der Inhalt des Spitzkolben für 20 s mittels Vortex vermischt und anschließend in ein 1,5 ml – Reagiergefäß überführt. Durch Zentrifugieren bei 4 °C für 15 min bei 18 000 x g wurden eventuell vorhandene Schwebteile aus der Probe entfernt. Zuletzt wurden 250  $\mu$ l des Überstandes in ein 2 ml Vial überführt und bis zur Vermessung am LC-MS/MS-System bei -20 °C gelagert.

### **2.5.2 Individuelle Kalibriergerade**

Um die Kalibrierfunktion der analytischen Methode trotz möglicher unterschiedlicher Zusammensetzung der Matrices zu gewährleisten, wurde am gleichen Tag der Aufarbeitung der Proben aus einem LPM-Versuch die dazugehörige Blank-Lösung (siehe 2.4.5) als Matrix zur Erstellung einer individuellen Kalibriergeraden herangezogen. Dazu wurde jeweils 1 ml dieser Lösung nach dem in Tabelle C.14 aufgeführten Schema mit 50  $\mu$ l einer methanolischen Kalibrierlösung in elf unterschiedlichen IB-Konzentrationen versetzt. Jede Kalibriergerade bestand demnach aus elf Kalibrierpunkten in einem Bereich von 0 – 5 ng/ml IB. Als Interner Standard lag 7DIB jeweils bei einem Konzentrations-Niveau von 2,5 ng/ml in der Probenlösung vor (siehe 1.3). Diese Kalibrierpunkte wurden analog zu den Proben aus den LPM-Experimenten aufgearbeitet (siehe 2.5.1) und bis zur Vermessung bei -20 °C gelagert.

Tabelle C.14: Konzentrationen der Ipratropiumbromid (IB) / Ipratropium-d7-bromid (7DIB) – Kalibrierlösungen (jeweils 50 µl wurden zu 1 ml Probenlösung zugegebenen) sowie die Konzentrations-Niveaus von IB und 7DIB in den Probenlösungen der elf Kalibrierpunkte (KP).

Kalibrierpunkt	IB / 7DIB - Konzentration der Kalibrierlösung [ng/µl]	IB / 7DIB – Konzentrations-Niveau [ng/ml]
KP 0	0 / 0,05	0 / 2,5
KP 0,01	0,0002 / 0,05	0,01 / 2,5
KP 0,05	0,001 / 0,05	0,05 / 2,5
KP 0,1	0,002 / 0,05	0,1 / 2,5
KP 0,25	0,005 / 0,05	0,25 / 2,5
KP 0,5	0,01 / 0,05	0,5 / 2,5
KP 1	0,02 / 0,05	1 / 2,5
KP 2	0,04 / 0,05	2 / 2,5
KP 3	0,06 / 0,05	3 / 2,5
KP 4	0,08 / 0,05	4 / 2,5
KP 5	0,1 / 0,05	5 / 2,5

Nach der analytischen Vermessung mittels LC-MS/MS-Methode wurde anhand der Quotienten der Peakflächen von IB und 7DIB die Kalibriergerade für jede der insgesamt zwölf Perfusionen separat erstellt (siehe *Tabellarischer Anhang 2.1*). Die lineare Regressionsanalyse erfolgte mittels GraphPad Prism® Software unter Berücksichtigung der Formel 5. Für alle ermittelten individuellen Kalibriergeraden war das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  größer als 0,9994. Unter Einbezug der jeweiligen Geradengleichung wurde daraufhin jeweils die IB-Konzentration der untersuchten LPM-Probenlösungen bestimmt.

### 2.5.3 LC-MS/MS-Methode

Die unter 1.2 detailliert beschriebene LC-MS/MS-Methode wurde zur Analyse der IB-Konzentration in den LPM-Probenlösungen herangezogen. Die Probenlösungen und die entsprechenden Kalibrierpunkte wurden jeweils am gleichen Tag vermessen. Das Verhältnis der Peakflächen von IB zu 7DIB diente dabei als Ausgangspunkt zur Bestimmung der IB-Konzentration.

## 2.6 Bestimmung der tatsächlich deponierten Dosis

Da bei jeder Applikation von IB ein Teil der nominalen Dosis ( $Dosis_{\text{nominal}}$ ) an der Oberfläche des Glas-Spacers und der Silikon-Verbindungsschläuche adsorbierte ( $Dosis_{\text{adsorbiert}}$ ),



musste dieser Teil bestimmt und die daraus resultierende tatsächlich deponierte Dosis ( $Dosis_{deponiert}$ ) ermittelt werden (Formel 11).

$$Dosis_{deponiert} = Dosis_{nominal} - Dosis_{adsorbiert}$$

Formel 11

Bei der nominalen Dosis handelte es sich um die vom Hersteller deklarierte nominale Menge IB pro Hub (20  $\mu\text{g}$ ) [169] multipliziert mit der Anzahl der Hübe ( $Anzahl_{Hub}$ ) (Formel 12):

$$Dosis_{nominal} = 20 \mu\text{g} * Anzahl_{Hub}$$

Formel 12

Die adsorbierte Dosis wurde bestimmt, indem am Tag nach der Durchführung des Experiments am LPM 100  $\mu\text{g}$  Salbutamol (SB, als Salbutamolsulfat) in Form einer methanolischen Lösung (1 mg/ml; 100  $\mu\text{l}$ ) in die Applikationshilfe (Glas-Spacer, angeschlossene Verbindungsstücke und Silikon-Schläuche) gegeben und möglichst gleichmäßig verteilt wurde. Nachdem die Lösungsmittelrückstände vollständig verdampft waren, wurde die mit Parafilm verschlossene Verbindung aus Dosier-Aerosol und Applikationshilfe viermal mit 5 ml MeOH gewaschen, die Lösungen jeweils gesammelt und mit MeOH auf 25 ml ergänzt. Diese Lösung wurde bis zur Vermessung bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Zur Analyse wurden die Proben jeweils um den Faktor 1000 dementsprechend verdünnt, dass in der zu vermessende Lösung ein Lösungsmittelgemisch MeOH + H<sub>2</sub>O (1 + 9 (V/V)) und Ipratropium-d7-bromid (7DIB) als Interner Standard in einer in allen Proben konstanten Konzentration von 4 ng/ml vorlag. 1 ml dieser Lösung wurde in ein 2 ml Vial überführt und mittels LC-MS/MS Methode (siehe 1.2) analysiert.

Zur Quantifizierung der IB- und SB-Konzentration in der Lösung wurde eine Kalibriergerade mit 5 Kalibrierpunkten im Bereich von 0 – 4 ng/ml IB und SB erstellt und vermessen (Tabelle C.15). 7DIB fungierte dabei als Interner Standard für die LC-MS/MS-Analytik, SB wurde als weiterer Interner Standard herangezogen um den durch Waschen mit MeOH extrahierten Anteil der Wirkstoffe IB und SB aus Dosier-Aerosol, Glas-Spacer, Silikon-Schläuche und Verbindungsstücke zu ermitteln.

Tabelle C.15: Die Ipratropiumbromid (IB)- / Salbutamol (SB)- / Ipratropium-d7-bromid (7DIB)-Konzentrationen der fünf Kalibrierpunkte (KP) zur Bestimmung der adsorbierten IB-Dosis.

Kalibrierpunkt	IB / SB – Konzentration	7DIB – Konzentration
KP 0	0 ng/ml	4 ng/ml
KP 1	1 ng/ml	4 ng/ml
KP 2	2 ng/ml	4 ng/ml
KP 3	3 ng/ml	4 ng/ml
KP 4	4 ng/ml	4 ng/ml

Aus den Quotienten der Peakflächen von IB und 7DIB, respektive SB und 7DIB wurden die Kalibriergeraden durch lineare Regression mittels GraphPad Prism® Software unter Berücksichtigung der Formel 5 erstellt. Unter Einbezug der ermittelten Geradengleichungen wurden jeweils die Konzentrationen an IB und SB in den Probenlösungen bestimmt.

Der aus der SB-Konzentration der Proben aus 12 Perfusionen ermittelte extrahierte Anteil an SB (Formel 13) lag dabei bei  $65,5 \pm 3,9 \%$  (MW  $\pm$  SD), wobei die maximale SB-Konzentration je 4 ng/ml (100  $\mu$ g in 25 ml; 1:1000 verdünnt) war.

$$\text{extrahierter Anteil [\%]} = \frac{\text{bestimmte SB – Konzentration}}{\text{maximale SB – Konzentration}} * 100$$

Formel 13

Unter Berücksichtigung dieses extrahierten Anteils konnte durch die gemessene IB-Konzentration die adsorbierte IB-Dosis unter Einbezug der Verdünnungsfaktoren ermittelt werden (Formel 14).

$$\text{Dosis}_{\text{adsorbiert}} [\mu\text{g}] = \frac{\text{bestimmte IB – Konzentration}}{\text{extrahierter Anteil}/100} * 25 \text{ ml} * 1000$$

Formel 14

Wie in den Formel 11 und Formel 12 dargestellt, konnte somit für jede Perfusion die tatsächlich deponierte Dosis ermittelt werden (siehe Tabelle C.16).

Tabelle C.16: Der extrahierte Anteil [%], die adsorbierte IB-Dosis [ $\mu\text{g}$ ], die nominale IB-Dosis [ $\mu\text{g}$ ] und die daraus resultierende tatsächlich deponierte IB-Dosis [ $\mu\text{g}$ ] der 12 durchgeführten Perfusions-Experimente.

Perfusions-Experiment	Extrahierter Anteil [%]	Adsorbierte IB-Dosis [ $\mu\text{g}$ ]	Nominale IB-Dosis [ $\mu\text{g}$ ]	Tatsächlich deponierte IB-Dosis [ $\mu\text{g}$ ]
1	55.58	73.76	100	26.24
2	69.17	55.21	100	44.80
3	69.75	72.04	100	28.00
4	65.67	27.65	40	12.40
5	67.99	24.76	40	15.24
6	65.04	27.55	40	12.45
7	68.86	25.53	40	14.47
8	62.22	26.36	40	13.64
9	65.84	29.50	40	10.50
10	69.46	18.55	40	21.45
11	63.37	19.00	40	21.00
12	63.22	25.92	40	14.08

Aus diesen Werten lässt sich ableiten, dass im Mittel  $36,4 \pm 9,0$  % (MW  $\pm$  SD) der nominalen Dosis tatsächlich in den Atemwegen deponiert wurde. Um diese Tatsache zu berücksichtigen wurden alle gemessenen Werte der LPM-Proben auf die individuellen, tatsächlich deponierten Dosen normiert.

### 3 Entwicklung einer RT-qPCR-Methode zur Detektion der mRNA-Expression von Arzneistofftransportern

#### 3.1 Verwendete Reagenzien, Geräte und Materialien

##### 3.1.1 Primer

Die als Primer entworfenen Oligonukleotide zur Verwendung in der Genexpression-Analyse mittels SYBR® Green-RT-qPCR wurden von Eurofins MWG Synthesis GmbH (Ebersberg) jeweils individuell in einem Synthese-Maßstab von 0.01 µmol synthetisiert und salzfrei aufgereinigt.

##### 3.1.2 Reagenzien

Aqua ad injectabilia	AlleMan Pharma, Rimbach
iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Agarose LE	ACROS Organics, Geel, Belgien
Tris-Aminomethan (Tris) 99+ %	
Midori Green Lösung	Biozym Scientific, Oldendorf
6 x DNA Loading Dye	Thermo Fisher Scientific, Life technologies, Waltham, USA
GeneRuler 1 kb DNA Standard	
Borsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
EDTA-Dinatriumsalz Dihydrat	Carl Roth, Karlsruhe

##### 3.1.3 Geräte

Zentrifuge, 5415R	Eppendorf, Hamburg
Pipetten, Eppendorf Research® plus, 0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl	
Gefrierschrank profi line, -20 °C,	Liebherr, Biberach an der Riß
Magnetrührer mit Heizplatte, MR 3002S	Heidolph Instruments, Schwabach
Gelelektrophorese-System, 40-0708	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen
Spannungsgeber, Electrophoresis power supply EPS 301	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Vortex 2 Genie	VWR, Ismaning
Gel-Dokumentations-System, GeneFlash	Syngene, Cambridge, England
Mx3005P qPCR System mit MXPro Software	Agilent Technologies, Stratagene Products Division La Jolla, USA

### 3.1.4 Materialien

Mikro-Schraubröhre 2 ml, aus Polypropylen, steril	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitze mit Filter, Biosphere® plus, 0,1 – 20 µl, 2 – 100 µl, 50 – 1250 µl	
PCR-Reagiergefäße, Multiply®-µStripPro 8er Kette mit anhängendem Deckel, 0,2 ml	
96 Well Multiply® PCR-Platte, randlos	
Multiply® 8er Deckelkette mit flachen Deckeln	

## 3.2 Primer-Design

Für die in Tabelle C.17 aufgeführten Arzneistofftransporter (detaillierte Beschreibung siehe Einleitung 1.3 und 1.4) sollte das passende Primer-Paar zur Amplifizierung der cDNA-Stränge und Detektion mittels RT-qPCR-Methode gefunden werden.

*Tabelle C.17: Gen-Kürzel und Protein-Synonyme der relevanten Arzneistofftransporter mit den jeweiligen Identifikationsnummern der Gene Datenbank (Gene ID [28]), den Kennungen der Nukleotide Datenbank der zugehörigen mRNA (NCBI Referenz-Sequenzen [320]) und der Nukleotid-Anzahl der entsprechenden mRNA-Sequenzen.*

Protein-Synonym	Gen-Kürzel	Gene ID	NCBI Referenz-Sequenz (mRNA)	Nukleotid-Anzahl der mRNA-Sequenz
OCT1	SLC22A1	6580	NM_003057.2 (Transkript Variante 1)	1921
OCT2	SLC22A2	6582	NM_003058.3	2512
OCT3	SLC22A3	6581	NM_021977.3	3245
OCTN1	SLC22A4	6583	NM_003059.2	2214
OCTN2	SLC22A5	6584	NM_003060.3 (Transkript Variante 2)	3295
PEPT2	SLC15A2	6565	NM_021082.3 (Transkript Variante 1)	5523
MDR1	ABCB1	5243	NM_000927.4	4718
MRP1	ABCC1	4363	NM_004996.3	6564
MRP5	ABCC5	10057	NM_005688.2 (Transkript Variante 1)	5851

Zur relativen Quantifizierung der Arzneistofftransporter mussten zusätzlich Referenz-Gene herangezogen werden, dementsprechend wurden auch für eine Auswahl an in Frage kommender Gene [121, 128, 321] nach passenden Primer-Paaren gesucht (Tabelle C.18).

Beta-Aktin (ACTB) kodiert für eine zytoplasmisch vorkommende Isoform des Strukturproteins Aktin, welches zur Stabilisierung des Zytoskeletts beiträgt, Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) ist ein Schlüsselenzym der Glykolyse und die ribosomale 18 S RNA ist Teil der kleinen Untereinheit (40 S) der Ribosomen [28, 121]. Das Gen Ubiquitin C (UBC) kodiert für Ubiquitin, welches, konjugiert an Proteine, unter anderem zur Regulierung der Transkription dient (siehe Allgemeiner Teil 4.1) [28]. Das HPRT1-Gen kodiert für die Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase, die am Stoffwechsel der Purinbasen beteiligt ist und das Gen SDHA kodiert für die Untereinheit A der Succinat-Dehydrogenase, welche ein Schlüsselenzym des Citratzyklus und der Atmungskette ist [28, 121].

Tabelle C.18: Potentielle Referenz-Gene mit den jeweiligen Identifikationsnummern der Gene Datenbank (Gene ID [28]), den Kennungen der Nukleotide Datenbank der zugehörigen mRNA (NCBI Referenz-Sequenzen [320]) und der Nukleotid-Anzahl der entsprechenden mRNA-Sequenzen.

Kürzel	Gene ID	NCBI Referenz-Sequenz (RNA)	Nukleotid-Anzahl der mRNA-Sequenz
ACTB	60	NM_001101.3	1852
GAPDH	2597	NM_002046.4 (Transkript Variante 1)	1401
18 S RNA	100008588	NR_003286.2	1869
UBC	7316	NM_021009.5	2594
HPRT1	3251	NM_000194.2	1435
SDHA	6389	NM_004168.2	2405

Zunächst wurden sowohl über die *Nukleotide* Datenbank [320] als auch über die *Gene* Datenbank [28] Informationen bezüglich Länge, FASTA-Schreibweise und Transkript-Varianten der mRNA-Sequenzen von Transportern und Referenz-Genen gesammelt. Falls zu einem Target mehr als eine Transkript-Variante bekannt war, wurde diejenige Variante mit der längeren mRNA-Sequenz beziehungsweise diejenige Variante, die für das häufiger vorkommende Protein kodiert, für die weiteren Untersuchungen ausgewählt. Mit Hilfe der Suchmaschine *Primer-BLAST* [322] welche die Suchoptionen der Programme *Primer 3* [323] und *BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)* [324] kombinierte, wurden zu den oben genannten NCBI Referenz-Sequenzen jeweils potentiell geeignete Primer-Paare mit den folgenden Kriterien ermittelt:

PCR-Produktgröße:	70 – 200 bp
Primer-Schmelztemperatur (T <sub>m</sub> ):	57,0 °C – 63,0 °C; Optimum: 60 °C
Exon-Spanne:	Primer muss Exon-Exon-Schnittstelle einschließen

Intron-Einschluss:	Primer-Paar muss durch mindestens ein Intron der korrespondierenden genomischen DNA getrennt sein
Spezifitäts-Check:	Suche nach für das PCR-Target spezifischen Primer-Paaren
Primer-Größe [Basen]:	15 – 25; Optimum: 20
Primer GC-Gehalt:	35 % - 65 %
Maximale Selbst-Komplementarität:	5 bp
Maximale Paar-Komplementarität:	2 bp

Für die Detektion der Genexpression mittels SYBR® Green-Farbstoff war eine PCR-Produktgröße von maximal 200 Basenpaaren (bp) empfehlenswert, da darüber hinaus die Effizienz einer PCR (siehe *Einleitung* 2.3.2) deutlich abnimmt. Die Schmelztemperatur der Primer-Oligonukleotide sollte optimaler Weise bei 60 °C liegen, da bei dieser Temperatur auch die verwendete Polymerase ihre optimalen Bedingung hatte, eine geringe Abweichung war jedoch möglich. Indem die Primer eine Exon-Exon-Schnittstelle überspannten, wurde kontrolliert, dass die Amplifikation nur für cDNA, nicht aber für genomische DNA stattfand. Nach Möglichkeit waren die Primer-Paare zusätzlich durch mindestens ein Intron auf der korrespondierenden genomischen DNA getrennt, um gegebenenfalls leicht zwischen einer Amplifikation von mRNA und genomischer DNA unterscheiden zu können, da das Produkt nach Amplifikation der letzteren wesentlich größer war. Die für Primer optimale Größe lag bei 20 Basen, mit einem Anteil an Guanin und Cytosin (GC-Gehalt) von 35 % - 65 %. Dabei sollte die maximale Selbst- und Paar- Komplementarität möglichst gering gehalten werden, um eine Bildung von Sekundärstrukturen und Primer-Dimerisierungen zu verhindern. Aus den vorgeschlagenen möglichen Primer-Paaren wurden diejenigen mit der geringsten theoretischen Selbst-Komplementarität beziehungsweise diejenigen Paare mit den geringsten berechneten Temperatur-Unterschieden in der Schmelztemperatur der Oligonukleotid-Sequenzen ausgewählt.

Zusätzlich wurde die Datenbank *RTPrimerDB* [325] auf bereits publizierte und evaluierte Primer-Paare für die entsprechenden Target-Sequenzen durchforstet. Sowohl die entworfenen als auch die publizierten Sequenzen wurden anschließend im online verfügbaren Programm *OligoArchitect™* [326] erneut auf theoretische Sekundär-Strukturen oder potentielle Primer-Dimerisierung überprüft und gegebenenfalls ausgeschlossen. Anschließend wurde über das ebenfalls online verfügbare Programm *Multifunctional Oligo Property Scan (MOPS)* [327] eine virtuelle PCR durchgeführt, welches erneut über die theoretische Berechnung von möglichen Sekundärstrukturen, Primer-Dimerisierung und Unterschieden in der Schmelztemperatur die entworfenen Oligonukleotid-Sequenzen auf einen unbedenklichen Einsatz in der RT-qPCR-Technik überprüfte.

Durch die Überprüfungen in drei unterschiedlichen Programmen sollte die Gefahr des praktischen Versagens der ausgewählten Primer-Sequenzen so gering wie möglich gehalten werden. Nach den beschriebenen theoretischen Optimierungen wurden schließlich die in Tabelle C.19 aufgeführten Oligonukleotid-Sequenzen zur individuellen Synthese in Auftrag gegeben.

Tabelle C.19: Forward- (FW) und Reverse- (RW) Sequenzen der ausgewählten Primer mit der jeweiligen Basen-Länge, der Schmelztemperatur ( $T_m$ ), dem Molekulargewicht (MW) und dem Guanin/Cytosin- (GC) Gehalt sowie der theoretischen PCR-Produkt-Länge. A = Adenin, C = Cytosin, G = Guanin, T = Thymin.

Kürzel		Sequenz (5' → 3')	Länge [Basen]	$T_m$ [°C]	MW [g/mol]	GC- Gehalt	Produkt- Länge
OCT1	FW	TCTCCATCGTCACTGAGTTCAAC	24	61,0	7238	45,8 %	85 bp
	RW	AGAAGCCCGCATTCAAACAG	20	57,3	6104	50,0 %	
OCT2	FW	CGGCTACTAACATCTGGCT	20	59,4	6052	55,0 %	150 bp
	RW	TCTGGTCTTGCATAATTTCCGGC	24	59,3	7306	41,7 %	
OCT3	FW	GCCCTGTCCAGCAATAAGA	20	57,3	6085	50,0 %	110 bp
	RW	GAGAGCCAAAATGTCCCAA	20	55,3	6128	45,0 %	
OCTN1	FW	TACCTCGGTGCTTACAACAGAATG	24	61,0	7336	45,8 %	200 bp
	RW	ACCTTGGGATTTTCTTCTGTCTCC	24	61,0	7251	45,8 %	
OCTN2	FW	TACTTCGTTTACCTTGGTGCCT	22	58,4	6658	45,5 %	182 bp
	RW	GTGTGACTTGGAGTTTTTCTGTGT	24	59,3	7426	41,7 %	
PEPT2	FW	TCTCCTGGTGTATGTGCTTGG	22	60,3	6754	50,0 %	191 bp
	RW	CCGTTCCCTGTCATGTTTTCTT	23	58,9	6913	43,5 %	
MDR1	FW	ACCTGTGAAGAGTAGAACATGAAGA	25	59,7	7772	40,0 %	148 bp
	RW	AATGTTCTGGCTTCCGTTGC	20	57,3	6089	50,0 %	
MRP1	FW	TCTCGAAACCATCCACGAC	20	59,4	6030	55,0 %	100 bp
	RW	CCCCGGACAATCAACCCTG	19	61,0	5702	63,2 %	
MRP5	FW	GGAAATCGTGCGGTCTTGGT	20	59,4	6204	55,0 %	187 bp
	RW	TGCCTCAAACATTCTCTGCC	21	59,8	6277	52,4 %	
ACTB	FW	TGAGCGCGGCTACAGCTT	18	58,2	5515	61,1 %	60 bp
	RW	TCCTTAATGTCACGCACGATT	22	56,5	6660	40,9 %	
GAPDH	FW	CGCTCTCTGCTCCTCCTGTT	20	61,4	5961	60,0 %	81 bp
	RW	CCATGGTGTCTGAGCGATGT	20	59,4	6164	55,0 %	
18 S RNA	FW	GCCTGCGGCTTAATTTGACT	20	57,3	6098	50,0 %	139 bp
	RW	ACCAGACAAATCGCTCCACC	20	59,4	5999	55,0 %	
UBC	FW	ATTTGGGTCGCGGTTCTTG	19	56,7	5856	52,6 %	133 bp
	RW	TGCCTTGACATTCTCGATGGT	21	57,9	6403	47,6 %	
HPRT1	FW	AGCCAGACTTTGTTGGATTGA	22	56,5	6780	40,9 %	189 bp
	RW	ACTGGCGATGTCAATAGGACT	21	57,9	6470	47,6 %	
SDHA	FW	AGACCTAAAGCACCTGAAGACG	22	60,3	6746	50,0 %	178 bp
	RW	CTCATCAATCCGCACCTTGTAGTC	24	62,7	7223	50,0 %	



Bei den Primer-Paaren von OCT1, OCT3, ACTB, GAPDH und UBC handelte es sich dabei um bereits in der Datenbank *RTPrimerDB* publizierte Sequenzen, die weiteren zehn Paare wurden mittels Primer-BLAST entworfen.

### 3.3 Test der Primer auf Signal-Spezifität

Um sicherzustellen, dass mit den gewählten Primer-Paaren eine spezifische Detektion des jeweiligen Targets erfolgte, wurden erste Vorversuche mit aus Calu-3-Zellen gewonnener cDNA (siehe 4.4) durchgeführt. Die entsprechenden Oligonukleotid-Sequenzen wurden dabei jeweils in einer 150 nM Konzentration in einem Ansatz von 20  $\mu$ l / Well eingesetzt und der RT-qPCR-Lauf erfolgte wie unter 4.5.3 detailliert beschrieben. Für MDR1 (ABCB1) konnte kein Fluoreszenz-Signal detektiert werden, das deutlich aus dem Grundrauschen austrat, weshalb dieses Primer-Paar von den weiteren Optimierungs-Schritten ausgeschlossen wurde.

Durch die Schmelzkurven der entstandenen DNA-Doppelstränge konnte abgeschätzt werden, ob die Amplifikation in nur einem einzigen Produkt resultierte (siehe *Einleitung* 2.3.1). Dazu wurde in einem Temperatur-Bereich von 55  $^{\circ}$ C – 95  $^{\circ}$ C die Fluoreszenz im Abstand von 0,5  $^{\circ}$ C in allen Wells parallel detektiert und gegen die Temperatur aufgetragen. Bei derjenigen Temperatur, an der es zu einer Trennung der DNA-Doppelstränge kam (Schmelztemperatur  $T_m$ ), konnte eine deutliche Reduktion der detektierten Fluoreszenz beobachtet werden (siehe Abbildung C.10 A), weil sich der SYBR<sup>®</sup> Green I-Farbstoff nur in doppelsträngige DNA einlagerte (siehe *Einleitung* 2.2.2).

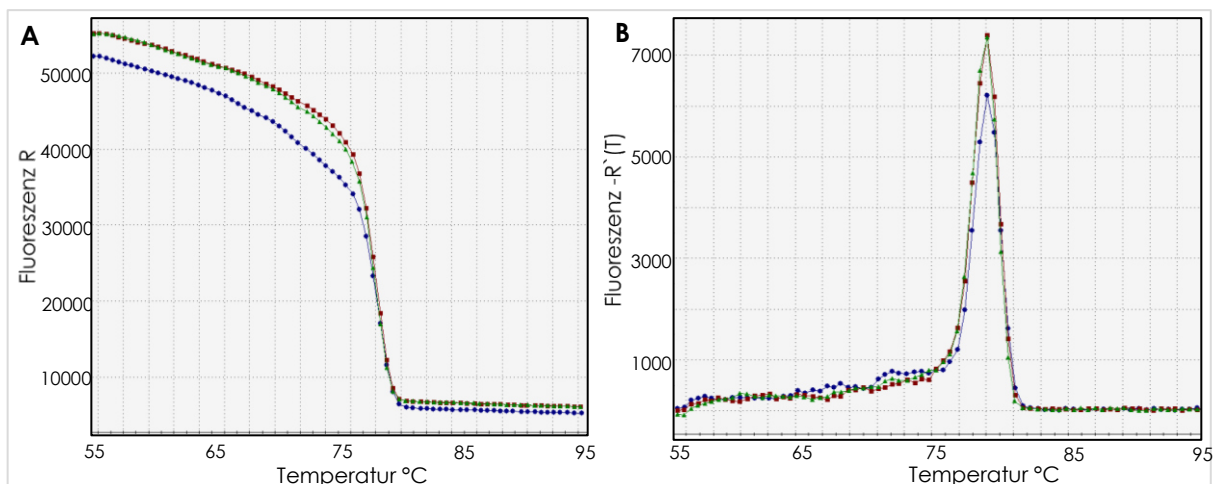


Abbildung C.10: Exemplarische Darstellung des Schmelzkurven-Verlaufs der OCT3-PCR-Produkte dreier unterschiedlicher cDNA-Ausgangskonzentrationen über den Temperaturbereich von 55  $^{\circ}$ C – 95  $^{\circ}$ C. **A:** Fluoreszenz  $R$  aufgetragen gegen die Temperatur. **B:** Negative erste Ableitung der Fluoreszenz ( $-R_n'(T)$ ) aufgetragen gegen die Temperatur. Der Peak der Ableitung lag bei 77,8  $^{\circ}$ C, der experimentell bestimmten Schmelztemperatur des OCT3-PCR-Produktes.

Da die Schmelztemperatur der DNA-Sekundär-Strukturen abhängig von Größe und prozentualem GC-Gehalt war, konnte sie für jedes entstandene PCR-Produkt spezifisch bestimmt werden (siehe *Tabellarischer Anhang 3.1*). Dazu wurde die negative erste Ableitung des Schmelzkurven-Verlaufes herangezogen (Abbildung C.10 B), welche die experimentell zu ermittelnde Schmelztemperatur als Peak des Graphen darstellte.

Falls allerdings die graphische negative erste Ableitung des Schmelzkurven-Verlaufs mehr als einen Peak ergab, musste davon ausgegangen werden, dass es zu unterschiedlichen Produkten während der PCR kam. Dies konnte zum einen durch unspezifische Amplifikation der eingesetzten cDNA, zum anderen durch Primer-Dimerisierung geschehen. Für die Primer-Paare von MRP5 und UBC konnte dieses Phänomen beobachtet werden (Abbildung C.11), weswegen diese beiden Primer-Paare für die weiteren Experimente ausgeschlossen wurden.

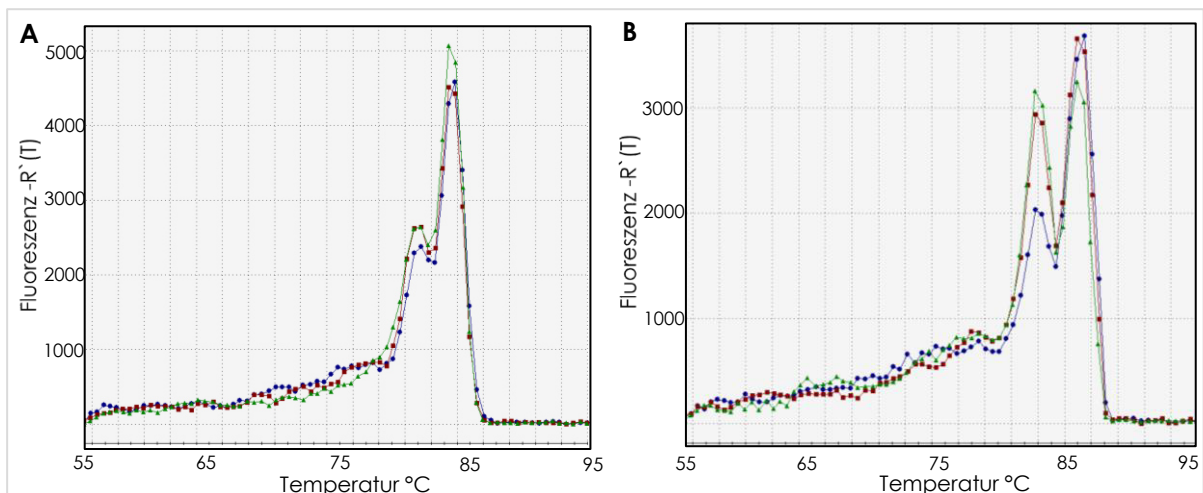


Abbildung C.11: Negative erste Ableitung der Fluoreszenz ( $-R'(T)$ ) aufgetragen gegen die Temperatur. **A:** Schmelzkurven-Verlauf der MRP5-PCR-Produkte dreier unterschiedlicher cDNA-Ausgangskonzentrationen. **B:** Schmelzkurven-Verlauf der UBC-PCR-Produkte dreier unterschiedlicher cDNA-Ausgangskonzentrationen. Beide Kurven wiesen mehr als einen Peak in der Schmelzkurve auf, was auf mehr als ein amplifiziertes PCR-Produkt schließen ließ.

Trotz Überprüfung der Schmelzkurve auf das Auftreten mehrerer Peaks konnte durch ein einziges Maximum in der Fluoreszenzkurve nicht ausgeschlossen werden, dass mehrere Produkte entstanden waren, die theoretisch den gleichen Schmelzpunkt zeigten. Deswegen wurden zusätzlich alle PCR-Produkte der verwendeten Primer-Paare auf einem 1,5-prozentigen Agarose-Gel, welchem 0,005 % Midori Green zur Detektion der DNA-Banden zugegeben wurde, getrennt. Die Elektrophorese erfolgte für 50 Minuten bei 120 V in TBE-Puffer (siehe 4.1.6) und die Auswertung der Banden wurde anschließend unter UV-Belichtung (280 nm) durchgeführt. Falls auf dem Gel für jedes PCR-Produkt nur eine Bande zu sehen war, konnte davon ausgegangen werden, dass die Amplifikation spezifisch für das Ziel-Gen erfolgt war.

### 3.4 Bestimmung der Reaktions-Effizienzen

Um die Expression unterschiedlicher Gene mittels RT-qPCR untereinander vergleichen zu können, ist es wichtig die Effizienz jeder spezifischen Reaktion zu kennen (siehe *Einleitung* 2.3.2). Diese wurde für alle verwendeten Primer-Paare über eine cDNA-Verdünnungsreihe bestimmt. Da keine exakten Ausgangskonzentrationen der jeweiligen cDNA-Sequenzen bekannt waren, erfolgte eine relative Auswertung über die entsprechenden Verdünnungsschritte. Als Ausgangsmaterial wurde in cDNA umgeschriebene RNA in fünf Konzentrationen einer 1:10-Verdünnungsreihe ( $V_1 = 1:10 - V_5 = 1:100000$ ) verwendet. Für jedes spezifische Primer-Paar wurden die entsprechenden Oligonukleotid-Sequenzen jeweils in einer 225 nM Konzentration in einem Ansatz von 20  $\mu$ l / Well eingesetzt und der RT-qPCR-Lauf erfolgte wie unter 4.5.3 detailliert beschrieben. Im Idealfall wiesen die Kurvenverläufe  $C_T$ -Werte im Abstand von 2,3 Zyklen auf (Abbildung C.12 A), was mit der exponentiellen Zunahme an DNA im Verlauf einer PCR korrelierte ( $\ln 10 = 2,3$ ). Aus dem Auftragen der erzielten  $C_T$ -Werte gegen die x-fache Verdünnung ließ sich durch lineare Regression eine Kalibriergerade bestimmen (siehe Abbildung C.12 B), aus deren Steigung die Effizienz der PCR für jedes Primer-Paar berechnet wurde (siehe *Einleitung* Formel 3, *Tabellarischer Anhang* 3.1).

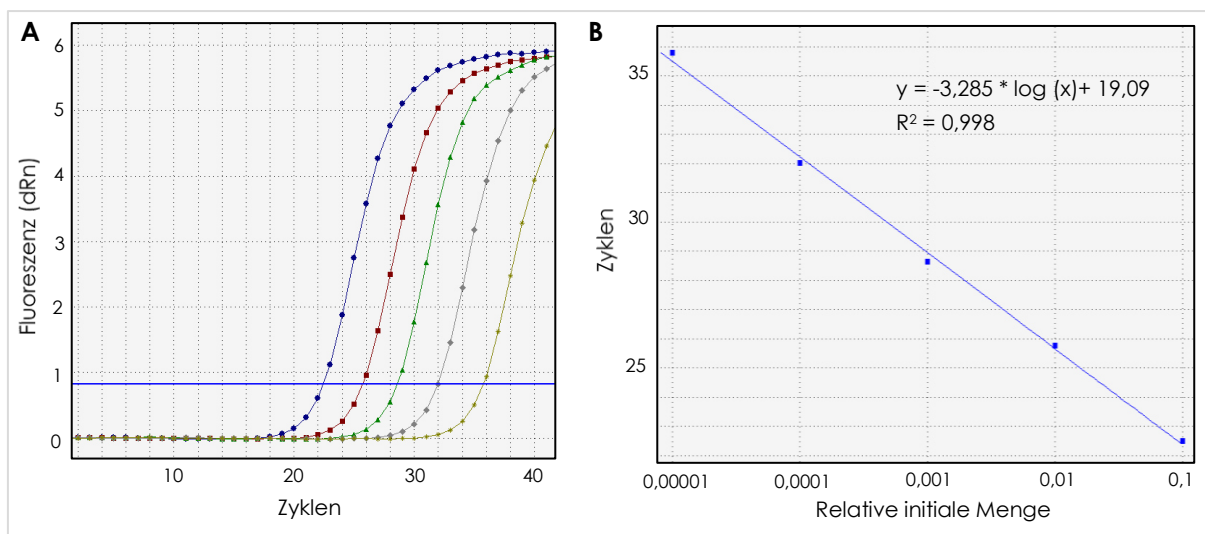


Abbildung C.12: Exemplarische Darstellung von **A**: optimal verlaufenden Amplifikations-Kurven einer cDNA-Verdünnungsreihe,  $V_1 = 1:10$  (blau) –  $V_5 = 1:100000$  (gelb), von GAPDH und **B**: der daraus resultierenden Kalibriergeraden mit einer Geradengleichung von  $y = -3,285 * \log (x) + 19,09$  und  $R^2 = 0,998$ . Die daraus berechnete Effizienz betrug 101,6 %.

Allerdings wiesen nicht alle Primer-Paare die dem Optimum entsprechenden fünf Amplifikations-Kurven mit  $C_T$ -Werten im Abstand von 2,3 Zyklen auf, ein Minimum an drei 1:10-Verdünnungsschritten ( $V_1$ - $V_3$ ) sollte allerdings nach MIQE-Guidelines [26] zu detek-

tieren sein. Aus diesem Grund mussten auch die Primer-Paare von OCT1 und OCT2 von den weiteren Optimierungs-Schritten ausgeschlossen werden, da lediglich bei Einsatz der höchsten cDNA-Ausgangsmenge ein Fluoreszenz-Signal zu detektieren war und eine zuverlässige Analyse von eingesetzter cDNA über eine größere Konzentrations-Spanne somit nicht zu gewährleisten war.

### 3.5 Optimierung der Primer-Konzentrationen

Zur Ermittlung der optimalen Primer-Konzentrationen wurde für jedes Oligonukleotid-Paar die effektivste Menge an den entsprechenden Forward- (FW) und Reverse- (RW) Sequenzen experimentell nach dem in Tabelle C.20 dargestellten Schema ermittelt. Pro Well wurden entweder 1  $\mu$ l, 2  $\mu$ l oder 3  $\mu$ l der beiden Oligonukleotid-Lösung (2  $\mu$ M) pipettiert und mit Aqua ad injectabilia auf 9  $\mu$ l ergänzt. Zusätzlich wurden pro Well 10  $\mu$ l iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix und 1  $\mu$ l cDNA-Lösung aus Calu-3-Zellen eingesetzt, was einen Gesamt-Ansatz von 20  $\mu$ l/Well ergab. Daraus resultierten Endkonzentrationen der Oligonukleotid-Sequenzen von 100 nM, 200 nM und 300 nM. Der RT-qPCR-Lauf erfolgte wie unter 4.5.3 beschrieben.

Tabelle C.20: Pipettierschema zur Ermittlung der optimalen Konzentrationen an FW- und RW-Primer-Sequenzen. Je senkrechter Reihe wurden unterschiedliche Volumina (1  $\mu$ l, 2  $\mu$ l, 3  $\mu$ l) einer 2  $\mu$ M FW-Oligonukleotid-Lösung pipettiert, je waagrechter Reihe entsprechend unterschiedliche Volumina (1  $\mu$ l, 2  $\mu$ l, 3  $\mu$ l) einer 2  $\mu$ M RW-Oligonukleotid-Lösung. Die daraus resultierenden Endkonzentrationen pro Well waren zwischen 100 nM und 300 nM je Oligonukleotid-Sequenz.

	<b>1 <math>\mu</math>l FW</b> (2 $\mu$ M)	<b>2 <math>\mu</math>l FW</b> (2 $\mu$ M)	<b>3 <math>\mu</math>l FW</b> (2 $\mu$ M)
<b>1 <math>\mu</math>l RW</b> (2 $\mu$ M)	100 nM FW + 100 nM RW	200 nM FW + 100 nM RW	300 nM FW + 100 nM RW
<b>2 <math>\mu</math>l RW</b> (2 $\mu$ M)	100 nM FW + 200 nM RW	200 nM FW + 200 nM RW	300 nM FW + 200 nM RW
<b>3 <math>\mu</math>l RW</b> (2 $\mu$ M)	100 nM FW + 300 nM RW	200 nM FW + 300 nM RW	300 nM FW + 300 nM RW

Für die Primer-Paare von OCTN1, OCTN2, ACTB, GAPDH und 18 S RNA wurde beim Einsatz von 300 nM FW-Primer und 300 nM RW-Primer die niedrigsten  $C_T$ -Werte (siehe *Tabellarischer Anhang 3.2*) und somit die besten Ergebnisse erzielt, ohne durch zu hohe Primer-Konzentrationen unerwünschte Primer-Dimere oder Sekundärstrukturen zu bilden. Beim Einsatz von 300 nM FW- / 200 nM RW-Primer zeigten die Oligonukleotid-Paare von OCT3 und PEPT2 die niedrigsten  $C_T$ -Werte, die Primer-Paare von HPRT1 und SDHA wiesen bei 200 nM FW- / und 300 nM RW-Primer die geringsten  $C_T$ -Werte auf. Lediglich das MRP1-Primer-Paar zeigte bei einer Konzentration von 200 nM FW- / 200 nM RW-Primer das beste Ergebnis. Da allerdings die Unterschiede der niedrigsten  $C_T$ -Werte zu denjenigen der maximalen Primer-Konzentrationen von 300 nM FW / 300 nM RW vernachlässigbar gering waren ( $\Delta C_T < 0,5$ ) wurden alle Primer zur besseren Vergleichbarkeit für alle weiteren Untersuchungen mit der optimierten Konzentration von 300 nM / Well je Oligonukleotid-Sequenz eingesetzt.

### 3.6 Referenz-Gen-Validierung

Um sicherzustellen, dass die Referenz-Gene (Housekeeping-Gene) durch die Versuchsbedingungen hinsichtlich ihrer Expression (Up- oder Down-Regulation) nicht beeinflusst wurden, sollte eine Validierung von fünf potentiellen Referenz-Genen stattfinden (siehe *Einleitung 2.3.3*). Zur Validierung der Referenz-Gen-Expression in humanem Lungengewebe wurden drei unterschiedliche Gewebeproben herangezogen, die jeweils im biologischen Duplikat untersucht wurden. Die RNA-Isolierung und cDNA-Synthese erfolgte für die Gewebeproben wie unter 5.3 und 5.4 näher beschrieben. Um die konstante Expression der Referenz-Gene in Calu-3-Zellen zu untersuchen wurden insgesamt acht unterschiedliche Proben verwendet: Zwei Proben wurden aus unbehandelten Calu-3-Monolayern (13 bzw. 21 Tage Wachstum) isoliert, zwei Proben wurden nach Inkubation mit Testosteron (35 nM bzw. 50 nM über 21 Tage) gewonnen, zwei Proben nach Inkubation mit Estradiol (1 nM bzw. 50 nM über 21 Tage) und zwei Proben nach Inkubation mit Carnitin (50  $\mu$ M bzw. 150  $\mu$ M über 72 Stunden). Die Inkubation der Calu-3-Zellen erfolgte wie unter 4.3 detailliert beschrieben, die RNA-Isolierung und cDNA-Synthese wie unter 4.4 dargestellt.

Sowohl für die Proben aus Gewebe als auch für die Proben aus Zellen wurden jeweils 1000 ng RNA in cDNA umgeschrieben und unmittelbar vor der Vermessung 1:10 mit Aqua ad injectabilia verdünnt. Pro Well wurden 10 ng in cDNA umgeschriebene RNA eingesetzt, die Vermessung erfolgte für jede Probe im fünffachem Replikat und der RT-qPCR-Lauf erfolgte wie unter 4.5.3 erklärt. Für jedes der fünf potentiellen Referenz-Gene wurden alle Proben sowie eine Verdünnungsreihe ( $V_1 = 1:10$ ;  $V_2 = 1:100$ ;  $V_3 = 1:1000$ ;  $V_4 = 1:10000$ ;  $V_5 = 1:100000$ ) im Triplikat und eine NTC (no-template control =  $H_2O$ ) im Duplikat auf einer Platte gemeinsam vermessen. Die Effizienz der PCR wurde für jedes Primer-Paar unter

Einbezug der  $C_T$ -Werte der zugehörigen Verdünnungsreihe nach Formel 3 (siehe *Einleitung* 2.3.3) bestimmt.

Die Mittelwerte der gemessenen  $C_T$ -Werte aller Proben wurden unter Berücksichtigung der ermittelten Effizienz anschließend mittels BestKeeper Software [127] analysiert. Dabei wurden die Werte aus Gewebeproben und diejenigen aus Calu-3-Zellen separat betrachtet, da eine gleichmäßige Expression der Gene zwischen Gewebe und Zellen nicht vorausgesetzt werden konnte.

Eine wiederholte paarweise Korrelations- und Regressions-Analyse der einzelnen Referenz-Gene gegen das ermittelte geometrische Mittel aller eingesetzten Referenz-Gene (= BestKeeper) zeigte für SDHA bei Betrachtung der Werte aus Zellen keine signifikante Korrelation ( $r = 0,480$ ,  $p = 0,229$ ), weshalb SDHA als stabil exprimiertes Referenz-Gen für die Zellkultur-Versuche ausgeschlossen wurde. Alle weiteren untersuchten Gene wiesen eine signifikante Korrelation ( $p < 0,05$ ) zum BestKeeper-Wert auf (siehe *Tabellarischer Anhang* 3.3.1) und waren damit als Referenz-Gene zur Genexpressions-Analyse in Calu-3-Zellen geeignet, da von einer konstanten Expression ausgegangen werden konnte. Darüber hinaus bot die Software die Möglichkeit, die untersuchten Referenz-Gene hinsichtlich ihrer konstanten Expression in allen Proben zu bewerten. Dazu wurde die intrinsische Varianz jeder Probe berechnet und als x-fache Über- oder Unterexpression in Bezug auf den mittleren Wert der Referenz-Gene ausgedrückt [29]. Alle Zellkultur-Proben zeigten untereinander eine hohe Proben-Integrität, das heißt die  $C_T$ -Werte der untersuchten Proben wichen je untersuchtem Primer-Paar nur geringfügig voneinander ab.

Bei Betrachtung der untersuchten Gewebeproben zeigte eine wiederholte paarweise Korrelations- und Regressions-Analyse der einzelnen Referenz-Gene gegen BestKeeper für alle fünf untersuchten Gene eine signifikante Korrelation (siehe *Tabellarischer Anhang* 3.3.2) und somit waren alle potentiell zur Genexpressions-Analyse aus humanem Lungengewebe geeignet. Allerdings war die Proben-Integrität der untersuchten Gewebe-Proben zum Teil wesentlich schlechter, was auf das inhomogene Ausgangsmaterial zurückzuführen war.

Da der experimentelle Aufwand beim Einsatz von mehreren Referenz-Genen ebenfalls stieg, sollten lediglich drei Referenz-Gene zur Normalisierung der  $C_T$ -Werte aus Zellkultur-Experimenten und Untersuchungen im Lungengewebe verwendet werden. Wegen des Ausschlusses von SDHA als Referenz-Gen zur relativen Quantifizierung der Genexpression in Zellkultur-Versuchen sollte SDHA zur besseren methodischen Vergleichbarkeit bei Untersuchungen des humanen Lungengewebes ebenfalls nicht zum Einsatz kommen. Aus den verbleibenden vier potentiell geeigneten Referenz-Genen wurden schließlich ACTB, GAPDH und 18 S RNA ausgewählt und für alle weiteren Versuche verwendet. Zwar zeigte 18 S RNA verglichen zu den drei weiteren Genen tendenziell eine geringere Korrelation

zum ermittelten BestKeeper-Wert, allerdings variierten die  $C_T$ -Werte der untersuchten Lungengewebs-Proben beim Einsatz der 18 S RNA-Primer mit Abstand am wenigsten. Des Weiteren kamen ACTB, GAPDH und 18 S RNA am häufigsten als Referenz-Gene bei RT-qPCR-Experimenten zum Einsatz, was eine Vergleichbarkeit zu anderen Ergebnissen möglich machte.

Angesichts der Tatsache, dass lediglich drei individuelle Lungengewebsproben jeweils im biologischen Replikat vermessen wurden, war die Übertragbarkeit auf alle untersuchten Gewebeproben nicht per se gegeben. Zudem bestand bezüglich der Proben-Integrität teilweise eine Einschränkung, weswegen im Anschluss an die Vermessungen der Arzneistofftransporter-Expression in humanem Lungengewebe die drei detektierten Referenz-Gene noch einmal hinsichtlich ihrer konstanten Expression in allen Proben verifiziert wurden (siehe 5.6.3).

## 4 Einfluss von Sexualsteroidhormonen auf die mRNA-Expression von Arzneistofftransportern

### 4.1 Verwendete Reagenzien, Geräte und Materialien

#### 4.1.1 Calu-3 Zellkulturlinie

Für nachfolgend beschriebene Untersuchungen wurde die humane Epithel-Zelllinie Calu-3 herangezogen. Die adhärenzte Zellkulturlinie wurde aus dem Lungen-Adenokarzinom eines 25-jährigen kaukasischen Mannes gewonnen, der zuvor einer Therapie mit Cyclophosphamid, Bleomycin und Doxorubicin unterzogen wurde [213]. Die Zelllinie wurde freundlicherweise von Dr. Carsten Ehrhardt (Trinity College Dublin, School of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences, Dublin, Irland) zur Verfügung gestellt.

#### 4.1.2 Substanzen

17- $\beta$ -Estradiol-Hemihydrat	Fagron, Rotterdam, Niederlande
Testosteron	Fluka, Buchs, Schweiz
Progesteron	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
L-Carnitin-Hydrochlorid	

#### 4.1.3 Kits

High Pure RNA Isolation Kit	Roche Diagnostics, Rotkreuz, Schweiz
Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit	
iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Venor® GeM Mycoplasma Detection Kit	Biochrom, Berlin

#### 4.1.4 Primer

Es wurden die in 3.2 detailliert beschriebenen Oligonukleotide als spezifische Primer zur Detektion der Genexpression von Transportern und Referenz-Genen verwendet.



#### 4.1.5 Sonstige Reagenzien

Minimum Essential Medium Eagle (MEM) mit Earle's Salzen, L-Glutamin und Natriumbikarbonat, steril filtriert	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
D-Glucose 45 %	
Dekontaminierung-Reagenz, RNase AWAY®	
Borsäure	
Nicht essenzielle Aminosäuren 100x Konzentrat	Biochrom, Berlin
Natriumpyruvat 100 mM	
Penicillin G (10000 U/ml) / Streptomycin (10000 µg/ml) in Wasser für Injektionszwecke	
Fetales Kälberserum (FBS)	
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	
Trypsin / EDTA (0,25 %/0,02 %) in PBS	
Trypanblau 0,5 % (m/v)	
Ethanol, getrocknet 99,99 %, SeccoSolv®	Merck, Darmstadt
Aqua ad injectabilia	AlleMan Pharma, Rimbach
Agarose LE	ACROS Organics, Geel, Belgien
Tris-Aminomethan (Tris) 99+ %	
Midori Green Lösung	Biozym Scientific, Oldendorf
6 x DNA Loading Dye	Thermo Fisher Scientific, Life technologies, Waltham, USA
GeneRuler 1 kb DNA Standard	
EDTA-Dinatriumsalz Dihydrat	Carl Roth, Karlsruhe

Millipore®-Wasser wurde aus einer hauseigenen Wasseraufbereitungsanlage (Milli-Q® Synthesis, Merck Millipore, Darmstadt) gewonnen und flüssiger Stickstoff wurde in Großmengen von Linde (München) bezogen.

#### 4.1.6 Lösungen und Puffer

Es wurden jeweils ethanolische Stammlösungen der drei Sexualhormone Estradiol (EST), Testosteron (TEST) und Progesteron (PRO) in der Konzentration 1 mg/ml hergestellt. Durch entsprechende Verdünnung mit Aqua ad injectabilia wurden für TEST und PRO Inkubationslösungen der Konzentration 1 ng/µl, für EST eine Inkubationslösung der Konzentration 0,01 ng/µl gewonnen. Des Weiteren wurde auch eine wässrige L-Carnitin-Inkubationslösung in der Konzentration 1 µg/µl hergestellt. Alle Inkubationslösungen wurden unter aseptischen Bedingungen steril filtriert und in sterile Röhren aliquotiert. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

Um das gebrauchsfertige Medium zu generieren wurde zu 500 ml Minimum Essential Medium Eagle (MEM) 50 ml fetales Kälberserum, 5 ml Penicillin / Streptomycin, 5 ml Natriumpyruvat 100 mM, 5 ml nicht essenzielle Aminosäuren 100 x Konzentrat und 3,2 ml Glucose hinzugefügt. Das Arbeiten erfolgte dabei unter aseptischen Bedingungen an einer Sicherheitswerkbank, die Lagerung erfolgte für maximal zwei Wochen bei 4 – 8 °C.

10-fach konzentrierter TBE-Puffer enthielt 0,89 M Tris, 0,89 M Borsäure und 0,02 M EDTA-Dinatrium in Millipore®-Wasser, zur Benutzung für die Gelelektrophorese wurde der Puffer entsprechend mit Millipore®-Wasser 1:10 verdünnt.

#### 4.1.7 Geräte

Sicherheitswerkbank Klasse II, HeraSafe® KS	Thermo Scientific™, Carlsbad, USA
Inkubator, Heracell 240i	
Mikroskop, Eclipse TS100	Nikon, Chiyoda, Japan
Digitalkamera für Mikroskop, VisiCam® 1.3	VWR, Ismaning
Vortex 2 Genie	
Zentrifuge, Kendro Megafuge 1.0 R	Heraeus, Hanau
Gefrierschrank HERAFreez, -80 °C	
Zentrifuge, Microfuge 22 R	Beckmann Coulter, Krefeld
Zentrifuge, 5415R	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer compact	
Pipetten, Eppendorf Research® plus, 0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl	
Gefrierschrank profi line, -20 °C,	Liebherr, Biberach an der Riß
PCR-Cycler, cyclone 25	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen
Gelelektrophorese-System, 40-0708	
Magnetrührer mit Heizplatte, MR 3002S	Heidolph Instruments, Schwabach
Spannungsgeber, Electrophoresis power supply EPS 301	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Gel-Dokumentations-System, GeneFlash	Syngene, Cambridge, England
Mikroplattenleser, Infinite® F200 mit NanoQuant Platte und i-control™ Software	Tecan, Männedorf, Schweiz
Pipettierhelfer, accu-jet® pro	BRAND, Wertheim
Präzisionswaage Mettler PL300	Mettler Toledo, Greifensee, Schweiz
Feinwaage, AB204-S/PH	
Analysenwaage, CPA 22D	Sartorius, Göttingen
Mx3005P qPCR System mit MXPro Software	Agilent Technologies, Stratagene Products Division La Jolla, USA

### 4.1.8 Materialien

Zellkulturflaschen, Nunc® EasYFlasks™, 75 cm <sup>2</sup> , mit Filterdeckel	Thermo Scientific™, Carlsbad, USA
Serologische Pipette, steril, 10 ml, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Schraubröhre 15 ml, 120 x 170 mm, Spitzboden, aus Polypropylen, steril	
Mikro-Schraubröhre 2 ml, aus Polypropylen, steril	
Schraubröhre 50 ml, 115 x 28 mm, aus Polypropylen, steril	
Pipettenspitzen 10 µl, 200 µl, 100 µl	
Pipettenspitze mit Filter, Biosphere® plus, 0,1 – 20 µl, 2 – 100 µl, 50 – 1250 µl	
Reagiergefäß 1,5 ml, aus Polypropylen, mit anhängendem Deckel	
PCR-Reagiergefäße, Multiply®-µStripPro 8er Kette mit anhängendem Deckel, 0,2 ml	
96 Well Multiply® PCR-Platte, randlos	
Multiply® 8er Deckelkette mit flachen Deckeln	
Spritzenvorsatzfilter, Minisart® NML, 0,2 µm, steril	Sartorius, Goettingen
Neubauer-Zählkammer, C-Chip™ Neubauer improved disposable hemocytometer	A. Hartenstein, Würzburg
Einmalspritze, Injekt®, 20 ml	B. Braun, Melsungen
Einmalkanüle, Sterican®, 20G x 40 mm	

## 4.2 Standardprozeduren in der Zellkultur

### 4.2.1 Auftauen und Kultivieren

Sowohl während der Kultivierung als auch während der Inkubationsversuche wurden die Zellen ausschließlich unter aseptischen Bedingungen an einer Sicherheitswerkbank mit laminarer Luftströmung bearbeitet, um mikrobielle Kontaminationen zu verhindern.

Die Calu-3-Zellen wurden in einem Stickstofftank bei -196 °C dauerhaft gelagert. Zum Auftauen wurden die Kryogefäße schnellst möglich aus flüssigem Stickstoff in ein auf 37 °C vorgewärmtes Wasserbad überführt. Sobald die sich darin befindende Zellsuspension vollständig aufgetaut war, wurde sie in eine Zellkulturflasche (T-75) mit 10 ml Medium (37 °C) eingebracht. Die Zellen wurden im Inkubator bei 37 °C in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre unter 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt kultiviert und bildeten adhärente Monolayer. Exemplarische Aufnahmen der Morphologie von Calu-3-Zellen sind in Abbildung C.13 dargestellt.

Jeweils Montag, Mittwoch und Freitag erfolgte ein Wechsel des Mediums, der nach dem Dekantieren des alten Mediums auch die Zugabe von 10 ml frischem, auf 37 °C vorgewärmtem Medium umfasste.

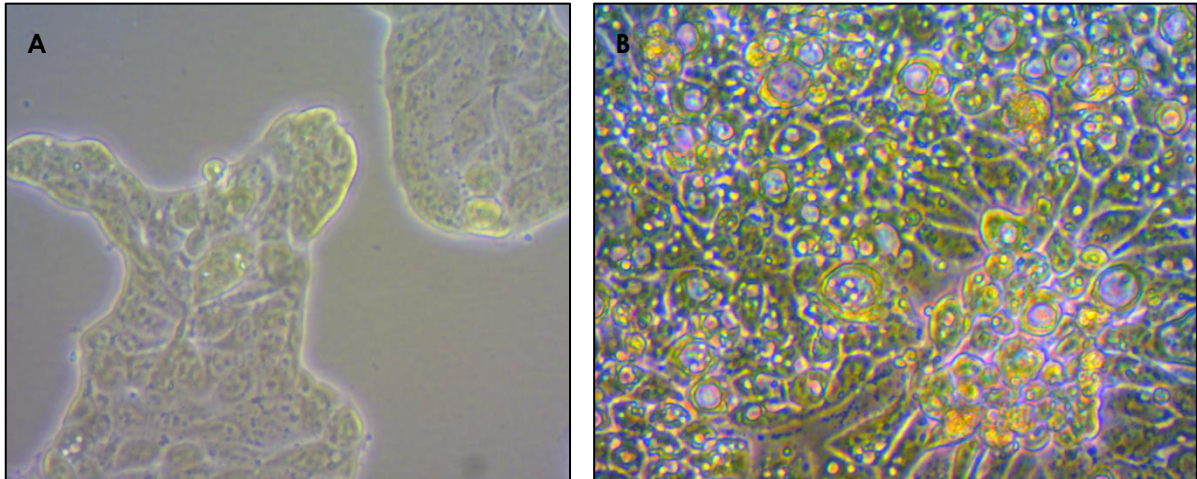


Abbildung C.13: Exemplarische Aufnahmen der Morphologie von Calu-3-Zellen. **A:** Wachstum bei circa 50 % Konfluenz nach 5 – 7 Tagen. **B:** Wachstum bei 100 % Konfluenz nach circa 10 Tagen.

#### 4.2.2 Passagieren

Sobald die Calu-3-Zellen eine Konfluenz von 30 – 50 % erreicht hatten (Abbildung C.13 A), wurden sie passagiert. Dafür wurde das restliche Medium abgegossen, die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen und anschließend mit 5 ml Trypsin / EDTA-Lösung (0,25 % / 0,2 %) im Inkubator für 5 – 10 Minuten inkubiert. Nach dem vollständigen Ablösen der Zellen vom Zellkulturflaschen-Boden wurde das Detachement durch Zugabe von 10 ml Medium gestoppt. 1 ml der vorliegenden Zellsuspension (circa  $10^6$  Zellen) wurde anschließend in eine neue Zellkulturflasche mit 10 ml Medium (37 °C) überführt.

#### 4.2.3 Zellzählung in Neubauer-Zählkammer

Nach der vollständigen Ablösung der Calu-3-Zellen durch die Inkubation mit Trypsin / EDTA-Lösung wurde die Reaktion durch 10 ml Medium gestoppt und die vorliegende Zellsuspension in eine 50 ml-Röhre überführt. Es wurde für 5 Minuten bei 4 °C mit 3300 x g zentrifugiert, das überstehende Medium wurde anschließend abgegossen und das entstandene Zellpellet in 5 ml PBS resuspendiert. 25 µl dieser Zellsuspension wurden mit 75 µl Trypanblaulösung vermischt, wovon anschließend 10 µl auf eine Neubauer-Zählkammer (0,1 mm Kammertiefe) aufgetragen wurden. Die Zellzahl in insgesamt vier Großquadraten (je 1 mm<sup>2</sup>

Fläche) wurde sorgfältig ausgezählt (Zellzahl<sub>gesamt</sub>) und unter Einbezug der 1:4-Verdünnung die Zelldichte (Zellzahl pro Mikroliter Zellsuspension) nach Formel 15 errechnet.

$$\text{Zelldichte [Zellen}/\mu\text{l}] = \frac{\text{Zellzahl}_{\text{gesamt}}}{\text{ausgezählte Fläche [mm}^2\text{]} * \text{Kammertiefe [mm]} * \text{Verdünnung}} \quad \text{Formel 15}$$

#### 4.2.4 Test auf Mycoplasmen-Kontamination

In regelmäßigen Abständen und zusätzlich unmittelbar vor Beendigung der Inkubationsversuche wurden die Zellen auf eine potentielle Kontamination mit Mycoplasmen getestet. Dazu wurden 300  $\mu\text{l}$  des verwendeten Mediums in eine 2 ml Röhre überführt, 5 Minuten im Wasserbad gekocht und anschließend bei 1000 x g für 1 min zentrifugiert. Mit dem Überstand wurde eine PCR nach Protokoll des Herstellers [328] durchgeführt. Das PCR Produkt wurde zusammen mit einer Positiv- und einer Negativkontrolle auf ein 1,5-prozentiges Agarose-Gel aufgetragen, dem 0,005 % Midori Green zur Detektion der DNA-Banden zugegeben war. Die Elektrophorese wurde für 60 Minuten bei 90 V in TBE-Puffer (siehe 4.1.6) durchgeführt. Die Auswertung der Banden erfolgte anschließend unter UV-Belichtung (280 nm) (Abbildung C.14). Nur wenn eine Mycoplasmen-Kontamination ausgeschlossen werden konnte, wurde mit den Zellen weitergearbeitet.

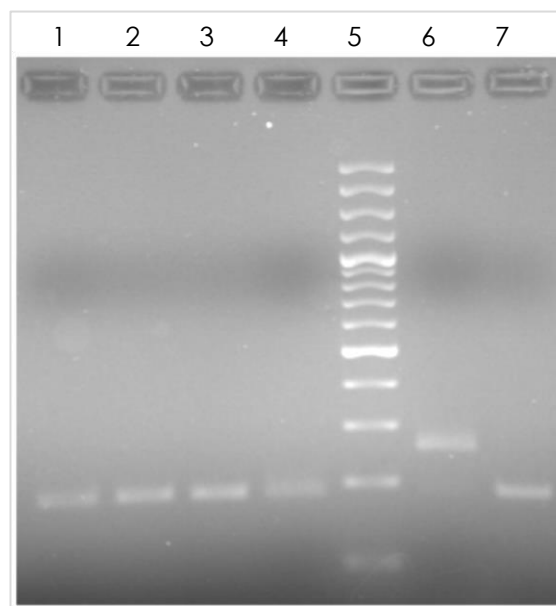


Abbildung C.14: Exemplarische Aufnahme eines 1,5-prozentigen Agarose-Gels mit den aufgetrennten Produkten einer Mycoplasmen-PCR. Spur 1-4: Probenlösungen ohne Mykoplasmen-Kontamination, Spur 5: DNA-Standard, Spur 6: Positiv-Kontrolle, Spur 7: Negativ-Kontrolle.

## 4.3 Durchführung der Inkubationsversuche

### 4.3.1 Inkubation mit Sexualsteroidhormonen

Calu-3-Zellen wurden mit einer Dichte von 2000 Zellen / cm<sup>2</sup> in separate Zellkulturflaschen (T-75) mit 10 ml Medium ausgesät. Durch die direkt im Anschluss erfolgende Zugabe jeweils entsprechender Volumina an Hormon-Inkubationslösungen in das Medium wurden folgende Endkonzentrationen erreicht:

Testosteron	35 nM
Estradiol	1 nM
Progesteron	69 nM
Estradiol + Progesteron	1 nM + 69 nM

Zusätzlich wurde immer eine Kontrolle ohne Zugabe von Hormon-Lösungen mitgeführt. Die Hormonlösungen wurden daraufhin täglich zur gleichen Uhrzeit additiv zum Medium hinzugegeben um die circadiane Rhythmik der Hormonausschüttung im Körper zu simulieren. Im Falle eines Medium-Wechsels (alle 2 – 3 Tage) wurden die Lösungen unmittelbar nach dem Austauschen des Mediums in das frische Medium dazugegeben. Nach 21 Tagen wurde der Versuch durch die Inkubation mit Trypsin / EDTA-Lösung und anschließender Zellpelletierung beendet. Die Versuche wurden jeweils mindestens drei Mal durchgeführt.

### 4.3.2 Inkubation mit Sexualsteroidhormonen und L-Carnitin

Calu-3-Zellen wurden mit einer Dichte von 2000 Zellen / cm<sup>2</sup> in separate Zellkulturflaschen (T-75) mit 10 ml Medium ausgesät. Die Zellen wurden über 18 Tage wie unter 4.3.1 beschrieben mit Hormonlösungen inkubiert. Zusätzlich wurde anschließend über 72 Stunden mit L-Carnitin (CAR) und Hormonen inkubiert, sodass folgende Endkonzentrationen erreicht wurden:

Testosteron + L-Carnitin	35 nM + 50 µM
Estradiol + L-Carnitin	1 nM + 50 µM
Progesteron + L-Carnitin	69 nM + 50 µM
Estradiol + Progesteron + L-Carnitin	1 nM + 69 nM + 50 µM

Als Kontrollen wurden Zellkulturflaschen ohne Zugabe von Inkubationslösungen sowie Zellkulturflaschen mit der alleinigen Zugabe von CAR-Inkubationslösung mitgeführt. Auch hier erfolgte eine tägliche Zugabe der Lösungen jeweils zur gleichen Zeit. Nach 21 Tagen

wurde der Versuch durch die Inkubation mit Trypsin / EDTA-Lösung und anschließender Zellpelletierung beendet, die Versuche erfolgten ebenfalls jeweils mindestens im Triplikat.

### **4.3.3 Zellpelletierung nach Versuchsende**

Zum Ende der Versuche wurden die Zellen durch die Zugabe von Trypsin / EDTA von der Zellkulturflasche abgelöst und es erfolgte jeweils eine Zellzählung wie unter 4.2.3 beschrieben. Um die Versuche auf eine einheitliche Zellzahl zu normieren wurden jeweils  $2 \times 10^6$  Zellen durch das entsprechende Volumen an Zellsuspension in 2 ml-Röhren aliquotiert. Durch Zentrifugation für 5 min bei  $18000 \times g$  und  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  und anschließendes Abgießen des Überstands wurden die Zellen pelletiert. Sofort nach Fertigstellung wurden die Zellpellets in flüssigem Stickstoff schockgefroren, die Langzeitlagerung erfolgte bei  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ .

## **4.4 RNA-Isolierung und cDNA-Synthese**

### **4.4.1 RNA-Isolierung**

Zur Vermeidung von RNA-Degradierung durch ubiquitär vorkommende RNasen wurden alle Oberflächen vor Beginn der Isolierung mit RNase-Dekontaminierung-Reagenz behandelt und es wurde zusätzlich ausschließlich mit Handschuhen gearbeitet. Die RNA-Isolierung fand unter aseptischen Bedingungen an einer Sicherheitswerkbank mit laminaren Luftströmungen statt.

Zur Isolierung von RNA aus den Zellpellets wurden diese in 200  $\mu\text{l}$  PBS resuspendiert, mit 400  $\mu\text{l}$  des im Kit enthaltenem Lysis-Puffers versetzt und für 15 s auf dem Vortex vermischt. Die Zellsuspension wurde vollständig in die im Kit enthaltene Röhre mit Glasfaservlies überführt, welche wiederum in eine 1,5 ml-Röhre platziert wurde. Durch Zentrifugation ( $4 \text{ }^\circ\text{C}$ , 15 s,  $8000 \times g$ ) wurden störende Bestandteile des Lysats entfernt, während RNA und DNA an die Glasfasern banden. Anschließend wurde für 15 min bei Raumtemperatur mit 100  $\mu\text{l}$  rekombinanter DNase I-Lösung (1,82 U/ $\mu\text{l}$ ) inkubiert um genomische DNA zu verdauen. Nach zwei Waschschrritten mit 500  $\mu\text{l}$  Wasch-Puffer I (5 M Guanidin-HCl, 20 mM Tris-HCl, pH 6,6) und 500  $\mu\text{l}$  Wasch-Puffer II (20 mM Natriumchlorid, 2 mM Tris-HCl, pH 7,5) wurde jeweils für 4 s bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  und  $8000 \times g$  zentrifugiert und die abzentrifugierten Lösungen verworfen. Zuletzt wurden 200  $\mu\text{l}$  Wasch-Puffer II auf das Glasfaservlies pipettiert und anschließend bis zur Trockne zentrifugiert ( $4 \text{ }^\circ\text{C}$ , 2 min,  $16000 \times g$ ).

Die Elution der isolierten und aufgereinigten RNA erfolgte mit 50  $\mu\text{l}$  Nuklease-freiem Wasser in ein frisches 1,5 ml – Reagiergefäß durch Zentrifugation (1 min,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $8000 \times g$ ). Bis zur

weiteren Bearbeitung wurde die eluierte RNA auf Eis gelagert, die Langzeit-Lagerung erfolgte bei -80 °C.

#### 4.4.2 RNA-Quantifizierung

Möglichst direkt im Anschluss an die RNA-Isolierung wurde die Ausbeute per Nanodrop-Methode bestimmt. Dazu wurde die NanoQuant Platte des Mikroplattenlesers mit Nuklease-freiem Wasser als Leerprobe kalibriert. Anschließend wurden von jeder RNA-Lösung 2 µl auf die Platte pipettiert und die Proben bei den Wellenlängen 260 nm, 280 nm und 340 nm vermessen. Die Absorption bei 340 nm, die in der Regel nahe 0 lag, wurde als Basislinie für die Absorptionen der beiden anderen Wellenlängen gesetzt. RNA, DNA und Nukleotide absorbieren bei einer Wellenlänge von 260 nm, weshalb die dabei gemessene Absorption ( $A_{260 \text{ nm}}$ ) zur Bestimmung der proportionalen RNA-Konzentration ( $C_{\text{RNA}}$ ) mittels i-control™ Software verwendet wurde (Formel 16).

$$C_{\text{RNA}} = \frac{A_{260 \text{ nm}}}{d * \varepsilon}$$

Formel 16

$C_{\text{RNA}}$	=	Konzentration der RNA-Lösung [ng/ml]
$A_{260 \text{ nm}}$	=	Absorption bei 260 nm
d	=	Schichtdicke der Messküvette; hier 0,2 cm
$\varepsilon$	=	Extinktionskoeffizient; für RNA = 40 ml/ng x cm <sup>-1</sup>

Um die Proben auf Verunreinigungen durch Proteine hin zu untersuchen wurde zusätzlich das Verhältnis der Absorptionen bei 260 nm / 280 nm betrachtet. Mit einem erzielten Wert von circa 2 wurde die Probe als rein eingestuft. Pro Probe erfolgte eine Zweifachbestimmung, der Mittelwert wurde zur Berechnung der RNA-Konzentration herangezogen. Im Mittel wurden aus den Zellpellets RNA-Konzentrationen von  $509,27 \pm 122,56$  ng/µl (MW ± SD) erzielt.



### 4.4.3 cDNA-Synthese

Direkt im Anschluss an die RNA-Quantifizierung wurden jeweils 1000 ng totale RNA, in cDNA umgeschrieben, um die Proben auf eine einheitliche Menge an totaler RNA zu normieren. Das jeweilige berechnete Volumen der RNA-Lösung wurde in ein 1,5 ml-Reagiergefäß pipettiert und mit Nuklease-freiem Wasser auf 11 µl ergänzt. In einem ersten Schritt wurden 2 µl an randomisierten Hexamer-Primern, einer Mischung aus einsträngigen Hexa-Nukleotiden, hinzugegeben und die Mischung für 10 min bei 65 °C vorsichtig geschüttelt. Dieser Schritt gewährleistete eine Denaturierung der RNA-Sekundärstrukturen und eine optimale Anlagerung der Primer an den RNA-Strang. In Vorversuchen erzielte die cDNA-Synthese mit randomisierten Hexamer-Primern im Vergleich zur cDNA-Synthese mit oligo(dT)<sub>18</sub>-Primern, welche spezifisch an die Poly(A)-Enden von mRNA binden, niedrigere C<sub>T</sub>-Werte in den nachfolgenden RT-qPCR-Experimenten. Deswegen wurden bei allen Proben zur Transkription von RNA in cDNA randomisierte Hexamer-Primer verwendet, die unter anderem den Vorteil aufwiesen, dass sie an unterschiedlichen Stellen an den RNA-Strang banden und somit eine gleichmäßige Repräsentation aller RNA-Sequenzen lieferten.

Nach Beendigung des ersten Schrittes wurden die Proben unverzüglich auf Eis gelagert und mit 4 µl Reaktions-Puffer, 0,5 µl Protector RNase Inhibitor (40 U/µl), 2 µl Desoxynukleotid-Mix (10 mM je Nukleotid) und 0,5 µl Transcriptor Reverse Transkriptase (20 U/µl) versetzt. Die reverse Transkription fand für 10 min bei 25 °C gefolgt von 30 min bei 55 °C statt. Durch Erhitzung auf 85 °C für 5 min wurde die Reverse Transkriptase inaktiviert und die Reaktion wurde durch die Lagerung auf Eis gestoppt.

Zusätzlich wurde zu jeder Probe eine Kontrolle mit der gleichen Konzentration an RNA erstellt, mit der analog zu den Proben verfahren wurde, jedoch ohne Zugabe von Primern, Reaktionspuffer, Nukleotid-Mix und Reverse Transkriptase (noRT-Kontrolle). Die Langzeit-Lagerung der cDNA-Proben sowie der noRT-Kontrollen fand bei -20 °C statt.

## 4.5 Vermessung der cDNA-Proben mittels RT-qPCR

### 4.5.1 Vorbereitung der Proben und Lösungen

Vor Verwendung wurden die cDNA-Proben 1:10 mit Aqua ad injeabilia verdünnt um eine Inhibition der PCR durch potentiell in der Probe enthaltene PCR-Inhibitoren auszuschließen. Um die Platten untereinander vergleichen zu können wurden immer Lauf-Vergleichs-Proben (inter-run controls = IRC) mitgeführt, die aus einer entsprechend 1:10 verdünnten Mischung nicht mehr benötigter cDNA-Lösungen bestanden. Zusätzlich wurde aus dieser Mischung eine Verdünnungsreihe (V1 = 1:10; V2 = 1:100; V3 = 1:1000) hergestellt, die zur

Effizienz-Bestimmung der jeweiligen Gen-spezifischen PCR herangezogen wurde. Zur Vermeidung von DNA-Degradation erfolgte die Handhabung der Proben ständig auf Eis.

Für jedes untersuchte Gen wurde ein Mix bestehend aus fünf Teilen iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix, drei Teilen Aqua ad injectabilia und einem Teil spezifischen Primer (FW/RW 3 pmol/μl) hergestellt, wobei auf das berechnete benötigte Gesamtvolumen jeweils circa 10 % aufgeschlagen wurde um einen Volumenverlust beim späteren Pipettieren kompensieren zu können. Auch die so vorbereiteten Mischungen wurden ständig auf Eis gelagert um einen Aktivitätsverlust der beinhalteten Polymerase zu vermeiden.

#### 4.5.2 Pipettieren der 96-Well-Platten

Alle Proben eines Zellkultur-Ansatzes wurden auf einer 96-Well-Platte vermessen, allerdings lediglich mit einem spezifischen Primer-Paar (siehe Abbildung C.15). Pro Platte konnte somit ein Gen vermessen werden, insgesamt wurden für jeden Zellkultur-Ansatz acht Platten mit fünf Ziel-Genen und drei Referenz-Genen vermessen.

In jedes Well wurden zunächst 18 μl der vorbereiteten Mischung aus SYBR® Green Mix, Wasser und dem spezifischen Primer-Paar (entsprechend 300 nM FW / 300 nM RW im Gesamt-Reaktionsansatz) pipettiert. Anschließend wurden jeweils 2 μl der verdünnten cDNA-Lösungen in fünffachen Replikaten in die entsprechenden Wells hinzugefügt. Die Menge an in cDNA umgeschriebener RNA lag damit für alle Proben bei 10 ng pro Well. Entsprechend wurden auch jeweils 2 μl der cDNA-Verdünnungsreihe (V1 – V3) zur Effizienz-Bestimmung sowie 2 μl der verdünnten IRC-Lösungen zur Lauf-Vergleichs-Kontrolle jeweils im Triplikat in die entsprechenden Wells pipettiert. Die IRC wurde mit zwei Primer-Paaren (HPRT1 und GAPDH) vermessen. Wichtig dabei war es, auf jeder Platte die gleiche cDNA-Lösung (IRC) in der gleichen Konzentration an den gleichen Positionen der Platte zu vermessen. Zusätzlich wurden Leerproben (NTC) im Duplikat mitgeführt, wobei statt einer cDNA-Lösung 2 μl Wasser eingesetzt wurden.

Nach dem vollständigen Pipettieren der Platten, wurden sie mittels optisch durchlässiger Deckelketten fest verschlossen um eine Evaporation von Flüssigkeit bei den anschließenden Erhitzungs-Zyklen zu verhindern. Abschließend wurde die Platte für 1 min bei 800 x g zentrifugiert und kontrolliert, ob alle potentiell störenden Luftblasen aus den Wells entfernt werden konnten.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	K	K	K	K	K		PRO + CAR	PRO + CAR	PRO + CAR	PRO + CAR	PRO + CAR	
<b>B</b>	EST	EST	EST	EST	EST		EST + PRO + CAR	EST + PRO + CAR	EST + PRO + CAR	EST + PRO + CAR	EST + PRO + CAR	
<b>C</b>	TEST	TEST	TEST	TEST	TEST							NTC
<b>D</b>	PRO	PRO	PRO	PRO	PRO							NTC
<b>E</b>	EST + PRO	EST + PRO	EST + PRO	EST + PRO	EST + PRO		V1	V2	V3			
<b>F</b>	CAR	CAR	CAR	CAR	CAR		V1	V2	V3		IRC HPRT1	IRC GAPDH
<b>G</b>	EST+ CAR	EST+ CAR	EST+ CAR	EST+ CAR	EST+ CAR		V1	V2	V3		IRC HPRT1	IRC GAPDH
<b>H</b>	TEST + CAR	TEST + CAR	TEST + CAR	TEST + CAR	TEST + CAR						IRC HPRT1	IRC GAPDH

Abbildung C.15: Exemplarisches Platten-Design für die Genexpressions-Analyse aus inkubierten Calu-3-Zellen. Die Proben wurden jeweils in fünffachen Replikaten (lila), der Standard zur Effizienz-Bestimmung in drei Verdünnungs-Konzentrationen (V1 = 1:10, V2 = 1:100, V3 = 1:1000) jeweils im Triplikat (türkis), NTC (no-template control) im Duplikat (blau), IRC (inter-run control) mit den Primer-Paaren HPRT1 und GAPDH jeweils im Triplikat (rot) vermessen. K: Kontrolle; EST: Inkubation mit 1nM Estradiol über 21 Tage; TEST: Inkubation mit 35 nM Testosteron über 21 Tage; PRO: Inkubation mit 69 nM Progesteron über 21 Tage; CAR: Inkubation mit 50 µM Carinitin für 72 h.

### 4.5.3 qPCR-Lauf

Der iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix enthielt eine Antikörper-vermittelte hot-start iTaq DNA-Polymerase, die einen schnellen Start bei hohen Temperaturen erlaubte. Der erste Schritt des qPCR-Laufes war die Erhitzung der Platte auf 95 °C für 3 min um die DNA-Polymerase zu aktivieren. Anschließend wurden 40 Zyklen mit zwei wechselnden Temperaturen (10 s bei 95 °C gefolgt von 30 s bei 60 °C) aneinander gereiht. Dabei diente die höhere Temperatur zur Denaturierung der DNA-Doppelstränge, die Anlagerung der Primer (Annealing) sowie die Duplizierung der DNA-Einzelstränge (Elongation) erfolgte bei 60 °C. Jeweils am Ende eines Zyklus wurde die Fluoreszenz (R) in allen Wells einzeln gemessen, gegen die Fluoreszenz des passiven Referenz-Farbstoffes (ROX™) normalisiert (Rn) und Basislinien-subtrahiert ( $\Delta Rn$ ) gegen die Zyklen-Zahl aufgetragen (siehe Einleitung 2.3.2). Der zur doppelsträngigen DNA proportionale Fluoreszenzanstieg in den Wells konnte nach jedem Zyklus beobachtet werden, indem bei einer Wellenlänge von 525 nm die von SYBR® Green I emittierte Fluoreszenz gemessen wurde (siehe Einleitung 2.2.2).

Abschließend wurde die Platte erneut für 1 min auf 95 °C erhitzt, im Anschluss auf 55 °C für 30 sec abgekühlt und über einen Temperatur-Gradienten langsam wieder auf 95 °C erhitzt. Während des letzten Erhitzens wurde im Abstand von 0,5 °C jeweils in allen Wells wiederum die Fluoreszenz bestimmt und gegen die Temperatur aufgetragen. Ein deutlicher Abfall der Fluoreszenz zwischen zwei Temperaturpunkten markierte dabei die Denaturierung der doppelsträngigen DNA und somit den Schmelzpunkt der entstandenen PCR-Produkte. Durch die Betrachtung der Schmelzkurve und einem einzelnen Maximum wurde die Spezifität der Reaktion gesichert und eventuelle Primer-Dimerisierungen oder unspezifische Produktbildungen konnten ausgeschlossen werden (siehe *Einleitung* 2.3.1).

## 4.6 Auswertung der RT-qPCR-Ergebnisse

### 4.6.1 Reaktions-Effizienzen

Um einen relativen Expressionsvergleich von Genen untereinander mittels RT-qPCR-Technik zu ermöglichen, ist es unerlässlich die Effizienz jeder spezifischen Reaktion zu kennen (siehe *Einleitung* 2.3.2). Zur Bestimmung der Effizienzen der acht im Zellkulturmodell untersuchten Gene wurden pro Well 10 ng, 1 ng und 0,1 ng in cDNA umgeschriebene RNA eingesetzt und bei jedem Lauf erneut individuell bestimmt. Unter Berücksichtigung von Formel 3 (siehe *Einleitung* 2.3.3) konnte anhand der berechneten Steigung aus der vermessenen Verdünnungsreihe die Effizienz in % ermittelt werden. Es wurden dabei im Mittel für die Reaktionen Werte > 85 % ermittelt, mit Ausnahme von 18 S RNA (78,5 %). Die für jedes Primer-Paar und jeden qPCR-Lauf spezifische Effizienz wurde anschließend in die Datenauswertung mit einbezogen, die Auswertung erfolgte somit Effizienz-korrigiert [134].

### 4.6.2 IRC-Normalisierung

Die Betrachtung der IRC-Werte (siehe *Einleitung* 2.3.2) der einzelnen Platten erfolgte bei einer einheitlichen Schwellenlinie (threshold line), die oberhalb des Fluoreszenz-Grundrauschens aber noch im exponentiellen Bereich der Amplifikation lag. Da bei den Untersuchungen zur Genexpression unter dem Einfluss von Hormonen lediglich diejenigen Versuche miteinander verglichen werden konnten, deren Zellkultur-Ansatz am gleichen Tag vorgenommen wurde und deren Proben auf denselben Platten vermessen wurden, wurden jeweils acht Platten miteinander verglichen (fünf Ziel-Gene, drei Referenz-Gene). Aus den Mittelwerten der im Triplikat gemessenen  $C_T$ -Werte der IRC-Proben wurde für jedes der zwei untersuchten Gene (HPRT1 und GAPDH) wiederum der Mittelwert aus den acht zu vergleichenden Platten gebildet. Bezogen auf diesen Mittelwert konnten platten-

spezifische Abweichungen in der Detektion berechnet werden. Mit dem so bestimmten individuellen Plattenfaktor wurden alle  $C_T$ -Werte dieser Platte normalisiert. Die Plattenfaktoren variierten in ihren Werten zwischen 0,927 und 1,152, was eine Normalisierung aller einzelnen  $C_T$ -Werte nötig machte um eine absolute Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Platten zu erreichen.

#### **4.6.3 Normierung auf Referenz-Gene**

Die Mittelwerte der IRC-normalisierten  $C_T$ -Werte der Referenz-Gene 18 S RNA, GAPDH und ACTB wurden mittels der BestKeeper® Software untersucht (siehe 3.6). Die Software bestätigte die konstante Expression der untersuchten Referenz-Gene in allen untersuchten Proben. Die für jede Probe individuellen Werte der Referenz-Gene wurden als Bezugspunkte zur relativen Quantifizierung der Genexpression der untersuchten Arzneistofftransporter herangezogen.

#### **4.6.4 Relative Quantifizierung mittels REST®**

In Anlehnung an die  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode (siehe *Einleitung* 2.2.1) [117] berechnet das *Relative Expression Software Tool* (REST®) die relative Expression von Ziel-Genen bezogen auf Referenz-Gene Effizienz-korrigiert unter Verwendung des *Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test*® (siehe *Einleitung* 2.3.3) [135]. Bei der Untersuchung des Hormoneinflusses auf die Transporter-Expression in Calu-3-Zellen wurden jeweils die IRC-korrigierten Werte der fünffachen Bestimmung jedes Ziel-Gens auf die entsprechenden Werte der drei Referenz-Gene normalisiert. Je nach Wahl der Interventions- und Kontrollgruppe konnten unter Verwendung von REST® unterschiedliche Interventionen gegeneinander verglichen werden. Da die Experimente mindestens im Triplikate aufgeführt wurden, wurden zuletzt die ermittelten Einzelwerte aus den Zellkulturansätzen einem zweiseitigen Student-t-Test mittels GraphPad PRISM® unterzogen. Der Expressions-Unterschied wurde dabei als signifikant betrachtet, wenn ein p-Wert  $< 0,05$  berechnet wurde.

## 5 Unterschiede in der Genexpression von Arzneistofftransportern in humanem Lungengewebe

### 5.1 Verwendete Reagenzien, Geräte und Materialien

#### 5.1.1 Verwendete Kits

Zur Isolierung von RNA aus humanem Lungengewebe wurde das High Pure RNA Tissue Kit verwendet, zur anschließenden cDNA-Synthese wurde das Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit eingesetzt (beides Roche Diagnostics, Rotkreuz, Schweiz).

Für die Vermessung der cDNA-Proben wurde der TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix no AmpErase® UNG (2x) in Kombination mit den folgenden optimierten Reaktionsmischungen mit spezifischen Primern und Sonden (Applied Biosystems® Life Technologies, Carlsbad, USA) eingesetzt:

Transporter	Genexpression Kit	Referenz-Gen	Genexpression Kit
OCT1	Hs00427552_m1	GAPDH	4332649
OCT2	Hs01010723_m1	ACTB	Hs01060665_g1
OCT3	Hs02382478_s1	18 S RNA	Hs99999901_s1
OCTN1	Hs01548717_m1		
OCTN2	Hs00929869_m1		
MDR1	Hs00184491_m1		
MRP1	Hs00219905_m1		
MRP5	Hs00194701_m1		
MATE1	Hs00217320_m1		

#### 5.1.2 Sonstige Reagenzien

Puffer zur Gewebe-Lyse, Absolutely RNA Lysis Buffer	Agilent Technologies, Waldbronn
Ethanol, getrocknet 99,99 %, SeccoSolv®	Merck, Darmstadt
Nuklease-freies Wasser	Ambion® Life Technologies, Carlsbad, USA
Dekontaminierung-Reagenz, RNase AWAY®	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

### 5.1.3 Geräte

Feinwaage, ABJ 220-4M	Kern & Sohn, Balingen
Dispergierer, T 10 basic ULTRA-TURRAX® mit Dispergierwerkzeug S 10 N – 5 G	IKA, Staufen
Zentrifuge, 5415R	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer compact	
Pipetten, Eppendorf Research® plus, 0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl	
Sicherheitswerkbank Klasse II, HeraSafe® KS	Thermo Scientific™ Life Technologies, Carlsbad, USA
Zentrifugen, Sorvall Legend RT und 05-090-128	
Mikroplattenleser, Infinite® F200 mit NanoQuant Platte und i-control™ Software	Tecan, Männedorf, Schweiz
Gefrierschrank HERAfreez, -80 °C	Heraeus, Hanau
Gefrierschrank profi line, -20 °C,	Liebherr, Biberach an der Riß
7900HT Fast Real-Time PCR System mit SDS 2.3 Software	Applied Biosystems® Life Technologies, Carlsbad, USA
Pipetten, Rainin Lite XLS, 0,1 – 2 µl, 2 – 20 µl, 20 – 100 µl, 100 – 1000 µl	Mettler Toledo, Greifensee, Schweiz
Pipette, Rainin EDP 3 Plus 0,5 – 200 µl	

### 5.1.4 Materialien

Schraubröhre 50 ml, 115 x 28 mm, aus Polypropylen, steril	Sarstedt, Nümbrecht
Mikro-Schraubröhre 2 ml, aus Polypropylen, steril	
Reagiergefäß 1,5 ml, aus Polypropylen, mit anhängendem Deckel	
Pipettenspitzen mit Filter, Biosphere® plus, 0,1 – 20 µl, 2 – 100 µl, 50 – 1250 µl	
Einweg-Skalpell, steril	megro, Wesel
384-Well Platte, MicroAmp® Optical Reaction Plate	Applied Biosystems® Life Technologies, Carlsbad, USA
Selbstklebende Folie, MicroAmp® Optical Adhesive Film	
Pipettenspitzen, BioClean 10 µl, 200 µl, 1000 µl	Mettler Toledo, Greifensee, Schweiz

Flüssiger Stickstoff und Trockeneis zur Lagerung wurden in Großmengen von Linde, München bezogen.

## 5.2 Humanes Lungengewebe

Zur Untersuchung der Genexpression von Arzneistofftransportern im humanen Lungengewebe wurden insgesamt 86 individuelle Gewebeproben herangezogen. Im Thoraxzentrum Bezirk Unterfranken (Münnerstadt) wurden dabei unter den in 2.2 bereits beschriebenen Ein- und Ausschlusskriterien 35 Proben von Patienten genommen, welchen im Rahmen der Behandlung ein oder mehrere Lungenlappen entnommen werden mussten. Die Entnahme der Gewebeprobe erfolgte dabei direkt nach Beendigung einer erfolgreichen Perfusion der Lungenlappen oder im Falle einer nicht-erfolgreichen Perfusion unmittelbar nach Abbruch des Versuchs. Die Proben wurden anschließend zum Transport auf Trockeneis gelagert.

Weitere 51 Gewebeproben wurden im Universitätsklinikum Würzburg in der Klinik und Poliklinik für Thorax-, Herz- und Thorakale Gefäßchirurgie entnommen. Patienten ab 18 Jahren, die an einem resektablen Bronchialkarzinom litten und bei welchen im Rahmen der Behandlung eine Teilresektion des Lungengewebes durchgeführt werden musste, wurden zusätzlich in die Studie eingeschlossen. Es galten die in 2.2 bereits genannten Ausschlusskriterien mit Ausnahme der Einschränkung in der Arzneimitteltherapie. Die Einnahme von Beta-2-Sympathomimetika oder Anticholinergika war hier kein Ausschlusskriterium, da mit diesen Gewebeproben keine pharmakokinetischen Untersuchungen durchgeführt werden sollten. Auch diese Patienten wurden durch den jeweiligen behandelten Arzt sorgfältig aufgeklärt, erhielten zusätzlich schriftliche Informationen zum Hintergrund und zur Durchführung der Studie und gaben vor der Operation ihr schriftliches Einverständnis entsprechend der Deklaration von Helsinki [9]. Die Proben wurden unmittelbar nach der Entnahme bei -20 °C gelagert, der Transport zum Institut erfolgte auf Trockeneis und die Langzeitlagerung aller Gewebeproben fand bei -80 °C statt.

## 5.3 RNA-Isolierung aus humanem Lungengewebe

### 5.3.1 Vorbereitung der Gewebeproben

Um eine adäquate und gleichmäßige RNA-Isolierung aus den humanen Lungengewebsproben sicherzustellen, mussten die hinsichtlich ihrer Größe sehr inhomogenen Proben pulverisiert und zu 25 – 30 mg Gewebe abgewogen werden (Normalisierungsschritt 1, Abbildung B.16, *Allgemeiner Teil* 3.3). Alle Arbeiten fanden dabei ausschließlich im Kühlraum bei 4 – 8 °C statt. Die Gewebeproben wurden durch flüssigen Stickstoff ständig im gefrorenen Zustand gehalten um eine Degradierung der RNA während der Proben-Vorbereitung zu verhindern. Mit einem Einweg-Skalpell wurde von den größeren Gewebeproben dünne Scheiben an Gewebe abgeschnitten und in einen durch flüssigen Stickstoff vorge-



kühlten Edelstahl-Topf gegeben. Die Gewebeproben wurden unter wiederholter Stickstoff-Zugabe mittels eines Edelstahl-Stößels vorsichtig pulverisiert. Jeweils 25 – 30 mg des pulverisierten Gewebes wurden direkt in vorgekühlte 2 ml-Schraubröhren abgewogen und anschließend wiederum in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der Aliquote an pulverisiertem Gewebe erfolgte bis zur weiteren Bearbeitung bei -80 °C.

### 5.3.2 RNA-Isolierung

RNA degradiert unter Einfluss von ubiquitär vorkommenden RNasen rasch, weshalb alle Oberflächen vor der RNA-Isolierung mit RNase-Dekontaminierung-Reagenz behandelt wurden. Zusätzlich fand die RNA-Isolierung unter aseptischen Bedingungen unter einer Sicherheitswerkbank (Klasse II) bei laminaren Luftströmungen statt und zum Schutz der Proben wurden alle Arbeiten ausschließlich mit Handschuhen getätigt.

Da mit dem im Kit enthaltenen Lysis-Puffer nur eine unzureichende RNA-Ausbeute erreicht werden konnte, wurde stattdessen zu jedem Aliquot an pulverisiertem, gefrorenem Gewebe 400 µl des Absolutely RNA Lysis Buffer (Agilent) hinzugegeben. Mit Hilfe des Rotor-Stator-Dispergierers wurde das Gewebe durch die angreifenden Scherkräfte homogenisiert und lysiert. Zwischen drei 30 s andauernden Dispergier-Intervallen (Geschwindigkeitsstufe 3, 5, 3) wurden die Proben jeweils für ebenfalls 30 s auf Eis gestellt um eine Degradierung der RNA zu verhindern.

Anschließend wurde das homogenisierte Lysat zentrifugiert (4 °C, 2 min, 16000 x g) und 400 µl des Überstandes in ein frisches 1,5 ml-Reagiergefäß überführt. Es wurden 200 µl Ethanol 99,99 % hinzugegeben und vorsichtig mit dem Lysat vermischt, wodurch ein Präzipitat aus RNA und DNA entstand. Diese Mischung wurde vollständig in die im Kit enthaltene Röhre mit Glasfaservlies transferiert, welche wiederum in eine 1,5 ml Röhre platziert wurde. RNA aber auch DNA banden dabei an die Fasern, das restliche Lysat konnte durch Zentrifugation (4 °C, 30 s, 16000 x g) entfernt werden. Um eventuell vorhandene Rückstände an genomischer DNA aus der Probe zu entfernen wurde anschließend für 15 min bei Raumtemperatur mit 100 µl rekombinanter DNase I-Lösung (1,82 U/µl) inkubiert. Nach Zugabe von 500 µl Wasch-Puffer I (5 M Guanidin-HCl, 20 mM Tris-HCl, pH 6,6) und anschließender Zentrifugation (4 °C, 15 s, 8000 x g) wurden 500 µl des Wasch-Puffers II (20 mM Natriumchlorid, 2 mM Tris-HCl, pH 7,5) hinzugegeben und erneut zentrifugiert (4 °C, 15 s, 8000 x g). Die abzentrifugierten Lösungen wurden jeweils verworfen. Der finale Waschschritt beinhaltete die Zugabe von 300 µl Wasch-Puffer II und einer anschließenden Zentrifugation (4 °C, 2 min, 16000 x g) bis zur Trockne des Glasfaservlieses. Durch die Waschschritte wurden sowohl verbleibende Nukleotide aus dem DNA-Verdau, als auch störende Proteine und Salze vom Vlies entfernt.

Die isolierte und aufgereinigte RNA wurde schließlich aus dem Glasfaservlies eluiert, indem die Röhre in ein frisches 1,5 ml-Reagiergefäß platziert wurde, 50 µl Nuklease-freies Wasser direkt auf das Vlies pipettiert wurden und für 1 min bei 4 °C und 8000 x g zentrifugiert wurde. Die eluierte, hochreine RNA wurde bis zur weiteren Bearbeitung auf Eis gelagert. Die Langzeit-Lagerung der RNA-Proben erfolgte bei -80 °C.

### 5.3.3 Bestimmung der RNA-Konzentration

Wie unter 4.4.2 detailliert beschrieben, erfolgte auch hier möglichst direkt im Anschluss an die RNA-Isolierung die Bestimmung der Ausbeute per Nanodrop-Methode. Mit einem Verhältnis der Absorptionen bei 260 nm / 280 nm von circa 2 wurden die Proben als rein eingestuft. Der Mittelwert einer Zweifachbestimmung wurde zur Berechnung der RNA-Konzentration herangezogen. Proben mit einer RNA-Konzentration < 50 ng/µl wurden nicht weiter verwendet, stattdessen wurde eine erneute RNA-Isolierung aus den entsprechenden Gewebeproben durchgeführt. Im Mittel wurden somit RNA-Konzentrationen von  $193 \pm 108$  ng/µl (MW  $\pm$  SD) erzielt.

## 5.4 cDNA-Synthese

Um die Proben auf eine einheitliche Menge an totaler RNA zu normieren wurden, analog zu 4.4.3, jeweils direkt im Anschluss an die RNA-Konzentrations-Bestimmung 1000 ng totale RNA in cDNA umgeschrieben (Normalisierungsschritt 2, Abbildung B.16). Allerdings konnte bei 13 der insgesamt 86 Proben aus Lungengewebe keine ausreichende RNA-Konzentration erzielt werden (Ausbeute < 90 ng/µl), sodass bei diesen Proben lediglich 500 ng RNA in cDNA umgeschrieben wurden.

Das jeweilige berechnete Volumen der RNA-Lösung wurde mit Nuklease-freiem Wasser auf 11 µl ergänzt und mit 2 µl randomisierte Hexamer-Primern für 10 min bei 65 °C inkubiert. Anschließend wurden 4 µl Reaktions-Puffer, 0,5 µl Protector RNase Inhibitor (40 U/µl), 2 µl Desoxynukleotid-Mix (10 mM je Nukleotid) und 0,5 µl Transkriptor Reverse Transkriptase (20 U/µl) ergänzt und für 10 min bei 25 °C gefolgt von 30 min bei 55 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 85 °C für 5 min gestoppt. Zu jeder Probe wurde eine noRT-Kontrolle erstellt, die Langzeitlagerung fand bei -20 °C statt.

## 5.5 Vermessung der Proben mittels RT-qPCR

Die aus humanem Lungengewebe gewonnenen cDNA-Proben wurden im Oktober 2013 und im Oktober 2014 im Labor von Prof. Kathleen M. Giacomini (San Francisco, USA) vermessen. Zum Transport wurden die Proben jeweils für circa 24 h auf Trockeneis gelagert.

### 5.5.1 Versuchsplanungen

Insgesamt mussten aus 86 Proben die Expressions-Niveaus von zwölf Genen (neun Arzneistofftransporter-Gene, drei Referenz-Gene) jeweils im Triplikat vermessen werden. Zusätzlich mussten auf jeder Platte Kontrollen mitgeführt werden, wie Leerproben (no-template controls = NTC) und Lauf-Vergleichs-Proben (inter-run controls = IRC) (siehe *Einleitung* 2.3.2). Die NTC wurden für jeden Primer/Sonden-Mix auf jeder Platte im Duplikat vermessen (siehe Abbildung C.16). Als IRC wurde eine Mischung nicht mehr benötigter cDNA-Lösungen vorangegangener cDNA-Synthesen verwendet. Wichtig dabei war es, auf jeder Platte exakt die gleiche cDNA-Lösung (IRC) in der gleichen Konzentration an den gleichen Positionen der Platte zu vermessen (siehe Abbildung C.16). Die Kontroll-cDNA wurde mit vier Primer/Sonden-Mixen (OCT1, OCT3, OCTN2 und GAPDH) jeweils im Triplikat vermessen. Die vier Gene wurden als Referenzen ausgewählt, da sie in Vorversuchen die geringsten Standardabweichungen der jeweiligen  $C_T$ -Werte aufzeigten.

	Probe 1			Probe 2			Probe 3			Probe 4			Probe 5			Probe 6			Probe 7		NTC		IRC		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
A																									
B																									
C																									
D																									
E																									
F																									
G																									
H																									
I																									
J																									
K																									
L																									
M																									
N																									
O																									
P																									

Abbildung C.16: Exemplarische Darstellung des Pipettierschemas einer 384-Well-Platte: Je waagrechtlicher Reihe wurde ein Primer/Sonden-Mix pipettiert: OCT1 (A), OCT2 (B), OCT3 (C), OCTN1 (D), OCTN2 (E), MATE 1 (F), MDR1 (G), MRP1 (H), MRP5 (I) sowie die Referenz-Gene 18 S RNA (J), ACTB (K) und GAPDH (L). In senkrechten Reihen wurden die Proben im Triplikate sowie NTC (no-template controls) im Duplikate pipettiert. Zusätzlich wurden IRC (inter-run controls) mit vier Primer/Sonden-Mischungen (OCT1, OCT3, OCTN2 und GAPDH) jeweils im Triplikate eingesetzt.

Diese Menge an Proben machte eine akribische Planung der RT-qPCR-Versuche unabdingbar. Abweichend von der Analyse der cDNA-Proben aus Calu-3-Zellen (siehe 4.5) wurden hier alle Ziel- und Referenz-Gene auf einer Platte vermessen (siehe Abbildung C.16). Pro Platte konnten maximal sieben Proben analysiert werden, insgesamt wurden, bedingt durch die Vermessung in zwei Zeitperioden, vierzehn 384-Well-Platten zur Detektion aller Proben benötigt.

### 5.5.2 Vorbereitung der Proben und Lösungen

Die cDNA-Proben wurden zur Vermessung unmittelbar vor Verwendung 1:25-fach mit Nuklease-freiem Wasser verdünnt. Die 13 Proben, bei welchen eine geringere RNA-Ausbeute erzielt wurde und somit nur 500 ng RNA in cDNA umgeschrieben werden konnte, wurden entsprechend nur 1:12,5-fach verdünnt. Zur Vermeidung von DNA-Degradierung wurden die Proben dabei ständig auf Eis gelagert. Entsprechend wurde auch die IRC-cDNA-Lösung verdünnt und gehandhabt.

Für jedes der zwölf untersuchten Gene wurde ein Mix bestehend aus neun Teilen TaqMan® Master Mix und einem Teil spezifischen Primer/Sonden-Mix hergestellt, wobei auf das berechnete benötigte Gesamtvolumen jeweils circa 10 % aufgeschlagen wurde um einen Volumenverlust beim späteren Pipettieren kompensieren zu können. Auch die so vorbereiteten zwölf Mischungen wurden ständig auf Eis gelagert um einen Aktivitätsverlust der beinhalteten Polymerase zu vermeiden.

### 5.5.3 Pipettieren der 384-Well-Platten

Pro Well wurden zunächst 5 µl der entsprechend vorbereiteten TaqMan/Primer/Sonden-Mixe pipettiert. Anschließend wurden nach dem in 5.5.1 beschriebenem Schema 5 µl der vorbereiteten cDNA-Lösungen beziehungsweise 5 µl Wasser (NTC) in die entsprechenden Wells pipettiert. Die Menge an in cDNA umgeschriebener RNA lag damit für alle Proben bei 10 ng pro Well.

Nachdem die Platten beschickt waren, wurden sie mittels eines optisch durchlässigen selbstklebenden Films so fest verschlossen, dass bei den anschließenden Erhitzungs-Zyklen keine Flüssigkeit aus den Wells evaporieren konnte. Dies hätte eine Beeinträchtigung der PCR-Effizienz und somit eine Verfälschung der Ergebnisse zur Folge gehabt. Abschließend wurde die Platte für 1 min bei 800 x g zentrifugiert und kontrolliert, ob alle potentiell störenden Luftblasen aus den Wells entfernt werden konnten.

#### 5.5.4 qPCR-Lauf

Da der TaqMan® Master Mix eine thermostabile AmpliTaq® Fast DNA-Polymerase enthielt, die einen schnellen Start mit hohen Temperaturen erlaubte, war es möglich den qPCR-Lauf im Vergleich zu herkömmlichen Läufen zeitlich deutlich zu verkürzen. Der erste Schritt des Laufes beinhaltete die Erwärmung der Platte auf 50 °C für 2 min, anschließend wurde auf 95 °C erhitzt und diese Temperatur für 3 min konstant gehalten. Somit war die DNA-Polymerase aktiviert und die eigentliche Polymerase-Ketten-Reaktion konnte beginnen. Insgesamt 40 Zyklen mit zwei wechselnden Temperaturen (15 s bei 95 °C gefolgt von 40 s bei 60 °C) wurden aneinander gereiht.

Die Reaktionsansätze wurden bei 516 nm vermessen, da der an TaqMan-Sonden kovalent gebundene FAM™-Farbstoff (6-Carboxyfluorescein) bei dieser Wellenlänge Fluoreszenz emittierte (siehe *Einleitung* 2.2.2). Zusätzlich im Master-Mix enthalten war der passive Referenz-Farbstoff ROX™ (6-Carboxyl-X-Rhodamin), welcher Licht mit einer Wellenlänge von 602 nm emittiert. Jeweils am Ende eines Zyklus wurde die Fluoreszenz (R) in allen Wells einzeln gemessen, auf die Fluoreszenz des Referenzfarbstoffes ROX™ normalisiert (R<sub>n</sub>) und gegen die Zyklen-Zahl aufgetragen (siehe *Einleitung* 2.3.2). Als weiterer Schritt der Datenprozessierung wurde von der normalisierten Fluoreszenz die Basislinien-Fluoreszenz abgezogen ( $\Delta R_n$ ) um den Austritt der Fluoreszenz-Kurven aus dem Grundrauschen direkt miteinander vergleichen zu können (siehe *Einleitung* 2.3.2). Die Basislinie wurde dabei im Bereich von 5-13 Zyklen berechnet. Die Differenz wurde von der Software automatisch kalkuliert und anschließend gegen die Zyklen-Zahl aufgetragen. Manuell wurde zuletzt eine Schwellenlinie (threshold line) festgelegt, die oberhalb des Fluoreszenz-Grundrauschen aber noch im exponentiellen Bereich der Amplifikation lag. Zu dem Zyklus, an dem die Fluoreszenz-Kurve der jeweiligen Probe aus dem Grundrauschen austrat und die Schwellenlinie schnitt, lag jeweils der C<sub>T</sub>-Wert (threshold cycle) einer Probe (siehe *Einleitung* 2.2). Prinzipiell galt, je kleiner der C<sub>T</sub>-Wert, desto mehr cDNA des untersuchten Gens lag zu Beginn der PCR in der Probe vor.

#### 5.5.5 Reaktions-Effizienzen

Zur Bestimmung der Effizienzen für die PCR-Amplifikationen der zwölf untersuchten Gene wurden zwei Verdünnungen der IRC-Stammlösung hergestellt und zusätzlich zur Stammlösung selbst verwendet. Somit wurden pro Well 100 ng, 10 ng und 1 ng in cDNA umgeschriebene RNA eingesetzt und die Bestimmung erfolgte analog zu der Vermessung der Proben im Triplikat. Durch Einbezug der Steigung der Kalibriergerade (siehe *Einleitung* 2.3.2) konnten unter Verwendung von Formel 3 für die Effizienzen Werte > 97 % festgestellt werden, mit Ausnahme von 18 S RNA (86 %) und OCT2 (79 %). Letzteres Gen musste jedoch ohnehin aufgrund extrem hoher und zum Teil nicht detektierbarer C<sub>T</sub>-Werte von der finalen

Datenauswertung ausgeschlossen werden. Die für jeden Primer/Sonden-Mix bestimmte Effizienz wurde anschließend in die Datenauswertung mit einbezogen, die Auswertung erfolgte somit Effizienz-korrigiert [134] (Normalisierungsschritt 4, Abbildung B.16).

## 5.6 Auswertung der Daten aus RT-qPCR-Messungen

Da die theoretische Verdopplung der DNA im Rahmen einer PCR nur bis zu einem gewissen Grad exponentiell verläuft, mussten hohe  $C_T$ -Werte kritisch betrachtet werden [105] und wurden ab einem  $C_T$ -Wert  $> 35$  nicht mehr in die Auswertung mit eingeschlossen. Dieses betraf hauptsächlich nur die Auswertung der OCT2-Expression, da die in den Proben enthaltenen entsprechenden Gensequenzen kaum oder überhaupt nicht in der Probe nachgewiesen werden konnten (alle  $C_T$ -Werte  $> 30$ ). Des Weiteren wurden zwei Proben von der Auswertung ausgeschlossen, welche bei allen untersuchten Genen  $C_T$ -Werte  $> 30$  oder überhaupt kein Signal aufzeigten. Zur Vergleichbarkeit aller Werte untereinander wurde die Schwellenlinie bei allen 14 Platten auf 0,02 festgelegt.

### 5.6.1 Ausreißertest

Die im Triplikat erhobenen  $C_T$ -Werte der verbleibenden 84 Proben sowie die IRC-Werte jeder Platte wurden alle einem Ausreißertest unterzogen. Einzelne Werte wurden ausgeschlossen, wenn eine der folgenden Bedingungen zutrif [329] (Formel 17):

$$\frac{C_{T_{max}} - C_{T_2}}{C_{T_{max}} - C_{T_{min}}} > 0.886 \quad \text{oder} \quad \frac{C_{T_{min}} - C_{T_2}}{C_{T_{min}} - C_{T_{max}}} > 0.886$$

Formel 17

- $C_{T_{max}}$  = maximaler Wert von 3 individuellen  $C_T$ -Werten
- $C_{T_2}$  = mittlerer Wert von 3 individuellen  $C_T$ -Werten
- $C_{T_{min}}$  = minimaler Wert von 3 individuellen  $C_T$ -Werten

### 5.6.2 IRC-Normalisierung

Aus den IRC-Mittelwerten aller 14 vermessener Platten wurde für jedes der vier untersuchten Gene (OCT1, OCT3, OCTN2 und GAPDH) der Mittelwert gebildet. Bezogen auf

diese Mittelwerte wurden plattenspezifische Abweichungen in der Detektion für jedes der vier Gene berechnet. Daraufhin wurde für jede Platte einzeln ein Plattenfaktor bestimmt, der zur Normalisierung aller  $C_T$ -Werte dieser Platte verwendet wurde. Dieser Plattenfaktor war der Mittelwert aus den vier plattenspezifischen Abweichungen der vier Gene.

Die Plattenfaktoren variierten in ihren Werten zwischen 0,968 und 1,024, was deutlich machte, dass es keine drastischen Abweichungen in den Messwerten zwischen den einzelnen Platten gab. Nichtsdestotrotz wurde eine Normalisierung aller einzelnen  $C_T$ -Werte durchgeführt um eine vollständige Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Platten zu erreichen (Normalisierungsschritt 3, Abbildung B.16).

### 5.6.3 Normierung auf Referenz-Gene

Für die 84 Proben, für welche nun Werte zur Verfügung standen, wurde jeweils aus den IRC-normalisierten  $C_T$ -Werten der Mittelwert gebildet. Die Mittelwerte der Referenz-Gene 18 S RNA, GAPDH und ACTB wurden mittels der BestKeeper® Software hinsichtlich ihrer konstanten Expression in allen Proben untersucht (siehe 3.6). Fünf der 84 Proben zeigten dabei unzureichende intrinsische Varianzen (> vierfache Über- oder Unterexpression), weshalb sie im Folgenden für die relative Quantifizierung ausgeschlossen wurden. Somit wurden insgesamt 79 Proben hinsichtlich ihrer Genexpressions-Niveaus untersucht.

Da die Expression von einzelnen Referenz-Genen erheblich variieren kann wird der Einsatz von mindestens drei Referenz-Genen empfohlen (siehe *Einleitung* 2.3.3) [121], was hier durch den Einsatz von 18 S RNA, GAPDH und ACTB gewährleistet war. Die Software berechnete zusätzlich aus den Daten der drei vermessenen Referenz-Gene unter Einbezug der jeweiligen ermittelten Effizienzen für jede der 79 Proben einen BestKeeper-Wert, welcher das geometrische Mittel der drei Referenz-Gene darstellte [127]. Dieser für jede Probe individuelle Wert wurde als Bezugspunkt zur relativen Quantifizierung der Genexpression der untersuchten Arzneistofftransporter herangezogen (Normalisierungsschritt 5, Abbildung B.16).

### 5.6.4 Relative Quantifizierung mittels REST®

Unter Berücksichtigung der jeweiligen Effizienz berechnete das *Relative Expression Software Tool* (REST®) unter Verwendung eines *Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test*® die relative Expression der Ziel-Gene bezogen auf Referenz-Gene (siehe *Einleitung* 2.3.3). Zur Normalisierung auf eine Referenz wurden hier die Mittelwerte der einzelnen  $C_T$ -Werte für jedes Transporter-Gen und jede Probe gegen den jeweiligen zuvor ermittelten

BestKeeper-Wert untersucht. Je nach Wahl der Kontrollgruppe konnten unter Verwendung von REST® unterschiedliche Fragestellungen beantwortet werden. Zur Untersuchung der individuellen Transporter-Expressionen der Proben wurden die für jede Probe detektierten Werte gegen die Werte aller 79 Proben ausgewertet. Somit konnte die individuelle Über- oder Unterexpression der Arzneistofftransporter in den Lungengewebsproben bezogen auf das gesamte Proben-Kollektiv dargestellt werden.

Bei der Betrachtung geschlechtsspezifischer Unterschiede wurden die Proben von männlichen Spendern als Kontrollgruppe definiert und die Proben von weiblichen Spendern als Interventionsgruppe behandelt. Analog wurde zur Untersuchung unterschiedlicher Altersgruppen vorgegangen. Der Expressions-Unterschied wurde dabei als signifikant betrachtet, wenn ein p-Wert  $< 0,05$  berechnet wurde.



## 6 Unterschiede in der Protein-Expression von Arzneistofftransportern in humanem Lungengewebe

### 6.1 Verwendete Reagenzien, Geräte und Materialien

#### 6.1.1 Reagenzien

DL-Dithiothreitol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natriumchlorid	
Glycerol for molecular biology 99 %	
Dinatriumhydrogenphosphat x 12 H <sub>2</sub> O	
N-Octyl-β-D-thioglucopyranosid	GERBU Biotechnik, Heidelberg
Tris-(hydroxymethyl)-methylamin (Tris), 99+%, for biochemistry	ACROS Organics, Geel, Belgien
Kaliumchlorid	Grüssing, Filsum
Kaliumdihydrogenphosphat	
Magermilchpulver, sprühgetrocknet	J.M. Gabler Saliter, Obergünzburg
Tween® 20 Ph.Eur.	Carl Roth, Karlsruhe

Der monoklonale Antikörper Anti-SLC22A3 antibody [EPR6630], rabbit (ab124826) wurde von abcam® (Cambridge, Vereinigtes Königreich) bezogen und als primärer Antikörper zur Detektion von humanem OCT3 mittels Western-Blot-Technik eingesetzt. Als sekundärer Antikörper diente der mit Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase = HRP) konjugierte Antikörper rabbit anti-goat IgG-HRP (sc-2922) von Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg).

Millipore®-Wasser wurde aus der hauseigenen Wasseraufbereitungsanlage Milli-Q® Synthesis (Merck Millipore, Darmstadt) gewonnen.

#### 6.1.2 Lösungen

Bolt® MES SDS Running Buffer (20x)	Novex™, Life Technologies, Carlsbad, USA
Bolt® LDS Sample Buffer (4x)	
Bolt® Sample Reducing Agent	
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific™, Life Technologies, Carlsbad, USA
Pierce™ Bovine Serum Albumin Standard Ampules, 2 mg/ml	
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	

Protease Inhibitor Cocktail for use with mammalian cell and tissue extracts, DMSO Lösung	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Clarity™ Western ECL Blotting Substrate	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA

Als Lysepuffer wurde eine Lösung von 0,1 M Natriumchlorid, 0,05 M Tris und 5 % (V/V) Glycerol in Millipore®-Wasser verwendet.

10x PBS-Puffer enthielt 1,37 M Natriumchlorid, 27 mM Kaliumchlorid, 18 mM Kaliumdihydrogenphosphat und 100 mM Dinatriumhydrogenphosphat in Millipore®-Wasser und wurde zur Verwendung 1:10 mit Millipore®-Wasser verdünnt.

20x PBST-Puffer enthielt 1 % (V/V) Tween® 20 in 1x PBS-Puffer und wurde zur Verwendung 1:20 mit 1x PBS-Puffer verdünnt.

### 6.1.3 Geräte

Feinwaage, ABJ 220-4M	Kern & Sohn, Balingen
Feinwaage, AB204-S/PH	Mettler-Toledo, Greifensee, Schweiz
Vortex 2 Genie	VWR, Ismaning
Schüttler, Mini Rocker MR-1	A. Hartenstein, Würzburg
Dispergierer, T 10 basic ULTRA-TURRAX® mit Dispergierwerkzeug S 10 N – 5 G	IKA, Staufen
Zentrifuge, Microfuge 22 R	Beckmann Coulter, Krefeld
Plattenlesegerät, Multiscan Ascent mit Ascent™ Software	Thermo Scientific™, Life Technologies, Carlsbad, USA
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Pipetten, Eppendorf Research® plus, 0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl	
Gelelektrophorese-Kammer, Bolt® Mini Gel Tank	Novex™, Life Technologies, Carlsbad, USA
iBlot® Gel Transfer Device	
Spannungsgeber, Electrophoresis power supply EPS 301	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Detektionssystem FluorChem™ FC2 mit AlphaEaseFC Software Version 6.0.2	Alpha Innotech, San Leandro, USA
Gefrierschrank HERAfreez, -80 °C	Heraeus, Hanau
Gefrierschrank profi line, -20 °C,	Liebherr, Biberach an der Riß

Zur digitalen Auswertung der detektierten Immunoblots wurde die Software ImageJ 1.46r verwendet.

### 6.1.4 Materialien

Schraubröhre 50 ml, 115 x 28 mm, aus Polypropylen, steril	Sarstedt, Nümbrecht
Mikro-Schraubröhre 2 ml, aus Polypropylen, steril	
Reagiergefäß 1,5 ml, aus Polypropylen, mit anhängendem Deckel	
Pipettenspitzen, 0,1 – 20 µl, 2 – 100 µl, 50 – 1250 µl	
Einweg-Skalpell, steril	megro, Wesel
ELISA-Platte, Microlon, 96 K, F-Form	Grainer Bio-one, Kremsmünster, Österreich
Bolt® 4-12% Bis-Tris Plus Gel, 10-well	Novex™, Life Technologies, Carlsbad, USA
iBlot® Transfer Stack, nitrocellulose, regular size	
Gelinkubationsschalen, Ultra Cruz®, large	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

Flüssiger Stickstoff und Trockeneis zur Lagerung wurden in Großmengen von Linde, München bezogen.

## 6.2 Humanes Lungengewebe

Zur Untersuchung der Protein-Expression von Arzneistofftransportern im humanen Lungengewebe wurden 12 individuelle Gewebeproben herangezogen. Es handelte sich dabei um diejenigen Lungengewebsproben, die im Anschluss an eine Applikation von Ipratropiumbromid an humanen Lungenlappen mit nachfolgender erfolgreicher Perfusion im Thoraxzentrum Bezirk Unterfranken (Münnerstadt) genommen wurden. Die Patienten wurden unter den in 2.2 beschriebenen Kriterien rekrutiert. Die Entnahme der Gewebeproben erfolgte direkt nach Beendigung einer erfolgreichen Perfusion, die Proben wurden anschließend zum Transport auf Trockeneis gelagert und die Langzeitlagerung fand bei -80 °C statt.

## 6.3 Protein-Isolierung aus humanem Lungengewebe

### 6.3.1 Vorbereitung der Gewebeproben

Um eine gleichmäßige Protein-Isolierung aus den humanen Lungengewebsproben zu gewährleisten, mussten die Proben pulverisiert und zu 100 mg Gewebe abgewogen werden (Normalisierungsschritt 1, Abbildung C.17). Die Pulverisierung der Gewebeproben erfolgte

wie unter 5.3.1 beschrieben. Jeweils 95 – 105 mg des pulverisierten Gewebes wurden direkt in vorgekühlte 2 ml-Schraubröhren abgewogen und anschließend wiederum in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der Aliquote an pulverisiertem Gewebe erfolgte bis zur weiteren Bearbeitung bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .



Abbildung C.17: Probenaufarbeitung und Normalisierungsschritte zur Bestimmung der Protein-Expression von Arzneistofftransportern in humanem Lungengewebe. **1:** Probenvorbereitung und Normalisierung auf eine einheitliche Masse (95 – 105 mg) an pulverisiertem Lungengewebe. **2:** Normalisierung auf eine konstante Menge an Gesamt-Protein (50  $\mu\text{g}$ ).

### 6.3.2 Protein-Isolierung

Zu 100 mg pulverisiertem Gewebe wurden 700  $\mu\text{l}$  des Lyse-Puffers, 7  $\mu\text{l}$  Protease Inhibitor Cocktail, 1  $\mu\text{l}$  Dithiothreitol in Millipore®-Wasser (0,65 mM) und 78  $\mu\text{l}$  N-Octyl- $\beta$ -D-thioglucopyranosid in Millipore®-Wasser (0,29 mM) hinzugegeben. Die Proben wurden anschließend für 20 s mittels Vortex vermischt und sofort im Anschluss in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Durch Lagerung auf Eis wurden die Proben langsam wieder auf circa  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  erwärmt und auf dem Schüttler für 1 h auf Eis inkubiert. Um den Gewebe- und Zellaufschluss zu maximieren wurde anschließend zusätzlich für dreimal 20 s mit dem Rotor-Stator-Dispergierer homogenisiert (Geschwindigkeitsstufe 3), zwischen den einzelnen Dispergierschritten wurden die Proben jeweils für ebenfalls 20 s auf Eis gestellt um eine Degradierung der Proteine zu verhindern. Abschließend wurden die Proben für 1 h bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  und  $18000 \times g$  zentrifugiert, 500  $\mu\text{l}$  des Überstands wurden als Protein-Lysat für die weiteren Untersuchungen herangezogen.

### 6.3.3 Bestimmung der Protein-Konzentration

Zur genauen Bestimmung der Gesamt-Protein-Konzentration in den Probenlösungen wurde aus dem Albumin-Standard eine Verdünnungsreihe mit Millipore®-Wasser in den Konzentrationen 2 mg/ml, 1 mg/ml, 0,75 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml und 0 mg/ml hergestellt. Um eventuell variierende Effekte auf den Bicinchoninsäure (BCA)-Assay durch die hinzugefügten Zusätze berücksichtigen zu können wurden auch hier jeweils anteilig Protease Inhibitor

Cocktail, Dithiothreitol-Lösung und N-Octyl- $\beta$ -D-thioglucopyranosid-Lösung hinzugefügt, was jedoch zu einer Verdünnung und somit zu einer Erniedrigung der jeweiligen tatsächlichen Proteinkonzentration an den Kalibrierpunkten führte (siehe Tabelle C.21).

Tabelle C.21: Tatsächliche Albumin-Konzentration der sechs Albumin-Kalibrierpunkte zur Bestimmung der Gesamt-Proteinkonzentration mittels Bicinchoninsäure (BCA)-Assay.

Albumin-Kalibrierpunkt	Tatsächliche Albumin-Konzentration [mg/ml]
2	1,781
1	0,89
0,75	0,668
0,5	0,445
0,25	0,223
0	0

Die Lysate aus humanem Lungengewebe sowie die sechs Albumin-Kalibrierpunkte wurden jeweils im Triplikat mittels Bicinchoninsäure-Assay vermessen. Dazu wurden auf einer 96-Well-Platte je Well 200  $\mu$ l Reagenz A (enthielt Natriumcarbonat und Bicinchoninsäure-Dinatriumsalz) und Reagenz B (enthielt Kupfer(II)-Sulfat) (49 +1) [330] des BCA Protein Assay Kits vorgelegt und jeweils 10  $\mu$ l der zu untersuchenden Protein-Lösung dazu pipettiert. Nach Inkubation für 30 min in Dunkelheit bei Raumtemperatur wurde die Platte anschließend bei einer Wellenlänge von 600 nm vermessen. Aus den ermittelten Absorptions-Mittelwerten der Albumin-Kalibrierpunkte wurde mittels linearer Regression eine Kalibriergerade erstellt, welche wiederum zur Ermittlung der tatsächlichen Gesamt-Protein-Konzentration in den Lysaten der Gewebeproben herangezogen wurde.

## 6.4 Protein-Detektion mittels Western-Blot-Analytik

### 6.4.1 Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe mittels SDS-Page und Transfer der Proteine

Um die Gewebeproben auf eine einheitliche Menge an isoliertem Gesamt-Protein zu normalisieren, wurden jeweils pro Tasche des Bolt® 4-12% Bis-Tris Plus Gels 50  $\mu$ g Protein aufgetragen (Normalisierungsschritt 2, Abbildung C.17). Die Proben wurden dazu mit Millipore®-Wasser zu Lösungen der Protein-Konzentration 50  $\mu$ g / 30  $\mu$ l verdünnt. Zu 30  $\mu$ l verdünntem Lysat wurden jeweils 10  $\mu$ l Bolt® LDS Sample Buffer und 4  $\mu$ l Bolt® Sample Reducing Agent hinzugegeben und die Proben für 3 min bei 85 °C mittels Thermomixer

vorsichtig geschüttelt. Direkt im Anschluss wurden die Proben auf Eis gestellt und somit wiederum auf 4 °C abgekühlt. Die so vorbereiteten Probenlösungen wurden jeweils in eine Tasche des Gels geladen. Pro Gel wurde zusätzlich in eine Tasche 7 µl des Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder geladen, um anschließende eine Bewertung der Protein-Größe der detektierten Banden zu ermöglichen. Der Gel-Lauf fand für 35 min bei 165 V unter Verwendung von Bolt® MES SDS Running Buffer (1x) statt, bis der Protein-Standard eine ausreichende Auftrennung nach Protein-Größe anzeigte.

Die Proteine wurden nach Beendigung der SDS-Page (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis = Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Der Transfer fand unter Verwendung des iBlot® Gel Transfer Device und des iBlot® Transfer Stack für 7 min bei 20 V statt.

#### **6.4.2 Inkubation der Membranen mit Antikörpern**

Die Nitrocellulose-Membranen wurden für circa 2 Stunden bei Raumtemperatur (RT) in 5 % (m/m) Magermilchpulver in PBS Puffer blockiert um verbliebene potentielle Proteinbindestellen abzusättigen und somit das Hintergrund-Signal bei der Protein-Detektion so gering wie möglich zu halten. Die Inkubation mit dem primären Antikörper zur spezifischen Detektion von OCT3 fand über Nacht (circa 15 h) im Kühlraum bei 4 – 8 °C auf dem Schüttler statt. Der Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1 : 50000 in 5 % (m/m) Magermilchpulver in PBS Puffer eingesetzt. Anschließend wurden die Membranen in vier Schritten für jeweils 5 min bei RT auf dem Schüttler gewaschen, um eine vollständige Entfernung des nicht gebundenen Antikörpers zu erzielen. Der erste Waschschrift wurde mit 20 ml PBS Puffer durchgeführt, gefolgt von zwei Waschschriften mit jeweils 20 ml PBST Puffer und einem abschließenden Waschschrift mit 20 ml PBS Puffer.

Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper fand in einer Verdünnung von 1 : 1000 in 5 % (m/m) Magermilchpulver in PBS Puffer bei RT für 4 h auf dem Schüttler statt. Der weniger spezifische, HRP-konjugierte sekundäre Antikörper band dabei an den primären Antikörper. Zwar war der sekundäre Antikörper ursprünglich zur Detektion von IgG-Antikörpern aus Ziegen ausgelegt (anti-goat IgG), allerdings konnte in Vorversuchen gezeigt werden, dass sowohl eine Bindung an den verwendeten monoklonalen Kaninchen-Antikörper stattfand (Signal vorhanden) als auch keine Kreuz-Reaktivität zu in den Proben enthaltenen menschlichem IgG stattfand (keine Banden nach Inkubation ohne primären OCT3-Antikörper). Dass trotzdem eine Detektion des Kaninchen-Antikörpers möglich war ist durch eine Kreuz-Reaktivität des sekundären Antikörpers zu Kaninchen IgG erklärbar und rechtfertigte den Einsatz. Abschließend wurden die Membranen erneut in vier Schritten (1 x PBS, 2 x PBST, 1x PBS) mit jeweils 20 ml Puffer für 5 min auf dem Schüttler bei RT gewaschen.

### **6.4.3 Detektion**

Zur Entwicklung der Membranen wurden 2 ml Lösung A des Clarity™ Western ECL Blotting Substrats (enthielt Luminol) mit 2 ml Lösung B (enthielt Natriumperoxid) vermischt und für 2 min auf der Membran inkubiert. Durch die an den sekundären Antikörper gekoppelte Meerrettich-Peroxidase wurde die Reaktion von Luminol zum Dicarboxylat-Dianion unter Freisetzung von Chemilumineszenz katalysiert [331, 332]. Die Detektion der frei gesetzten Lichtquanten fand je Membran für 2 min und 10 min statt und die Darstellung der Ergebnisse erfolgte digital durch die AlphaEaseFC Software. Anschließend erfolgte die Auswertung der detektierten Banden in entsprechender Höhe (61 kDa) mittels Image J Software. Ein semiquantitativer Vergleich der Banden auf zwei verschiedenen Membranen konnte sichergestellt werden, da drei Proben auf beiden Membranen analysiert wurden und eine Vergleichbarkeit der Membranen ermöglichten.

## 7 Zelluläre Aufnahme von [<sup>3</sup>H]-Ipratropiumbromid in stabil transfizierte Zellen

### 7.1 Verwendete Reagenzien, Geräte und Materialien

#### 7.1.1 Radioaktiv markierte Substanzen

[Methyl-<sup>3</sup>H]-Ipratropiumbromid ([<sup>3</sup>H]-IB) mit einer spezifischen Aktivität von 173,8 mCi/mg und einer Konzentration von 0,7 mCi/ml wurde von GlaxoSmithKline (Ware, England) zur Verfügung gestellt. Albuterol (= Salbutamol)-[ring-<sup>3</sup>H] ([<sup>3</sup>H]-SB) wurde von American Radio-labeled Chemicals (St. Louis, USA) bezogen, die spezifische Aktivität betrug 82,9 µCi/mg in einer Konzentration von 1 mCi/ml.

#### 7.1.2 Stabil transfizierte Zellen

Die humane embryonale Nierenzelllinie HEK293 wurde in der Gruppe von Prof. Kathleen M. Giacomini (UCSF, San Francisco, USA) mit der jeweiligen vollständigen humanen Referenz-cDNA transfiziert und die Zelllinien etabliert [43, 44, 48]. Verwendet wurden hier zum einen mit humanem OCT1 stabil transfizierte HEK293 Zellen (HEK-h-OCT1), zum anderen mit humanem OCT3 (HEK-h-OCT3) stabil transfizierte Zellen. Als Kontrolle wurden HEK-MOCK Zellen (leerer Vektor) herangezogen.

#### 7.1.3 TaqMan® Genexpression Kits

Die optimierten Reaktions-Mischungen mit spezifischen Primern und Sonden wurden in Kombination mit TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2x) eingesetzt und von Applied Biosystems® Life Technologies (Carlsbad, USA) bezogen.

Transporter	Genexpression Kit	Referenz-Gen	Genexpression Kit
OCT1	Hs00427552_m1	GAPDH	4332649
OCT3	Hs01009568_m1	ACTB	Hs01060665_g1
		18 S RNA	Hs99999901_s1



### 7.1.4 Sonstige Reagenzien

Dulbecco`s Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco® Life Technologies, Carlsbad, USA
Penicillin / Streptomycin (10000 U/ml / 10000 µg/ml)	
HBSS (Hank`s Balanced Salt Solution)	
Fetales Kälberserum (FBS = fetal bovine serum)	UCSF Cell Culture Facility, San Francisco, USA
Hygromycin B (50 mg/ml)	Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, USA
Super Script® VILO cDNA Synthesis Kit	
β-Estradiol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natriumhydroxid	
SDS (Sodium dodecyl sulfate)	
EcoLite(+) <sup>TM</sup> Liquid Scintillation Cocktail	MP Biomedicals, Santa Ana, USA
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific™, Life Technologies, Carlsbad, USA
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Venlo, Niederlande
Nuklease-freies Wasser	Ambion® Life Technologies, Carlsbad, USA

### 7.1.5 Geräte

CO <sub>2</sub> Inkubator, MCO-18AC	Panasonic, Kadoma, Japan
Sicherheitswerkbank, Bio Safety Class II Cabinet	Kleanzone Devices, Chennai, India
Mikroskop, EVOS® XL Core Cell Imaging System	Thermo Scientific™, Life Technologies, Carlsbad, USA
Photometer, Multiskan™ FC mit SkanIt™ Software	
Zentrifuge, Sorvall Legend RT	
Mini-Zentrifuge, 05-090-128	
LS 6500 Multipurpose Scintillation Counter	Beckman Coulter, Brea, USA
Mikrotiterplatten-Schüttler, GeneMate Orbital Shaker MP4	BioExpress, Kaysville, USA
7900HT Fast Real-Time PCR System mit SDS 2.3 Software	Applied Biosystems® Life Technologies, Carlsbad, USA
Pipetten, Rainin Lite XLS, 0,1 – 2 µl, 2 – 20 µl, 20 – 100 µl, 100 – 1000 µl	Mettler Toledo, Greifensee, Schweiz
Pipette, Rainin EDP 3 Plus 0,5 – 200 µl	

### 7.1.6 Materialien

24-Well Platte, Corning® BioCoat™, poly-D-Lysin beschichtet	Corning , Tewksbury, USA
96-Well Zellkultur-Platte, Corning® Costar®, Polystyren	
1,5 ml Reagiergefäß, Axygen®, steril	
0,2 ml Reagiergefäß, Axygen®, steril	
Schraubröhre zur Szintillations-Messung, Fisherbrand™ HDPE 7ml Scintillation Vial	Thermo Scientific™, Life Technologies, Carlsbad, USA
384-Well Platte, MicroAmp® Optical Reaction Plate	Applied Biosystems® Life Technologies, Carlsbad, USA
Selbstklebende Folie, MicroAmp® Optical Adhesive Film	
15 ml Schraubröhre, Accuflow Centrifuge Tubes, steril	E&K Scientific, Santa Clara, USA
Pipettenspitzen, BioClean 10 µl, 200 µl, 1000 µl	Mettler Toledo, Greifensee, Schweiz

## 7.2 Zellkultur

Die drei stabil transfizierten HEK293 Zelllinien HEK-h-OCT1, HEK-h-OCT3 und HEK-MOCK wurden jeweils in Dulbecco`s Modified Eagle Medium supplementiert mit 10 % (V/V) fetalem Kälberserum, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 75 µg/ml Hygromycin B kultiviert. Die Aufbewahrung erfolgte im Inkubator unter humider 5-prozentiger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre bei 37 °C. Die Zellen wurden während der Kultivierung unter aseptischen Bedingungen an einer Sicherheitswerkbank mit laminarer Luftströmung bearbeitet.

Zur Durchführung der Versuche mit den radioaktiv markierten Substanzen wurden die Zellen trypsiniert, gezählt (siehe 4.2) und in einer Anzahl von 350 000 Zellen pro Well in eine poly-D-Lysin beschichtete 24-Well Platte ausgesät. Dabei wurde auf jeder Platte die gleiche Anzahl Wells mit HEK-MOCK und HEK-h-OCT1, respektive HEK-h-OCT3, besiedelt um einen direkten Vergleich zwischen Zellen mit und ohne erhöhter Transporter-Expression gewährleisten zu können. Nach circa 24 Stunden wurden die Zellen mikroskopisch hinsichtlich ihrer Adhärenz und Konfluenz (70 – 80 %) untersucht und die morphologische Gleichförmigkeit beurteilt (siehe Abbildung C.18).

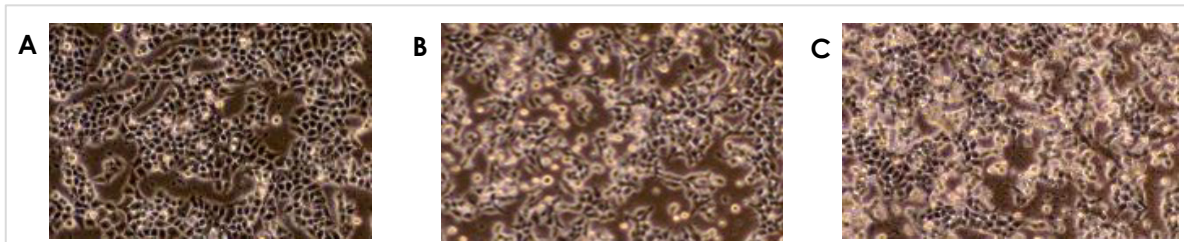


Abbildung C.18: Beispielhafte Abbildungen der Zellmorphologie von **A:** HEK-MOCK, **B:** HEK-h-OCT1; **C:** HEK-h-OCT3.

## 7.3 Verifizierung der Transporter-Expression in stabil transfizierten Zellen

### 7.3.1 RNA-Isolierung aus stabil transfizierten Zellen und cDNA-Synthese

Zur Sicherstellung, dass die untersuchten Zelllinien tatsächlich den postulierten Transporter (OCT1 / OCT3) verstärkt exprimieren, wurden die kultivierten Zellen (HEK-MOCK, HEK-h-OCT1 und HEK-h-OCT3) jeweils trypsinisiert und pelletiert (circa  $1 \times 10^7$  Zellen). Die Zellpellets wurden direkt im Anschluss lysiert und die totale RNA wurde nach Protokoll des Herstellers [333] isoliert. Per Nanodrop-Methode wurde die RNA-Konzentration bestimmt (siehe 4.4.2) und 1  $\mu\text{g}$  totale RNA nach Protokoll des Herstellers [334] in cDNA umgeschrieben. Die Lagerung erfolgte für RNA bei  $-80^\circ\text{C}$ , für cDNA bei  $-20^\circ\text{C}$ .

### 7.3.2 Vermessung der cDNA mittels RT-qPCR

Die drei cDNA-Lösungen wurden mit RNase-freiem Wasser auf eine Konzentration von 2 ng/ $\mu\text{l}$  verdünnt. Auf einer 384-Well-Platte wurden jeweils 5  $\mu\text{l}$  der verdünnten cDNA-Lösung zusammen mit 4,5  $\mu\text{l}$  TaqMan® Master Mix und 0,5  $\mu\text{l}$  des entsprechenden spezifischen Primer- und Sonden- Mixes pipettiert. Zum einen wurde die Expression der beiden Transporter-Gene OCT1 und OCT3 untersucht, zum anderen wurden die Referenz-Gene GAPDH und ACTB sowie 18 S RNA hinsichtlich ihrer Expression analysiert. Alle Reaktionen wurden im Triplikат durchgeführt. Nach dem Verschließen der Platte mit einem selbstklebenden, optisch durchlässigen Film wurde die Platte zentrifugiert (1 min,  $800 \times g$ ) und der qPCR-Lauf, wie in 5.5 beschrieben, gestartet. Die Auswertung der gemessenen  $C_T$ -Werte erfolgte als relative Quantifizierung bezogen auf den Mittelwert der drei Referenz-Gene.

## 7.4 Zelluläre Aufnahme von [<sup>3</sup>H]-Ipratropiumbromid ([<sup>3</sup>H]-IB)

### 7.4.1 Inkubationspuffer

Als Inkubationspuffer wurde eine 1 : 3000 Verdünnung (3 nM, Inkubationspuffer 1) beziehungsweise eine 1 : 30000 Verdünnung (0,3 nM, Inkubationspuffer 2) der Stammlösung von [<sup>3</sup>H]-IB (siehe 7.1.1) mit HBSS unmittelbar vor Beginn der Inkubationsversuche erstellt. Diese Lösungen wurden vor Verwendung auf 37 °C erwärmt.

### 7.4.2 Inkubation der Zellen mit [<sup>3</sup>H]-Ipratropiumbromid

Zu Beginn der Versuche wurde das Medium aus den einzelnen Wells abgesaugt und die Zell-Monolayer jeweils zweimal vorsichtig mit 1 ml auf 37 °C erwärmter HBSS gewaschen. Nachdem alle Rückstände der HBSS vollständig aus den Wells entfernt worden waren, wurde durch Zugabe von 400 µl des jeweiligen Inkubationspuffers die Inkubation der Zellen mit radioaktiv markiertem [<sup>3</sup>H]-IB gestartet. Dabei wurde mit der längsten Inkubationszeit begonnen (30 min) und in den jeweiligen zeitlichen Abständen die weiteren Inkubationszeiten (10 min, 6 min und 3 min) gestartet. Die Inkubation erfolgte pro Zeitpunkt, Inkubationspuffer und Zelllinie im Triplikat (siehe Abbildung C.19).

	HEK-MOCK			HEK-h-OCT1		
3 min						
6 min						
10 min						
30 min						

Abbildung C.19: Exemplarisches Platten-Design der [<sup>3</sup>H]-Ipratropiumbromid-Inkubationsversuche: HEK-h-OCT1 Zellen (oder HEK-h-OCT3 Zellen) wurden für 3 min, 6 min, 10 min und 30 min inkubiert und gegen HEK-MOCK Zellen verglichen.

Zum gleichen Zeitpunkt wurde die Inkubation in allen Wells gestoppt indem möglichst zügig der Inkubationspuffer aus den Wells abgekippt und die Zell-Monolayer jeweils zweimal mit 1 ml eiskalter HBSS gewaschen wurden. Nach dem zweiten Waschschrift musste sorgfältig darauf geachtet werden, alle Rückstände des Inkubationspuffers vollständig aus den Wells zu entfernen um eine Verfälschung der Ergebnisse durch diesen zu

verhindern. Zuletzt wurde pro Well 800 µl eines lysierenden Puffers (0,1 % SDS (m/V) und 0,1 M Natriumhydroxid (m/V) in Millipore®-Wasser) hinzugefügt und für 2 h bei 37 °C auf einem Mikrotiterplatten-Schüttler lysiert.

### 7.4.3 Messung der Szintillation

Zur Messung der Szintillation in den Zell-Lysaten wurden jeweils 600 µl des Lysates mit 3 ml EcoLite(+)<sup>TM</sup> Szintillations-Cocktail in eine Schraubröhre gegeben und für 20 s mittels Vortex vermischt. Die Proben wurden anschließend mit einem Szintillationszähler vermessen.

Tritium-markierte Substanzen emittieren im Rahmen des Beta-Zerfalls Elektronen und somit wird Energie freigesetzt. Durch diese werden die Chromophore der Flüssigkeitsmoleküle im verwendeten Szintillations-Cocktail angeregt und demzufolge werden Photonen emittiert, welche wiederum an einer Photokathode als Impulse pro Minute (counts per minute = CPM) gemessen werden können [335]. Das Ausmaß der zellulären Aufnahme von [<sup>3</sup>H]-IB in die entsprechenden Zellen konnte schließlich durch proportionale Umrechnung auf die ursprüngliche Strahlungsquelle als Kernzerfall pro Minute (disintegrations per minute = DPM) dargestellt werden. Diese Rate beschreibt den tatsächlichen radioaktiven Kernzerfall in der Quelle der Strahlung, also in der Probe. Durch zusätzliche Vermessung einer Positiv-Kontrolle (10 µl Inkubationspuffer in 3 ml Szintillations-Cocktail) konnte der in den Proben gemessene Kernzerfall pro Minute entsprechend der eingesetzten Konzentration an [<sup>3</sup>H]-IB in die aufgenommene Stoffmenge [pmol] umgerechnet werden.

### 7.4.4 Messung des Proteingehalts

Da die ausgesäte Zellzahl immer nur eine grobe Normierung der tatsächlich vorliegenden Zellzahl sein kann, musste die gemessene Szintillation auf den Proteingehalt des Zell-Lysates normiert werden. Dazu wurden 30 µl des Lysates für eine BCA (bicinchoninic acid = Bicinchoninsäure) Proteinbestimmung eingesetzt und mit 200 µl der frisch hergestellten Mischung (50 : 1) aus Reagenz A (enthielt Natriumcarbonat und Bicinchoninsäure-Dinatriumsalz) und Reagenz B (enthielt Kupfer(II)-Sulfat) [330] vermischt. Nach Inkubation für 30 min bei 37 °C in der Dunkelkammer wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen. Die Ermittlung des Proteingehaltes erfolgte über eine parallel vermessene Kalibrierkurve bestehend aus 8 Kalibrierpunkten eines Albumin-Standards im Konzentrationsbereich von 0 – 2000 ng/µl. Die Auswertung der Experimente zur Aufnahme von [<sup>3</sup>H]-IB in stabil transfizierten Zellen erfolgte somit in pmol / mg Protein.

Aufgrund eines Messfehlers bei der Bestimmung des Proteingehalts in 2 Proben für die zelluläre Aufnahme in HEK-h-OCT3 konnte für den Zeitpunkt *10 min* nach Inkubation mit 0,3 nM [<sup>3</sup>H]-IB (Inkubationspuffer 2) lediglich ein Einzelwert zur Auswertung herangezogen werden, da die Messung wegen zu geringer Probenvolumina nicht wiederholt werden konnte.

## **7.5 Untersuchung der zellulären Aufnahme von [<sup>3</sup>H]-Salbutamol ([<sup>3</sup>H]-SB)**

### **7.5.1 Inkubationspuffer**

Als Inkubationspuffer wurde eine 1 : 3000 Verdünnung (17 µM) der Stammlösung von [<sup>3</sup>H]-SB (siehe 7.1.1) mit HBSS unmittelbar vor Beginn der Inkubationsversuche erstellt und vor Verwendung auf 37 °C erwärmt.

### **7.5.2 Inkubation der Zellen mit [<sup>3</sup>H]-Salbutamol**

Analog zur Inkubation mit [<sup>3</sup>H]-IB (siehe 7.4) wurden die drei Zelllinien in einer Anzahl von 350 000 Zellen / Well ausgesät und für circa 24 h kultiviert. Nach der mikroskopischen Überprüfung der Morphologie wurde mit der Inkubation begonnen, die Inkubationszeitpunkte lagen hier bei 10 min und 30 min und die Versuche wurden ebenfalls jeweils im Triplikat durchgeführt. Nach dem Waschen mit eiskalter HBSS und der Zell-Lyse erfolgte die Bestimmung der Szintillation und des Proteingehaltes der Lysate wie in 7.4.3 und 7.4.4 beschrieben.

## **7.6 β-Estradiol-induzierte Inhibition der zellulären Aufnahme von [<sup>3</sup>H]-Ipratropiumbromid**

### **7.6.1 β-Estradiol-Lösungen**

Zur Untersuchung, inwiefern β-Estradiol einen inhibitorischen Effekt auf die zelluläre Aufnahme von [<sup>3</sup>H]-IB in die jeweiligen stabil transfizierten Zellen hatte, wurden Lösungen in den Konzentrationen 10<sup>-5</sup> M, 10<sup>-6</sup> M und 10<sup>-9</sup> M β-Estradiol in HBSS hergestellt. Diese Konzentrations-Niveaus entsprachen dabei publizierten Untersuchungen zur zellulären Aufnahme von MPP+(1-Methyl-4-phenylpyridinium), einer Referenz-Substanz für den OCT-vermittelten Transport [311]. Die Lösungen wurden vor Verwendung auf 37 °C erwärmt.

### 7.6.2 Inkubationspuffer

Als Inkubationspuffer wurden 1 : 30000 Verdünnungen (0,3 nM) der Stammlösung von [<sup>3</sup>H]-IB (siehe 7.1.1) in den jeweiligen  $\beta$ -Estradiol-Lösungen ( $10^{-5}$  M,  $10^{-6}$  M und  $10^{-9}$  M) und in HBSS (Positiv-Kontrolle) vor Beginn der Inkubationsversuche erstellt. Diese Inkubationslösungen wurden vor Verwendung ebenfalls auf 37 °C erwärmt.

### 7.6.3 Inkubation der Zellen

Die drei Zelllinien (HEK-MOCK, HEK-h-OCT1, HEK-h-OCT3) wurden in einer Anzahl von 350 000 Zellen / Well ausgesät, für circa 24 h kultiviert und mikroskopisch hinsichtlich ihrer Morphologie überprüft. Nach der Entfernung des Mediums und den beiden Waschschritten (siehe 7.4.2) wurden die Zell-Monolayer mit 1 ml der entsprechenden  $\beta$ -Estradiol-Lösungen (ohne [<sup>3</sup>H]-IB) für 10 min bei 37 °C inkubiert. Die Monolayer der Positiv-Kontrolle wurden entsprechend mit erwärmter HBSS behandelt. Nach vollständiger Entfernung der Lösungen aus den Wells wurden 400  $\mu$ l der entsprechenden Inkubationslösungen (mit [<sup>3</sup>H]-IB) auf die Zell-Monolayer gegeben und bei 37 °C inkubiert. Die Inkubationszeit betrug dabei 10 min und die Versuche wurden jeweils im Triplikat durchgeführt. HEK-h-OCT3 und HEK-MOCK wurden mit  $10^{-5}$  M  $\beta$ -Estradiol-Lösung und der Positiv-Kontrolle untersucht, bei HEK-h-OCT1 wurden zusätzliche Untersuchungen mit  $10^{-6}$  M und  $10^{-9}$  M  $\beta$ -Estradiol-Lösungen durchgeführt. Nach den Waschschritten und der Zell-Lyse erfolgte die Bestimmung der Szintillation und des Proteingehaltes der Lysate wie in 7.4.3 und 7.4.4 beschrieben.





---

## **D Tabellarischer Anhang**

# 1 Entwicklung und Validierung der Ipratropiumbromid (IB)-Analytik

## 1.1 Auswahl des Internen Standards

Extraktionsmethode*	Peakfläche 7DIB (MW ± SD)	Peakfläche BSAB (MW ± SD)	Peakfläche SB (MW ± SD)
WCX	1214525 ± 34	42260 ± 15	117414 ± 11
ACN + WCX	34802 ± 3	6384 ± 10	3324 ± 14
MeOH + WCX	147629 ± 2	38343 ± 3	5054 ± 35
ACN + dSPE	768257 ± 4	385903 ± 2	922821 ± 3
AOAC	913862 ± 4	442802 ± 2	503099 ± 1
EN-15662	959223 ± 3	450065 ± 2	619093 ± 6

7DIB = Ipratropium-d7-bromid

BSAB = Butylscopolaminbromid

SB = Salbutamolsulfat

MW = Mittelwert

SD = Standardabweichung

\* siehe Experimenteller Teil 1.4

Extraktions-Ansätze: n = 4

## 1.2 Vergleich von Extraktionsmethoden aus Lungen-Perfusions-Modell-Proben

Extraktionsmethode*	Peakfläche IB (MW ± SD)			
	0 ng/ml	0,01 ng/ml	5 ng/ml	10 ng/ml
WCX	100 ± 45	1242 ± 119	60842 ± 6744	120982 ± 16462
ACN + WCX	1964 ± 1343	33911 ± 4116	1537135 ± 472656	3386621 ± 295011
MeOH + WCX	244 ± 38	5023 ± 348	260580 ± 12776	504125 ± 26067
ACN + dSPE	1145 ± 209	29244 ± 1567	1461113 ± 86651	2661224 ± 237855
AOAC	1238 ± 41	32005 ± 1065	1596630 ± 17319	2943066 ± 155973
EN-15662	1177 ± 132	32866 ± 2048	1655845 ± 77500	3026253 ± 190397

MW = Mittelwert

SD = Standardabweichung

\* siehe Experimenteller Teil 1.4

Extraktions-Ansätze: n = 3

## 2 Pharmakokinetik von Ipratropiumbromid (IB) untersucht am humanen Lungen-Perfusions-Modell (LPM)

### 2.1 Individuelle Kalibriergeraden der 12 Perfusionen am LPM

Perfusions-Experiment	Steigung a (95 % CI)	y-Achsenabschnitt b (95 % CI)	Bestimmtheitsmaß R <sup>2</sup>
1	0,531 (0,528 – 0,535)	0,001554 (-0,006170 – 0,009278)	0,9999
2	1,156 (1,144 – 1,167)	0,006430 (-0,01895 – 0,03181)	0,9998
3	1,130 (1,123 – 1,136)	0,009598 (-0,005419 – 0,02452)	0,9999
4	1,145 (1,133 – 1,157)	-0,0005938 (-0,02700 – 0,02581)	0,9998
5	1,158 (1,148 – 1,168)	0,008704 (-0,01316 – 0,03057)	0,9999
6	1,158 (1,146 – 1,170)	0,005334 (-0,02189 – 0,03256)	0,9998
7	1,158 (1,145 – 1,171)	0,002381 (-0,02684 – 0,03160)	0,9998
8	1,097 (1,082 – 1,113)	0,003624 (-0,03207 – 0,03932)	0,9996
9	1,067 (1,049 – 1,084)	0,001719 (-0,03775 – 0,04119)	0,9995
10	0,998 (0,988 – 1,009)	-0,0007607 (-0,02455 – 0,02303)	0,9998
11	0,980 (0,9619 – 0,998)	0,003757 (-0,03670 – 0,04421)	0,9994
12	1,005 (0,9901 – 1,019)	0,002278 (-0,03022 – 0,03478)	0,9996
<b>Mittelwert</b>	1,061	0,003669	0,9997
<b>Standardabweichung</b>	0,193	0,003311	0,0002

95 % CI = 95 %-Konfidenzintervall

Perfusions-Experimente: n = 12

## 2.2 Umverteilung von IB in die Perfusionsflüssigkeit

### 2.2.1 Applikation von 100 µg IB

**Konzentration von IB in der Perfusionsflüssigkeit [ng/ml]**  
normalisiert auf den %-Anteil der tatsächlich deponierten Dosis

<b>Zeitpunkt [min]</b>	<b>Experiment 1</b>	<b>Experiment 2</b>	<b>Experiment 3</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>Standard- abweichung</b>
<b>-2</b>	2,38	0,03	0,10	<b>0,84</b>	1,34
<b>0</b>	3,09	1,81	0,41	<b>1,77</b>	1,34
<b>3</b>	3,16	1,70	0,48	<b>1,78</b>	1,34
<b>6</b>	3,23	1,84	0,44	<b>1,84</b>	1,40
<b>10</b>	3,67	1,78	0,51	<b>1,99</b>	1,59
<b>15</b>	3,76	1,68	0,56	<b>2,00</b>	1,62
<b>20</b>	4,05	2,59	0,58	<b>2,41</b>	1,74
<b>25</b>	4,31	2,29	0,64	<b>2,41</b>	1,84
<b>30</b>	4,62	2,68	0,69	<b>2,66</b>	1,96
<b>35</b>	5,03	2,76	0,70	<b>2,83</b>	2,17
<b>40</b>	5,43	2,81	0,75	<b>3,00</b>	2,35
<b>50</b>	5,62	3,01	0,77	<b>3,13</b>	2,43
<b>60</b>	6,00	3,05	0,81	<b>3,29</b>	2,60
<b>80</b>	-	-	0,83	-	-

Perfusions-Experimente: n = 3

## 2.2.2 Applikation von 40 µg IB

**Konzentration von IB in der Perfusionsflüssigkeit [ng/ml]**  
normalisiert auf den %-Anteil der tatsächlich deponierten Dosis

ZP [min]	Exp. 4	Exp. 5	Exp. 6	Exp. 10	Exp. 11	Exp. 12	MW	SD
-2	0,03	0,29	0,21	0,16	0,06	0,07	<b>0,14</b>	0,10
0	0,08	0,64	0,15	0,80	0,57	0,21	<b>0,41</b>	0,30
3	0,09	0,64	0,24	0,93	0,57	0,54	<b>0,50</b>	0,30
6	0,10	0,71	0,25	1,02	0,54	0,53	<b>0,52</b>	0,33
10	0,11	0,62	0,40	0,94	0,71	0,92	<b>0,62</b>	0,32
15	0,11	0,70	0,35	0,96	0,85	1,14	<b>0,68</b>	0,39
20	0,12	0,74	0,40	1,07	0,99	1,31	<b>0,77</b>	0,44
25	0,13	0,73	0,43	1,15	1,03	0,55	<b>0,67</b>	0,38
30	0,14	0,78	0,43	1,22	1,03	0,45	<b>0,68</b>	0,41
35	0,15	0,80	0,45	1,28	1,04	0,51	<b>0,71</b>	0,41
40	0,15	0,82	0,47	1,43	1,03	0,47	<b>0,73</b>	0,46
50	0,18	0,86	0,50	1,41	1,05	0,56	<b>0,76</b>	0,44
60	0,18	0,86	0,54	1,46	1,07	0,61	<b>0,79</b>	0,45
80	0,20	-	-	1,63	1,15	0,64	<b>0,90</b>	0,62

ZP = Zeitpunkt      MW = Mittelwert      SD = Standardabweichung

Perfusions-Experimente: n = 6

### 2.2.3 Applikation von 40 µg IB nach L-Carnitin-Vernebelung

**Konzentration von IB in der Perfusionsflüssigkeit [ng/ml]**  
normalisiert auf den %-Anteil der tatsächlich deponierten Dosis

Zeitpunkt [min]	Experiment 7	Experiment 8	Experiment 9	Mittelwert	Standardabweichung
-2	0,79	0,05	0,08	<b>0,31</b>	0,42
0	0,55	0,36	0,12	<b>0,34</b>	0,22
3	0,47	0,41	0,14	<b>0,34</b>	0,17
6	0,45	0,49	0,11	<b>0,35</b>	0,21
10	0,58	0,60	0,11	<b>0,43</b>	0,28
15	0,61	0,66	0,10	<b>0,46</b>	0,31
20	0,68	0,72	0,10	<b>0,50</b>	0,35
25	0,71	0,87	0,11	<b>0,57</b>	0,40
30	0,76	0,90	0,12	<b>0,59</b>	0,41
35	0,75	0,95	0,13	<b>0,61</b>	0,43
40	0,81	1,00	0,13	<b>0,64</b>	0,46
50	0,83	1,00	0,14	<b>0,66</b>	0,46
60	0,94	1,14	0,13	<b>0,74</b>	0,53
80	-	1,31	0,16	<b>0,74</b>	0,81

Perfusions-Experimente: n = 3

## 2.3 AUC<sub>0-60 min</sub>

Die Fläche unter der Kurve (Area under the curve = AUC) wurde vom Zeitpunkt 0 min bis zum Zeitpunkt 60 min (AUC<sub>0-60 min</sub>) mittels GraphPad Prism® Software unter Verwendung der Trapezmethode[336] berechnet.

Perfusions-Experiment	AUC <sub>0-60 min</sub> [ng/ml x min] normalisiert auf den %-Anteil der tatsächlich deponierten Dosis			AUC <sub>0-60 min</sub> [ng/ml/kg x min] normalisiert auf den %-Anteil der tatsächlich deponierten Dosis und das Gewicht der Präparation		
	Einzelwert	Mittelwert	Standardabweichung	Einzelwert	Mittelwert	Standardabweichung
1	277,6			376,2		
2	148,7			619,8		
3	39,1	<b>155,1</b>	<b>119,4</b>	74,6	<b>356,9</b>	<b>273,1</b>
4	8,3			19,2		
5	45,9			137,0		
6	25,2			70,4		
10	72,3			370,9		
11	56,0			148,9		
12	40,0	<b>41,3</b>	<b>22,6</b>	163,8	<b>151,7</b>	<b>120,5</b>
7	43,1			172,4		
8	49,9			161,4		
9	7,3	<b>33,4</b>	<b>22,9</b>	9,7	<b>114,5</b>	<b>90,9</b>

Perfusions-Experimente: n = 12

### 3 Entwicklung einer RT-qPCR-Methode zur Detektion der mRNA-Expression von Arzneistofftransportern

#### 3.1 Experimentell bestimmte Schmelzpunkte und Reaktions-Effizienzen

Target	T <sub>m</sub> [°C]	Geradengleichung der Kalibriergeraden	R <sup>2</sup>	Effizienz [%]
OCT1	80,1	- *	- *	- *
OCT2	83,1	- *	- *	- *
OCT3	77,8	$y = -3,978 * \log(x) + 23,25$	0,996	<b>78,4</b>
OCTN1	79,6	$y = -3,164 * \log(x) + 27,22$	0,998	<b>107,0</b>
OCTN2	82,1	$y = -3,501 * \log(x) + 23,53$	0,997	<b>93,0</b>
PEPT2	79,6	$y = -3,361 * \log(x) + 25,56$	0,998	<b>98,4</b>
MRP1	82,1	$y = -3,932 * \log(x) + 24,24$	1,000	<b>119,3</b>
ACTB	81,6	$y = -3,131 * \log(x) + 16,25$	0,999	<b>108,6</b>
GAPDH	82,7	$y = -3,285 * \log(x) + 19,09$	0,998	<b>101,06</b>
18 S RNA	83,1	$y = -3,768 * \log(x) + 14,07$	0,999	<b>84,2</b>
HPRT1	78,5	$y = -3,103 * \log(x) + 21,25$	0,996	<b>110,0</b>
SDHA	85,9	$y = -3,266 * \log(x) + 20,98$	0,998	<b>102,4</b>

T<sub>m</sub> = experimentell bestimmte Schmelztemperatur des PCR-Produktes    R<sup>2</sup> = Bestimmtheitsmaß

\* nicht bestimmbar, da nur eine cDNA-Ausgangsmenge detektierbar

#### 3.2 Optimierung der Primer-Konzentration

OCT3	100 nM FW	200 nM FW	300 nM FW	OCTN1	100 nM FW	200 nM FW	300 nM FW
100 nM RW	28,74	27,02	26,71	100 nM RW	34,68	32,91	32,91
200 nM RW	26,96	26,09	<b>25,70</b>	200 nM RW	32,58	30,7	30,84
300 nM RW	27,32	26,09	26,13	300 nM RW	33,32	30,67	<b>30,34</b>

C<sub>T</sub>-Werte verschiedener RT-qPCR-Ansätzen mit unterschiedlichen Konzentrationen an Forward- (FW) und Reverse- (RW) Primern von OCT3 und OCTN1



OCTN2	100 nM FW	200 nM FW	300 nM FW	PEPT2	100 nM FW	200 nM FW	300 nM FW
100 nM RW	31,10	29,05	28,80	100 nM RW	36,46	35,90	33,92
200 nM RW	28,83	27,41	27,68	200 nM RW	34,12	33,34	<b>31,52</b>
300 nM RW	28,80	26,75	<b>26,59</b>	300 nM RW	33,54	32,26	31,54

C<sub>T</sub>-Werte verschiedener RT-qPCR-Ansätzen mit unterschiedlichen Konzentrationen an Forward- (FW) und Reverse- (RW) Primern von OCTN2 und PEPT2

MRP1	100 nM FW	200 nM FW	300 nM FW	ACTB	100 nM FW	200 nM FW	300 nM FW
100 nM RW	32,85	30,93	30,68	100 nM RW	27,85	27,25	26,55
200 nM RW	32,95	<b>30,18</b>	30,42	200 nM RW	24,75	23,66	23,51
300 nM RW	32,17	30,76	30,46	300 nM RW	23,67	22,73	<b>22,66</b>

C<sub>T</sub>-Werte verschiedener RT-qPCR-Ansätzen mit unterschiedlichen Konzentrationen an Forward- (FW) und Reverse- (RW) Primern von MRP1 und ACTB

GAPDH	100 nM FW	200 nM FW	300 nM FW	18 S RNA	100 nM FW	200 nM FW	300 nM FW
100 nM RW	28,72	26,89	26,57	100 nM RW	30,87	23,40	20,66
200 nM RW	27,80	25,74	25,20	200 nM RW	29,68	22,33	20,09
300 nM RW	27,83	25,79	<b>25,15</b>	300 nM RW	28,56	22,20	<b>20,07</b>

C<sub>T</sub>-Werte verschiedener RT-qPCR-Ansätzen mit unterschiedlichen Konzentrationen an Forward- (FW) und Reverse- (RW) Primern von GAPDH und 18 SRNA

HPRT1	100 nM FW	200 nM FW	300 nM FW	SDHA	100 nM FW	200 nM FW	300 nM FW
100 nM RW	29,68	28,60	28,34	100 nM RW	30,47	29,08	29,07
200 nM RW	28,49	27,16	27,06	200 nM RW	28,13	27,30	26,89
300 nM RW	27,94	<b>26,74</b>	26,81	300 nM RW	27,44	<b>26,83</b>	26,94

C<sub>T</sub>-Werte verschiedener RT-qPCR-Ansätzen mit unterschiedlichen Konzentrationen an Forward- (FW) und Reverse- (RW) Primern von HPRT1 und SDHA

### 3.3 Referenz-Gen-Validierung

#### 3.3.1 Korrelation zwischen Referenz-Genen und BestKeeper in Zellen

$r$ \ $p$	ACTB	GAPDH	18 S RNA	HPRT1	SDHA	BK
<b>ACTB</b>		0,005	0,015	0,010	0,105	<b>0,001</b>
<b>GAPDH</b>	0,868		0,226	0,071	0,032	<b>0,015</b>
<b>18 S RNA</b>	0,807	0,482		0,003	0,818	<b>0,003</b>
<b>HPRT1</b>	0,835	0,667	0,891		0,493	<b>0,001</b>
<b>SDHA</b>	0,614	0,749	0,099	0,284		<b>0,229</b>
<b>BK</b>	<b>0,968</b>	<b>0,808</b>	<b>0,895</b>	<b>0,943</b>	<b>0,480</b>	

$r$  = Korrelationskoeffizient    $p$  = p-Wert   BK = BestKeeper

Untersuchte Proben: n = 8

#### 3.3.2 Korrelation zwischen Referenz-Genen und BestKeeper in Gewebe

$r$ \ $p$	ACTB	GAPDH	18 S RNA	HPRT1	SDHA	BK
<b>ACTB</b>		0,001	0,049	0,001	0,001	<b>0,001</b>
<b>GAPDH</b>	0,998		0,036	0,001	0,001	<b>0,001</b>
<b>18 S RNA</b>	0,814	0,840		0,042	0,001	<b>0,001</b>
<b>HPRT1</b>	0,997	0,999	0,829		0,023	<b>0,028</b>
<b>SDHA</b>	0,987	0,991	0,874	0,992		<b>0,001</b>
<b>BK</b>	<b>0,996</b>	<b>0,999</b>	<b>0,859</b>	<b>0,998</b>	<b>0,996</b>	

$r$  = Korrelationskoeffizient    $p$  = p-Wert   BK = BestKeeper

Untersuchte Proben: n = 6

## 4 Einfluss von Sexualsteroidhormonen auf die mRNA-Expression von Arzneistofftransportern

### 4.1 Expression von Arzneistofftransportern nach Hormon-Inkubation verglichen zu keiner Hormon-Inkubation

#### 4.1.1 Expression nach Inkubation mit Hormonen verglichen zu keiner Inkubation

Untersuchter Transporter	Intervention	Relative Expression		
		Mittelwert	Standardabweichung	p – Wert
<b>MRP1</b>	TEST vs. NT *	1,025	± 0,119	0,6869
	EST vs. NT *	0,995	± 0,103	0,9185
	PRO vs. NT	1,015	± 0,252	0,9067
	EST + PRO vs. NT	1,116	± 0,091	<b>0,0449</b>
<b>OCT3</b>	TEST vs. NT *	0,906	± 0,173	0,3193
	EST vs. NT *	0,855	± 0,210	0,2152
	PRO vs. NT	0,835	± 0,148	0,0689
	EST + PRO vs. NT	0,987	± 0,111	0,8175
<b>OCTN1</b>	TEST vs. NT *	1,000	± 0,147	0,9974
	EST vs. NT *	0,981	± 0,176	0,8381
	PRO vs. NT	1,142	± 0,213	0,2243
	EST + PRO vs. NT	1,129	± 0,101	<b>0,0468</b>
<b>OCTN2</b>	TEST vs. NT *	0,909	± 0,076	0,0526
	EST vs. NT *	0,828	± 0,042	<b>0,0002</b>
	PRO vs. NT	1,003	± 0,088	0,9525
	EST + PRO vs. NT	0,944	± 0,080	0,2048
<b>PEPT2</b>	TEST vs. NT *	0,913	± 0,144	0,2698
	EST vs. NT *	0,808	± 0,156	<b>0,0482</b>
	PRO vs. NT	0,800	± 0,194	0,0860
	EST + PRO vs. NT	0,984	± 0,120	0,7899

TEST = Testosteron

EST = Estradiol

PRO = Progesteron

NT = no treatment

Zellkultur-Ansätze: n = 3, \* Ausnahme: n = 4

#### 4.1.2 Expression nach Inkubation mit Hormonen und L-Carnitin verglichen zu keiner Inkubation

Untersuchter Transporter	Intervention	Relative Expression		p – Wert
		Mittelwert	Standard-abweichung	
<b>MRP1</b>	TEST + CAR vs. NT *	0,929	± 0,187	0,4771
	EST + CAR vs. NT *	0,918	± 0,203	0,4507
	PRO + CAR vs. NT *	0,949	± 0,237	0,6810
	EST + PRO + CAR vs. NT	0,973	± 0,070	0,4586
<b>OCT3</b>	TEST + CAR vs. NT *	0,943	± 0,186	0,5630
	EST + CAR vs. NT *	0,851	± 0,221	0,2263
	PRO + CAR vs. NT *	0,877	± 0,288	0,4245
	EST + PRO + CAR vs. NT	0,918	± 0,047	<b>0,0156</b>
<b>OCTN1</b>	TEST + CAR vs. NT *	1,067	± 0,082	0,1545
	EST + CAR vs. NT *	1,050	± 0,236	0,6870
	PRO + CAR vs. NT *	1,175	± 0,436	0,4533
	EST + PRO + CAR vs. NT	1,123	± 0,080	<b>0,0240</b>
<b>OCTN2</b>	TEST + CAR vs. NT *	1,057	± 0,164	0,5122
	EST + CAR vs. NT *	0,946	± 0,191	0,5923
	PRO + CAR vs. NT *	1,073	± 0,280	0,6222
	EST + PRO + CAR vs. NT	0,770	± 0,065	<b>0,0008</b>
<b>PEPT2</b>	TEST + CAR vs. NT *	0,881	± 0,221	0,3220
	EST + CAR vs. NT *	0,803	± 0,237	0,1477
	PRO + CAR vs. NT *	0,830	± 0,241	0,2082
	EST + PRO + CAR vs. NT	0,830	± 0,016	<b>&lt; 0,0001</b>

TEST = Testosteron    EST = Estradiol    PRO = Progesteron    CAR = L-Carnitin    NT = no treatment

Zellkultur-Ansätze: n = 3, \* Ausnahme: n = 4

### 4.1.3 Expression nach Inkubation mit Hormonen und L-Carnitin verglichen zur Inkubation mit L-Carnitin

Untersuchter Transporter	Intervention	Relative Expression		p – Wert
		Mittelwert	Standard-abweichung	
<b>MRP1</b>	TEST + CAR vs. CAR	1,015	± 0,075	0,7522
	EST + CAR vs. CAR	0,977	± 0,155	0,8126
	PRO + CAR vs. CAR	0,997	± 0,116	0,9664
	EST + PRO + CAR vs. CAR	0,910	± 0,074	0,1021
<b>OCT3</b>	TEST + CAR vs. CAR	0,919	± 0,108	0,2603
	EST + CAR vs. CAR	0,919	± 0,159	0,4264
	PRO + CAR vs. CAR	0,869	± 0,222	0,3644
	EST + PRO + CAR vs. CAR	0,833	± 0,043	<b>0,0026</b>
<b>OCTN1</b>	TEST + CAR vs. CAR	0,918	± 0,058	0,0703
	EST + CAR vs. CAR	0,944	± 0,111	0,4330
	PRO + CAR vs. CAR	1,073	± 0,277	0,6737
	EST + PRO + CAR vs. CAR	0,894	± 0,066	<b>0,0496</b>
<b>OCTN2</b>	TEST + CAR vs. CAR	1,022	± 0,149	0,8140
	EST + CAR vs. CAR	0,923	± 0,188	0,5164
	PRO + CAR vs. CAR	1,064	± 0,272	0,7054
	EST + PRO + CAR vs. CAR	0,693	± 0,051	<b>0,0005</b>
<b>PEPT2</b>	TEST + CAR vs. CAR	0,854	± 0,063	<b>0,0157</b>
	EST + CAR vs. CAR	0,790	± 0,091	<b>0,0164</b>
	PRO + CAR vs. CAR	0,806	± 0,087	<b>0,0182</b>
	EST + PRO + CAR vs. CAR	0,736	± 0,086	<b>0,0059</b>

TEST = Testosteron

EST = Estradiol

PRO = Progesteron

CAR = L-Carnitine

Zellkultur-Ansätze: n = 3

## 4.2 Expression von Arzneistofftransportern nach Inkubation mit weiblichen Sexualsteroidhormonen verglichen zur Inkubation mit Testosteron

### 4.2.1 Expression nach Inkubation mit Estradiol und Progesteron verglichen zur Inkubation mit Testosteron

Untersuchter Transporter	Intervention	Relative Expression		
		Mittelwert	Standardabweichung	p – Wert
<b>MRP1</b>	EST vs. TEST *	0,973	± 0,080	0,5283
	PRO vs. TEST	1,030	± 0,211	0,7775
	EST + PRO vs. TEST	1,071	± 0,050	<b>0,0321</b>
<b>OCT3</b>	EST vs. TEST *	0,937	± 0,071	0,1252
	PRO vs. TEST	1,014	± 0,156	0,8567
	EST + PRO vs. TEST	1,184	± 0,143	<b>0,0447</b>
<b>OCTN1</b>	EST vs. TEST *	0,979	± 0,036	0,2805
	PRO vs. TEST	1,088	± 0,113	0,1676
	EST + PRO vs. TEST	0,998	± 0,155	0,9797
<b>OCTN2</b>	EST vs. TEST *	0,914	± 0,043	<b>0,0070</b>
	PRO vs. TEST	1,066	± 0,064	0,0846
	EST + PRO vs. TEST	0,970	± 0,073	0,4358
<b>PEPT2</b>	EST vs. TEST *	0,884	± 0,093	<b>0,0456</b>
	PRO vs. TEST	0,935	± 0,148	0,4056
	EST + PRO vs. TEST	1,094	± 0,119	0,1623

TEST = Testosteron      EST = Estradiol      PRO = Progesteron

Zellkultur-Ansätze: n = 3, \* Ausnahme: n = 4

#### 4.2.2 Expression nach Inkubation mit Estradiol sowie Progesteron und L-Carnitin verglichen zur Inkubation mit Testosteron und L-Carnitin

Untersuchter Transporter	Intervention	Relative Expression		p – Wert
		Mittelwert	Standard-abweichung	
<b>MRP1</b>	EST + CAR vs. TEST + CAR *	0,990	± 0,095	0,8409
	PRO + CAR vs. TEST CAR *	1,018	± 0,117	0,7711
	EST + PRO + CAR vs. TEST + CAR	0,943	± 0,123	0,3791
<b>OCT3</b>	EST + CAR vs. TEST + CAR *	0,910	± 0,179	0,3542
	PRO + CAR vs. TEST CAR *	0,914	± 0,157	0,3117
	EST + PRO + CAR vs. TEST + CAR	0,951	± 0,111	0,4055
<b>OCTN1</b>	EST + CAR vs. TEST + CAR *	0,978	± 0,151	0,7778
	PRO + CAR vs. TEST CAR *	1,085	± 0,334	0,6285
	EST + PRO + CAR vs. TEST + CAR	1,018	± 0,116	0,7574
<b>OCTN2</b>	EST + CAR vs. TEST + CAR *	0,895	± 0,124	0,1401
	PRO + CAR vs. TEST CAR *	1,004	± 0,119	0,9517
	EST + PRO + CAR vs. TEST + CAR	0,751	± 0,074	<b>0,0009</b>
<b>PEPT2</b>	EST + CAR vs. TEST + CAR *	0,905	± 0,048	<b>0,0075</b>
	PRO + CAR vs. TEST CAR *	0,936	± 0,037	<b>0,0126</b>
	EST + PRO + CAR vs. TEST + CAR	0,879	± 0,164	0,1868

TEST = Testosteron      EST = Estradiol      PRO = Progesteron      CAR = L-Carnitine

Zellkultur-Ansätze: n = 3, \* Ausnahme: n = 4

### 4.3 Expression von Arzneistofftransportern nach Inkubation mit unterschiedlichen weiblichen Sexualsteroidhormonen

#### 4.3.1 Expression nach Inkubation mit Estradiol und Progesteron

Untersuchter Transporter	Intervention	Relative Expression		p – Wert
		Mittelwert	Standard-abweichung	
<b>MRP1</b>	PRO vs. EST	1,017	± 0,159	0,8598
	EST + PRO vs. EST	1,042	± 0,051	0,2330
	EST + PRO vs. PRO	0,968	± 0,093	0,5813
<b>OCT3</b>	PRO vs. EST	1,100	± 0,097	0,1478
	EST + PRO vs. EST	1,227	± 0,145	0,0534
	EST + PRO vs. PRO	1,061	± 0,126	0,4461
<b>OCTN1</b>	PRO vs. EST	1,108	± 0,141	0,2561
	EST + PRO vs. EST	0,998	± 0,201	0,9892
	EST + PRO vs. PRO	0,893	± 0,077	0,0731
<b>OCTN2</b>	PRO vs. EST	1,194	± 0,061	<b>0,0051</b>
	EST + PRO vs. EST	1,087	± 0,072	0,1042
	EST + PRO vs. PRO	0,894	± 0,034	<b>0,0058</b>
<b>PEPT2</b>	PRO vs. EST	1,045	± 0,066	0,3059
	EST + PRO vs. EST	1,145	± 0,122	0,1094
	EST + PRO vs. PRO	1,062	± 0,107	0,3710

EST = Estradiol      PRO = Progesteron

Zellkultur-Ansätze: n = 3



### 4.3.2 Expression nach Inkubation mit Estradiol sowie Progesteron und L-Carnitin

Untersuchter Transporter	Intervention	Relative Expression		p – Wert
		Mittelwert	Standardabweichung	
<b>MRP1</b>	PRO + CAR vs. EST + CAR *	1,033	± 0,132	0,6365
	EST + PRO + CAR vs. EST + CAR	1,036	± 0,226	0,7567
	EST + PRO + CAR vs. PRO + CAR	0,901	± 0,129	0,1744
<b>OCT3</b>	PRO + CAR vs. EST + CAR *	1,030	± 0,228	0,8046
	EST + PRO + CAR vs. EST + CAR	0,999	± 0,174	0,9940
	EST + PRO + CAR vs. PRO + CAR	0,930	± 0,146	0,3699
<b>OCTN1</b>	PRO + CAR vs. EST + CAR *	1,092	± 0,189	0,3661
	EST + PRO + CAR vs. EST + CAR	0,946	± 0,153	0,5006
	EST + PRO + CAR vs. PRO + CAR	0,749	± 0,102	<b>0,0038</b>
<b>OCTN2</b>	PRO + CAR vs. EST + CAR *	1,129	± 0,134	0,1023
	EST + PRO + CAR vs. EST + CAR	0,877	± 0,211	0,2811
	EST + PRO + CAR vs. PRO + CAR	0,801	± 0,153	<b>0,0431</b>
<b>PEPT2</b>	PRO + CAR vs. EST + CAR *	1,035	± 0,049	0,2089
	EST + PRO + CAR vs. EST + CAR	0,972	± 0,223	0,8049
	EST + PRO + CAR vs. PRO + CAR	0,918	± 0,186	0,4012

EST = Estradiol

PRO = Progesteron

CAR = L-Carnitine

Zellkultur-Ansätze: n = 3, \* Ausnahme: n = 4

#### 4.4 Expression von Arzneistofftransportern mit und ohne L-Carnitin-Inkubation

Untersucher Transporter	Intervention	Relative Expression		
		Mittelwert	Standardfehler	p – Wert
<b>MRP1</b>	CAR vs. NT *	0,929	± 0,176	0,4500
	TEST + CAR vs. TEST	1,005	± 0,083	0,9114
	EST + CAR vs. EST	0,959	± 0,139	0,5642
	PRO + CAR vs. PRO	0,972	± 0,117	0,6419
	EST + PRO + CAR vs. EST + PRO *	0,891	± 0,089	<b>0,0496</b>
<b>OCT3</b>	CAR vs. NT *	0,909	± 0,227	0,4508
	TEST + CAR vs. TEST	1,106	± 0,248	0,4176
	EST + CAR vs. EST	1,196	± 0,251	0,1658
	PRO + CAR vs. PRO	1,026	± 0,251	0,8367
	EST + PRO + CAR vs. EST + PRO *	0,944	± 0,098	0,2975
<b>OCTN1</b>	CAR vs. NT *	1,073	± 0,235	0,5564
	TEST + CAR vs. TEST	1,030	± 0,043	0,2044
	EST + CAR vs. EST	1,075	± 0,071	0,0791
	PRO + CAR vs. PRO	1,100	± 0,226	0,4010
	EST + PRO + CAR vs. EST + PRO *	0,961	± 0,057	0,2226
<b>OCTN2</b>	CAR vs. NT *	1,013	± 0,163	0,8829
	TEST + CAR vs. TEST	1,194	± 0,222	0,1303
	EST + CAR vs. EST	1,201	± 0,231	0,1320
	PRO + CAR vs. PRO	1,164	± 0,316	0,3322
	EST + PRO + CAR vs. EST + PRO *	0,830	± 0,113	<b>0,0236</b>
<b>PEPT2</b>	CAR vs. NT *	0,959	± 0,274	0,7724
	TEST + CAR vs. TEST	1,060	± 0,222	0,6015
	EST + CAR vs. EST	1,090	± 0,128	0,2069
	PRO + CAR vs. PRO	1,064	± 0,097	0,2281
	EST + PRO + CAR vs. EST + PRO *	0,869	± 0,095	<b>0,0327</b>

TEST = Testosteron    EST = Estradiol    PRO = Progesteron    CAR = L-Carnitine    NT = no treatment

Zellkultur-Ansätze: n = 3, \* Ausnahme: n = 4

## 5 Unterschiede in der Genexpression von Arzneistofftransportern in humanem Lungengewebe

### 5.1 Charakteristika der verwendeten Gewebeproben

Gewebe Nr.	Herkunft der Gewebeprobe	Geschlecht	Spender		Verwendetes Gewebe
			Alter [J]		
1	LPM	m	50		li OL
2	LPM	m	71		li OL
3	LPM	w	82		re OL
4	LPM	m	55		re OL
5	LPM	m	53		re OL
6	LPM	m	64		re OL
7 #	LPM	m	54		re UL
8	LPM	w	51		li OL
9	LPM-Experiment 1	m	61		re UL
10 #	LPM	m	74		li OL
11	LPM	m	64		re UL
12	LPM-Experiment 2	w	84		re UL
13	LPM-Experiment 3	w	56		li UL
14	LPM-Experiment 4	m	64		li UL
15	LPM	m	73		li OL
16	LPM-Experiment 5	m	53		li OL
17	LPM	m	65		re OL
18	LPM-Experiment 6	w	59		re UL
19	LPM	m	56		re OL
20	LPM	w	53		re OL
21	LPM-Experiment 7	m	44		li OL
22	LPM	m	63		li UL
23	LPM	w	66		li OL
24	LPM	w	60		li OL
25	LPM-Experiment 8	m	70		li OL
26	LPM	m	63		li OL
27	LPM-Experiment 9	w	66		re OL
28	LPM	m	80		re UL
29	LPM	m	53		re OL
30	LPM	w	71		re OL
31	LPM-Experiment 10	m	66		li UL
32	LPM-Experiment 11	m	72		re UL
33	LPM-Experiment 12	m	74		re OL
34	LPM	m	75		li OL
35	LPM	w	72		re UL

Fortsetzung der Tabelle *Charakteristika der verwendeten Gewebeproben*

Gewebe Nr.	Herkunft der Gewebeprobe	Geschlecht	Spender	
			Alter [J]	Entnommenes Gewebe
36	Universitätsklinikum	m	62	re OL
37 #	Universitätsklinikum	m	41	li OL
38 #	Universitätsklinikum	m	61	re OL
39	Universitätsklinikum	w	78	_*
40	Universitätsklinikum	m	31	re *
41 #	Universitätsklinikum	m	78	- *
42	Universitätsklinikum	m	65	li OL
43	Universitätsklinikum	m	80	li OL
44	Universitätsklinikum	m	51	re OL
45	Universitätsklinikum	w	55	re OL
46	Universitätsklinikum	m	70	re OL
47	Universitätsklinikum	w	57	li OL
48	Universitätsklinikum	m	75	li OL
49	Universitätsklinikum	m	81	li OL
50	Universitätsklinikum	w	54	re UL
51	Universitätsklinikum	w	75	re UL
52	Universitätsklinikum	m	64	li OL
53	Universitätsklinikum	w	51	re OL
54	Universitätsklinikum	m	75	re OL
55	Universitätsklinikum	m	74	li OL
56	Universitätsklinikum	w	44	re UL
57	Universitätsklinikum	m	55	re ML
58	Universitätsklinikum	m	79	li OL
59	Universitätsklinikum	m	64	li OL
60	Universitätsklinikum	w	44	li OL
61	Universitätsklinikum	m	64	li OL
62	Universitätsklinikum	m	58	li OL
63	Universitätsklinikum	w	78	re UL
64	Universitätsklinikum	w	48	re UL
65	Universitätsklinikum	m	71	li OL
66	Universitätsklinikum	m	76	li UL
67	Universitätsklinikum	m	73	li OL
68	Universitätsklinikum	m	75	li OL
69	Universitätsklinikum	m	80	li UL
70	Universitätsklinikum	w	69	re OL

Fortsetzung der Tabelle *Charakteristika der verwendeten Gewebeproben*

<b>Gewebe Nr.</b>	<b>Herkunft der Gewebeprobe</b>	Geschlecht	<b>Spender</b>		Entnommenes Gewebe
			Alter [J]		
<b>71</b>	Universitätsklinikum	m	34		re OL
<b>72</b>	Universitätsklinikum	w	59		li *
<b>73</b>	Universitätsklinikum	m	80		re OL
<b>74</b>	Universitätsklinikum	m	56		re OL
<b>75</b>	Universitätsklinikum	m	57		re ML
<b>76 #</b>	Universitätsklinikum	m	52		li UL
<b>77</b>	Universitätsklinikum	w	39		li OL
<b>78</b>	Universitätsklinikum	m	78		re UL
<b>79</b>	Universitätsklinikum	w	79		re OL
<b>80</b>	Universitätsklinikum	m	80		re OL
<b>81 #</b>	Universitätsklinikum	w	78		re OL
<b>82</b>	Universitätsklinikum	w	70		li OL
<b>83</b>	Universitätsklinikum	m	63		li OL
<b>84</b>	Universitätsklinikum	w	51		re OL
<b>85</b>	Universitätsklinikum	m	45		li UL
<b>86</b>	Universitätsklinikum	m	79		li OL

**LPM = Lungen-Perfusions-Modell****m = männlich****w = weiblich****re = rechts****li = links****OL = Oberlappen****ML = Mittellappen****UL = Unterlappen**

# nicht in die Auswertung mit eingeschlossen. \* Information nicht erhalten.

## 5.2 C<sub>T</sub>-Werte der 79 untersuchten Gewebeproben

Mittelwerte (n = 3) der C<sub>T</sub>-Werte der untersuchten Transporter und der drei Referenz-Gene (BK)

Gewebe Nr.	OCT1	OCT3	OCTN1	OCTN2	MATE1	MDR1	MRP1	MRP5	BK
1	28,49	21,98	28,09	25,50	25,45	26,34	24,15	26,07	15,12
2	29,69	23,84	26,16	26,23	27,00	26,25	24,59	27,33	16,72
3	29,48	24,68	28,50	26,18	27,70	27,97	25,23	27,96	16,96
4	28,90	22,72	26,29	25,52	26,13	25,52	23,65	25,48	14,41
5	28,65	21,72	25,86	24,39	25,13	26,67	23,74	26,11	14,78
6	28,92	22,93	27,34	25,60	26,27	26,14	25,01	27,28	16,01
8	27,68	21,96	26,38	24,68	24,94	26,53	23,50	25,63	14,78
9	29,00	23,29	27,15	26,40	26,07	26,35	25,03	25,91	15,83
11	28,05	21,72	26,35	24,45	24,49	25,64	22,68	25,38	13,81
12	27,53	22,16	25,77	24,14	25,27	25,08	22,82	24,75	13,53
13	26,49	22,42	25,49	24,24	25,06	25,63	23,33	25,67	13,91
14	26,53	21,96	25,83	23,96	24,43	25,25	22,77	25,79	14,59
15	26,97	21,25	26,37	23,98	24,22	24,16	22,37	24,74	14,31
16	27,30	19,65	25,84	23,05	23,98	25,88	22,68	25,50	12,87
17	28,65	22,62	27,76	27,30	27,62	28,79	25,94	27,60	15,47
18	30,89	23,60	27,80	27,28	27,44	28,67	25,25	27,29	15,02
19	29,69	24,45	28,25	28,22	27,51	27,72	24,82	28,30	14,99
20	30,32	22,41	28,17	26,87	26,78	26,39	25,09	27,40	15,60
21	29,46	22,20	26,60	26,38	26,97	23,75	24,33	26,41	14,25
22	28,41	21,95	25,81	25,61	26,05	24,55	24,64	26,71	14,29
23	29,78	22,07	27,20	26,19	25,61	27,96	24,82	26,41	14,74
24	26,18	22,01	24,48	24,60	25,81	24,99	23,13	24,71	14,06
25	26,54	22,49	26,28	24,91	25,58	25,02	23,61	26,29	13,93
26	28,78	22,76	26,49	25,51	26,42	26,55	23,67	25,57	14,15
27	27,22	21,46	25,41	24,56	26,08	25,34	23,52	26,24	14,38
28	28,56	23,61	26,84	26,08	26,45	27,74	24,19	26,27	14,24
29	28,40	23,42	27,72	25,46	25,28	25,45	23,37	26,06	14,46
30	27,48	22,33	25,33	25,46	24,91	26,29	23,42	24,72	13,91
31	27,54	22,10	25,36	25,30	26,27	25,99	22,82	26,09	13,92
32	27,40	23,72	26,32	26,63	26,64	25,65	23,81	26,14	14,03
33	27,53	22,24	25,80	25,09	25,20	25,54	22,96	25,24	13,81
34	26,92	22,93	24,66	25,11	25,58	26,57	23,28	26,00	13,90
35	27,45	23,02	26,08	25,70	26,18	25,83	23,44	25,86	14,55
36	30,58	24,20	27,35	25,91	27,93	24,57	24,74	27,56	17,25
39	27,55	23,03	25,24	24,85	26,73	24,46	24,44	25,79	15,22
40	28,99	22,76	26,35	24,70	26,53	25,88	24,54	26,39	16,06
42	28,90	22,16	26,32	24,37	25,38	24,02	23,81	25,88	14,38
43	29,71	24,29	28,55	27,58	26,53	28,50	26,36	27,59	16,86
44	30,30	21,16	26,18	25,28	26,79	27,24	25,47	26,60	16,17
45	29,43	22,99	28,21	26,42	25,69	28,10	24,97	26,64	16,17

Fortsetzung der Tabelle C<sub>T</sub>-Werte der 79 untersuchten Gewebeproben**Mittelwerte (n = 3) der C<sub>T</sub>-Werte der untersuchten Transporter und der drei Referenz-Gene (BK)**

<b>Gewebe Nr.</b>	<b>OCT1</b>	<b>OCT3</b>	<b>OCTN1</b>	<b>OCTN2</b>	<b>MATE1</b>	<b>MDR1</b>	<b>MRP1</b>	<b>MRP5</b>	<b>BK</b>
<b>46</b>	28,80	21,26	27,92	25,00	24,40	26,70	23,65	25,52	14,91
<b>47</b>	30,22	23,51	27,81	26,67	27,16	24,37	25,73	27,55	16,50
<b>48</b>	28,44	23,23	27,12	24,70	26,55	26,15	24,19	25,01	14,52
<b>49</b>	27,70	22,15	25,27	24,34	25,63	24,39	23,79	25,21	15,09
<b>50</b>	26,69	20,75	25,90	23,20	24,78	24,46	22,62	24,72	13,99
<b>51</b>	29,48	23,47	29,46	26,68	27,67	26,31	25,76	27,11	16,13
<b>52</b>	30,51	23,76	28,83	27,80	29,61	27,74	26,90	27,42	17,33
<b>53</b>	29,52	24,36	27,87	26,58	26,96	27,18	25,31	27,02	15,65
<b>54</b>	28,61	22,26	26,77	24,91	24,81	26,51	23,76	26,40	14,79
<b>55</b>	27,82	21,80	25,62	24,36	26,17	23,37	23,54	25,39	14,47
<b>56</b>	28,79	21,15	27,16	24,77	23,91	24,47	23,48	25,04	15,02
<b>57</b>	30,92	21,62	26,09	26,26	26,83	24,38	24,15	25,57	13,91
<b>58</b>	29,07	23,16	27,40	26,26	25,36	25,94	23,80	25,63	14,32
<b>59</b>	28,71	20,57	26,17	25,48	27,37	26,48	25,28	25,80	14,49
<b>60</b>	27,78	21,07	26,21	25,03	24,85	26,48	23,77	25,59	14,28
<b>61</b>	28,08	20,81	25,92	25,74	25,42	24,77	24,15	25,31	14,16
<b>62</b>	28,44	22,35	25,81	25,95	26,48	25,10	24,13	26,25	14,65
<b>63</b>	27,94	21,98	27,92	25,48	25,91	26,57	24,09	24,89	14,58
<b>64</b>	28,10	23,14	26,65	26,77	26,69	26,52	24,10	26,96	14,68
<b>65</b>	29,84	24,00	27,56	26,70	27,47	24,84	24,35	26,25	15,43
<b>66</b>	29,34	22,37	26,79	26,45	25,73	24,91	24,63	26,43	15,57
<b>67</b>	30,45	23,42	30,34	26,52	26,68	27,37	25,62	26,87	16,80
<b>68</b>	27,71	23,11	27,23	25,72	25,05	26,39	23,93	26,87	14,52
<b>69</b>	28,81	23,37	25,76	26,00	26,65	25,41	24,83	26,48	15,43
<b>70</b>	29,01	22,32	27,92	26,40	24,63	26,94	23,86	26,77	15,12
<b>71</b>	29,52	23,61	27,40	26,46	26,86	26,17	23,49	26,11	14,60
<b>72</b>	28,45	22,05	26,79	25,89	26,98	24,90	25,10	25,71	15,08
<b>73</b>	29,25	23,37	26,20	26,02	25,91	27,37	23,96	25,91	15,27
<b>74</b>	27,86	21,41	26,95	25,91	25,37	25,81	23,82	26,33	14,57
<b>75</b>	29,50	21,33	27,30	25,69	25,08	26,12	24,06	26,28	14,76
<b>77</b>	27,57	21,58	27,76	25,89	25,72	28,20	25,06	27,02	15,88
<b>78</b>	28,78	22,26	27,94	26,44	25,24	27,38	23,87	25,04	14,69
<b>79</b>	28,97	23,50	28,63	26,38	26,59	26,12	24,98	26,38	15,40
<b>80</b>	29,18	22,73	28,89	25,79	25,63	26,15	24,06	26,33	15,46
<b>82</b>	29,57	23,41	27,60	26,92	26,15	26,52	25,04	26,96	16,84
<b>83</b>	27,40	22,64	26,46	25,04	24,06	25,15	22,99	24,74	13,42
<b>84</b>	29,00	22,31	26,70	25,30	25,29	24,80	22,96	25,35	13,95
<b>85</b>	27,38	21,16	25,01	24,44	25,52	23,17	22,96	24,85	13,75
<b>86</b>	27,68	21,98	27,10	25,24	25,83	25,73	22,86	26,16	14,32

BK = Best Keeper: Geometrisches Mittel der drei Referenz-Gene

### 5.3 Expressions-Niveau der untersuchten Transporter-Gene

**Δ C<sub>T</sub>- Werte**  
normalisiert auf das geometrische Mittel  
der Referenz-Gene ACTB, GAPDH und 18 S RNA

Untersuchter Transporter	Median	25 % Perzentil	75 % Perzentil	5 % Perzentil	95 % Perzentil
OCT1	13,63	13,17	14,12	12,33	15,05
OCT2 *	16,93	16,09	17,71	15,29	18,91
OCT3	7,47	6,92	8,42	6,14	9,23
OCTN1	11,98	11,32	12,63	10,10	13,32
OCTN2	10,75	10,09	11,32	9,21	12,25
MATE1	11,12	10,36	11,75	9,51	12,61
MDR1	11,22	10,26	11,84	9,24	13,22
MRP1	9,23	8,88	9,57	8,18	10,24
MRP5	11,21	10,64	11,66	10,09	12,37

Untersuchte Proben: n = 79

\* Ausnahme: n = 56

### 5.4 Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Genexpression der Transporter

#### 5.4.1 Alle Gewebeproben

**Relative Expression**  
in Gewebeproben weiblicher Patienten verglichen  
zu Gewebeproben männlicher Patienten

Untersuchter Transporter	Mittelwert	Standardfehler	p – Wert
OCT1	1,28	0,58 – 2,76	0,092
OCT3	1,11	0,45 – 2,73	0,523
OCTN1	0,99	0,40 – 2,39	0,926
OCTN2	1,10	0,45 – 2,57	0,533
MATE1	1,15	0,46 – 2,81	0,346
MDR1	0,92	0,28 – 3,01	0,670
MRP1	1,01	0,60 – 1,74	0,908
MRP5	1,12	0,58 – 2,17	0,309

Gewebeproben weiblicher Patienten: n = 27, Gewebeproben männlicher Patienten: n = 52



### 5.4.2 Gewebeprobe < 50 Jahre

Untersucher Transporter	Relative Expression in Gewebeprobe weiblicher Patienten verglichen zu Gewebeprobe männlicher Patienten		
	Mittelwert	Standardfehler	p – Wert
OCT1	2,083	0,788 – 3,637	0,183
OCT3	1,962	0,787 – 4,575	0,252
OCTN1	0,806	0,325 – 1,690	0,651
OCTN2	1,131	0,381 – 4,043	0,897
MATE1	2,774	1,025 – 7,356	0,117
MDR1	0,384	0,148 – 1,006	0,116
MRP1	1,018	0,632 – 1,644	0,907
MRP5	1,059	0,529 – 2,077	0,842

Gewebeprobe weiblicher Patienten: n = 4, Gewebeprobe männlicher Patienten: n = 4

### 5.4.3 Gewebeprobe 50 – 60 Jahre

Untersucher Transporter	Relative Expression in Gewebeprobe weiblicher Patienten verglichen zu Gewebeprobe männlicher Patienten		
	Mittelwert	Standardfehler	p – Wert
OCT1	1,610	0,575 – 3,618	0,155
OCT3	0,862	0,311 – 2,045	0,622
OCTN1	1,193	0,537 – 2,614	0,498
OCTN2	1,248	0,471 – 3,441	0,481
MATE1	1,076	0,502 – 2,470	0,790
MDR1	1,305	0,555 – 3,821	0,473
MRP1	1,074	0,692 – 1,665	0,620
MRP5	1,361	0,732 – 2,284	0,159

Gewebeprobe weiblicher Patienten: n = 11, Gewebeprobe männlicher Patienten: n = 11

## 5.4.4 Gewebeproben > 60 Jahre

Untersucher Transporter	Relative Expression in Gewebeproben weiblicher Patienten verglichen zu Gewebeproben männlicher Patienten		
	Mittelwert	Standardfehler	p – Wert
OCT1	1,178	0,606 – 2,303	0,300
OCT3	1,041	0,484 – 2,335	0,845
OCTN1	0,937	0,342 – 2,584	0,771
OCTN2	1,053	0,471 – 2,327	0,790
MATE1	1,038	0,434 – 2,359	0,864
MDR1	0,900	0,284 – 2,892	0,721
MRP1	1,014	0,574 – 1,833	0,937
MRP5	1,103	0,576 – 2,163	0,545

Gewebeproben weiblicher Patienten: n = 12, Gewebeproben männlicher Patienten: n = 37

## 5.5 Altersspezifische Unterschiede in der Genexpression der Transporter

### 5.5.1 Alle Gewebeproben

Untersucher Transporter	Relative Expression < 50 Jahre verglichen zu 50 – 60 Jahre		
	Mittelwert	Standardfehler	p – Wert
OCT1	1,277	0,468 – 3,379	0,446
OCT3	1,159	0,408 – 3,203	0,626
OCTN1	1,147	0,556 – 2,439	0,579
OCTN2	1,039	0,337 – 2,960	0,912
MATE1	1,066	0,364 – 3,439	0,818
MDR1	1,371	0,418 – 4,213	0,370
MRP1	1,142	0,718 – 1,780	0,346
MRP5	1,127	0,576 – 2,410	0,579

< 50 Jahre: n = 8, 50 – 60 Jahre: n = 22

Untersucher Transporter	Relative Expression < 50 Jahre verglichen zu > 60 Jahre		
	Mittelwert	Standardfehler	p – Wert
OCT1	0,922	0,403 – 2,117	0,686
OCT3	1,342	0,485 – 3,419	0,226
OCTN1	1,053	0,460 – 2,421	0,826
OCTN2	0,963	0,350 – 2,739	0,876
MATE1	0,987	0,326 – 3,186	0,958
MDR1	1,221	0,322 – 4,669	0,555
MRP1	1,021	0,596 – 1,848	0,897
MRP5	0,944	0,473 – 1,963	0,748

< 50 Jahre: n = 8, > 60 Jahre: n = 49

Untersucher Transporter	Relative Expression 50 – 60 Jahre verglichen zu > 60 Jahre		
	Mittelwert	Standardfehler	p – Wert
OCT1	0,722	0,317 – 1,667	<b>0,026</b>
OCT3	1,159	0,453 – 3,005	0,355
OCTN1	0,918	0,366 – 2,296	0,613
OCTN2	0,927	0,382 – 2,191	0,622
MATE1	0,925	0,401 – 2,197	0,622
MDR1	0,890	0,289 – 2,605	0,607
MRP1	0,894	0,522 – 1,500	0,293
MRP5	0,837	0,430 – 1,639	0,150

50 – 60 Jahre: n = 22, > 60 Jahre: n = 49

### 5.5.2 Gewebeproben von weiblichen Spendern

Untersucher Transporter	Relative Expression < 50 Jahre verglichen zu 50 – 60 Jahre		
	Mittelwert	Standardfehler	p – Wert
OCT1	1,453	0,569 – 3,946	0,420
OCT3	1,747	0,912 – 4,739	0,175
OCTN1	0,943	0,670 – 1,564	0,836
OCTN2	0,989	0,401 – 2,284	0,970
MATE1	1,712	0,602 – 4,814	0,190
MDR1	0,743	0,299 – 2,727	0,597
MRP1	1,112	0,717 – 1,731	0,605
MRP5	0,994	0,542 – 1,953	0,981

< 50 Jahre: n = 4, 50 – 60 Jahre: n = 11

Untersucher Transporter	Relative Expression < 50 Jahre verglichen zu > 60 Jahre		
	Mittelwert	Standardfehler	p – Wert
OCT1	1,177	0,546 – 2,908	0,602
OCT3	1,823	0,701 – 4,002	0,074
OCTN1	0,993	0,461 – 2,428	0,989
OCTN2	0,984	0,447 – 2,287	0,969
MATE1	1,598	0,591 – 4,137	0,227
MDR1	0,819	0,278 – 2,729	0,682
MRP1	1,020	0,641 – 1,644	0,935
MRP5	0,902	0,456 – 1,836	0,716

< 50 Jahre: n = 4, > 60 Jahre: n = 12

Untersucher Transporter	Relative Expression 50 – 60 Jahre verglichen zu > 60 Jahre		
	Mittelwert	Standardfehler	p – Wert
OCT1	0,810	0,303 – 1,915	0,446
OCT3	1,044	0,466 – 2,162	0,835
OCTN1	1,053	0,422 – 2,530	0,847
OCTN2	0,996	0,464 – 2,029	0,985
MATE1	0,933	0,444 – 1,889	0,763
MDR1	1,102	0,334 – 3,230	0,809
MRP1	0,917	0,551 – 1,497	0,584
MRP5	0,907	0,521 – 1,518	0,531

50 – 60 Jahre: n = 11, > 60 Jahre: n = 12

### 5.5.3 Gewebeproben von männlichen Spendern

Untersucher Transporter	Relative Expression < 50 Jahre verglichen zu 50 – 60 Jahre		
	Mittelwert	Standardfehler	p – Wert
OCT1	1,123	0,457 – 2,920	0,781
OCT3	0,768	0,245 – 2,008	0,581
OCTN1	1,395	0,516 – 3,933	0,442
OCTN2	1,091	0,331 – 4,937	0,867
MATE1	0,664	0,267 – 1,571	0,298
MDR1	2,528	0,857 – 5,321	<b>0,019</b>
MRP1	1,173	0,647 – 1,899	0,442
MRP5	1,278	0,671 – 2,440	0,458

< 50 Jahre: n = 4, 50 – 60 Jahre: n = 11

Untersucher Transporter	Relative Expression < 50 Jahre verglichen zu > 60 Jahre		
	Mittelwert	Standardfehler	p – Wert
OCT1	0,665	0,286 – 1,606	0,111
OCT3	0,968	0,404 – 2,299	0,911
OCTN1	1,155	0,461 – 3,227	0,698
OCTN2	0,917	0,295 – 3,681	0,807
MATE1	0,598	0,236 – 1,427	0,155
MDR1	1,920	0,705 – 5,187	0,178
MRP1	1,016	0,514 – 1,897	0,952
MRP5	0,940	0,482 – 1,957	0,836

< 50 Jahre: n = 4, > 60 Jahre: n = 37

Untersucher Transporter	Relative Expression 50 – 60 Jahre verglichen zu > 60 Jahre		
	Mittelwert	Standardfehler	p – Wert
OCT1	0,592	0,319 – 1,212	<b>0,004</b>
OCT3	1,260	0,451 – 3,527	0,337
OCTN1	0,827	0,320 – 2,235	0,410
OCTN2	0,841	0,314 – 2,213	0,445
MATE1	0,900	0,364 – 2,355	0,614
MDR1	0,759	0,277 – 2,234	0,338
MRP1	0,866	0,490 – 1,436	0,357
MRP5	0,735	0,369 – 1,512	0,072

50 – 60 Jahre: n = 11, > 60 Jahre: n = 37

## 5.6 Korrelation der individuellen Transporter-Expressionen

### 5.6.1 Individuelle Transporter-Expressionen

Individuelle Transporter-Expression gegen den Mittelwert aus  
79 Gewebeproben normalisiert auf Best Keeper (BK)

Gewebe Nr.	OCT1	OCT3	OCTN1	OCTN2	MATE1	MDR1	MRP1	MRP5
1	1,224	1,661	0,487	1,273	1,683	0,903	1,147	1,209
2	1,650	1,436	5,617	2,322	1,746	2,911	2,563	1,531
3	2,245	0,964	1,314	2,841	1,264	1,040	1,963	1,173
4	0,566	0,615	1,033	0,767	0,641	0,974	0,987	1,113
5	0,866	1,562	1,800	2,169	1,653	0,564	1,199	0,930
6	1,691	1,619	1,517	2,197	1,773	1,925	1,183	0,968
8	1,680	1,333	1,261	1,774	1,894	0,625	1,414	1,296
9	1,413	1,118	1,522	1,105	1,783	1,461	1,027	2,211
11	0,664	0,796	0,656	1,054	1,315	0,589	1,261	0,784
12	0,782	0,490	0,809	1,085	0,633	0,720	0,948	1,009
13	2,052	0,534	1,273	1,317	0,951	0,638	0,867	0,690
14	3,201	1,159	1,603	2,549	2,356	1,323	2,037	1,018
15	1,957	1,541	0,910	2,066	2,245	2,318	2,200	1,730
16	0,574	1,673	0,485	1,458	0,976	0,261	0,654	0,376
17	1,401	1,368	0,780	0,463	0,476	0,210	0,430	0,534
18	0,225	0,520	0,555	0,346	0,396	0,168	0,506	0,486
19	0,497	0,287	0,398	0,177	0,370	0,317	0,665	0,237
20	0,496	1,741	0,643	0,685	0,932	1,216	0,844	0,672
21	0,347	0,784	0,750	0,378	0,321	2,976	0,555	0,525
22	0,727	0,950	1,326	0,659	0,623	1,757	0,461	0,436
23	0,393	1,201	0,693	0,605	1,162	0,226	0,556	0,736
24	2,826	0,785	2,855	1,143	0,631	1,108	1,111	1,496
25	2,016	0,514	0,746	0,833	0,673	0,988	0,726	0,454
26	0,512	0,502	0,755	0,645	0,438	0,398	0,811	0,874
27	1,726	1,408	1,859	1,451	0,651	1,074	1,052	0,643
28	0,631	0,300	0,627	0,460	0,455	0,186	0,605	0,570
29	0,825	0,399	0,399	0,826	1,199	1,056	1,235	0,771
30	1,051	0,566	1,423	0,565	1,055	0,402	0,814	1,338
31	1,021	0,669	1,411	0,635	0,415	0,502	1,241	0,523
32	1,208	0,243	0,782	0,272	0,347	0,686	0,678	0,544
33	0,952	0,565	0,964	0,680	0,809	0,633	1,045	0,873
34	1,528	0,377	2,257	0,713	0,660	0,330	0,892	0,546
35	1,672	0,554	1,323	0,745	0,683	0,868	1,259	0,943
36	1,300	1,630	3,548	4,178	1,324	13,433	3,351	1,892
39	2,491	0,880	3,755	2,132	0,744	3,564	1,005	1,572
40	1,673	1,878	3,113	4,243	1,531	2,378	1,688	1,868
42	0,555	0,881	0,993	1,666	1,060	2,698	0,869	0,827
43	1,792	1,167	1,184	0,998	2,659	0,674	0,844	1,409
44	0,740	5,956	3,772	3,055	1,377	1,000	0,963	1,731

Fortsetzung der Tabelle *Individuelle Transporter-Expressionen*

**Individuelle Transporter-Expression gegen den Mittelwert aus  
79 Gewebeproben normalisiert auf Best Keeper (BK)**

Gewebe Nr.	OCT1	OCT3	OCTN1	OCTN2	MATE1	MDR1	MRP1	MRP5
<b>45</b>	1,347	1,750	0,930	1,393	2,965	0,554	1,356	1,693
<b>46</b>	0,855	2,327	0,471	1,548	3,011	0,608	1,388	1,529
<b>47</b>	0,989	1,537	1,532	1,465	1,338	9,169	1,014	1,127
<b>48</b>	0,836	0,447	0,627	1,451	0,518	0,677	0,733	1,660
<b>49</b>	2,052	1,450	3,371	2,772	1,451	3,407	1,430	2,153
<b>50</b>	1,896	1,733	1,013	2,851	1,223	1,507	1,481	1,402
<b>51</b>	1,263	1,233	0,381	1,131	0,731	1,865	0,770	1,188
<b>52</b>	1,438	2,305	1,342	1,191	0,433	1,579	0,810	2,196
<b>53</b>	0,883	0,481	0,816	0,867	0,855	0,726	0,751	0,907
<b>54</b>	0,900	1,092	0,965	1,521	2,081	0,638	1,188	0,766
<b>55</b>	1,230	1,192	1,725	1,778	0,650	4,505	1,112	1,234
<b>56</b>	0,928	2,691	0,863	1,963	4,561	3,058	1,689	2,304
<b>57</b>	0,102	0,918	0,840	0,325	0,280	1,517	0,495	0,739
<b>58</b>	0,474	0,430	0,448	0,430	1,027	0,679	0,832	0,939
<b>59</b>	0,680	2,772	1,187	0,832	0,287	0,527	0,341	0,946
<b>60</b>	1,105	1,700	0,996	0,980	1,422	0,456	0,828	0,940
<b>61</b>	0,832	1,870	1,128	0,552	0,881	1,379	0,589	1,055
<b>62</b>	0,915	0,939	1,714	0,672	0,595	1,539	0,842	0,776
<b>63</b>	1,223	1,143	0,378	0,887	0,840	0,529	0,823	1,889
<b>64</b>	1,175	0,560	0,970	0,386	0,522	0,586	0,871	0,482
<b>65</b>	0,607	0,527	0,870	0,683	0,515	3,166	1,241	1,323
<b>66</b>	0,937	1,744	1,633	0,896	1,892	3,317	1,127	1,286
<b>67</b>	1,036	2,021	0,326	1,998	2,297	1,414	1,349	2,220
<b>68</b>	1,369	0,510	0,580	0,719	1,464	0,573	0,876	0,457
<b>69</b>	1,223	0,802	3,030	1,110	0,908	2,120	0,888	1,129
<b>70</b>	0,857	1,313	0,547	0,680	2,952	0,595	1,389	0,744
<b>71</b>	0,424	0,386	0,549	0,454	0,443	0,711	1,260	0,824
<b>72</b>	1,219	1,534	1,161	0,938	0,565	2,376	0,582	1,514
<b>73</b>	0,810	0,724	1,995	0,979	1,358	0,489	1,446	1,505
<b>74</b>	1,281	1,661	0,732	0,653	1,215	0,889	0,980	0,689
<b>75</b>	0,482	2,009	0,656	0,866	1,704	0,818	0,949	0,818
<b>77</b>	3,869	3,673	1,033	1,634	2,364	0,420	1,039	1,064
<b>78</b>	0,744	1,015	0,399	0,490	1,444	0,324	1,029	1,825
<b>79</b>	1,076	0,724	0,405	0,834	0,925	1,278	0,790	1,185
<b>80</b>	0,974	1,270	0,354	1,315	1,877	1,305	1,542	1,282
<b>82</b>	1,942	2,088	2,251	1,566	3,413	2,623	2,056	2,156
<b>83</b>	0,788	0,326	0,463	0,537	1,354	0,632	0,776	0,933
<b>84</b>	0,384	0,589	0,567	0,645	0,834	1,162	1,149	0,884
<b>85</b>	1,004	1,117	1,590	1,021	0,621	3,147	0,998	1,093
<b>86</b>	1,218	0,949	0,552	0,868	0,741	0,789	1,588	0,653

BK = Best Keeper: Geometrisches Mittel der drei Referenz-Gene



### 5.6.2 Korrelation der Transporter-Expressionen

r \ p	OCT1	OCT3	OCTN1	OCTN2	MATE1	MDR1	MRP1	MRP5
OCT1		0,0907	<b>0,0004</b>	<b>1,9*10<sup>-05</sup></b>	<b>0,0135</b>	0,4831	<b>0,0008</b>	<b>0,0139</b>
OCT3	0,192		<b>0,0127</b>	<b>7,4*10<sup>-06</sup></b>	<b>4,8*10<sup>-05</sup></b>	0,2644	0,1503	<b>0,0001</b>
OCTN1	0,387	0,279		<b>1,6*10<sup>-08</sup></b>	<b>0,6513</b>	<b>5,8*10<sup>-05</sup></b>	<b>3,0*10<sup>-05</sup></b>	<b>0,0010</b>
OCTN2	0,461	0,480	<b>0,584</b>		<b>0,0004</b>	<b>4,2*10<sup>-06</sup></b>	<b>2,2*10<sup>-12</sup></b>	<b>2,0*10<sup>-07</sup></b>
MATE1	0,277	0,441	0,052	0,391		0,5058	<b>1,5*10<sup>-06</sup></b>	<b>4,0*10<sup>-06</sup></b>
MDR1	0,080	0,127	0,436	0,492	0,076		<b>2,1*10<sup>-06</sup></b>	<b>0,0028</b>
MRP1	0,370	0,163	0,451	<b>0,689</b>	<b>0,511</b>	<b>0,505</b>		<b>1,2*10<sup>-05</sup></b>
MRP5	0,276	0,420	0,364	<b>0,545</b>	0,490	0,332	0,470	

r = Korrelationskoeffizient p = Ergebnis aus Student-t-Test

Untersuchte Proben: n = 79

### 5.7 Individuelle Unterschiede der Genexpression in Korrelation mit der am LPM gemessenen Pharmakokinetik

Untersucher Transporter	Lungen-Perfusions-Experiment-Nr.									
	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
OCT1	3,201	0,574	0,225	0,347	2,016	1,726	1,021	1,208	0,952	
OCT3	1,159	1,673	0,520	0,784	0,514	1,408	0,669	0,243	0,565	
OCTN1	1,603	0,485	0,555	0,750	0,746	1,859	1,411	0,782	0,964	
OCTN2	2,549	1,458	0,346	0,378	0,833	1,451	0,635	0,272	0,680	
MATE1	2,356	0,976	0,396	0,321	0,673	0,651	0,415	0,347	0,809	
MDR1	1,323	0,261	0,168	2,976	0,988	1,074	0,502	0,686	0,633	
MRP1	2,037	0,654	0,506	0,555	0,726	1,052	1,241	0,678	1,045	
MRP5	1,018	0,376	0,486	0,525	0,454	0,943	0,523	0,544	0,873	
AUC <sub>0-60 min</sub> [ng/ml x min]	8,31	45,90	25,19	43,09	49,86	7,82	72,32	56,00	39,96	

Untersuchte Proben: n = 9

## 6 Unterschiede in der Protein-Expression von Arzneistofftransportern in humanem Lungengewebe

### 6.1 Individuelle Unterschiede der OCT3-Protein-Expression in Korrelation mit der am LPM gemessenen Pharmakokinetik

Lungen-Perfusions-Experiment-Nr.	OCT3-Protein-Expression [x-fach verglichen zum Mittelwert]	AUC <sub>0-60 min</sub> [ng/ml x min]	Pearson-Korrelationsanalyse
4	0,6140	8,31	<b>Steigung der Ausgleichsgeraden:</b> 68,24 ± 22,76  <b>y-Achsenabschnitt der Ausgleichsgeraden:</b> -8,01 ± 16,37  <b>Korrelationskoeffizient r:</b> 0,7499  <b>p-Wert:</b> 0,02
5	0,7149	45,90	
6	0,5396	25,19	
7	0,5634	43,09	
8	0,5317	49,86	
9	0,3239	7,28	
10	1,1070	72,32	
11	0,8480	56,00	
12	0,9087	39,96	

Untersuchte Proben: n = 9

## 6.2 Individuelle Unterschiede der OCT3-Protein-Expression in Korrelation mit der individuellen OCT3-Genexpression

Lungen-Perfusions-Experiment-Nr.	OCT3-Protein-Expression [x-fach verglichen zum Mittelwert]	OCT3-RNA-Expression [x-fach verglichen zum Mittelwert]	Pearson-Korrelationsanalyse
1	2,8417	1,118	<b>Steigung der Ausgleichsgeraden:</b> $-0,06915 \pm 0,1617$ <b>y-Achsenabschnitt der Ausgleichsgeraden:</b> $0,8829 \pm 0,2212$ <b>Korrelationskoeffizient r:</b> $-0,1340$ <b>p-Wert:</b> $0,6779$
2	2,6772	0,490	
3	1,5978	0,534	
4	0,6140	1,159	
5	0,7149	1,673	
6	0,5396	0,520	
7	0,5634	0,784	
8	0,5317	0,514	
9	0,3239	1,408	
10	1,1070	0,669	
11	0,8480	0,243	
12	0,9087	0,565	

Untersuchte Proben: n = 12

## 7 Zelluläre Aufnahme von [<sup>3</sup>H]-Ipratropiumbromid ([<sup>3</sup>H]-IB) in stabil transfizierte Zellen

### 7.1 Expression der Transporter-Gene in stabil transfizierten Zellen

Untersuchter Transporter	Zelllinie	Δ C <sub>T</sub> -Werte normalisiert auf 3 Referenz-Gene				
		1	2	3	MW	SD
OCT1	HEK-h-OCT1	3,04	2,18	2,47	<b>2,56</b>	<b>0,44</b>
OCT3	HEK-h-OCT1	17,00	17,00	17,15	<b>17,05</b>	<b>0,09</b>
OCT1	HEK-h-OCT3	17,75	17,07	17,68	<b>17,50</b>	<b>0,38</b>
OCT3	HEK-h-OCT3	3,64	3,37	3,30	<b>3,43</b>	<b>0,18</b>
OCT1	HEK-MOCK	16,85	17,31	16,98	<b>17,05</b>	<b>0,24</b>
OCT3	HEK-MOCK	17,57	18,03	16,30	<b>17,30</b>	<b>0,90</b>

MW = Mittelwert SD = Standardabweichung

RT-qPCR-Ansätze: n = 3

### 7.2 [<sup>3</sup>H]-IB-Aufnahme in HEK-h-OCT1

#### 7.2.1 Inkubation mit 3 nM [<sup>3</sup>H]-IB

Zeitpunkt [min]	Zelllinie	[ <sup>3</sup> H]-IB [pmol/mg Protein]				
		1	2	3	MW	SD
<b>3</b>	HEK-h-OCT1	0,348	0,328	0,325	<b>0,334</b>	<b>0,012</b>
<b>6</b>	HEK-h-OCT1	0,581	0,572	0,534	<b>0,562</b>	<b>0,025</b>
<b>10</b>	HEK-h-OCT1	0,736	0,719	0,691	<b>0,715</b>	<b>0,022</b>
<b>30</b>	HEK-h-OCT1	1,130	1,020	0,975	<b>1,042</b>	<b>0,080</b>
<b>3</b>	HEK-MOCK	0,130	0,122	0,134	<b>0,129</b>	<b>0,006</b>
<b>6</b>	HEK-MOCK	0,177	0,181	0,181	<b>0,180</b>	<b>0,002</b>
<b>10</b>	HEK-MOCK	0,218	0,229	0,219	<b>0,222</b>	<b>0,006</b>
<b>30</b>	HEK-MOCK	0,272	0,279	0,243	<b>0,264</b>	<b>0,019</b>

MW = Mittelwert SD = Standardabweichung

Zellkultur-Ansätze: n = 3

## 7.2.2 Inkubation mit 0,3 nM [<sup>3</sup>H]-IB

Zeitpunkt [min]	Zelllinie	[ <sup>3</sup> H]-IB [pmol/mg Protein]				
		1	2	3	MW	SD
3	HEK-h-OCT1	0,028	0,072 *	0,027	<b>0,028</b>	<b>&lt; 0,001</b>
6	HEK-h-OCT1	0,039	0,046	0,042	<b>0,042</b>	<b>0,004</b>
10	HEK-h-OCT1	0,055	0,061	0,063	<b>0,060</b>	<b>0,004</b>
30	HEK-h-OCT1	0,079	0,088	0,083	<b>0,084</b>	<b>0,004</b>
3	HEK-MOCK	0,012	0,011	0,009	<b>0,011</b>	<b>0,002</b>
6	HEK-MOCK	0,019	0,016	0,020	<b>0,018</b>	<b>0,002</b>
10	HEK-MOCK	0,022	0,023	0,023	<b>0,022</b>	<b>0,001</b>
30	HEK-MOCK	0,030	0,031	0,028	<b>0,030</b>	<b>0,002</b>

MW = Mittelwert SD = Standardabweichung

Zellkultur-Ansätze: n = 3 \*Ausreißer, Wert nicht in die Auswertung mit eingeschlossen

## 7.3 [<sup>3</sup>H]-IB-Aufnahme in HEK-h-OCT3

### 7.3.1 Inkubation mit 3 nM [<sup>3</sup>H]-IB

Zeitpunkt [min]	Zelllinie	[ <sup>3</sup> H]-IB [pmol/mg Protein]				
		1	2	3	MW	SD
3	HEK-h-OCT3	0,266	0,272	0,272	<b>0,270</b>	<b>0,004</b>
6	HEK-h-OCT3	0,456	0,451	0,444	<b>0,450</b>	<b>0,006</b>
10	HEK-h-OCT3	0,656	0,668	0,645	<b>0,656</b>	<b>0,012</b>
30	HEK-h-OCT3	0,861	0,855	0,920	<b>0,879</b>	<b>0,036</b>
3	HEK-MOCK	0,128	0,130	0,143	<b>0,134</b>	<b>0,008</b>
6	HEK-MOCK	0,183	0,174	0,178	<b>0,178</b>	<b>0,005</b>
10	HEK-MOCK	0,293	0,235	0,258	<b>0,262</b>	<b>0,029</b>
30	HEK-MOCK	0,417	0,248	0,254	<b>0,306</b>	<b>0,096</b>

MW = Mittelwert SD = Standardabweichung

Zellkultur-Ansätze: n = 3

### 7.3.2 Inkubation mit 0,3 nM [<sup>3</sup>H]-IB

Zeitpunkt [min]	Zelllinie	<sup>3</sup> H-IB [pmol/mg Protein]				
		1	2	3	MW	SD
3	HEK-h-OCT3	0,026	0,023	0,017	<b>0,022</b>	<b>0,004</b>
6	HEK-h-OCT3	0,038	0,040	0,046	<b>0,042</b>	<b>0,004</b>
10	HEK-h-OCT3	0,056	0,083 *	0,127 *	<b>0,056</b>	-
30	HEK-h-OCT3	0,132 *	0,064	0,070	<b>0,067</b>	<b>0,004</b>
3	HEK-MOCK	0,008	0,010	0,011	<b>0,010</b>	<b>0,002</b>
6	HEK-MOCK	0,016	0,019	0,018	<b>0,018</b>	<b>0,001</b>
10	HEK-MOCK	0,025	0,022	0,025	<b>0,024</b>	<b>0,002</b>
30	HEK-MOCK	0,032	0,033	0,031	<b>0,032</b>	<b>0,001</b>

MW = Mittelwert SD = Standardabweichung

Zellkultur-Ansätze: n = 3 \*Ausreißer, Wert nicht in die Auswertung mit eingeschlossen

### 7.4 Vergleich der Differenzen der Mittelwerte

Zeitpunkt [min]	Zelllinie	$\Delta$ MW [pmol/mg Protein]	
		3 nM	0,3 nM
3	HEK-h-OCT1	0,205	0,017
6	HEK-h-OCT1	0,383	0,024
10	HEK-h-OCT1	0,493	0,037
30	HEK-h-OCT1	0,777	0,054
3	HEK-h-OCT3	0,137	0,012
6	HEK-h-OCT3	0,272	0,024
10	HEK-h-OCT3	0,394	0,032
30	HEK-h-OCT3	0,572	0,035

$\Delta$  MW = Differenz der Mittelwerte

## 7.5 [<sup>3</sup>H]-Salbutamol-Aufnahme in HEK-h-OCT1 und HEK-h-OCT3

Zeitpunkt [min]	Zelllinie	[ <sup>3</sup> H]-SB [nmol/mg Protein]				
		1	2	3	MW	SD
10	HEK-h-OCT1	0,888	1,034	0,930	<b>0,950</b>	<b>0,075</b>
30	HEK-h-OCT1	1,335	1,497	1,265	<b>1,366</b>	<b>0,119</b>
10	HEK-h-OCT3	0,681	0,646	0,609	<b>0,645</b>	<b>0,036</b>
30	HEK-h-OCT3	0,752	0,822	0,821	<b>0,798</b>	<b>0,040</b>
10	HEK-MOCK	0,362	0,342	0,470	<b>0,391</b>	<b>0,069</b>
30	HEK-MOCK	0,525	0,459	0,523	<b>0,503</b>	<b>0,037</b>

[<sup>3</sup>H]-SB = [<sup>3</sup>H]-Salbutamol MW = Mittelwert SD = Standardabweichung

Zellkultur-Ansätze: n = 3

## 7.6 $\beta$ -Estradiol-Einfluss auf die [<sup>3</sup>H]-IB-Aufnahme in HEK-h-OCT1

Zeitpunkt [min]	$\beta$ -Estradiol Konzentration	[ <sup>3</sup> H]-IB [pmol/mg Protein]				
		1	2	3	MW	SD
10	0 M	0,089	0,091	0,078	<b>0,086</b>	<b>0,007</b>
10	10 <sup>-5</sup> M	0,072	0,060	0,068	<b>0,067</b>	<b>0,006</b>
10	10 <sup>-6</sup> M	0,045	0,043	0,047	<b>0,045</b>	<b>0,002</b>
10	10 <sup>-9</sup> M	0,072	0,053	0,073	<b>0,066</b>	<b>0,011</b>

MW = Mittelwert SD = Standardabweichung

Zellkultur-Ansätze: n = 3





---

## **E Zusammenfassung**

## Zusammenfassung

Arzneistofftransporter ermöglichen endogenen und exogenen Molekülen die Überwindung von Zellmembranen und tragen dadurch zur Aufnahme, Verteilung und Elimination von Arzneistoffen bei. Inhalativ applizierte Wirkstoffe, wie Vertreter aus der Gruppe der Beta-2-Sympathomimetika oder Anticholinergika, zählen zu den Substraten wichtiger, pulmonal exprimierter Arzneistofftransporter. Trotz intensivierter Forschung auf dem Gebiet der Transporter-Expression ist diese im humanen Lungengewebe bisher wenig untersucht und deren pharmakokinetische Auswirkungen auf pulmonal verabreichte Arzneistoffe sind kaum bekannt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss von Arzneistofftransportern auf die pulmonale Absorption inhalierter Arzneistoffe untersucht und Erkenntnisse über deren Expressions-Profil im humanen Lungengewebe gewonnen werden.

Pharmakokinetische Parameter des inhalativen Anticholinergikums Ipratropiumbromid wurden an einem *ex vivo* Modell der humanen Lunge untersucht. Nach vorheriger Applikation des kompetitiven OCTN1/2-Inhibitors L-Carnitin wurde keine signifikante Reduktion der absorbierten Wirkstoffmenge detektiert. Damit zeigten sich die beiden organischen Kationen/Carnitin-Transporter OCTN1 und OCTN2, anders als bisher vermutet, nicht als primär an der Absorption von Ipratropiumbromid beteiligte Transporter. Infolgedessen wurde die Beteiligung weiterer Transporter hypothetisiert.

Erstmals wurden die am humanen Lungen-Perfusions-Modell gewonnenen pharmakokinetischen Daten zur pulmonalen Absorption in direkter Beziehung zur mRNA- und Protein-Expression von Arzneistofftransportern in den jeweiligen individuellen Gewebeproben betrachtet. Die pulmonale Genexpression des Multidrug Resistance-Related Protein MRP5 wies eine signifikante negative Korrelation mit der *Area under the curve* ( $AUC_{0-60 \text{ min}}$ ) von Ipratropiumbromid auf ( $r = -0,699$ ;  $p < 0,05$ ), was die Beteiligung von MRP5 an den Umverteilungsprozessen von Ipratropiumbromid in der humanen Lunge nahelegte. Auf Proteinebene wurde eine positive Korrelation zwischen der Expression des organischen Kationentransporters OCT3 und der  $AUC_{0-60 \text{ min}}$  von Ipratropiumbromid ermittelt ( $r = 0,7499$ ,  $p < 0,05$ ), woraus sich eine potentielle Beteiligung von OCT3 an der Aufnahme von Ipratropiumbromid aus dem luminalen Lungenbereich ableiten ließ.

Zur Untermauerung dieser Hypothese wurden Untersuchungen mit stabil transfizierten HEK293-Zellen durchgeführt. Sowohl der organische Kationentransporter OCT1 als auch OCT3 trugen dabei signifikant zu einer erhöhten zellulären Aufnahme der beiden Tritium-markierten Bronchodilatoren Ipratropiumbromid und Salbutamol bei. Damit wurde für OCT3 zum ersten Mal eine Beteiligung an der zellulären Aufnahme dieser beiden Arzneistoffe nachgewiesen.

Im Kontext der Gendermedizin sind geschlechtsspezifische Unterschiede in der Transporter-Expression von großem Interesse. Inwiefern die drei Sexualsteroidhormone Estradiol, Progesteron und Testosteron einen regulatorischen Effekt auf die mRNA-Expression von Membrantransportern haben, wurde erstmals durch *in vitro* Inkubationsversuche in physiologischen Hormonkonzentrationen mit der humanen Bronchialepithelzelllinie Calu-3 geprüft. Mittels intensiv optimierter und sorgfältig validierter RT-qPCR-Analytik konnten vor allem nach Inkubation mit weiblichen Sexualhormonen verglichen zu keiner Hormon-Zugabe statistisch signifikante Expressions-Unterschiede detektiert werden: Nach Behandlung mit Estradiol zeigten der Oligopeptid-Transporter PEPT2 ( $80,8 \pm 15,6$  %) und OCTN2 ( $82,8 \pm 4,2$  %) eine geringere Genexpression, das Multidrug Resistance-Related Protein MRP1 ( $111,6 \pm 9,1$  %) sowie OCTN1 ( $112,9 \pm 10,1$  %) waren nach Zugabe von Estradiol kombiniert mit Progesteron höher exprimiert als ohne Hormon-Zusatz.

Da Estradiol überdies als Inhibitor des OCT1- und OCT3-vermittelten Transports gilt, wurde die Auswirkung des Hormons, unter anderem in physiologischer Konzentration, auf die Aufnahme von Tritium-markierten Ipratropiumbromid in stabil transfizierte HEK293-Zellen untersucht, wobei tatsächlich eine reduzierte zelluläre Ipratropiumbromid-Aufnahme beobachtet wurde. Somit könnte auch *in vivo* eine geschlechtsspezifische Inhibition der beiden Transporter stattfinden, wodurch deren Substrate einer geschlechtsspezifisch variierenden Pharmakokinetik unterliegen könnten.

Darüber hinaus wurde in rund 80 humanen Lungengewebsproben die Genexpression von Arzneistofftransportern hinsichtlich geschlechts- und altersspezifischer Unterschiede überprüft. In unter 50-jährigen Männern war das Multidrug-Resistance Protein MDR1 signifikant höher exprimiert verglichen zu Männern von 50 - 60 Jahren. OCT1 war in Patienten von 50 - 60 Jahren signifikant geringer exprimiert als in über 60-Jährigen. Daneben lieferte die Analyse aller Gewebeproben das Genexpressions-Profil von Arzneistofftransportern im humanen Lungengewebe, wobei OCT3 das höchste und OCT2 das geringste mRNA-Expressions-Niveau unter den untersuchten Transportern aufwies. Eine wesentliche Beteiligung von OCT3 an Transportvorgängen im humanen Lungengewebe erschien damit wahrscheinlich.

Resümierend konnte mit der vorliegenden Arbeit ein Beitrag zur Aufklärung des Einflusses von Arzneistofftransportern auf die pulmonale Absorption inhalativ verabreichter Arzneistoffe geleistet werden. Dabei konnte OCT3 erstmals als maßgeblich an der zellulären Aufnahme von Ipratropiumbromid beteiligter Transporter in der humanen Lunge identifiziert werden, womit einerseits die Beteiligung von Arzneistofftransportern an pharmakokinetischen Prozessen *in vivo* und andererseits die Bedeutung von Arzneistofftransportern für die inhalative Arzneimitteltherapie deutlich wurde.

## Summary

Drug transporters facilitate the transport of endogenous and exogenous compounds across cell membranes. Therefore they contribute to the absorption, distribution and elimination of drugs. Pulmonary administered drugs, such as members of the drug class of betamimetics or anticholinergics, are known substrates of relevant pulmonary expressed drug transporters. Despite intensified research in the field of transporter expression few data are available about their expression in the human lung and the pharmacokinetic implications on pulmonary administered drugs. The aim of this thesis was to investigate the impact of drug transporters on the absorption of inhaled drugs and to gain insights into their expression profiles in human lung tissue.

Pharmacokinetic properties of the inhaled anticholinergic ipratropium bromide were explored using an *ex vivo* model of the human lung. After preceding application of the competitive OCTN1/2-inhibitor L-carnitine no significant decrease of the amount of absorbed active ingredient was detected. This contradicted previous assumptions regarding the contribution of the organic cation/carnitine transporters OCTN1 and OCTN2 to the absorption of ipratropium bromide. Consequently the involvement of additional transporters was hypothesized.

For the first time pharmacokinetic data of the pulmonary absorption obtained by employing the human lung perfusion model were correlated with the mRNA and protein expression of drug transporters in respective individual tissue samples. The pulmonary gene expression of the multidrug resistance-related protein MRP5 showed a significant negative correlation with the *area under the curve* ( $AUC_{0-60 \text{ min}}$ ) of ipratropium bromide ( $r = -0,699$ ;  $p < 0,05$ ). This might indicate that MRP5 contributes to the redistribution processes of ipratropium bromide in the human lung. A positive correlation between the protein expression of the organic cation transporter OCT3 and the  $AUC_{0-60 \text{ min}}$  of ipratropium bromide was detected ( $r = 0,7499$ ,  $p < 0,05$ ) suggesting a potential involvement of OCT3 in the absorption of ipratropium bromide in the luminal lung area.

Uptake assays using stably transfected HEK293 cells were performed to substantiate this hypothesis. Both organic cation transporters, OCT1 and OCT3, contributed significantly to an increased cellular uptake of the tritium labeled bronchodilators ipratropium bromide and salbutamol. Thus, the contribution of OCT3 to the cellular uptake of both pharmaceutical substances was demonstrated for the first time.

Gender-specific differences of drug transporter expression are of major interest in the context of gender medicine. *In vitro* incubation studies with the human bronchial epithelial cell line Calu-3 for the first time elucidated whether physiological concentrations of the three sex steroid hormones estradiol, progesterone and testosterone exert a regulatory effect upon the mRNA expression of membrane transporters. By thoroughly optimized and

Carefully validated RT-qPCR analytics statistically significant differences in gene expression were detected primarily after incubation with female sex hormones compared to no hormone exposure: After incubation with estradiol the peptide transporter PEPT2 ( $80,8 \pm 15,6 \%$ ) and OCTN2 ( $82,8 \pm 4,2 \%$ ) showed decreased expression whereas the multidrug resistance-related protein MRP1 ( $111,6 \pm 9,1 \%$ ) as well as OCTN1 ( $112,9 \pm 10,1 \%$ ) were upregulated after addition of both estradiol and progesterone compared to no treatment.

Since estradiol is also a known inhibitor of the transport mediated by OCT1 and OCT3 its impact on the uptake of tritium labeled ipratropium bromide was investigated in stably transfected HEK293 cells. Indeed, a reduced cellular uptake of ipratropium bromide was observed after incubation with estradiol, also at physiological concentrations. Therefore, a gender-specific inhibition of both transporters *in vivo* is conceivable and could result in gender-specific pharmacokinetic characteristics for substrates of these transporters.

Moreover, the gene expression of drug transporters in approximate 80 lung tissue samples was examined regarding gender and age related differences. The multidrug resistance protein MDR1 was significantly higher expressed in men younger than 50 years compared to 50 - 60 year old men. OCT1 was significantly less expressed in 50 - 60 years old patients compared to patients older than 60 years. Furthermore, the gene expression profile of drug transporters in the human lung was analyzed. In all tissue samples OCT3 showed the highest mRNA expression level whereas OCT2 was least expressed amongst the investigated transporters. This suggested a substantial involvement of OCT3 in transport processes in human lung tissue.

In conclusion, the present research contributed to the elucidation of the role of drug transporters in the pulmonary absorption of inhaled drugs. For the first time OCT3 was identified to be substantially involved in the cellular absorption of ipratropium bromide in human lungs. Hence, the data supported the involvement of drug transporters in pharmacokinetic processes *in vivo* and emphasized the importance of drug transporters for inhaled pharmacotherapy.



---

## **F Abkürzungsverzeichnis**

$^3\text{H}$	Tritium (Isotop des Wasserstoffs)
[ $^3\text{H}$ ]-IB	[Methyl- $^3\text{H}$ ]-Ipratropiumbromid
[ $^3\text{H}$ ]-SB	Salbutamol-[ring- $^3\text{H}$ ]
$\Delta C_T$	Differenz der $C_T$ -Werte von Ziel-Gen und Referenz-Genen
$\Delta\Delta C_T$	Differenz der $C_T$ -Differenzen von Kontroll- und Interventionsgruppe
$\Delta R_n$	Differenz aus normalisierter Fluoreszenz und Basislinien-Fluoreszenz
18 S RNA	18 S Untereinheit der ribosomalen RNA
7DIB	Ipratropium-7d-bromid
A	Adenin
ABC	ATP-binding cassette
ACN	Acetonitril
ACTB	Actin beta (= Beta-Aktin)
ADP	Adenosindiphosphat
AIC	Air liquide interface culture (= Luft/Flüssigkeits-Grenzschicht)
ANOVA	Analysis of variance (= Varianzanalyse)
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
ASP+	4-[4-(Dimethylamino)-styryl]-N-methylpyridinium
ATP	Adenosintriphosphat
$\text{AUC}_{0-60 \text{ min}}$	Area under the curve (= Fläche unter der Kurve) vom Zeitpunkt 0 min bis zum Zeitpunkt 60 min
BK	Best Keeper (= geometrisches Mittel aus Referenz-Genen)
bp	Basenpaare
BSAB	Butylscopolaminbromid
C	Cytosin
CAR	L-Carnitin
cDNA	Complementary DNA (= komplementäre Desoxyribunukleinsäure)
CI	Confidence interval (= Konfidenzintervall)
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease (= chronisch obstruktive Lungenkrankheit)
$C_T$	Threshold cycle (= Zyklus an dem die Fluoreszenz-Kurve die Schwellenlinie schneidet)
CYP	Cytochrom P450
dSPE	Dispersive solid phase extraction (= Dispersive Festphasenextraktion)
EN	Europäische Norm
ERE	Estrogen-Response-Element
ESI	Elektrospray-Ionisation
EST	Estradiol
FAM	6-Carboxyfluorescein
FEV1/FVC	Relative Einsekundenkapazität (= Tiffeneau-Index): Einsekundenkapazität / Forcierte Vitalkapazität
FM	Fließmittel
FW	Forward-Primer
g	Erdbeschleunigung ( $\approx 9,81 \text{ m/s}^2$ )
G	Guanin



GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GSH	Glutathion
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HEK293	Humane embryonale Nierenzelllinie 293
HEK-h-OCT1	Mit humanem OCT1 stabil transfizierte HEK293 Zellen
HEK-h-OCT3	Mit humanem OCT3 stabil transfizierte HEK293 Zellen
HEK-MOCK	HEK293 Zellen mit leerem Vektor
HPRT1	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase 1
IB	Ipratropiumbromid
IGF I	Insulin-like growth factor I (= insulinähnlicher Wachstumsfaktor I)
IRC	Inter-run control (= Lauf-Vergleichs-Probe)
IS	Interner Standard
ICH	International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use
KP	Kalibrierpunkt
LCC	Liquide covered culture (= Kultur von Zellen in Zellkulturflaschen, bedeckt mit flüssigem Nährmedium)
LC-MS/MS	Liquid Chromatography (= Flüssigchromatographie) gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie
LLOQ	Lower limit of quantification (= Bestimmungsgrenze)
LPM	Lungen-Perfusions-Modell
m	Männlich
MATE1	Multidrug and Toxin Extrusion Protein 1
MATE2	Multidrug and Toxin Extrusion Protein 2
MDR1	Multidrug-Resistance Protein 1 = P-Glykoprotein
MeOH	Methanol
Milli-Q-H <sub>2</sub> O	Millipore®-Wasser
MIQE	Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments
mRNA	Messenger RNA (= Boten-Ribonukleinsäure)
MRP1	Multidrug Resistance-Related Protein 1
MRP5	Multidrug Resistance-Related Protein 5
MSD	Membrane Spanning Domain (= membranständige Domäne)
MW	Mittelwert
n	Anzahl
NBD	Nucleotide Binding Domain (= ATP-bindende Domäne)
NCBI	National Center for Biotechnology Information
noRT	Kontrolle ohne Reverse Transkriptase
NT	No treatment (= Kontrolle ohne Inkubation)
NTC	No-template control (= Leerprobe)
OAT	Organischer Anionentransporter
OATP	Organic Anion Transporting Polypeptide
OCT1	Organischer Kationentransporter 1
OCT2	Organischer Kationentransporter 2

---

OCT3	Organischer Kationentransporter 3
OCTN1	Organischer Kationen/Carnitin-Transporter 1
OCTN2	Organischer Kationen/Carnitin-Transporter 2
P	Phosphat
PBS	Phosphate buffered saline (= Phosphatgepufferte Salzlösung)
PBST	PBS mit 1 % Tween 20
PCR	Polymerase chain reaction (= Polymerase-Ketten-Reaktion)
PEEP	Positive End Expiratory Pressure (= positiver end-expiratorischer Druck)
PEPT1	Oligopeptid-Transporter 1
PEPT2	Oligopeptid-Transporter 2
P-gp	P-Glykoprotein = Multidrug-Resistance Protein 1
PRO	Progesteron
PSA	Primary and secondary amine exchange materials
PSP	Post-Spike-Probe
QP	Qualitätsprobe
QuEChERS	Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe
r	Korrelationskoeffizient
REST	Relative Expression Software Tool
Rn	Auf Referenzfarbstoff normalisierte Fluoreszenz
ROX	6-Carboxyl-X-Rhodamin
RT	Raumtemperatur
RT-qPCR	Reverse Transkriptase – quantitative real-time Polymerase-Ketten-Reaktion
RW	Reverse-Primer
SB	Salbutamolsulfat
SD	Standardabweichung
SDHA	Succinat-Dehydrogenase, Untereinheit A
SDS	Sodium dodecyl sulfate (= Natriumdodecylsulfat)
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
SLC	Solute carrier
SNP	Single nucleotide polymorphism (= Einzelnukleotid-Polymorphismus)
SNR	Signal to noise ratio (= Signal-Rausch-Verhältnis)
T	Thymin
TEST	Testosteron
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur eines PCR-Produktes
T <sub>exp</sub>	Expirationszeit
T <sub>insp</sub>	Inspirationszeit
TMD	Transmembrane Domäne
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
U	Uracil
UBC	Ubiquitin C
w	Weiblich
WCX	Weak cation-exchanger (= schwacher Kationenaustauscher)

---

## **G Literaturverzeichnis**

1. Schneeberger EE and Lynch RD, *The tight junction: a multifunctional complex*. Am J Physiol Cell Physiol, 2004. 286(6): C1213-1228.
2. Niessen CM, *Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function*. J Invest Dermatol, 2007. 127(11): 2525-2532.
3. Hartsock A and Nelson WJ, *Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton*. Biochim Biophys Acta, 2008. 1778(3): 660-669.
4. Brooke MA, Nitoiu D and Kelsell DP, *Cell-cell connectivity: desmosomes and disease*. J Pathol, 2012. 226(2): 158-171.
5. Haghi M, Ong HX, Traini D and Young P, *Across the pulmonary epithelial barrier: Integration of physicochemical properties and human cell models to study pulmonary drug formulations*. Pharmacol Ther, 2014. 144(3): 235-252.
6. Yang NJ and Hinner MJ, *Getting across the cell membrane: an overview for small molecules, peptides, and proteins*. Methods Mol Biol, 2015. 1266: 29-53.
7. Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Ruth P, et al., *Mutschler Arzneimittelwirkungen, Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*. 9. Auflage. 2008, Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH.
8. Patton JS, *Mechanisms of macromolecule absorption by the lungs*. Adv Drug Deliv Rev, 1996. 19(1): 3-36.
9. Doherty GJ and McMahon HT, *Mechanisms of endocytosis*. Annu Rev Biochem, 2009. 78: 857-902.
10. Vasiliou V, Vasiliou K and Nebert DW, *Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family*. Hum Genomics, 2009. 3(3): 1-10.
11. Lodish H, Berk A, Zipursky S, Matsudaira P, et al., *Molecular Cell Biology*. 4th edition. 2000, New York: W. H. Freeman.
12. Hediger MA, Clemençon B, Burrier RE and Bruford EA, *The ABCs of membrane transporters in health and disease (SLC series): introduction*. Mol Aspects Med, 2013. 34(2-3): 95-107.
13. Ayrton A and Morgan P, *Role of transport proteins in drug discovery and development: a pharmaceutical perspective*. Xenobiotica, 2008. 38(7-8): 676-708.
14. Lee EJ, Lean CB and Limentani LM, *Role of membrane transporters in the safety profile of drugs*. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2009. 5(11): 1369-1383.
15. *Guideline on the investigation of drug interactions*. European Medicines Agency, Committee for Human Medicinal Products (CHMP), 2012: London, accessed: 24.05.2016, available from: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2012/07/WC500129606.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2012/07/WC500129606.pdf).
16. *Guidance for Industry. Drug Interaction Studies - Study Design, Data Analysis, Implications for Dosing, and Labeling Recommendations. Draft Guidedance*. U.S. Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), 2012: Rockville, USA, accessed: 24.05.2016, available from: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM292362.pdf>.
17. Giacomini KM and Huang SM, *Transporters in Drug Development and Clinical Pharmacology*. Clin Pharmacol Ther, 2013. 94(1): 3-9.
18. König J, Müller F and Fromm MF, *Transporters and Drug-Drug Interactions: Important Determinants of Drug Disposition and Effects*. Pharmacol Rev, 2013. 65(3): 944-966.
19. Yee SW, Chen LG and Giacomini KM, *Pharmacogenomics of membrane transporters: past, present and future*. Pharmacogenomics, 2010. 11(4): 475-479.

20. Giacomini KM, *Membrane transporters in drug development*. Nat Rev Drug Discov, 2010. 9(3): 215-236.
21. Bosquillon C, *Drug transporters in the lung-do they play a role in the biopharmaceutics of inhaled drugs?* J Pharm Sci, 2010. 99(5): 2240-2255.
22. Endter S, Francombe D, Ehrhardt C and Gumbleton M, *RT-PCR analysis of ABC, SLC and SLCO drug transporters in human lung epithelial cell models*. J Pharm Pharmacol, 2009. 61(5): 583-591.
23. Dean M, Hamon Y and Chimini G, *The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily*. J Lipid Res, 2001. 42(7): 1007-1017.
24. van der Deen M, de Vries EGE, Timens W, Scheper RJ, et al., *ATP-binding cassette (ABC) transporters in normal and pathological lung*. Respir Res, 2005. 6(1): 59-75.
25. Langmann T, Mauerer R, Zahn A, Moehle C, et al., *Real-time reverse transcription-PCR expression profiling of the complete human ATP-binding cassette transporter superfamily in various tissues*. Clin Chem, 2003. 49(2): 230-238.
26. Leslie EM, Deeley RG and Cole SPC, *Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense*. Toxicol Appl Pharmacol, 2005. 204(3): 216-237.
27. Loo TW and Clarke DM, *Recent progress in understanding the mechanism of P-glycoprotein-mediated drug efflux*. J Membr Biol, 2005. 206(3): 173-185.
28. Gene. Database, accessed: 1.6.2015, available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>.
29. Cordon-Cardo C, O'Brien JP, Boccia J, Casals D, et al., *Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human normal and tumor tissues*. J Histochem Cytochem, 1990. 38(9): 1277-1287.
30. Borst P, Evers R, Kool M and Wijnholds J, *A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins*. J Natl Cancer Inst, 2000. 92(16): 1295-1302.
31. Cole SPC, *Targeting multidrug resistance protein 1 (MRP1, ABCG1): past, present, and future*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2014. 54: 95-117.
32. Toyoda Y, Hagiya Y, Adachi T, Hoshijima K, et al., *MRP class of human ATP binding cassette (ABC) transporters: historical background and new research directions*. Xenobiotica, 2008. 38(7-8): 833-862.
33. Jansen RS, Mahakena S, de Haas M, Borst P, et al., *ATP-binding cassette subfamily C member 5 (ABCC5) functions as an efflux transporter of glutamate conjugates and analogs*. J Biol Chem, 2015. 290(51): 30429-30440.
34. Bleasby K, Castle JC, Roberts CJ, Cheng C, et al., *Expression profiles of 50 xenobiotic transporter genes in humans and pre-clinical species: A resource for investigations into drug disposition*. Xenobiotica, 2006. 36(10-11): 963-988.
35. SLC Tables. BioParadigms, accessed: 28.07.2016, available from: <http://slc.bioparadigms.org/>.
36. He L, Vasiliou K and Nebert DW, *Analysis and update of the human solute carrier (SLC) gene superfamily*. Hum Genomics, 2009. 3(2): 195-206.
37. Daniel H and Kottra G, *The proton oligopeptide cotransporter family SLC15 in physiology and pharmacology*. Pflugers Arch, 2004. 447(5): 610-618.
38. Liu W, Liang R, Ramamoorthy S, Fei YJ, et al., *Molecular cloning of PEPT 2, a new member of the H<sup>+</sup>/peptide cotransporter family, from human kidney*. Biochim Biophys Acta, 1995. 1235(2): 461-466.
39. Koepsell H, *The SLC22 family with transporters of organic cations, anions and zwitterions*. Mol Aspects Med, 2013. 34(2-3): 413-435.

40. Nigam SK, *What do drug transporters really do?* Nat Rev Drug Discov, 2015. 14(1): 29-44.
41. Koepsell H, Lips K and Volk C, *Polyspecific organic cation transporters: structure, function, physiological roles, and biopharmaceutical implications.* Pharm Res, 2007. 24(7): 1227-1251.
42. Ciarimboli G and Schlatter E, *Regulation of organic cation transport.* Pflugers Arch, 2005. 449(5): 423-441.
43. Zhang SZ, Lovejoy KS, Shima JE, Lagpacan LL, et al., *Organic cation transporters are determinants of oxaliplatin cytotoxicity.* Cancer Res, 2006. 66(17): 8847-8857.
44. More SS, Li SL, Yee SW, Chen LG, et al., *Organic cation transporters modulate the uptake and cytotoxicity of picoplatin, a third-generation platinum analogue.* Mol Cancer Ther, 2010. 9(4): 1058-1069.
45. Nies AT, Hofmann U, Resch C, Schaeffeler E, et al., *Proton pump inhibitors inhibit metformin uptake by organic cation transporters (OCTs).* Plos One, 2011. 6(7): e22163.
46. Minematsu T and Giacomini KM, *Interactions of tyrosine kinase inhibitors with organic cation transporters and multidrug and toxic compound extrusion proteins.* Mol Cancer Ther, 2011. 10(3): 531-539.
47. Cropp CD, Yee SW and Giacomini KM, *Genetic variation in drug transporters in ethnic populations.* Clin Pharmacol Ther, 2008. 84(3): 412-416.
48. Shu Y, Sheardown SA, Brown C, Owen RP, et al., *Effect of genetic variation in the organic cation transporter 1 (OCT1) on metformin action.* J Clin Invest, 2007. 117(5): 1422-1431.
49. Tzvetkov MV, Vormfelde SV, Balen D, Meineke I, et al., *The effects of genetic polymorphisms in the organic cation transporters OCT1, OCT2, and OCT3 on the renal clearance of metformin.* Clin Pharmacol Ther, 2009. 86(3): 299-306.
50. Motohashi H, Sakurai Y, Saito H, Masuda S, et al., *Gene expression levels and immunolocalization of organic ion transporters in the human kidney.* J Am Soc Nephrol, 2002. 13(4): 866-874.
51. Kido Y, Matsson P and Giacomini KM, *Profiling of a prescription drug library for potential renal drug-drug interactions mediated by the organic cation transporter 2.* J Med Chem, 2011. 54(13): 4548-4558.
52. Kekuda R, Prasad PD, Wu X, Wang H, et al., *Cloning and functional characterization of a potential-sensitive, polyspecific organic cation transporter (OCT3) most abundantly expressed in placenta.* J Biol Chem, 1998. 273(26): 15971-15979.
53. Wu X, Kekuda R, Huang W, Fei YJ, et al., *Identity of the organic cation transporter OCT3 as the extraneuronal monoamine transporter (uptake2) and evidence for the expression of the transporter in the brain.* J Biol Chem, 1998. 273(49): 32776-32786.
54. Sata R, Ohtani H, Tsujimoto M, Murakami H, et al., *Functional analysis of organic cation transporter 3 expressed in human placenta.* J Pharmacol Exp Ther, 2005. 315(2): 888-895.
55. Chen LG, Pawlikowski B, Schlessinger A, More SS, et al., *Role of organic cation transporter 3 (SLC22A3) and its missense variants in the pharmacologic action of metformin.* Pharmacogenet Genomics, 2010. 20(11): 687-699.
56. Tamai I, Ohashi R, Nezu J, Yabuuchi H, et al., *Molecular and functional identification of sodium ion-dependent, high affinity human carnitine transporter OCTN2.* J Biol Chem, 1998. 273(32): 20378-20382.
57. Tamai I, *Pharmacological and pathophysiological roles of carnitine/organic cation transporters (OCTNs: SLC22A4, SLC22A5 and Slc22a21).* Biopharm Drug Dispos, 2013. 34(1): 29-44.

58. Yabuuchi H, Tamai I, Nezu J, Sakamoto K, et al., *Novel membrane transporter OCTN1 mediates multispecific, bidirectional, and pH-dependent transport of organic cations*. *J Pharmacol Exp Ther*, 1999. 289(2): 768-773.
59. Ramsay RR, Gandour RD and van der Leij FR, *Molecular enzymology of carnitine transfer and transport*. *Biochim Biophys Acta*, 2001. 1546(1): 21-43.
60. Wagner CA, Lukewille U, Kaltenbach S, Moschen I, et al., *Functional and pharmacological characterization of human Na<sup>+</sup>-carnitine cotransporter hOCTN2*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2000. 279(3): F584-F591.
61. Diao L, Ekins S and Polli JE, *Quantitative structure activity relationship for inhibition of human organic cation/carnitine transporter*. *Mol Pharm*, 2010. 7(6): 2120-2131.
62. Urban TJ, Gallagher RC, Brown C, Castro RA, et al., *Functional genetic diversity in the high-affinity carnitine transporter OCTN2 (SLC22A5)*. *Mol Pharmacol*, 2006. 70(5): 1602-1611.
63. Nezu JI, Tamai I, Oku A, Ohashi R, et al., *Primary systemic carnitine deficiency is caused by mutations in a gene encoding sodium ion-dependent carnitine transporter*. *Nat Genet*, 1999. 21(1): 91-94.
64. Magoulas PL and El-Hattab AW, *Systemic primary carnitine deficiency: an overview of clinical manifestations, diagnosis, and management*. *Orphanet J Rare Dis*, 2012. 7: 68.
65. Pons R and De Vivo DC, *Primary and secondary carnitine deficiency syndromes*. *J Child Neurol*, 1995. 10(Suppl 2): S8-24.
66. di San Filippo CA, Wang YH and Longo N, *Functional domains in the carnitine transporter OCTN2, defective in primary carnitine deficiency*. *J Biol Chem*, 2003. 278(48): 47776-47784.
67. D'Argenio G, Petillo O, Margarucci S, Torpedine A, et al., *Colon OCTN2 gene expression is up-regulated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma in humans and mice and contributes to local and systemic carnitine homeostasis*. *J Biol Chem*, 2010. 285(35): 27078-27087.
68. Motohashi H and Inui K, *Multidrug and toxin extrusion family SLC47: physiological, pharmacokinetic and toxicokinetic importance of MATE1 and MATE2-K*. *Mol Aspects Med*, 2013. 34(2-3): 661-668.
69. Yonezawa A and Inui KI, *Importance of the multidrug and toxin extrusion MATE/SLC47A family to pharmacokinetics, pharmacodynamics/toxicodynamics and pharmacogenomics*. *Br J Pharmacol*, 2011. 164(7): 1817-1825.
70. Masuda S, Terada T, Yonezawa A, Tanihara Y, et al., *Identification and functional characterization of a new human kidney-specific H<sup>+</sup>/organic cation antiporter, kidney-specific multidrug and toxin extrusion 2*. *J Am Soc Nephrol*, 2006. 17(8): 2127-2135.
71. Terada T and Inui KI, *Physiological and pharmacokinetic roles of H<sup>+</sup>/organic cation antiporters (MATE/SLC47A)*. *Biochem Pharmacol*, 2008. 75(9): 1689-1696.
72. Wittwer MB, Zur AA, Khuri N, Kido Y, et al., *Discovery of potent, selective multidrug and toxin extrusion transporter 1 (MATE1, SLC47A1) inhibitors through prescription drug profiling and computational modeling*. *J Med Chem*, 2013. 56(3): 781-795.
73. Stocker SL, Morrissey KM, Yee SW, Castro RA, et al., *The effect of novel promoter variants in MATE1 and MATE2 on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of metformin*. *Clin Pharmacol Ther*, 2013. 93(2): 186-194.
74. Gumbleton M, Al-Jayyousi G, Crandon-Lewis A, Francombe D, et al., *Spatial expression and functionality of drug transporters in the intact lung: objectives for further research*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2011. 63(1-2): 110-118.
75. Scheffer GL, Pijnenborg AC, Smit EF, Muller M, et al., *Multidrug resistance related molecules in human and murine lung*. *J Clin Pathol*, 2002. 55(5): 332-339.

76. Lechapt-Zalcman E, Hurbain I, Lacave R, Commo F, et al., *MDR1-Pgp 170 expression in human bronchus*. Eur Respir J, 1997. 10(8): 1837-1843.
77. Campbell L, Abulrob AN, Kandalafi LE, Plummer S, et al., *Constitutive expression of p-glycoprotein in normal lung alveolar epithelium and functionality in primary alveolar epithelial cultures*. J Pharmacol Exp Ther, 2003. 304(1): 441-452.
78. Torky AR, Stehfest E, Viehweger K, Taege C, et al., *Immuno-histochemical detection of MRPs in human lung cells in culture*. Toxicology, 2005. 207(3): 437-450.
79. Groneberg DA, Eynott PR, Doring F, Dinh QT, et al., *Distribution and function of the peptide transporter PEPT2 in normal and cystic fibrosis human lung*. Thorax, 2002. 57(1): 55-60.
80. Lips KS, Volk C, Schmitt BM, Pfeil U, et al., *Polyspecific cation transporters mediate luminal release of acetylcholine from bronchial epithelium*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2005. 33(1): 79-88.
81. Hamilton KO, Topp E, Makagiansar I, Siahaan T, et al., *Multidrug resistance-associated protein-1 functional activity in Calu-3 cells*. J Pharmacol Exp Ther, 2001. 298(3): 1199-1205.
82. Brechot JM, Hurbain I, Fajac A, Daty N, et al., *Different pattern of MRP localization in ciliated and basal cells from human bronchial epithelium*. J Histochem Cytochem, 1998. 46(4): 513-517.
83. Flens MJ, Zaman GJ, van der Valk P, Izquierdo MA, et al., *Tissue distribution of the multidrug resistance protein*. Am J Pathol, 1996. 148(4): 1237-1247.
84. Wijnholds J, Mol CA, van Deemter L, de Haas M, et al., *Multidrug-resistance protein 5 is a multispecific organic anion transporter able to transport nucleotide analogs*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. 97(13): 7476-7481.
85. Horvath G, Schmid N, Fragoso MA, Schmid A, et al., *Epithelial organic cation transporters ensure pH-dependent drug absorption in the airway*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2007. 36(1): 53-60.
86. Horvath G, Mendes ES, Schmid N, Schmid A, et al., *The effect of corticosteroids on the disposal of long-acting beta(2)-agonists by airway smooth muscle cells*. J Allergy Clin Immunol, 2007. 120(5): 1103-1109.
87. Salomon JJ, Endter S, Tachon G, Falson F, et al., *Transport of the fluorescent organic cation 4-(4-(dimethylamino)styryl)-N-methylpyridinium iodide (ASP+) in human respiratory epithelial cells*. Eur J Pharm Biopharm, 2012. 81(2): 351-359.
88. Florea BI, Van Der Sandt ICJ, Schrier SM, Kooiman K, et al., *Evidence of P-glycoprotein mediated apical to basolateral transport of flunisolide in human broncho-tracheal epithelial cells (Calu-3)*. Br J Pharmacol, 2001. 134(7): 1555-1563.
89. Dilger K, Schwab M and Fromm MF, *Identification of budesonide and prednisone as substrates of the intestinal drug efflux pump P-glycoprotein*. Inflamm Bowel Dis, 2004. 10(5): 578-583.
90. Cooray HC, Shahi S, Cahn AP, van Veen HW, et al., *Modulation of p-glycoprotein and breast cancer resistance protein by some prescribed corticosteroids*. Eur J Pharmacol, 2006. 531(1-3): 25-33.
91. van der Deen M, Homan S, Timmer-Bosscha H, Scheper RJ, et al., *Effect of COPD treatments on MRP1-mediated transport in bronchial epithelial cells*. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2008. 3(3): 469-475.
92. Akan I, Akan S, Akca H, Savas B, et al., *N-acetylcysteine enhances multidrug resistance-associated protein 1 mediated doxorubicin resistance*. Eur J Clin Invest, 2004. 34(10): 683-689.
93. Bandi N and Kompella UB, *Budesonide reduces multidrug resistance-associated protein 1 expression in an airway epithelial cell line (Calu-1)*. Eur J Pharmacol, 2002. 437(1-2): 9-17.



94. Nakanishi T, Haruta T, Shirasaka Y and Tamai I, *Organic cation transporter-mediated renal secretion of ipratropium and tiotropium in rats and humans*. Drug Metab Dispos, 2011. 39(1): 117-122.
95. Nakamura T, Nakanishi T, Haruta T, Shirasaka Y, et al., *Transport of ipratropium, an anti-chronic obstructive pulmonary disease drug, is mediated by organic cation/carnitine transporters in human bronchial epithelial cells: implications for carrier-mediated pulmonary absorption*. Mol Pharm, 2010. 7(1): 187-195.
96. Grube M, Ameling S, Noutsias M, Kock K, et al., *Selective regulation of cardiac organic cation transporter novel type 2 (OCTN2) in dilated cardiomyopathy*. Am J Pathol, 2011. 178(6): 2547-2559.
97. Glube N, Closs E and Langguth P, *OCTN2-mediated carnitine uptake in a newly discovered human proximal tubule cell line (Caki-1)*. Mol Pharm, 2007. 4(1): 160-168.
98. Ehrhardt C, Kneuer C, Bies C, Lehr CM, et al., *Salbutamol is actively absorbed across human bronchial epithelial cell layers*. Pulm Pharmacol Ther, 2005. 18(3): 165-170.
99. Gnadt M, Trammer B, Freiwald M, Kardziej B, et al., *Methacholine delays pulmonary absorption of inhaled beta(2)-agonists due to competition for organic cation/carnitine transporters*. Pulm Pharmacol Ther, 2012. 25(1): 124-134.
100. Salomon JJ, Hagos Y, Petzke S, Kuhne A, et al., *Beta-2 adrenergic agonists are substrates and inhibitors of human organic cation transporter 1*. Mol Pharm, 2015. 12(8): 2633-2641.
101. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, et al., *Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia*. Science, 1985. 230(4732): 1350-1354.
102. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, et al., *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1986. 51(1): 263-273.
103. Jansohn M and Rothhämel S, *Gentechnische Methoden*. 5. Auflage. 2012, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
104. Wong ML and Medrano JF, *Real-time PCR for mRNA quantitation*. Biotechniques, 2005. 39(1): 75-85.
105. Dorak MT, *Real-time PCR*. 2006, New York and London: Taylor & Francis Group.
106. Pfaffl MW, *Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung*. BIOSpektrum, 2004. 1(4): 92-95.
107. VanGuilder HD, Vrana KE and Freeman WM, *Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis*. Biotechniques, 2008. 44(5): 619-626.
108. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS and Griffith R, *Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences*. Biotechnology (N Y), 1992. 10(4): 413-417.
109. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G and Watson R, *Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions*. Biotechnology (N Y), 1993. 11(9): 1026-1030.
110. Valasek MA and Repa JJ, *The power of real-time PCR*. Adv Physiol Educ, 2005. 29(3): 151-159.
111. Bustin SA and Nolan T, *Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction*. J Biomol Tech, 2004. 15(3): 155-166.
112. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, et al., *The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments*. Clin Chem, 2009. 55(4): 611-622.
113. Bustin SA, *Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays*. J Mol Endocrinol, 2000. 25(2): 169-193.
114. Wilkening S and Bader A, *Quantitative real-time polymerase chain reaction: methodical analysis and mathematical model*. J Biomol Tech, 2004. 15(2): 107-111.

115. Pabinger S, Rödiger S, Kriegner A, Vierlinger K, et al., *A survey of tools for the analysis of quantitative PCR (qPCR) data*. *Biomol Detect Quantif*, 2014. 1(1): 23-33.
116. Vogelstein B and Kinzler KW, *Digital PCR*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. 96(16): 9236-9241.
117. Livak KJ and Schmittgen TD, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-delta delta C(T)) Method*. *Methods*, 2001. 25(4): 402-408.
118. Gudnason H, Dufva M, Bang DD and Wolff A, *Comparison of multiple DNA dyes for real-time PCR: effects of dye concentration and sequence composition on DNA amplification and melting temperature*. *Nucleic Acids Res*, 2007. 35(19): e127.
119. Stryer L and Haugland RP, *Energy transfer: a spectroscopic ruler*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1967. 58(2): 719-726.
120. Derveaux S, Vandesompele J and Hellemans J, *How to do successful gene expression analysis using real-time PCR*. *Methods*, 2010. 50(4): 227-230.
121. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, et al., *Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes*. *Genome Biol*, 2002. 3(7): research0034.0031-0034.0011.
122. Huggett J, Dheda K, Bustin S and Zumla A, *Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations*. *Genes Immun*, 2005. 6(4): 279-284.
123. Rieu I and Powers SJ, *Real-Time Quantitative RT-PCR: Design, Calculations, and Statistics*. *Plant Cell*, 2009. 21(4): 1031-1033.
124. Bar T, Kubista M and Tichopad A, *Validation of kinetics similarity in qPCR*. *Nucleic Acids Res*, 2012. 40(4): 1395-1406.
125. Ramakers C, Ruijter JM, Deprez RH and Moorman AF, *Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data*. *Neurosci Lett*, 2003. 339(1): 62-66.
126. Karlen Y, McNair A, Perseguers S, Mazza C, et al., *Statistical significance of quantitative PCR*. *Bmc Bioinformatics*, 2007. 8(131).
127. Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C and Neuvians TP, *Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper - Excel-based tool using pair-wise correlations*. *Biotechnol Lett*, 2004. 26(6): 509-515.
128. Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, De Borman B, et al., *Housekeeping genes as internal standards: use and limits*. *J Biotechnol*, 1999. 75(2-3): 291-295.
129. Tricarico C, Pinzani P, Bianchi S, Paglierani M, et al., *Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction: normalization to rRNA or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies*. *Anal Biochem*, 2002. 309(2): 293-300.
130. Libus J and Storchova H, *Quantification of cDNA generated by reverse transcription of total RNA provides a simple alternative tool for quantitative RT-PCR normalization*. *Biotechniques*, 2006. 41(2): 156-162.
131. Banda M, Bommineni A, Thomas RA, Luckinbill LS, et al., *Evaluation and validation of housekeeping genes in response to ionizing radiation and chemical exposure for normalizing RNA expression in real-time PCR*. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*, 2008. 649(1-2): 126-134.
132. Dheda K, Huggett JF, Bustin SA, Johnson MA, et al., *Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR*. *Biotechniques*, 2004. 37(1): 112-119.
133. Andersen CL, Jensen JL and Orntoft TF, *Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets*. *Cancer Res*, 2004. 64(15): 5245-5250.

134. Pfaffl MW, *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. Nucleic Acids Res, 2001. 29(9): 2001-2007.
135. Pfaffl MW, Horgan GW and Dempfle L, *Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR*. Nucleic Acids Res, 2002. 30(9): 1-10.
136. Patton JS and Byron PR, *Inhaling medicines: delivering drugs to the body through the lungs*. Nat Rev Drug Discov, 2007. 6(1): 67-74.
137. Forbes B, *Human airway epithelial cell lines for in vitro drug transport and metabolism studies*. Pharm Sci Technolo Today, 2000. 3(1): 18-27.
138. Högger P, *Explaining pulmonary pharmacokinetics of inhaled corticosteroids: how close to in vivo reality can we get*, in *Respiratory Drug Delivery X*. 2006, Arlington Heights: Davies Healthcare International Publishing, 205-217.
139. Sakagami M, *In vivo, in vitro and ex vivo models to assess pulmonary absorption and disposition of inhaled therapeutics for systemic delivery*. Adv Drug Deliv Rev, 2006. 58(9): 1030-1060.
140. Lehmann AD, Daum N, Bur M, Lehr C-M, et al., *An in vitro triple cell co-culture model with primary cells mimicking the human alveolar epithelial barrier*. Eur J Pharm Biopharm, 2011. 77(3): 398-406.
141. Steinke M, Gross R, Walles H, Gangnus R, et al., *An engineered 3D human airway mucosa model based on an SIS scaffold*. Biomaterials, 2014. 35(26): 7355-7362.
142. Freiwald M, Valotis A, Kirschbaum A, McClellan M, et al., *Monitoring the initial pulmonary absorption of two different beclomethasone dipropionate aerosols employing a human lung reperfusion model*. Respir Res, 2005. 6(1): 21.
143. Trammer B, Amann A, Haltner-Ukomadu E, Tillmanns S, et al., *Comparative permeability and diffusion kinetics of cyclosporine A liposomes and propylene glycol solution from human lung tissue into human blood ex vivo*. Eur J Pharm Biopharm, 2008. 70(3): 758-764.
144. Trammer B, Kardziej B, Schmidt M and Högger P, *Analysis of Fenoterol and Ipratropium Transfer from Human Lung Tissue into Human Plasma Using a Dynamic Dialysis Model*. Br J Pharm Res, 2014. 4(11): 1287.
145. Niemeier RW, *The Isolated Perfused Lung*. Environ Health Perspect, 1984. 56: 35-41.
146. Cryan S-A, Sivasdas N and Garcia-Contreras L, *In vivo animal models for drug delivery across the lung mucosal barrier*. Adv Drug Deliv Rev, 2007. 59(11): 1133-1151.
147. Linder A, Friedel G, Fritz P, Kivisto KT, et al., *The ex-vivo isolated, perfused human lung model: description and potential applications*. Thorac Cardiovasc Surg, 1996. 44(3): 140-146.
148. Derendorf H, Hochhaus G and Möllmann H, *Evaluation of pulmonary absorption using pharmacokinetic methods*. J Aerosol Med, 2001. 14(Supplement 1): 9-17.
149. Schultz I, Vollmers F, Luehmann T, Rybak J-C, et al., *Pulmonary Insulin-like growth factor I delivery from trehalose and silk-fibroin microparticles*. ACS Biomater Sci Eng, 2015. 1(2): 119-129.
150. Gnadl M, Trammer B, Kardziej B, Bayliss MK, et al., *Comparison of the bronchodilating effects of inhaled beta(2)-agonists after methacholine challenge in a human lung reperfusion model*. Eur J Pharm Biopharm, 2012. 81(3): 617-626.
151. Vollmers F, *Charakterisierung der pulmonalen Pharmakokinetik von Salmeterol und Insulin-like Growth Factor-1*. Dissertation, Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, 2015.
152. *Molekulare Daten von Salbutamol*. DrugBank Version 4.3, accessed: 21.02.2016, available from: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB01001>.

153. *Molekulare Daten von Salmeterol*. DrugBank Version 4.3, accessed: 21.02.2016, available from: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00938>.
154. Ohashi R, Tamai I, Nezu J-i, Nikaido H, et al., *Molecular and physiological evidence for multifunctionality of carnitine/organic cation transporter OCTN2*. *Mol Pharmacol*, 2001. 59(2): 358-366.
155. Restrepo RD, *Use of inhaled anticholinergic agents in obstructive airway disease*. *Respir Care*, 2007. 52(7): 833-851.
156. *Global strategy for the diagnosis, management and prevention of COPD (updated 2015)*. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD), 2015, accessed: 15.08.2015, available from: <http://www.goldcopd.org>.
157. Cruz AA, Bousquet J and Khaltaev N, *Global surveillance, prevention and control of chronic respiratory diseases: a comprehensive approach*. World Health Organization, 2007, accessed: 15.08.2015, available from: [http://www.who.int/gard/publications/GARD\\_Manual/en/](http://www.who.int/gard/publications/GARD_Manual/en/).
158. Vogelmeier C, Buhl R, Criege C, Gillissen A, et al., *Leitlinie der Deutschen Atemwegsliga und der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin zur Diagnostik und Therapie von Patienten mit chronisch obstruktiver Bronchitis und Lungenemphysem (COPD)*. *Pneumologie*, 2007. 61(5): e1-e40.
159. *Fachinformation Spiriva® Respimat®*. Boehringer Ingelheim International GmbH, 2014.
160. *Fachinformation Seebri® Breezhaler® 44 Mikrogramm*. Novartis Europharm Limited, 2015.
161. *Fachinformation Bretaris® Genuair® 322 Mikrogramm Pulver zur Inhalation*. AstraZeneca AB, 2015.
162. *Fachinformation Incruse®*. Glaxo Group Limited, 2015.
163. *Nationale VersorgungsLeitlinie Asthma - Langfassung. 2. Auflage, Version 5*. Bundesärztekammer (BÄK) Arbeitsgemeinschaft der Deutschen Ärztekammern, Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV), Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF), 2009, zuletzt geändert: August 2013, accessed: 15.08.2015, available from: <http://www.leitlinien.de/nvl/asthma/>.
164. *Gelbe Liste Pharmindex*. Database, accessed: 15.08.2015, available from: <http://www.gelbe-liste.de/>.
165. *Fachinformation Itrop®*. Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, 2014.
166. *Fachinformation Otrivin Duo 0,5 mg/ml + 0,6 mg/ml Nasenspray, Lösung*. GSK-Gebro Consumer Healthcare GmbH, 2016.
167. *ROTE LISTE® Online*. Database, accessed: 15.8.2015, available from: <http://online.rote-liste.de/>.
168. von Bruchhausen F, Dannhardt G, Ebel S, Frahm AW, et al., *Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis Band 8, Stoffe E-O*. 5. Auflage. 1993, Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
169. *Fachinformation Atrovent® N Dossier-Aerosol*. Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, 2014.
170. Schwabe U and Pfaffrath D, *Arzneiverordnungs-Report 2012*. Berlin, Heidelberg: Springer Medizin Verlag.
171. Ensing K, Dezeeuw RA, Nossent GD, Koeter GH, et al., *Pharmacokinetics of ipratropium bromide after single dose inhalation and oral and intravenous administration*. *Eur J Clin Pharmacol*, 1989. 36(2): 189-194.
172. Bösch D, *Lunge und Atemwege*. 2014, Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
173. Wu JW, Ding CG, Ge QH, Li Z, et al., *Simultaneous determination of ipratropium and salbutamol in rat plasma by LC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study*. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2011. 879(30): 3475-3483.

174. Garcia P, Paris AC, Leufroy A, Popot MA, et al., *Quantitative analysis of a quaternary ammonium drug: ipratropium bromide by LC/ESI-MS(n) in horse plasma and urine*. Biomed Chromatogr, 2012. 26(4): 534-540.
175. John H, Binder T, Hochstetter H and Thiermann H, *LC-ESI MS/MS quantification of atropine and six other antimuscarinic tropane alkaloids in plasma*. Anal Bioanal Chem, 2010. 396(2): 751-763.
176. *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1) - ICH Harmonised Tripartite Guideline*. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH), 2005, accessed: 09.10.2016, available from: [http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q2\\_R1/Step4/Q2\\_R1\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf).
177. *Guideline on bioanalytical method validation*. European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP), 2011: London, accessed: 09.10.2016, available from: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2011/08/WC500109686.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf).
178. Shah VP, Midha KK, Dighe S, McGilveray IJ, et al., *Analytical methods validation: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies*. J Pharm Sci, 1992. 81(3): 309-312.
179. Shah VP, Midha KK, Findlay JW, Hill HM, et al., *Bioanalytical method validation—a revisit with a decade of progress*. Pharm Res, 2000. 17(12): 1551-1557.
180. Matuszewski BK, Constanzer ML and Chavez-Eng CM, *Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS*. Anal Chem, 2003. 75(13): 3019-3030.
181. Taylor PJ, *Matrix effects: The Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry*. Clin Biochem, 2005. 38(4): 328-334.
182. Dams R, Huestis MA, Lambert WE and Murphy CM, *Matrix effect in bio-analysis of illicit drugs with LC-MS/MS: influence of ionization type, sample preparation, and biofluid*. J Am Soc Mass Spectrom, 2003. 14(11): 1290-1294.
183. Chambers E, Wagrowski-Diehl DM, Lu ZL and Mazzeo JR, *Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC/MS/MS analyses*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2007. 852(1-2): 22-34.
184. Van Eeckhaut A, Lanckmans K, Sarre S, Smolders I, et al., *Validation of bioanalytical LC-MS/MS assays: Evaluation of matrix effects*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2009. 877(23): 2198-2207.
185. Trammer B, *Ex-vivo-Modelle zur Charakterisierung der Pharmakokinetik pulmonal applizierter Wirkstoffe: Dialyse- und humanes Lungenperfusionsmodell*. Dissertation, Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, 2011.
186. Gnadl M, *Pharmacokinetic and pharmacodynamic characterization of inhaled  $\beta_2$  - agonists using the isolated human lung perfusion model*. Dissertation, Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, 2010.
187. *Molekulare Daten von Ipratropiumbromid*. DrugBank Version 4.3, accessed: 03.12.2015, available from: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00332>.
188. Patton JS, Fishburn CS and Weers JG, *The lungs as a portal of entry for systemic drug delivery*. Proc Am Thorac Soc, 2004. 1(4): 338-344.
189. Dolovich M, *Lung dose, distribution, and clinical response to therapeutic aerosols*. Aerosol Sci Technol, 1993. 18(3): 230-240.
190. Steimer A, Haltner E and Lehr C-M, *Cell culture models of the respiratory tract relevant to pulmonary drug delivery*. J Aerosol Med, 2005. 18(2): 137-182.

191. Somers GI, Lindsay N, Lowdon BM, Jones AE, et al., *A comparison of the expression and metabolizing activities of phase I and II enzymes in freshly isolated human lung parenchymal cells and cryopreserved human hepatocytes*. Drug Metab Dispos, 2007. 35(10): 1797-1805.
192. Hastings RH, Folkesson HG and Matthay MA, *Mechanisms of alveolar protein clearance in the intact lung*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2004. 286(4): L679-L689.
193. Nakanishi T and Tamai I, *Solute carrier transporters as targets for drug delivery and pharmacological intervention for chemotherapy*. J Pharm Sci, 2011. 100(9): 3731-3750.
194. Löffler G, Petrides PE and Heinrich PC, *Biochemie & Pathobiochemie*. 8. Auflage. 2007, Heidelberg: Springer Medizin Verlag.
195. Mohr K, *The pharmacology of estrogens*. Pharm Unserer Zeit, 2004. 33(5): 360-364.
196. Anderson DC, *Sex-hormone-binding globulin*. Clin Endocrinol, 1974. 3(1): 69-96.
197. Morris ME, Lee H-J and Predko LM, *Gender differences in the membrane transport of endogenous and exogenous compounds*. Pharmacol Rev, 2003. 55(2): 229-240.
198. *Referenzwerte für Laborparameter*. Allgemeines Krankenhaus der Stadt Wien, Klinische Abteilung für Medizinische und Chemische Labordiagnostik, accessed: 27.04.2016, available from: <http://www.kimcl.at/>.
199. Blair IA, *Analysis of estrogens in serum and plasma from postmenopausal women: past present, and future*. Steroids, 2010. 75(4-5): 297-306.
200. Dunn JF, Nisula BC and Rodbard D, *Transport of steroid hormones: binding of 21 endogenous steroids to both testosterone-binding globulin and corticosteroid-binding globulin in human plasma*. J Clin Endocrinol Metab, 1981. 53(1): 58-68.
201. Vermeulen A, Verdonck L and Kaufman JM, *A critical evaluation of simple methods for the estimation of free testosterone in serum*. J Clin Endocrinol Metab, 1999. 84(10): 3666-3672.
202. O'Malley BW and Means AR, *Female steroid hormones and target cell nuclei*. Science, 1974. 183(4125): 610-620.
203. Beato M, *Gene regulation by steroid hormones*. Cell, 1989. 56(3): 335-344.
204. Wang CY, Uray IP, Mazumdar A, Mayer JA, et al., *SLC22A5/OCTN2 expression in breast cancer is induced by estrogen via a novel intronic estrogen-response element (ERE)*. Breast Cancer Res Treat, 2012. 134(1): 101-115.
205. Bagamasbad P and Denver RJ, *Mechanisms and significance of nuclear receptor auto- and cross-regulation*. Gen Comp Endocrinol, 2011. 170(1): 3-17.
206. Kelly MJ and Levin ER, *Rapid actions of plasma membrane estrogen receptors*. Trends Endocrinol Metab, 2001. 12(4): 152-156.
207. Moriarty K, Kim KH and Bender JR, *Minireview: estrogen receptor-mediated rapid signaling*. Endocrinology, 2006. 147(12): 5557-5563.
208. Shaw RD, Li BUK, Hamilton JW, Shug AL, et al., *Carnitine transport in rat small intestine*. Am J Physiol, 1983. 245(3): G376-G381.
209. Evans AM and Fornasini G, *Pharmacokinetics of L-carnitine*. Clin Pharmacokinet, 2003. 42(11): 941-967.
210. Carter AL, Abney TO and Lapp DF, *Biosynthesis and metabolism of carnitine*. J Child Neurol, 1995. 10(Suppl 2): S3-7.
211. Rebouche CJ, *Carnitine function and requirements during the life cycle*. Faseb Journal, 1992. 6(15): 3379-3386.
212. Lombard KA, Olson AL, Nelson SE and Rebouche CJ, *Carnitine status of lactoovo vegetarians and strict vegetarian adults and children*. Am J Clin Nutr, 1989. 50(2): 301-306.

213. *Characteristics of Calu-3 celline*. ATCC (American Type Culture Collection), accessed: 30.01.2015, available from: [http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-55.aspx?geo\\_country=de#characteristics](http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-55.aspx?geo_country=de#characteristics).
214. Foster KA, Avery ML, Yazdanian M and Audus KL, *Characterization of the Calu-3 cell line as a tool to screen pulmonary drug delivery*. Int J Pharm, 2000. 208(1-2): 1-11.
215. Gruenert DC, Finkbeiner WE and Widdicombe JH, *Culture and transformation of human airway epithelial cells*. Am J Physiol, 1995. 268(3 Pt 1): L347-360.
216. Stewart CE, Torr EE, Mohd Jamili NH, Bosquillon C, et al., *Evaluation of differentiated human bronchial epithelial cell culture systems for asthma research*. J Allergy, 2012. 2012: 1-11.
217. Finkbeiner WE, Carrier SD and Teresi CE, *Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) phenotypic analysis of cell cultures of human tracheal epithelium, tracheobronchial glands, and lung carcinomas*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1993. 9(5): 547-556.
218. Florea BI, Cassara ML, Junginger HE and Borchard G, *Drug transport and metabolism characteristics of the human airway epithelial cell line Calu-3*. J Control Release, 2003. 87(1-3): 131-138.
219. Mathias NR, Timoszyk J, Stetsko PI, Megill JR, et al., *Permeability characteristics of Calu-3 human bronchial epithelial cells: In vitro-in vivo correlation to predict lung absorption in rats*. J Drug Target, 2002. 10(1): 31-40.
220. Vllasaliu D, Fowler R, Garnett M, Eaton M, et al., *Barrier characteristics of epithelial cultures modelling the airway and intestinal mucosa: A comparison*. Biochem Biophys Res Commun, 2011. 415(4): 579-585.
221. Hamilton KO, Backstrom G, Yazdanian MA and Audus KL, *P-glycoprotein efflux pump expression and activity in Calu-3 cells*. J Pharm Sci, 2001. 90(5): 647-658.
222. Xie T, Ho SL and Ramsden D, *Characterization and implications of estrogenic down-regulation of human catechol-O-methyltransferase gene transcription*. Mol Pharmacol, 1999. 56(1): 31-38.
223. Arakawa H, Nakanishi T, Yanagihara C, Nishimoto T, et al., *Enhanced expression of organic anion transporting polypeptides (OATPs) in androgen receptor-positive prostate cancer cells: Possible role of OATP1A2 in adaptive cell growth under androgen-depleted conditions*. Biochem Pharmacol, 2012. 84(8): 1070-1077.
224. Lu R, Kanai N, Bao Y, Wolkoff AW, et al., *Regulation of renal oatp mRNA expression by testosterone*. Am J Physiol, 1996. 270(2): F332-F337.
225. Urakami Y, Okuda M, Saito H and Inui K, *Hormonal regulation of organic cation transporter OCT2 expression in rat kidney*. FEBS Lett, 2000. 473(2): 173-176.
226. Schurch R, Todesco L, Novakova K, Mevissen M, et al., *The plasma carnitine concentration regulates renal OCTN2 expression and carnitine transport in rats*. Eur J Pharmacol, 2010. 635(1-3): 171-176.
227. Grainger CI, Greenwell LL, Lockley DJ, Martin GP, et al., *Culture of Calu-3 cells at the air interface provides a representative model of the airway epithelial barrier*. Pharm Res, 2006. 23(7): 1482-1490.
228. Stentebjerg-Andersen A, Notlevsen IV, Brodin B and Nielsen CU, *Calu-3 cells grown under AIC and LCC conditions: implications for dipeptide uptake and transepithelial transport of substances*. Eur J Pharm Biopharm, 2011. 78(1): 19-26.
229. Ehrhardt C, Fiegel J, Fuchs S, Abu-Dahab R, et al., *Drug absorption by the respiratory mucosa: cell culture models and particulate drug carriers*. J Aerosol Med, 2002. 15(2): 131-139.
230. Olarerin-George AO and Hogenesch JB, *Assessing the prevalence of mycoplasma contamination in cell culture via a survey of NCBI's RNA-seq archive*. Nucleic Acids Res, 2015. 43(5): 2535-2542.

231. Miller CJ, Kassem HS, Pepper SD, Hey Y, et al., *Mycoplasma infection significantly alters microarray gene expression profiles*. Biotechniques, 2003. 35(4): 812-815.
232. Mukherjee M, Pritchard DI and Bosquillon C, *Evaluation of air-interfaced Calu-3 cell layers for investigation of inhaled drug interactions with organic cation transporters in vitro*. Int J Pharm, 2012. 426(1-2): 7-14.
233. Kingston RE, *Preparation of poly(A)+ RNA*, in *Current Protocols in Molecular Biology*. 2001, New York: Greene Publishing Associates & Wiley Interscience. Unit 4.5, 4.5.1-4.5.3.
234. Stahlberg A, Hakansson J, Xian XJ, Semb H, et al., *Properties of the reverse transcription reaction in mRNA quantification*. Clin Chem, 2004. 50(3): 509-515.
235. Wang C, Catlin DH, Demers LM, Starcevic B, et al., *Measurement of total serum testosterone in adult men: Comparison of current laboratory methods versus liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. J Clin Endocrinol Metab, 2004. 89(2): 534-543.
236. Evseenko DA, Paxton JW and Keelan JA, *Independent regulation of apical and basolateral drug transporter expression and function in placental trophoblasts by cytokines, steroids, and growth factors*. Drug Metab Dispos, 2007. 35(4): 595-601.
237. Meetam P, Srimaroeng C, Soodvilai S and Chatsudthipong V, *Regulatory role of testosterone in organic cation transport: in vivo and in vitro studies*. Biol Pharm Bull, 2009. 32(6): 982-987.
238. Meetam P, Srimaroeng C, Soodvilai S and Chatsudthipong V, *Role of estrogen in renal handling of organic cation, tetraethylammonium: in vivo and in vitro studies*. Biol Pharm Bull, 2009. 32(12): 1968-1972.
239. Piercy KT, Donnell RL, Kirkpatrick SS, Timaran CH, et al., *Effects of estrogen, progesterone, and combination exposure on interleukin-1 beta-induced expression of VCAM-1, ICAM-1, PECAM, and E-selectin by human female iliac artery endothelial cells*. J Surg Res, 2002. 105(2): 215-219.
240. Baggio G, Corsini A, Floreani A, Giannini S, et al., *Gender medicine: a task for the third millennium*. Clin Chem Lab Med, 2013. 51(4): 713-727.
241. Miller VM, *Why are sex and gender important to basic physiology and translational and individualized medicine?* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2014. 306(6): H781-H788.
242. Arain FA, Kuniyoshi FH, Abdalrhim AD and Miller VM, *Sex/gender medicine. The biological basis for personalized care in cardiovascular medicine*. Circ J, 2009. 73(10): 1774-1782.
243. Maas A and Appelman YEA, *Gender differences in coronary heart disease*. Neth Heart J, 2010. 18(12): 598-602.
244. Regitz-Zagrosek V, Lehmkuhl E and Weickert MO, *Gender differences in the metabolic syndrome and their role for cardiovascular disease*. Clin Res Cardiol, 2006. 95(3): 136-147.
245. Makkar RR, Fromm BS, Steinman RT, Meissner MD, et al., *Female gender as a risk factor for torsades de pointes associated with cardiovascular drugs*. Jama, 1993. 270(21): 2590-2597.
246. Benton RE, Sale M, Flockhart DA and Woosley RL, *Greater quinidine-induced QTc interval prolongation in women*. Clin Pharmacol Ther, 2000. 67(4): 413-418.
247. Becklake MR and Kauffmann F, *Gender differences in airway behaviour over the human life span*. Thorax, 1999. 54(12): 1119-1138.
248. Macsali F, Svanes C, Bjorge L, Omenaas ER, et al., *Respiratory health in women: from menarche to menopause*. Expert Rev Respir Med, 2012. 6(2): 187-202.
249. North CM and Christiani DC, *Women and lung cancer: what is new?* Semin Thorac Cardiovasc Surg, 2013. 25(2): 87-94.
250. Goeckenjan G, Sitter H, Thomas M, Branscheid D, et al., *Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms*. Pneumologie, 2010. 64(S 2): e1-e164.



251. Mair KM, Johansen AK, Wright AF, Wallace E, et al., *Pulmonary arterial hypertension: basis of sex differences in incidence and treatment response*. Br J Pharmacol, 2014. 171(3): 567-579.
252. Meibohm B, Beierle I and Derendorf H, *How important are gender differences in pharmacokinetics?* Clin Pharmacokinet, 2002. 41(5): 329-342.
253. Cassese M and Zuber V, *Clinical trials and gender medicine*. Ann Ist Super Sanita, 2011. 47(1): 100-103.
254. Chilet-Rosell E, *Gender bias in clinical research, pharmaceutical marketing, and the prescription of drugs*. Glob Health Action, 2014. 7: 25484.
255. Mazure CM and Jones DP, *Twenty years and still counting: including women as participants and studying sex and gender in biomedical research*. BMC Womens Health, 2015. 15: 94-109.
256. Fletcher CV, Acosta EP and Strykowski JM, *Gender differences in human pharmacokinetics and pharmacodynamics*. J Adolesc Health, 1994. 15(8): 619-629.
257. Schuetz EG, Furuya KN and Schuetz JD, *Interindividual variation in expression of P-glycoprotein in normal human liver and secondary hepatic neoplasms*. J Pharmacol Exp Ther, 1995. 275(2): 1011-1018.
258. Krecic-Shepard ME, Barnas CR, Slimko J, Jones MP, et al., *Gender-specific effects on verapamil pharmacokinetics and pharmacodynamics in humans*. J Clin Pharmacol, 2000. 40(3): 219-230.
259. Tamminga WJ, Wemer J, Oosterhuis B, Weiling J, et al., *CYP2D6 and CYP2C19 activity in a large population of Dutch healthy volunteers: indications for oral contraceptive-related gender differences*. Eur J Clin Pharmacol, 1999. 55(3): 177-184.
260. Hagg S, Spigset O and Dahlqvist R, *Influence of gender and oral contraceptives on CYP2D6 and CYP2C19 activity in healthy volunteers*. Br J Clin Pharmacol, 2001. 51(2): 169-173.
261. Zanger UM, Raimundo S and Eichelbaum M, *Cytochrome P450 2D6: overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2004. 369(1): 23-37.
262. Hunt CM, Westerkam WR and Stave GM, *Effect of age and gender on the activity of human hepatic CYP3A*. Biochem Pharmacol, 1992. 44(2): 275-283.
263. Greenblatt DJ and von Moltke LL, *Gender has a small but statistically significant effect on clearance of CYP3A substrate drugs*. J Clin Pharmacol, 2008. 48(11): 1350-1355.
264. Court MH, Duan SX, von Moltke LL, Greenblatt DJ, et al., *Interindividual variability in acetaminophen glucuronidation by human liver microsomes: Identification of relevant acetaminophen UDP-glucuronosyltransferase isoforms*. J Pharmacol Exp Ther, 2001. 299(3): 998-1006.
265. Wright CE, Sisson TL, Ichhpurani AK and Peters GR, *Steady-state pharmacokinetic properties of pramipexole in healthy volunteers*. J Clin Pharmacol, 1997. 37(6): 520-525.
266. Sarton E, Olofsen E, Romberg R, den Hartigh J, et al., *Sex differences in morphine analgesia: an experimental study in healthy volunteers*. Anesthesiology, 2000. 93(5): 1245-1254.
267. Sakamoto A, Matsumaru T, Yamamura N, Uchida Y, et al., *Quantitative expression of human drug transporter proteins in lung tissues: analysis of regional, gender, and interindividual differences by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. J Pharm Sci, 2013. 102(9): 3395-3406.
268. Dalbo VJ, Roberts MD, Hassell SE, Brown RD, et al., *Effects of age on serum hormone concentrations and intramuscular proteolytic signaling before and after a single bout of resistance training*. J Strength Cond Res, 2011. 25(1): 1-9.

269. *Krebs in Deutschland 2001/2012, 10. Auflage*. Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2015: Berlin, accessed: 18.10.2016, available from: [http://www.rki.de/DE/Home/homepage\\_node.html](http://www.rki.de/DE/Home/homepage_node.html).
270. Berg T, Hegelund Myrback T, Olsson M, Seidegard J, et al., *Gene expression analysis of membrane transporters and drug-metabolizing enzymes in the lung of healthy and COPD subjects*. *Pharmacol Res Perspect*, 2014. 2(4): e00054.
271. Kashofer K, Viertler C, Pichler M and Zatloukal K, *Quality control of RNA preservation and extraction from paraffin-embedded tissue: implications for RT-PCR and microarray analysis*. *Plos One*, 2013. 8(7): e70714.
272. Auer H, Mobley JA, Ayers LW, Bowen J, et al., *The effects of frozen tissue storage conditions on the integrity of RNA and protein*. *Biotech Histochem*, 2014. 89(7): 518-528.
273. Blackhall FH, Pintilie M, Wigle DA, Jurisica I, et al., *Stability and heterogeneity of expression profiles in lung cancer specimens harvested following surgical resection*. *Neoplasia*, 2004. 6(6): 761-767.
274. Ingoglia F, Visigalli R, Rotoli BM, Barilli A, et al., *Functional characterization of the organic cation transporters (OCTs) in human airway pulmonary epithelial cells*. *Biochim Biophys Acta*, 2015. 1848(7): 1563-1572.
275. Klaassen CD and Aleksunes LM, *Xenobiotic, bile acid, and cholesterol transporters: function and regulation*. *Pharmacol Rev*, 2010. 62(1): 1-96.
276. Prasad B, Evers R, Gupta A, Hop C, et al., *Interindividual variability in hepatic organic anion-transporting polypeptides and P-glycoprotein (ABCB1) protein expression: quantification by liquid chromatography tandem mass spectroscopy and influence of genotype, age, and sex*. *Drug Metab Dispos*, 2014. 42(1): 78-88.
277. Groves CE, Suhre WB, Cherrington NJ and Wright SH, *Sex differences in the mRNA, protein, and functional expression of organic anion transporter (Oat) 1, Oat3, and organic cation transporter (Oct) 2 in rabbit renal proximal tubules*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2006. 316(2): 743-752.
278. Joseph S, Nicolson TJ, Hammons G, Word B, et al., *Expression of drug transporters in human kidney: impact of sex, age, and ethnicity*. *Biol Sex Differ*, 2015. 6: 4.
279. Bromberger JT, Matthews KA, Kuller LH, Wing RR, et al., *Prospective study of the determinants of age at menopause*. *Am J Epidemiol*, 1997. 145(2): 124-133.
280. Dratva J, Gomez Real F, Schindler C, Ackermann-Liebrich U, et al., *Is age at menopause increasing across Europe? Results on age at menopause and determinants from two population-based studies*. *Menopause*, 2009. 16(2): 385-394.
281. Mooij MG, Schwarz UI, de Koning BAE, Leeder JS, et al., *Ontogeny of human hepatic and intestinal transporter gene expression during childhood: age matters*. *Drug Metab Dispos*, 2014. 42(8): 1268-1274.
282. Beierle I, Meibohm B and Derendorf H, *Gender differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics*. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 1999. 37(11): 529-547.
283. Ahmadimoghaddam D, Hofman J, Zemankova L, Nachtigal P, et al., *Synchronized activity of organic cation transporter 3 (OCT3/Slc22a3) and multidrug and toxin extrusion 1 (MATE1/Slc47a1) transporter in transplacental passage of MPP+ in rat*. *Toxicol Sci*, 2012. 128(2): 471-481.
284. Ahmadimoghaddam D and Staud F, *Transfer of metformin across the rat placenta is mediated by organic cation transporter 3 (OCT3/SLC22A3) and multidrug and toxin extrusion 1 (MATE1/SLC47A1) protein*. *Reprod Toxicol*, 2013. 39: 17-22.

285. König J, Zolk O, Singer K, Hoffmann C, et al., *Double-transfected MDCK cells expressing human OCT1/MATE1 or OCT2/MATE1: determinants of uptake and transcellular translocation of organic cations*. Br J Pharmacol, 2011. 163(3): 546-555.
286. Landowski CP, Sun D, Foster DR, Menon SS, et al., *Gene expression in the human intestine and correlation with oral valacyclovir pharmacokinetic parameters*. J Pharmacol Exp Ther, 2003. 306(2): 778-786.
287. Joy MS, Roberts BV, Wang J, Hu Y, et al., *A pilot study of leukocyte expression patterns for drug metabolizing enzyme and transporter transcripts in autoimmune glomerulonephritis*. Int J Clin Pharmacol Ther, 2014. 52(4): 303-313.
288. de Sousa Abreu R, Penalva LO, Marcotte EM and Vogel C, *Global signatures of protein and mRNA expression levels*. Mol Biosyst, 2009. 5(12): 1512-1526.
289. Maier T, Guell M and Serrano L, *Correlation of mRNA and protein in complex biological samples*. FEBS Lett, 2009. 583(24): 3966-3973.
290. Kozak M, *An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs*. Nucleic Acids Res, 1987. 15(20): 8125-8148.
291. Browne GJ and Proud CG, *Regulation of peptide-chain elongation in mammalian cells*. Eur J Biochem, 2002. 269(22): 5360-5368.
292. Preiss T, Muckenthaler M and Hentze MW, *Poly(A)-tail-promoted translation in yeast: implications for translational control*. RNA, 1998. 4(11): 1321-1331.
293. Lackner DH, Beilharz TH, Marguerat S, Mata J, et al., *A network of multiple regulatory layers shapes gene expression in fission yeast*. Mol Cell, 2007. 26(1): 145-155.
294. Payne SH, *The utility of protein and mRNA correlation*. Trends Biochem Sci, 2015. 40(1): 1-3.
295. Ciechanover A, *Intracellular protein degradation: from a vague idea thru the lysosome and the ubiquitin-proteasome system and onto human diseases and drug targeting*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2006. 2006(1): 1-12.
296. Rogers S, Wells R and Rechsteiner M, *Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis*. Science, 1986. 234(4774): 364-368.
297. Greenbaum D, Colangelo C, Williams K and Gerstein M, *Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale*. Genome Biol, 2003. 4(9): 117.
298. Koussounadis A, Langdon SP, Um IH, Harrison DJ, et al., *Relationship between differentially expressed mRNA and mRNA-protein correlations in a xenograft model system*. Sci Rep, 2015. 5: 10775.
299. Ghosh R, Gilda JE and Gomes AV, *The necessity of and strategies for improving confidence in the accuracy of western blots*. Expert Rev Proteomics, 2014. 11(5): 549-560.
300. Rocha-Martins M, Njaine B and Silveira MS, *Avoiding pitfalls of internal controls: validation of reference genes for analysis by qRT-PCR and western blot throughout rat retinal development*. Plos One, 2012. 7(8).
301. Dittmer A and Dittmer J, *Beta-actin is not a reliable loading control in western blot analysis*. Electrophoresis, 2006. 27(14): 2844-2845.
302. Bass JJ, Wilkinson DJ, Rankin D, Phillips BE, et al., *An overview of technical considerations for Western blotting applications to physiological research*. Scand J Med Sci Sports, 2016.
303. Nies AT, Koepsell H, Damme K and Schwab M, *Organic cation transporters (OCTs, MATEs), in vitro and in vivo evidence for the importance in drug therapy*. Handb Exp Pharmacol, 2011(201): 105-167.
304. Chen G, Gharib TG, Huang CC, Taylor JM, et al., *Discordant protein and mRNA expression in lung adenocarcinomas*. Mol Cell Proteomics, 2002. 1(4): 304-313.

305. Prasad B and Unadkat JD, *Optimized approaches for quantification of drug transporters in tissues and cells by MRM proteomics*. *Aaps j*, 2014. 16(4): 634-648.
306. Kim TK and Eberwine JH, *Mammalian cell transfection: the present and the future*. *Anal Bioanal Chem*, 2010. 397(8): 3173-3178.
307. Colosimo A, Goncz KK, Holmes AR, Kunzelmann K, et al., *Transfer and expression of foreign genes in mammalian cells*. *Biotechniques*, 2000. 29(2): 314-331.
308. Pfeifer A and Verma IM, *Gene therapy: promises and problems*. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2001. 2: 177-211.
309. Kunert R and Reinhart D, *Advances in recombinant antibody manufacturing*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2016. 100(8): 3451-3461.
310. Thomas P and Smart TG, *HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins*. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2005. 51(3): 187-200.
311. Hayer-Zillgen M, Brüss M and Bönisch H, *Expression and pharmacological profile of the human organic cation transporters hOCT1, hOCT2 and hOCT3*. *Br J Pharmacol*, 2002. 136(6): 829-836.
312. Lehotay SJ, *Determination of pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate: Collaborative study*. *J AOAC Int*, 2007. 90(2): 485-520.
313. Anastassiades M, Lehotay SJ, Stajnbaher D and Schenck FJ, *Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce*. *J AOAC Int*, 2003. 86(2): 412-431.
314. Lehotay SJ, Son KA, Kwon H, Koesukwiwat U, et al., *Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables*. *J Chromatogr A*, 2010. 1217(16): 2548-2560.
315. Braggio S, Barnaby RJ, Grossi P and Cugola M, *A strategy for validation of bioanalytical methods*. *J Pharm Biomed Anal*, 1996. 14(4): 375-388.
316. Müleek M and Högger P, *Highly sensitive analysis of polyphenols and their metabolites in human blood cells using dispersive SPE extraction and LC-MS/MS*. *Anal Bioanal Chem*, 2015. 407(7): 1885-1899.
317. *WMA Declaration of Helsinki - Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects*. 64th WMA General Assembly, 2013: Fortaleza, Brazil, accessed: 15.01.2015, available from: <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/>.
318. Bein T and Pfeifer M, *Intensivbuch Lunge. Von der Pathophysiologie zur Strategie der Intensivtherapie*. 2. Auflage. 2010, Berlin: MWV Medizinisch Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.
319. *Technische Daten PARI BOY SX*. PARI GmbH, accessed: 21.01.2015, available from: <http://www.pari.de/de-de/produkte/untere-atemwege/pari-boy-sx/>.
320. *Nucleotide*. Database, accessed: 1.6.2015, available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>.
321. Sharungbam G, Schwager C, Chiblak S, Brons S, et al., *Identification of stable endogenous control genes for transcriptional profiling of photon, proton and carbon-ion irradiated cells*. *Radiat Oncol*, 2012. 7: 70.
322. *Primer-BLAST*. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, accessed: 1.6.2015, available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>.
323. *Primer3 web version 4.0.0*. Whitehead Institute for Biomedical Research, accessed: 1.6.2015, available from: <http://primer3.ut.ee/>.
324. *BLAST*. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, accessed: 1.6.2015, available from: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

325. Lefever S, Vandesompele J, Speleman F and Pattyn F, *RTPrimerDB: the portal for real-time PCR primers and probes*. *Nucleic Acids Res*, 2009. 37(Database issue): D942-D945.
326. *OligoArchitect Online*. Sigma-Aldrich Co. LLC, accessed: 1.6.2015, available from: <http://www.oligoarchitect.com/Login.jsp>.
327. *MOPS - Multifunctional Oligo Property Scan*. Eurofins Genomics GmbH, accessed: 1.6.2015, available from: <http://www.eurofinsgenomics.eu/de/dna-rna-oligonucleotides/oligo-design-mehr/oligo-property-scan.aspx>.
328. *Nachweis von Mykoplasmen mit Venor®GeM: Anwendung im Detail*. Biochrom AG, 2010.
329. Sachs L, *Angewandte Statistik*. 11. Auflage. 2003, Berlin, Heidelberg: Springer.
330. *Sicherheitsdatenblatt Pierce™ BCA Protein Assay Kit*. Thermo Fisher Scientific Inc., accessed: 12.01.2016, available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/23227>.
331. Dodeigne C, Thunus L and Lejeune R, *Chemiluminescence as a diagnostic tool. A review*. *Talanta*, 2000. 51(3): 415-439.
332. Rongen HAH, Hoetelmans RMW, Bult A and Van Bennekom WP, *Chemiluminescence and immunoassays*. *J Pharm Biomed Anal*, 1994. 12(4): 433-462.
333. *RNeasy® Mini Handbook*. QIAGEN, 2010.
334. *SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit*. Invitrogen™ Life Technologies, 2008.
335. Hender RW, *Procedure for simultaneous assay of two  $\beta$ -emitting isotopes with the liquid scintillation counting technique*. *Anal Biochem*, 1964. 7(1): 110-120.
336. *GraphPad Statistics Guide. Area under the curve*. GraphPad Software, Inc., accessed: 09.12.2015, available from: [http://www.graphpad.com/guides/prism/6/statistics/index.htm?stat\\_area\\_under\\_the\\_curve.htm](http://www.graphpad.com/guides/prism/6/statistics/index.htm?stat_area_under_the_curve.htm).



---

# Erklärung

Hiermit erkläre ich des Eides statt, dass ich die Dissertation

## **Der Einfluss von Arzneistofftransportern auf die pulmonale Absorption inhalierter Arzneistoffe**

selbstständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher oder anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher, außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden, keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den

---

Lisa Schaaf