INAUGURAL-DISSERTATION

Zur Erlangung der Doktorwürde
der Naturwissenschaftlichen-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

Vorgelegt von
Diplom-Biochemikerin
Doreen Lüdtke geb. Mitschke

Tag der mündlichen Prüfung: 22. September 2009

Charakterisierung der Proteinexpression und Funktion metabolischer Enzyme im Darm der Ratte

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat Gert Fricker
Dr. rer. nat., apl. Prof. Akad. Direktor
Jürgen Reichling

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Bayer Schering Pharma AG, Abteilung DMPK angefertigt.

Mein Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. Gert Fricker für die Bereitschaft diese Arbeit seitens des Instituts für Pharmazie und Molekulare Biotechnologie in Heidelberg zu betreuen und für Ansprechbarkeit und Anregungen bei der Bearbeitung des Themas.

Herrn Dr. Andreas Reichel danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, für seine stete Ansprechbarkeit, für die wertvollen Anregungen und für das Gewähren von ausreichendem wissenschaftlichem Freiraum zum selbstständigen Arbeiten.

Frau Dr. Ursula Mönning danke ich für die sehr gute und kompetente Betreuung vor Ort, für ihre immerwährende Ansprechbarkeit, für die wertvollen Anregungen und für das Gewähren von ausreichendem wissenschaftlichem Freiraum zum selbstständigen Arbeiten.

Herrn Prof. Dr. Jürgen Reichling für die Anfertigung des Zweitgutachtens.

Dr. Anna-Lena Frisk und Sabina Bassow für die kompetente Unterstützung bei der Anfertigung der Immunhistochemischen Daten.

Der gesamten LC-MS/MS-Gruppe für die Messung der funktionellen Versuchsansätze.

Nicole Ventz, Caroline MacLean und Uta Reckling für die tatkräftige Unterstützung bei der Herstellung von Darmpräparaten.

Irmgard Rehmann und Ann-Helen Ossa für die Unterstützung bei der HPLC-Analytik und für eine insgesamt schöne Zeit zusammen, die über diese Doktorarbeit hinausging.

Meinen lieben Laborkolleginnen Nicole Ventz, Viola Draheim, Caroline MacLean und Anja Rayss für fröhliche und produktive Arbeitstage.

Enrico Missner für Anregungen und Ratschlägen in Problemfragen, während des gesamten Studiums und der Doktorarbeit.

Daniel Trost und Martin Klein für viele kleine und große Späße.

Frau Andrea Meyer, die gute Seele des Sekretariats, für die Übernahme von vielen organisatorischen Dingen.

Der gesamten FPK für die schöne Arbeitsatmosphäre, während meiner gesamten Zeit dort.

Meinem Ehemann Henry und meiner Familie für die ständige Unterstützung während der gesamten Studienzeit.

Abkürzungen

16ßOH-TESTO	16ß-Hydroxytestosteron
17ß-HSD	17ß-Hydroxysteroid-Dehydrogenase
1-ABT	1-Aminobenzotriazole
1OH-BUPR	1-Hydroxybupropion
1OH-MDZ	1-Hydroxymidazolam
3-HM	3-Hydroxymorphinan
3-MM	3-Methyoxymorphinan
4OH-MDZ	4-Hydroxymidazolam
6ßOH-TESTO	6ß-Hydroxytestosteron
a b	apikal nach basolateral
ABC	ATP-Binding-Casette
ACN	Acetonitril
ATCC	American-Type-Culture-Collection
ATP	Adenosin-5`-Triphosphat
b a	basolateral nach apikal
BCA	Bicinchoninsäure
Bcrp	Breast cancer resistant protein
BSA	Rinderserumalbumin
BUPR	Bupropion
$CL_{FP\ DR}$	*„First pass“ in vivo* Clearance der Darmregion
$CL_{FP\ L}$	*„First pass“ in vivo* Clearance der Leber
$CL_{int\ pE}$	intrinsische Clearance der primären Enterzyoten
$CL_{int\ DR}$	intrinsische Clearance der Darmregion
$CL_{int\ ES}$	intrinsische Clerance der „Everted Sacs“
$CL_{int\ oJ;\ mJ;\ uJ}$	intrinsische Clearance des oberen, mittleren und unteren Jejunums
CYP P450	Cytochrome P450
DAB	Diaminobenzidin
DEX	Dextromethorphan
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure

ABKÜRZUNGEN

ES	„Everted Sac“
ES-Protein	Proteinmenge des gesamten „Everted Sac“
E-Protein	Proteinmenge des Enterozyten des Darms
EtOH	Ethanol
F_G	Fraktion der unmetabolisiert über die Darmwand absorbiert wird
fu	freie, nicht an Plasmaprotein gebundene Fraktion
fu_{Gut}	freie nicht an Darminhalt gebundene Fraktion
GST	Gluthation-S-Transferasen
HPLC	Hochdruch-Flüssigkeitschromatographie
ICE-Inhibitor-I	Interleukin-1ß-Converting-Enzym-Inhibitor-I
LC-MS/MS	Flüssigkeitschromatographie mit Tandem-Massenspektrum
MDR1	Multi-Drug-Resistance 1
MDZ	Midazolam
MeOH	Methanol
Mio	Million
MW	Mittelwert
NAD^+/NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
$NADP^+$/$NADPH_2$	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NAT	N-Acetyl-Transferasen
P_{app}	apparente Permeation
PBS	Phosphatpuffer-Saline
P_{eff}	effektive Permeation
Pen/Strep	Penecillin/Streptomycin
Ppg	P-Glycoprotein
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
StrepABC	Streptavidin-Biotin-Komplex
SULT	Sulfotransferasen
TESTO	Testosteron
TESTO-GLUC	Testosteron-Glucuronid
UGT	Udinyl-Glucuronid-Transferasen

Zusammenfassung

Der Darm ist kein homogen aufgebautes Organ, sondern unterliegt in der Morphologie, als auch in seiner Proteinverteilung Veränderungen vom proximalen bis distalen Ende. Da der intestinale Metabolismus eine große Auswirkung auf die Bioverfügbarkeit von oral aufgenommen Arzneistoffen besitzen kann, basiert eine erfolgreiche Arzneimittelentwicklung auch auf dem umfangreichen Wissen über metabolische Enzyme entlang des Darms. Wie die Hepatozyten, enthalten ebenso die Enterozyten ein Set an verschiedenen Cytochrome P450 (CYP P450) und anderen metabolisierenden Enzymen der Phase-I und -II. Obwohl die involvierten Enzyme für die Leber gut charakterisiert sind, existieren nur wenige Informationen über ihre Expression/Funktion in der Darmwand und entlang des gesamten Darms. Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnte gezeigt werden, das mehrere CYP P450 Enzyme (CYP3A, 2B1, 2C6, 2D1, 1A1) und weitere Enzyme der Phase-I/-II (17ß-HSD2, UGT) im Darm exprimiert werden. Außerdem wurde gezeigt, dass CYP2B1 und 3A eine kontinuierlich verminderte Expression entlang des Darms aufweisen, und dominant in den Zellen der Zottenspitze exprimiert werden, also genau dort wo die meisten Nähr- und Arzneistoffe absorbiert werden. Mengenmäßig stellen CYP2B1 (ca. 65 %) und 3A (ca. 28 %) die dominanten CYP P450 Isoformen im proximalen Darm der Ratte dar. Dagegen spielen die Enzyme CYP2C6 und 2D1 im Darm eine eher untergeordnete Rolle. Daraus kann die Hypothese abgeleitet werden, dass diese beiden Enzyme eher eine Rolle im endogenen Abbauprozess spielen, als im Metabolismus von Arzneistoffen. Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnte weiterhin gezeigt werden, dass der proximale Darm im Vergleich zur Leber circa 15fach niedrigere und der distale Darm circa 100fach niedrigere CYP P450 Mengen enthält. Auch ist die CYP P450 Verteilung in der Leber ganz anders, als im Darm. Während im Darm CYP3A und 2B1 dominieren, stellen in der Leber alle untersuchten CYP P450 Enzyme gleichgroße Fraktionen an der CYP P450 Gesamtsumme.

Des Weiteren wurden zwei unterschiedliche *in vitro* Modelle eingesetzt um den intestinalen Metabolismus zu charakterisieren. Zum einem wurden isolierte primäre Enterozyten der Ratte verwendet, zum anderen intakte Darmsegmente der Ratte („Everted Sacs“). Beide Modelle lieferten vergleichbare Abbauraten der untersuchten Test-Substanzen: Dextromethorphan, Testosteron, Midazolam und Bupropion. Basierend auf den Abbauraten konnte die intrinsische Clearances (CL_{int}) Werte für alle Test-Substanzen in beiden Modellen errechnet

werden. Von allen untersuchten Test-Substanzen zeigt Testosteron den höchsten Abbau im Darm. Dieser Abbau erfolgt dabei hauptsächlich über das Phase-I-Enzym 17ß-HSD2. Die anderen Test-Substanzen werden dagegen hauptsächlich über CYP P450 Enzyme abgebaut, was auch über Versuchsansätze mit Aminobenzotriazol (ABT), einem irreversiblen CYP P450 Inhibitor, bestätigt werden konnte. Des Weiteren konnte anhand der $CL_{int\ ES}$-Werte der Testsubstanzen und unter Zuhilfenahme von ermittelten Skalierungsfaktoren die $CL_{int\ DR}$ der Test-Substanzen errechnet werden. Aus diesen Ergebnissen konnten wiederum mittels „Q_{Gut} Modell“ die *„First pass“ in vivo* Clearances ($CL_{FP\ Darm}$) und der Substanzanteil der unmetabolisiert die Darmwand übertritt (F_G-Werte) für alle Test-Substanzen berechnet werden. Dabei errechnete sich für Testosteron (4.7 mL/min/kg Körpergewicht) und Bupropion (3.4 mL/min/kg Körpergewicht) die höchsten $CL_{FP\ Darm}$-Werte und die niedrigsten F_G-Werte für die proximalen Darmregionen. Im distalen Dünndarm sinkt für beide Substrate der Metabolismus stark ab, was eine Erhöhung der F_G-Werte zur Folge hat.

Neben den „Everted Sacs“ können auch primäre Enterozyten für die Vorhersage von intestinalen Metabolismus und Absorption eingesetzt werden. Allerdings erfordert eine valide Vorhersage eine reproduzierbare hohe Vitalität der Enterozytenkulturen. Die Methode wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit aufgebaut, aber noch weitere Schritte sind notwendig, um sie weiter zu optimieren und anwenden zu können.

Summary

The intestine is not a homogenous designed organ with a changing morphology and changing protein expression profiles from its proximal to distal expansion. The intestine is capable of influencing the bioavailability of orally administered drugs. Therefore, a profound knowledge of metabolic enzymes along the intestine is necessary for a successful drug development. Alike hepatocytes, enterocytes contain a set of many different Cytochrome P450 (CYP P450) isoforms and other phase-I/-II metabolic enzymes. Although the metabolic enzymes of the liver are very well characterized, only few information exist about their expression and function in the rat gut wall and along the entire intestine.

In this doctoral thesis the expression of several CYP P450 enzymes (CYP3A, 2B1, 2C6, 2D1, 1A1) and other phase-I/-II-enzymes (17ß-HSD2, UGT) along the entire intestine was shown in spatial detail. CYP2B1 and CYP3A show decreasing expression profiles along the rat intestine and are not or very low expressed in the large intestine. Both enzymes are dominantly expressed in the very upper tip of the villi of the proximal intestine and therefore in the nutrient and drug dominant absorption area. Furthermore, CYP2B1 (65 %) and 3A (ca. 28 %) are the predominant CYP P450 isoforms in the proximal intestine, while CYP2C6 and 2D1 just play minor roles there. This may suggest that CYP2C6 and 2D1 are more likely to be involved in the metabolism of endogenous, rather than exogenous substrates.

In comparison with the liver, the proximal intestine of the rat contains 15 times and the distal intestine 100 times lower CYP P450 amounts. Furthermore, the liver shows a completely different CYP P450 distribution. While in the rat intestine CYP3A and CYP2B1 dominate, all examined CYP P450 isoforms contribute similar fractions to the whole CYP P450 amount in the liver of the rat.

Furthermore, two *in vitro* models were established to characterize the intestinal metabolism. Primary enterocytes of the rat intestine and intact gut segments of the rat ("Everted Sacs") were prepared for the functional assays. Both *in vitro* models led to comparable metabolic degradation rates for all test compounds investigated: testosterone, midazolam, dextromethorphan and bupropion. For all compounds the intrinsic clearance (CL_{int}) was calculated. Testosterone showed the highest intestinal metabolism, which is mainly the consequence of 17ß-HSD2 activity. The other compounds are predominately metabolized by

CYP P450 isoforms, as incubations with the CYP P450 inhibitor, aminobenzotriazole (ABT), showed.

Based on the $CL_{int\,ES}$ values and specific scaling factors, the intrinsic clearance for all test-compounds was calculated for the respective intestinal regions ($CL_{int\,DR}$). By using the "Q_{Gut} model" it was possible to calculate the first pass *in vivo* clearance ($CL_{FP\,DR}$) and the unchanged absorbed fraction of the test-compound (F_G). Of all compounds investigated, testosterone and bupropion showed the highest first pass *in vivo* clearances and the lowest F_G values in the proximal intestine. Along the intestine, the metabolism of both compounds decreased strongly and therefore, an increase in the F_G values could be observed.

Besides the "Everted Sac" model also primary enterocytes could be used for the prediction of intestinal metabolism and absorption. The base for a valid prediction is a reproducible vital cell culture. The isolation of vital primary enterocytes needs further investigation.

1. EINLEITUNG 1

1.1. DARMPHYSIOLOGIE DER RATTE 2
1.2. METABOLISMUS 5
1.2.1. PHASE-I-METABOLISMUS 6
1.2.1.1. Reaktionsschemata CYP P450 Enzyme 7
1.2.1.2. CYP P450 Isoformen 8
1.2.1.3. Intestinale CYP P450 Expression 10
1.2.2. PHASE-II-METABOLISMUS 11
1.3. INTESTINALE PHASE-III-REAKTION 11
1.4. ZIEL DER ARBEIT 13

2. MATERIAL UND METHODE 14

2.1. GERÄTE UND HILFSMITTEL 14
2.2. CHEMIKALIEN, ANTIKÖRPER, REKOMBINANTE PROTEINEN UND ENZYME 15
2.3. ZUSAMMENSETZUNG DER PUFFER 18
2.4. TIERHALTUNG 19
2.5. GEWEBEPRÄPARATION ZUR ANALYSE DER PROTEINEXPRESSION 20
2.5.1. PRÄPARATION VON ORGANHOMOGENATEN 20
2.5.2. HERSTELLUNG VON INTESTINALHOMOGENATEN 20
2.5.3. ISOLATION DER EINZELNEN ENTEROZYTENPOPULATIONEN 21
2.6. BIOCHEMISCHE METHODEN 21
2.6.1. KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON PROTEINEN 21
2.6.2. LDS-POLYACRYLAMID-GELEKTROPHORESE (LDS-PAGE) 22
2.6.3. WESTERN BLOT DETEKTION 22
2.6.4. QUANTIFIZIERUNG DER CYP P450 EXPRESSION 23
2.6.5. IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG 24
2.7. FUNKTIONELLER ASSAY MITTELS PRIMÄREN ENTEROZYTEN-MODELL 26
2.7.1. ISOLATION DER MATURIERTEN, PRIMÄREN RATTEN-ENTEROZYTEN 26
2.7.1.1. Vitalitätsbestimmung der Enterozyten 27
2.7.2. METABOLISCHER STABILITÄTSASSAY MIT PRIMÄREN RATTEN-ENTEROZYTEN 27
2.7.3. AUSWERTUNG DES FUNKTIONELLEN ENTEROZYTEN-ASSAYS 28
2.7.3.1. Bestimmung der Initialgeschwindigkeit 28

2.7.3.2. Berechnung intrinsischen Clearance der primären Enterozyten ($CL_{int\ pE}$) 28
2.8. FUNKTIONELLER ASSAY MITTELS „EVERTED SAC" MODELL 29
2.8.1. ISOLATION VON „EVERTED SACS" 29
2.8.2. METABOLISCHER STABILITÄTSASSAY MIT „EVERTED SACS" 29
2.8.2.1. Probenaufarbeitung für die LC-MS/MS 30
2.8.2.2. Probenaufarbeitung für die HPLC 30
2.8.3. AUSWERTUNG DER FUNKTIONELLEN ASSAYS MITTELS „EVERTED SACS" 31
2.8.3.1. Berechnung der metabolisierten und gebildeten Stoffmenge 31
2.8.3.2. Berechnung enzymkinetischer Daten von Testosteron 32
2.8.3.3. Berechnung der *„First pass" in vivo* Clearance des Test-Substanzen 33
2.9. FUNKTIONELLER PERMEATIONSASSAY MITTELS CACO-2-MODELL 35
2.9.1. CACO-2 ZELLKULTUR 35
2.9.2. PERMEATIONSEXPERIMENT MIT CACO-2 ZELLEN 36
2.9.3. AUSWERTUNG CACO-2 PERMEATION 37
2.10. ANALYTIK 38
2.10.1. HPLC-ANALYTIK 38
2.10.2. LC-MS/MS-ANALYTIK 39
2.11. STATISTIK 39

3. ERGEBNISSE 41

3.1. CYP P450 EXPRESSION IN VERSCHIEDENEN ORGANEN 41
3.2. PROTEINEXPRESSION ENTLANG DES RATTENDARMS 42
3.2.1. CYP P450 EXPRESSION ENTLANG DES RATTENDARMS 42
3.2.2. 17ß-HSD2 UND UGT EXPRESSION ENTLANG DES RATTENDARMS 45
3.3. CYP P450 QUANTIFIZIERUNG 46
3.3.1. REPRODUZIERBARKEIT DER METHODE 47
3.3.2. CYP P450 QUANTIFIZIERUNG 47
3.4. CYP P450 EXPRESSION IN DEN EINZELNEN ENTEROZYTENPOPULATIONEN 48
3.4.1. EXPRESSION VON MARKERPROTEINEN IN DEN ENTEROZYTENPOPULATIONEN 50
3.4.2. EXPRESSION VON CYP P450 IN DEN ENTEROZYTENPOPULATIONEN 51
3.5. IMMUNHISTOCHEMIE 51
3.5.1. PHÄNOTYPISCHE BEURTEILUNG DER DARMMORPHOLOGIE 52
3.5.2. IMMUNHISTOCHEMISCHE ANALYSE DER MARKERPROTEINE VILLIN UND KI-67 53
3.5.3. IMMUNHISTOCHEMISCHEN ANALYSE DER CYP3A EXPRESSION 55
3.6. INTESTINALER METABOLISMUS MIT DEM PRIMÄREN ENTEROZYTEN-MODELL 56

3.6.1. METHODENENTWICKLUNG 56
3.6.2. INTESTINALER METABOLISMUS MIT DEM PRIMÄREN ENTEROZYTEN-MODELLS 58
3.7. INTESTINALER METABOLISMUS MIT DEM „EVERTED SAC-MODELL 61
3.7.1. ZEITVERLÄUFE DES INTESTINALEN METABOLISMUS MIT DEM „EVERTED SAC"-MODELL 62
3.7.2. INHIBITION DES CYP P450-VERMITTELTEN METABOLISMUS 66
3.7.3. INTESTINALER METABOLISMUS ENTLANG DES DARMS 67
3.7.4. K_M-, V_{MAX}- UND $CL_{INT\ ES}$-WERTE FÜR TESTO 69
3.7.5. BERECHNUNG DER INTESTINALE *„FIRST PASS" IN VIVO* $CL_{FP\ DR}$ 70
3.8. PERMEATION ÜBER DIE DARMWAND 72
3.8.1. PERMEATION MITTELS „EVERTED SAC"-MODELL 72
3.8.1.1. Serosale Akkumulation der Substrate 72
3.8.1.2. Akkumulation der Metabolite im mukosalen und serosalen Kompartiment 74
3.8.2. CACO-2-PERMEATION 75

4. DISKUSSION 77

5. REFERENZEN: 100

6. ANHANG: I

1. Einleitung

Die Konzentration eines Arzneistoffs im Organismus nach oraler Gabe wird durch das Ausmaß der Resorption aus dem Darm, Verteilung im peripheren Gewebe, dem hepatischen und extrahepatischen Stoffwechsel, sowie von der renalen und biliären Ausscheidung bestimmt. Viele Faktoren können bereits im Darm die Geschwindigkeit und das Ausmaß der Absorption von Arzneistoffen beeinflussen. Die orale Absorption von Substanzen wird von Eigenschaften der Substanz, aber auch von den Eigenschaften des Darms nachhaltig beeinflusst. Die Hauptkriterien einer Substanz für eine erfolgreiche Absorption sind dessen Permeabilität über die Darmwand, die Löslichkeit, die Absorptionszeit und die Stabilität (Van De Waterbeemd et al. 2003). Die Permeabilität ist definiert als die Geschwindigkeit (cm/s) mit der eine Substanz die Membranen von Zellen überwindet. Für die Permeabilität von Substanzen spielen verschiedenen Eigenschaften des Moleküls, wie Gewicht, Größe, Form, Konformation, Ionisierungsgrad, Ladung, Lipophilie und die Anzahl der Wasserstoffbrücken-Donatoren bzw. -Akzeptoren eine wichtige Rolle (Palm et al. 1997; Palm et al. 1999; Lipinski et al. 2001). Das molekulare Gewicht und die Lipophilie von Arzneistoffkandidaten hat laut Fagerholm et al. in den letzten Jahren stark zugenommen, was eine verminderte Permeabilität über die zelluläre Barriere und verminderten Löslichkeit der Kandidaten zur Folge hat (Fagerholm 2007). Nach Lipinski et al. ist die schlechte Löslichkeit der aktuellen Arzneikandidaten im Darm der Grund für deren unzureichende orale Absorption und somit auch deren unzureichende Bioverfügbarkeit (Lipinski et al. 2001). Daher werden immer mehr Anstrengungen unternommen, die Permeabilität, Löslichkeit und Absorption von Kandidaten möglichst früh in der pharmazeutischen Entwicklung zu bestimmen. Caco-2 Zellen werden in der pharmazeutischen Industrie für die Bestimmung der Permeabilität standardmäßig eingesetzt. Caco-2 Zellen sind eine Adenokarzinomzelllinie aus dem menschlichen Colon (Hilgers et al. 1990). Die Zellen sind in der Lage unter standardisierten Zellkulturmethoden zu polarisieren und Monolayerstrukturen auszubilden (Hidalgo et al. 1989). Die Zellen bilden dabei gut entwickelte Mikrovilli bzw. *„Tight Junctions“* aus und zeigen eine polarisierte Expression verschiedener Hydrolasen und Transporter.

Außerdem gibt es *in silico* Modelle, die die gastrointestinale Absorption über rein chemische Strukturdaten (log D, pK_a, Löslichkeit) und/oder wenigen *in vitro* Daten (Caco-2-Permeation) simulieren. Dazu zählt auch das „Advanced Compartmental absorption and transit“ Model

(ACAT) der Software Gastroplus™. Das ACAT Model simuliert dabei die intestinale Absorption und Pharmakokinetik von Arzneistoffen nach oraler und intravenöser Gabe im Menschen und anderen ausgewählten Spezies. Im Model ist der gesamte Darm in neun Segmente (Magen, 7x Dünndarm und Colon) gegliedert und eignet sich für die Simulation von Freisetzungsprofilen, pH-abhängigen Auflösungen und Permeabilitäten, Transport von formulierten Arzneistoffen durch den Darmtrakt und Absorptionen der Arzneistoffe über die Darmwand in die Portalvene. Dieses Modell kann in vielen Fällen Hinweise auf das biologische Verhalten von Substanzen im Gastrointestinaltrakt liefern. Allerdings gibt es auch Substanzen mit komplexem biologischem Verhalten, dass noch nicht über solche Modelle abgebildet werden kann (Plauth et al. 1991; Parrott und Lave 2002).

1.1. Darmphysiologie der Ratte

Für pharmakokinetische Untersuchungen im Rahmen der frühen Arzneimittelentwicklung, insbesondere von Bioverfügbarkeitsstudien, wird nicht der Mensch, sondern hauptsächlich die Ratte herangezogen. Die allgemeine Darmmorphologie und Anatomie unterscheidet sich im Allgemeinen nicht wesentlich zwischen Ratte und Mensch, obwohl die Ratte keine Gallenblase und einen sehr diffusen Pankreas aufweist.

Der Darmtrakt ist, wie in anderen Spezies, beginnend am Pylorus des Magens in folgende Abschnitte gegliedert: Duodenum, Jejunum, Ileum, Caecum, Colon und Rektum. Der Dünndarm der Ratte und des Menschen machen ungefähr 83 % der Gesamtdarmlänge aus, wobei das Jejunum in der Ratte ca. 90 % und im Menschen ca. 38 % der Dünndarmlänge einnimmt. Außerdem unterscheiden sich die beiden Spezies stark in der Ausdehnung des Caecums, dass in der Ratte ca. 26 % der Dickdarmlänge ausmacht, während es im Menschen gerade mal 5 % sind (DeSesso und Jacobson 2001).

Die Anatomie der Darmwand selber variiert stark in Abhängigkeit von der Darmregion und ist ausgehend vom Lumen, aus folgende Schichten aufgebaut: Mukosa, Submukosa, Mukosa muskularis, und Serosa (Abbildung 1). Die Mukosa selber ist wiederum in drei Bereiche, Zotten, Krypten und Lamina Propria gegliedert. Die Krypten stellen das proliferierende Kompartiment der Mukosa dar, welches das nicht-proliferierende Kompartiment der Mukosa, die Zotten, ständig mit neuen Zellen versorgt (Abbildung 2). An der Basis der Krypten befinden sich Stammzellen, die mitotisch aktiv sind und Tochterzellen produzieren, die entlang der Krypten/Zottenachse Richtung Zottenspitze wandern. Diese Zellen sind funktionell und strukturell gereift, wenn sie die post-mitotischen Grenze am Krypten/Zotten

Übergang überschreiten. Auf ihrem weiteren Weg reifen die Zellen weiter, bis sie die Zottenspitze erreicht haben, von wo sie anschließend ins Darmlumen abgestoßen werden und sterben (Zoubi et al. 1994). Der Darm der Ratte zeigt dabei erstaunlich hohe Zellumsatzraten. Eine Zeitspanne von Teilung der Stammzelle in den Krypten bis zum Abstoßen der Zelle an der Zottenspitze nimmt nur 2-3 Tage ein.

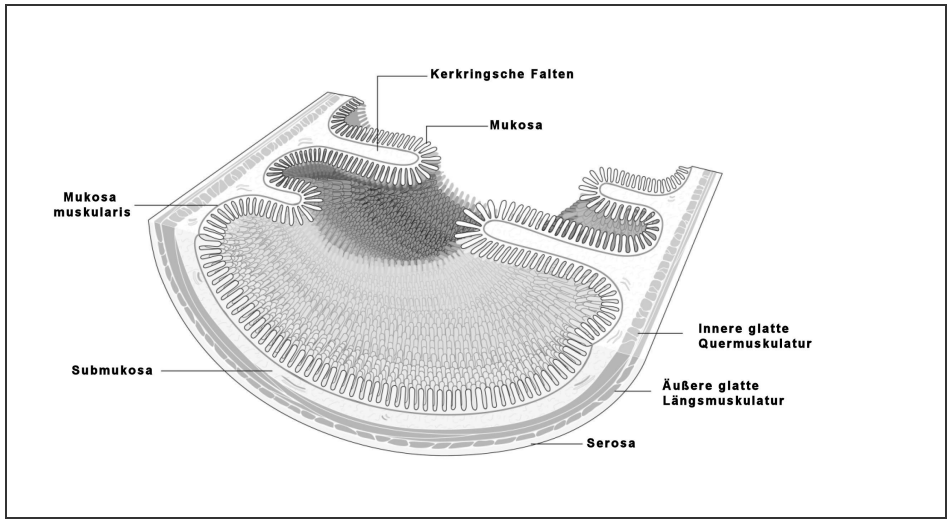


Abbildung 1: Aufbau der Darmwand im Querschnitt (DeSesso und Jacobson 2001)

Das Innere der Zotten bildet die Lamina Propria, die von zahlreichen Lymphgefäßen und Blutkapillaren durchzogen ist und für den Transport von absorbierten Nähr- und Arzneistoffe zur Leber verantwortlich ist.

Die Absorptionsoberfläche des Duodenums und Jejunums ist, aufgrund der sehr hohen Anzahl von Zotten in diesen Regionen, sehr viel größer als in den anderen Darmregionen (DeSesso und Jacobson 2001). Pro Quadratmillimeter kommen im Jejunum der Ratte ca. 40 Zotten, wobei jede Zotte ca. 10-12 Krypten besitzt (Abbildung 2) (Komuro und Hashimoto 1990). Die Form der Darmzotten ist abhängig von der Darmregion und dem Alter der Tiere. In erwachsenen Tieren sind die Darmzotten des Jejunums im Allgemeinen 0.5 mm hoch und zungen- oder kammförmig ausgebildet (Abbildung 2). Die Zotten und Krypten bestehen dabei aus drei wesentlichen Zelltypen: Becher-, endokrine und absorptive Zellen. Die Becherzellen produzieren Schleim, der wahrscheinlich zum Schutz der Darmwand dient. Die Krypten enthalten zusätzlich an der Basis endokrine Paneth Zellen, diese produzieren das bakterizid wirkende Enzym Lysozym, welches in Prokaryonten vorkommenden Polysaccharide, wie Peptidoglycan und Chitodextrin spaltet und daher an der Regulierung der Mikroflora beteiligt ist (Rozman und Hänninen 1986). Die wichtigsten Zellen der Mukosa aber sind die Enterozyten, säulenförmige, polarisierte Zellen, die mit ihren Nachbarzellen über dichte

„*Tight Junctions*“ in der Nähe ihrer luminalen Oberfläche verbunden sind. Die Oberfläche ihrer apikalen Membran wird dabei durch zahlreiche Mikrovilli, 3000-7000 pro Zelle im Dünndarm, stark vergrößert. Im Lichtmikroskop erscheinen die Mikrovilli wie ein Bürstensaum, weswegen die apikale Membran auch als solche bezeichnet wird. Auf den Mikrovilli befindet sich eine kohlenhydratreiche Glykokalyx.

Die unter der Mukosa gelegene Submukosa stellt das Skelett des Darms dar, welches der Darmwand die strukturelle Integrität liefert. Sie stützt die Mukosa und verbindet sie gleichzeitig mit der äußeren Muskelschicht. Das Rahmenkonstrukt der Submukosa bilden zwei Ansammlungen von Kollagenfasern die diagonal um die Darmwand laufen und essentiell sind für ihre Flexibilität sich auf Darmperistaltik und wandernden Nahrungsbrei anzupassen. Die Submukosa im Duodenum enthält außerdem die Brunnerschen Drüsen, die einen glykoproteinhaltigen, alkalischen Schleim produzieren, der den sauren Nahrungsbrei aus dem Magen neutralisiert.

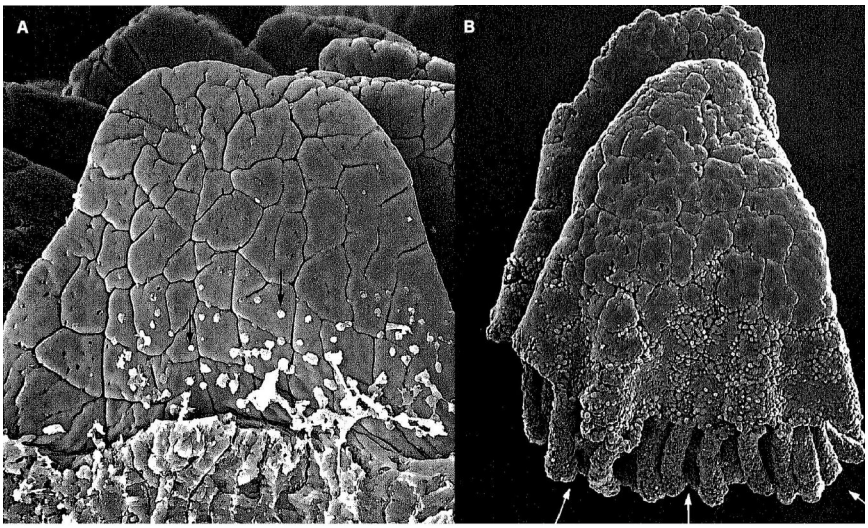


Abbildung 2: Zotten und Kryptenstruktur des Dünndarms der Ratte
In Abb. **A** ist eine zungen- oder kammähnliche Zotte dargestellt. Die laterale Oberfläche zeigt viele irreguläre Falten, die miteinander verbunden sind , wobei die weißen Flecken das mukosale Sekret der Becherzellen darstellt (schwarze Pfeile) In Abb. **B** ist ebenfalls eine zungenförmige Zotten und deren fransenähnlichen Krypten (weiße Pfeile) dargestellt (Komuro und Hashimoto 1990).

Der Submukosa schließt sich die Mukosa muskularis an, eine dünne Schicht von glatten Muskeln, die mit der Lamina Propria assoziiert ist. Die Kontraktionen der Muskelfaser führen zu wellenförmigen Bewegungen der Zotten, die eine Strömung der Flüssigkeitsschicht auf den Enterozyten auslöst und zu absorbierende Nährstoffe zu den Enterozyten geleitet. Die Darmwand enthält zusätzlich Muskelfasern, die zum einem zirkulär und zum anderen parallel zur Längsachse des Kanals angeordnet auftreten. Die koordinierte, rhythmische Kontraktion

dieser Muskelfasern zueinander führt zur Darmperistaltik, die zur Vermischung des Nahrungsbrei, zur Kontaktaufnahme zwischen Nahrungsbrei und Bürstensaummembran und zum Vortrieb des Nahrungsbrei durch den Darmtrakt beiträgt (DeSesso und Jacobson 2001).
Im Duodenum und oberen Jejunum werden aufgrund der anatomischen Anordnung die meisten Nähr- und Arzneistoffe absorbiert, wobei dies durch 1) passive Diffusion, 2) erleichterte Diffusion, 3) aktiven Transport, 4) Pinozytose oder 5) „*Solvent drag*“, mit dem Wasserstrom mitgenommen Teilchen, erfolgen kann. Im Dickdarm werden dagegen hauptsächlich Wasser und Elektrolyte absorbiert, wobei auch Stoffe die im Ileum nicht aufgenommen wurden oder Metabolite vom bakteriellem Metabolismus durchaus von den Dickdarmzellen absorbiert werden können (DeSesso und Jacobson 2001). Auf dem Weg über die Enterozytenmembran und durch die Zellen selbst, können Arzneistoffe einem Metabolismus und/oder Efflux-Transportprozess unterliegen. Die Efflux-Transporter befördern Arzneistoffe aus der Zelle zurück ins Darmlumen, von wo sie entweder mit dem Faeces ausgeschieden, oder erneut die Enterozytenmembran überqueren. Zusätzlich, können Metaboliten, die durch Enzyme in den Enterozyten entstehen, entweder zurück ins Darmlumen, oder über die basolaterale Membran in den Blutstrom transportiert werden. Dieser Metabolismus und die Transportprozesse von Arzneistoffen auf ihrer Passage über die Enterozyten ergeben den *„First pass Effekt“* der Darmwand. Die Blutgefäße aus dem Darm gelangen in die Pfortader, von wo aus sie in die Leber fließen. In der Leber werden Arzneistoffen ebenfalls aus dem Blutstrom in die Zellen aufgenommen, metabolisiert und/oder über die Galle ausgeschieden. Diese Prozesse zusammen ergeben den hepatischen *„First pass Effekt“*. Die orale Bioverfügbarkeit von Arzneistoffen ist definiert über die Menge an Substanz die im Darm absorbiert und die Menge die keinem *„First pass Effekt“* im Darm und in der Leber unterliegt. Die orale Bioverfügbarkeit ist auch eine wichtige Größe in der pharmazeutischen Industrie für die Charakterisierung von oral aufgenommenen Arzneistoffen (Van De Waterbeemd et al. 2003).

1.2. Metabolismus

Die in Darm und Leber metabolisierenden Enzyme werden in zwei verschiedene Reaktionssysteme eingeordnet: Phase-I- und Phase-II-Reaktionen. Die Phase-I-Reaktionen sind Funktionalisierungsreaktionen, d.h. sie führen funktionelle Gruppen in das unpolare Molekül ein oder legen entsprechende funktionelle Gruppen frei. Diese Reaktionen umfassen u.a. Oxidationen, Reduktionen und Hydrolysen. Reaktionen der Phase-II dagegen stellen

Konjugationsreaktionen mit körpereigenen Liganden dar, die sich in der Regel an einen Metabolisierungsschritt der Phase-I anschließen und durch Transferasen katalysiert werden. In den Phase-II-Reaktionen werden funktionelle Gruppen z.B. mit sehr polaren, negativ geladenen endogenen Molekülen gekoppelt. Typische Reaktionen sind Glucuronidierung, Sulfatierung, Methylierung, Acetylierung und Konjugationen mit Aminosäuren und Glutathion. Die beiden metabolischen Reaktionsphasen zusammen, stellen ein Entgiftungs-, Inaktivierungs- und Eliminierungssystem dar, deren Metaboliten meist unwirksam sind, oder zumindest deutlich abgeschwächt wirken. Einige Phase-I-Metabolite sind allerdings selbst pharmakologisch wirksam, oder die Metabolite selber stellen das eigentliche Wirkprinzip dar. In diesem Fall bezeichnet man die Ausgangssubstanz als „*Prodrug*“. So wird die analgetische Wirkung von Codein ausschließlich durch dessen Metaboliten Morphin vermittelt (Aktories et al. 2005).

1.2.1. Phase-I-Metabolismus

Die wichtigsten Enzyme des Phase-I-Stoffwechsels sind die mischfunktionellen Monooxygenasen, Oxidasen und Reduktasen, die in der nachfolgenden Tabelle zusammengefasst sind (Tabelle 1).

Tabelle 1: Beispiele für Enzyme die am Phase-I-Metabolismus beteiligt sind.

Enzym	Kofaktoren	Reaktion
mischfunktionelle Monoxygenasen (CYP)	$NADPH_2$, O_2	Hydroxylierungen
Flavin-Monooxygenase (FMO)	$NADPH_2$, O_2	N (oder S-)-Oxidation
Monoaminoxidase (MAO)	O_2	Oxidative Deaminierung
Semicarbazid sensitive Aminoxidase (SSAO)	O_2	Oxidative Deaminierung
Alkoholdehydrogenase	NAD^+	Alkoholoxidation
Aldehyddehydrogenase	$NAD(P)^+$	Aldehydoxidation
Aldehydoxidase	O_2	Aldehydoxidation
Aldo-Ketoreduktase (AKR)	$NAD(P)^+$	Dehydrogenisierung
Xanthineoxidase	NAD^+,O_2	C-Oxidation

Von besonderer Bedeutung für die Biotransformation von Arzneistoffen sind u.a. 2 verschiedene Klassen von Phase-I-Enzymen, 1.) mischfunktionelle Monooxygenasen und 2.) Aldo-Ketoreduktasen.

Zu den Aldo-Ketoreduktasen gehören unter anderem die Hydroxysteroid-Dehydrogenasen (HSD), die außerhalb der Geschlechtsorgane, an Synthese und Abbau der Sexualhormone beteiligt sind. Von diesen Enzymen gibt es mehrere Isoformen, wie z.B. 17ß-HSD2, welches

am Endoplasmatischem Retikulum gebunden vorliegt und unter Zuhilfenahme von NAD^+/ $NADP^+$ Dehydrogenisierungen von Testosteron (TESTO) und Estradiol katalysiert. Die mischfunktionellen Monooxygenasen, die sogenannten Cytochrome P450 Enzyme (CYP P450), sind die bedeutendsten Vertreter der Phase-I-Enzyme. CYP P450 Enzyme sind Hämproteine mit einem molekularen Gewicht von 45-55 kDa und liegen an der Membran des endoplasmatischen Retikulums verankert vor. Da sie im reduzierten Zustand ein Differenzspektrum mit einem Absorptionsmaximum bei 450 nm zeigen, wurden diese Enzyme als CYP P450 Proteine bezeichnet. Aufgrund von Proteinsequenzhomologien werden verschiedene CYP P450 Enzym-Familien, -Unterfamilien und Isoformen unterschieden.

1.2.1.1. Reaktionsschemata CYP P450 Enzyme

Die CYP P450 Enzyme zeigen eine hohe Spannbreite an Spezifität, mit Substraten deren Größe zwischen Ethylen (M_r 28) und Cyclosporin (M_r 1201) variiert (Isin und Guengerich 2007). Dadurch werden die Substrate in der Regel nicht nur durch ein Enzym, sondern durch die Kombination mehrerer CYP P450 Proteine metabolisiert. In einem Redoxprozess werden zwei Elektronen unter Beteiligung von NADPH und einem reduzierendem Flavoprotein übertragen und das Substrat somit oxidiert. Unter Zuhilfenahme von molekularem Sauerstoff wird das CYP P450 Isoenzym anschließend regeneriert, so dass es ein neues Substrat oxidieren kann. Der Funktionsmechanismus der CYP P450 Enzyme ist in Abbildung 3 schematisch dargestellt.

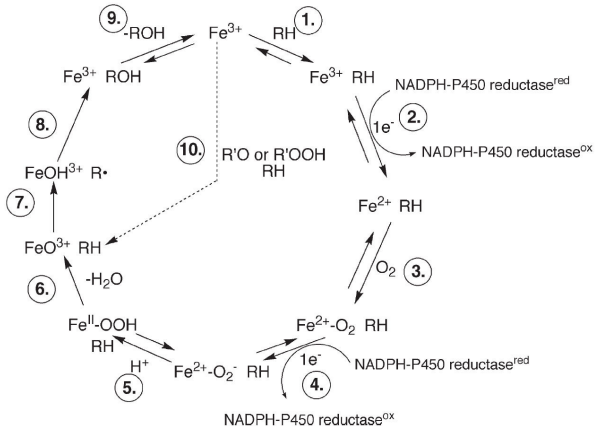


Abbildung 3: Graphische Darstellung des CYP P450 Reaktionsmechanismus (Guengerich 2001)

Neben Hydroxylierungen gibt es auch Epoxidierungen, aromatische Hydroxylierungen, N- und S-Oxidationen, N-Desalkylierunen, O-Alkylierungen, Desaminierungen, Entschwefelung,

oxidative Dehalogenierungen und noch ein paar andere außergewöhnlichere Reaktionen (Mutschler und Schäfer-Korting 1997)

Der Zyklus beginnt damit, dass ein Eisen des Häm-Protein sich im Fe^{3+} Oxidationsstatus befindet. Das Substrat bindet an das Enzym in der Nähe der distalen Region des Häm-Proteins (Schritt 1). Im zweiten Schritt wird ein Elektron auf das CYP P450 Protein übertragen und damit das Protein reduziert. Dieser Schritt ist unabhängig davon, ob ein Substrat am CYP P450 gebunden hat und steht nur an zweiter Stelle, weil es die langsamere Reaktion darstellt. Der Elektronentransfer geht vom NADPH über den Flavoprotein-NADPH-P450 Oxireduktasekomplex, mit einem Fluss von der Reduktase, über FAD und FMN auf das Eisenmolekül des CYP P450 Proteins, dass zum Fe^{2+} reduziert wird (Schritt 2). Der reduzierte Häm-Fe^{2+} Komplex bindet molekularen Sauerstoff (Schritt 3). Der sehr instabiler Komplex kann in ein Hyperoxidanion ($O_2^{\bullet-}$) und in ein Häm-Fe^{3+} Komplex zerfallen. Ein zweites Elektron wird anschließend auf den Häm-Fe^{2+}-Sauerstoff-Komplex, über den Flavoprotein-NADPH-P450 Oxidreduktasekomplex oder über Cytochrome b_5 von NADPH übertragen (Schritt 4). Cytochrome b_5 ist nur bei dieser Reduktion des Eisenmoleküle vertreten, weil Cytochrome b_5 den ersten Elektronentransfer thermodynamisch zu ineffizient katalysieren würde. Im nächsten Schritt wird ein Proton, aus dem CYP P450 Protein geliefert (Schritt 5) und anschließend die O-O Bindung der Sauerstoffs auf gespaltet (Schritt 6), wobei Wasser und ein Häm-Eisen-(III)-oxid-Komplex entstehen, dessen präzise Elektronenkonfiguration unbekannt ist. Im nächsten Schritt zieht dieser elektronendefiziente Komplex entweder ein Wasserstoff oder ein Elektron vom Substrat ab (Schritt 7) und zerfällt im nächsten Schritt zu Häm-Fe^{3+} Komplex und ein oxidiertes Substrat (Schritt 8), häufig in Form einer neuen Hydroxylgruppe. Im letzten Schritt dissoziiert die oxidierte Substanz vom Enzym (Schritt 9) (Guengerich 2001).

1.2.1.2. CYP P450 Isoformen

Bis in den 60er Jahren des letzten Jahrhunderts war kaum etwas über die Existenz von mehreren CYP P450 Isoformen bekannt. In den 70er Jahren führten Verbesserungen auf dem Gebiet der Proteinaufreinigung zu immer mehr Hinweisen das mehrere CYP P450 Isoformen existieren müssen und schließlich zur Entdeckung einer riesigen Anzahl von CYP P450 Isoformen, die durch Nelson, Anfang der 80er Jahre, eine einheitliche Nomenklatur erhielten (Nelson et al. 1993; Guengerich 2004). Bis heute sind im Menschen 18 CYP P450 Familien und 45 Unterfamilien identifiziert worden, während in der Ratte etwa 14 CYP P450 Familien

und 29 CYP P450 Unterfamilien beschrieben sind (http://cpd.ibmh.msk.su). Die Nomenklatur der CYP P450 Enzyme setzt sich wie folgt zusammen: Die erste Zahl nach dem „CYP“ stellt die Familie des Proteins dar, der folgende Buchstabe die Unterfamilie und die anschließende Zahl die Proteinisoform bzw. das Gen. Die letzte Zahl ist dabei eine fortlaufende Zahl und ist speziesübergreifend, so ist CYP3A1 eine CYP P450 Isoform der Ratte, während CYP3A4 aus dem Menschen stammt. CYP P450 Isoformen, die speziesübergreifende eine hoch konservierte Aminosäuresequenz besitzen, erhalten auch speziesübergreifend die gleiche CYP P450 Nomenklatur, wie z.B. CYP1A1. Ansonsten müssen die Mitglieder einer Familie bzw. Unterfamilie 40 % bzw. 55 % Identität der Aminosäuresequenz aufweisen (Nelson et al. 1993).

Für den Metabolismus von Arzneistoffen sind im Wesentlichen die Mitglieder der CYP1-3 Familien bedeutsam und machen ca. 70 % der humanen, mikrosomalen CYP P450 Proteine in der Leber aus (Yan und Caldwell 2001). Davon spielt die CYP3A Unterfamilie und ihr bekanntester Vertreter CYP3A4 in der humanen Leber eine zentrale Rolle, weil sie jeweils 40 % bzw. 30 % am Gesamt-CYP P450 Gehalt einnehmen (Paine et al. 2006) (Abbildung 4).

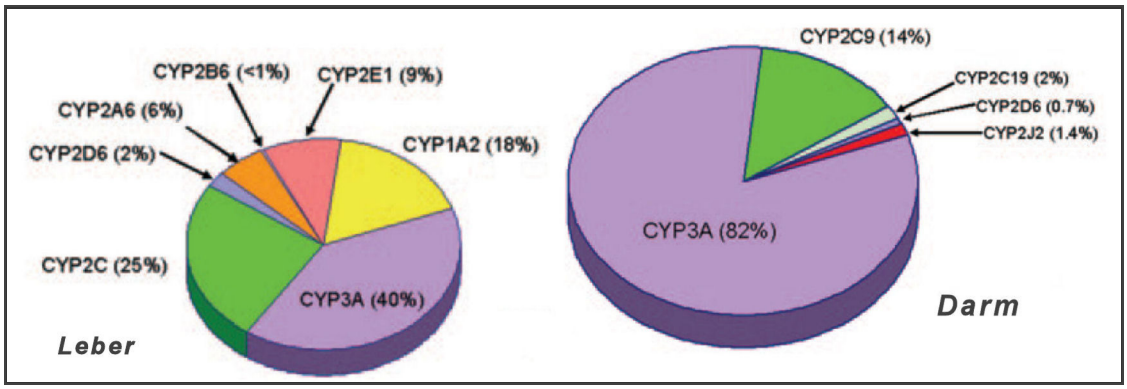


Abbildung 4: CYP P450 Zusammensetzung des menschlichen Darms und der Leber (Paine et al. 2006)

Auch für den Arzneimittelmetabolismus ist CYP3A4 von wesentlicher Bedeutung. Circa 50 % der derzeit auf dem Markt befindlichen Arzneistoffe werden im Menschen von dieser Isoform metabolisiert, wie z.B. Verapamil, Diltiazem, Midazolam und Dexamethason (Yan und Caldwell 2001; Kivisto et al. 2004). Obwohl CYP2D6 nur einen relativ kleinen Anteil an der Gesamt-CYP P450 Menge in der Leber hält (2 %), ist es doch für die pharmazeutische Industrie aus zweierlei Gründen von Bedeutung (Paine et al. 2006). Zum einen metabolisiert CYP2D6, trotz seiner geringen Mengen im Vergleich zu CYP3A in der humanen Leber, ca. 30 % der derzeit auf dem Markt verfügbaren Arzneimittel und zum anderen gibt es verschiedene CYP2D6 Polymorphismen (Yan und Caldwell 2001). Studien haben gezeigt,

das Nukleotidaustausche an den Intron/Exon Grenzen und innerhalb des Exons zum veränderten mRNA „Splicing“ und anschließend zu defekten CYP2D6 Proteinen führen kann. Die Eliminierung von CYP2D6 Substrate erfolgt in Menschen mit veränderten Genvariationen langsamer, weswegen diese als „*Poor Metabolizer*“ bezeichnet werden. Im Gegensatz dazu werden Individuen, die das unveränderte Gen enthalten als „*Extensive Metabolizer“* bezeichnet. In der kaukasischen Bevölkerung besitzen ca. 5-10 % der Menschen ein verändertes CYP2D6 Allel, während es in der asiatischen Bevölkerung nur ca. 1 % der Menschen betrifft (Ellis et al. 1996; Marez-Allorge et al. 1999; Yan und Caldwell 2001). Dies kann in speziellen Fällen dramatische Auswirkung bei der Einnahme von Arzneistoffen haben, die dem CYP2D6 Metabolismus unterliegen, besonders dann wenn das therapeutische Fenster dieser Arzneistoffe nur sehr klein ist.

1.2.1.3. Intestinale CYP P450 Expression

Wie bereits erwähnt, werden CYP P450 Enzyme auch in extrahepatischen Geweben, vor allen in Organen an Eingangspforten zum zentralen Blutkreislauf, wie Nasenschleimhaut, Lunge und Darm exprimiert (Ding und Kaminsky 2003). Dabei hat jedes Gewebe sein eigenes CYP P450 Expressionsprofil, das sich deutlich von der Leber unterscheiden kann. Im humanen Darm wurden eine ganze Reihe CYP P450 Isoformen nachgewiesen, wobei CYP3A und 2C9/19 den größten Anteil ausmachten (siehe Abbildung 4) (Obach et al. 2001; Paine et al. 2006). Diese CYP P450 Enzyme tragen dabei einen wesentlichen Beitrag zum intestinalen *„First pass Effekt“* einer ganzen Reihe von Substanzen, wie Cyclosporin (Wu et al. 1995), Nifedipine (Iwao et al. 2002), Midazolam (Paine et al. 1996), Diltiazem (Iwao et al. 2004) bei. Deutlich weniger Studien hinsichtlich der CYP P450 Expression existieren für den Rattendarm. In der Leber und im Dünndarm der Ratte wurde die mRNA von CYP3A1, 2B1, 2C6, 2C11-13, 1A1 und 2D1-4 nachgewiesen, wobei CYP2C11 bzw. CYP2C12 geschlechtsspezifisch in der männlichen bzw. weiblichen Ratten exprimiert werden (Mugford und Kedderis 1998). Einige CYP P450 Enzyme scheinen dagegen ausschließlich in der Leber exprimiert zu sein, weil keine mRNA für CYP1A2, 2A1, 2B2, 2E1, 3A2, 4A2 im Darm der Ratten detektiert werden konnte (Hiroi et al. 1998; Kaminsky und Zhang 2003). Obwohl viele der CYP P450 Enzyme konstitutiv exprimiert werden, unterliegen einige auch der Induktion, wie z.B. CYP1A1, das allerdings durch die normale stärkehaltige Diät der Ratten induziert werden kann (Kaminsky und Zhang 2003).

1.2.2. Phase-II-Metabolismus

Wie bereits weiter oben erwähnt, sind die in Phase-I-Reaktionen eingeführten funktionellen Gruppen häufig Voraussetzung dafür, dass Arzneimittel Substrate für Phase-II-Reaktionen werden. Besitzt ein Arzneimittel bereits für die Konjugation geeignete funktionelle Gruppen, kann auch ohne vorgeschaltete Phase-I-Reaktion eine direkte Konjugation erfolgen. Typische Phase-II-Enzyme stellen Gluthation-S-Transferasen (GST), Glucuronosyltransferasen (UGT), N-Acetyltransferasen (NAT), Sulfotransferasen (SULT) und Methyltransferasen dar. Da im Rahmen dieser Doktorarbeit nur die UGTs von Bedeutung sind, werden sie nachfolgend näher erläutert.

UGTs sind eine Superfamilie von Enzymen, die im Menschen insgesamt 3 Unterfamilien, UGT1A, 2A und 2B umfassen. UGTs liegen wie die CYP P450 Enzyme, an die ER-Membran gebunden vor. Anders als bei den CYP P450 Enzymen allerdings liegt der Hauptanteil des Enzyms, einschließlich der Substratbindungstasche, nicht cytosolisch vor, sondern luminal, zum Inneren des Endoplasmatischen Retikulums hin gerichtet. UGTs katalysieren die kovalente Bindung von Glucuronsäure an funktionelle Gruppen lipophiler Verbindungen. Dabei übertragen sie aktivierte Glucuronsäure vor allem auf Hydroxy-, Carboxy-, Amino- und SH-Gruppen. Neben Arzneistoffen und Xenobiotika sind auch viele endogene Stoffe, wie Bilirubin, Steroidhormone, Gallensäuren, biogene Amine und fettlösliche Amine Substrate für UGTs (Aktories et al. 2005). Die Leber ist dabei das Hauptorgan für Glucuronidierungsreaktionen, jedoch weisen auch andere Organe, wie die Niere und der Darm mitunter hohe UGT-Expressionslevel auf, die auf signifikante, extrahepatische Glucuronidierungsaktivitäten schließen lassen. Mehrere UGT Isoformen, wie UGT1A1, 1A3, 1A4, 1A6, 1A10, 2B4 und 2B15 wurden auf mRNA-Ebene im menschlichen Dünndarm bzw. Dickdarm nachgewiesen (Fisher et al. 2001). Im Rattendarm dagegen sind auf mRNA-Ebene bisher verschiedene Mitglieder der UGT1A Unterfamilie nachgewiesen worden, wobei UGT1A2 und UGT1A3 ausschließlich extrahepatisch exprimiert werden (Grams et al. 2000).

1.3. Intestinale Phase-III-Reaktion

Neben dem Metabolismus beeinflusst auch die Funktion von Transporter-Proteinen im Darm und in der Leber den *„First pass Effekt*“ von Arzneistoffen nachhaltig. Transporter-Proteine gehen mit ihrem Substrat eine spezifische Bindung ein, ändern die Konformation und transferieren das gebundene Substrat durch die biologische Membran. Je nach Richtung des Substrattransports in die Zelle hinein oder aus der Zelle heraus wird zwischen Aufnahme-

(„Uptake“) und Ausscheidungs-Transportsystemen („Efflux“) unterschieden. Von besonderem Interesse ist dabei das P-glycoprotein (Pgp), das Genprodukt des „Multidrug resistance receptor 1“ (MDR1). Pgp ist in der apikalen Enterozytenmembran lokalisiert und zählt zur Familie der „ATP-Binding-Cassette“-Transporter (ABC-Transporter), die unter Energieverbrauch ihre Funktion ausüben. Pgp kann aufgenommene Arzneistoffe in das Darmlumen zurück transportieren und somit eine aktive Barrierefunktion ausüben. Er hat ein breites Substratspektrum und steht in Verbindung mit der Aufnahme oder Abgabe von Nährstoffen, Aminosäuren, Kohlenhydraten, Peptiden oder hydrophoben Substanzen, sowie lipophilen und basischen Arzneistoffen mit planarem Ringsystem, aber auch neutrale Arzneistoffe, wie Digoxin (Higgins 1992). Pgp wird in gesunden Zellen der Leber, Niere, Darm und des Gehirns exprimiert, aber auch in sehr großen Mengen in Tumorzellen. Viele Studien unterstützen die Theorie, dass dieser Transporter den Körper vor der Aufnahme von toxischen Substanzen in den zentralen Blutkreislauf (Darm, Leber, Niere) oder in empfindliche Organe (Gehirn) schützt (Schinkel et al. 1994; Schinkel et al. 1996).

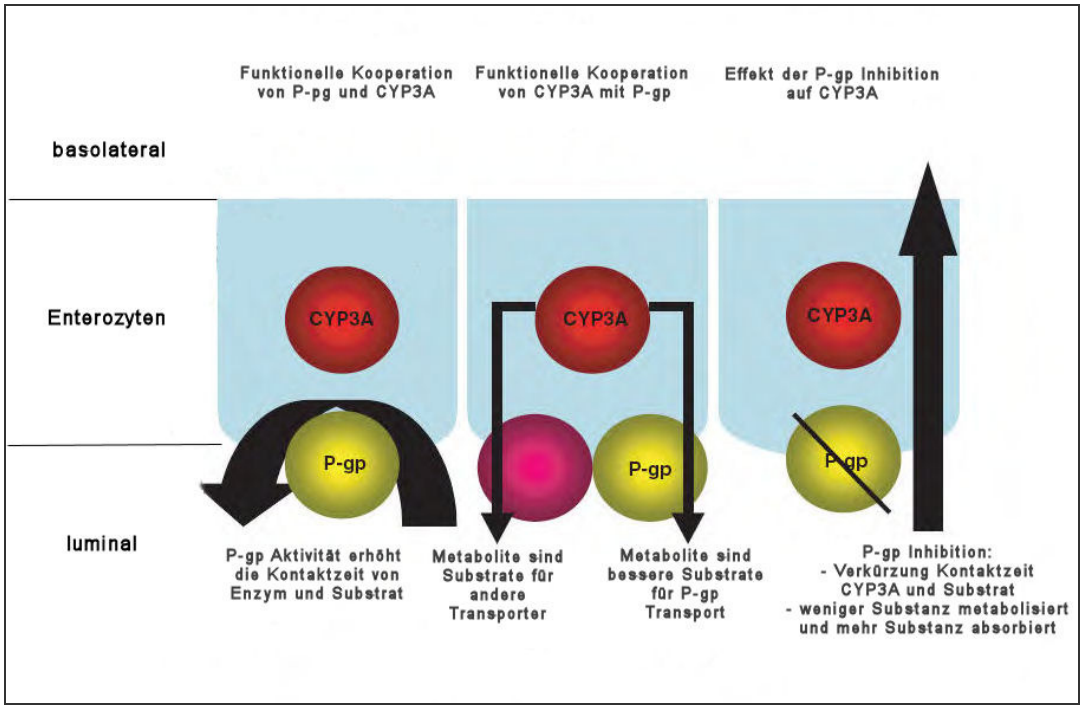


Abbildung 5: Zusammenspiel von Transporter und CYP P450 Enzyme (Christians et al. 2005)

Die Funktion von Pgp im Darm ist noch nicht vollständig aufgeklärt, aber Studien an Mensch und Ratte haben gezeigt, dass es die Rate und das Ausmaß an absorbierten und metabolisierten Arzneistoff beeinflussen kann (Gan et al. 1996; Terao et al. 1996). Interessanterweise zeigen CYP3A4 und Pgp sehr große überlappende Bereiche in ihrer

Substratspezifität, sind gemeinsam in der Nähe der apikalen Membran von Enterozyten lokalisiert und werden durch die gleichen Kernrezeptoren reguliert (Kliewer et al. 1998; Cummins et al. 2002; Kivisto et al. 2004). Benet et al stellte darauf hin eine apikale Recycling Hypothese auf, die beinhaltet das Pgp und CYP3A4 im Transport und Metabolismus von Arzneistoffen in der apikalen Membran von Enterozyten miteinander kooperieren (siehe Abbildung 5). Nach dieser Theorie, reguliert Pgp die Menge an Arzneistoff in der Zelle, die CYP3A4 für den Metabolismus zur Verfügung gestellt wird, indem Arzneistoff immer wieder aus der Zelle transportiert wird. Die transportierte Substanz kann erneut von den Enterozyten aufgenommen werden und anschließend wieder CYP3A4 zum Metabolismus zur Verfügung stehen (Cummins et al. 2002; Benet et al. 2004). Auf diese Weise kann eine relativ geringe Menge von CYP3A4 in der Darmwand (relativ zur Leber) eine deutliche Wirkung auf die Absorptionsrate von Arzneistoffen besitzen. Außerdem betrifft der Transport durch Pgp nicht nur den Arzneistoff selber, sondern auch dessen Metaboliten, die dann aus der Zelle heraus transportiert und somit nicht systemisch verfügbar gemacht werden.

1.4. Ziel der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Proteinexpression und Funktion der im Rattendarm exprimierten metabolischen Enzyme der Phase-I und –II charakterisiert werden, um damit das Ausmaß des intestinalen Metabolismus im Vergleich zur Leber der Ratte in der frühen Arzneimittelentwicklung vorherzusagen.

Grundvoraussetzung für die Charakterisierung war die Identifizierung und Quantifizierung der wesentlichen CYP P450 Isoformen, sowie 17ß-HSD2 und UGT. Neben der Charakterisierung entlang des gesamten Darms sollte auch die Enzymexpression entlang der Zottenachse, d.h. während der Enterozytendifferenzierung analysiert werden. Die Expression der Proteine vermag nicht vollständig die Funktion der Enzyme abzubilden, deswegen sollte die Proteinexpression auch auf funktioneller Ebene mittels geeigneter *in vitro* Methoden verifiziert werden. Anhand der *in vitro* Methode sollte außerdem ein Werkzeug zur Skalierung des intestinalen Metabolismus auf den gesamten Darm zur Verfügung gestellt werden, mit dem man den intestinalen *„First pass Effekt“* von Arzneistoffkandidaten in der frühen Phase der Arzneimittelentwicklung abschätzen kann.

2. Material und Methode

2.1. Geräte und Hilfsmittel

Geräte	Firma
Allgemein	
Makrolonkäfige	Techniplast
Varifuge 3.0R	Heraeus Septach
centrifuge 5417R	Eppendorf
pH Meter	Knick Portamess
Vortex Mixer SA8	Stuart
GENios Plattenreader	Tecan
AT261 DeltaRange Feinwaage	Mettler
CP622-OCE Waage	Satorius
96-Loch-Platten (schwarz)	Nunc
Proteincharakterisierung	
Potter-S-Homogenisator	B.Braun Biotech International
Axiovert S100 Mikroskop	Zeiss
verbesserte Neubauer Zählkammer	Brand
Novex MiniCell Gelelektrophorese	Invitrogen
Power Ease 500	Invitrogen
xcell II Blot Module	Invitrogen
ThermoMix 5436	Eppendorf
Swip KL-2 Schüttler	Edward Bühler
Quantity One Software	Biorad
ChemiDoc™ XRS	Biorad
Immunhistochemie	
Microtom	Leica Microsystems Holdings GmbH
Wasserbad	Heraus
Superfrost Objektträger	Menzel Gläser
Permeationsversuche/Stabilitätsversuche	
Lamina-Air-Flow Arbeitsbank	Heraeus
Variomag Teleshake 70 mit TEC control 485	inheco
96-Tiefloch-Platten	Firma Corning Costar
Packardgefäße mit Schraubdeckel	Wheaton
12-Loch-Zellkulturplatten	Firma Corning Costar

100 mL Zellkulturflaschen	Firma Corning Costar
Transwell®-Clear-Platten 1 cm^2, Porengröße 0.4 µm	Firma Corning Costar
Agilent 1100C	Agilent
HPLC Agilent 1200+API 3200 Q Trap	Agilent
Thermo Quest Hypersil GOLD - 1.9 µm - 2.1 mm x 50 mm	Fisher Scientific

2.2. Chemikalien, Antikörper, rekombinante Proteinen und Enzyme

Chemikalien	Firma	Bestellnr.
Proteincharakterisierung		
Isofluran	Abbot	3506
Glycerin (87%)	Merck	104091
PBS-Puffer (Ca^{2+}, Mg^{2+} frei)	Invitrogen	14190
BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific	23225
0.25% Trypsin/EDTA (gebrauchsfertig)	Invitrogen	25200
0.4 % Trypanblau	Sigma Aldrich	T8154
Separationspuffer	-	-
Homogenisierungspuffer	-	-
Intestinal Waschpuffer	-	-
Lysispuffer	-	-
isotonische Kochsalzlösung	Fresenius	NL1015
Penicillin (10000Units/mL) /Streptomycin (10000µg/mL)	Invitrogen	13465
Glutamax	Invitrogen	35050
SeeBlue® Plus2 Prestained Standard (1x)	Invitrogen	LC5925
NuPAGE 4-12% Bis/Tris Gel (1 mm x12well)	Invitrogen	NP0322
Aceton	JT Baker	8002
Harnstoff	Merck	108488
TBST-Puffer	-	-
Magic Mark™ XP Western Standard	Invitrogen	LC5602
BSA	Fluka	24672887
NuPAGE MOPS SDS Laufpuffer	Invitrogen	NP0001
NuPAGE Transfer Buffer (20x)	Invitrogen	NP0006-1
NuPAGE Antioxidant	Invitrogen	NP0005
NuPAGE Sample Reducing Agent (10x)	Invitrogen	NP0009
NuPAGE LDS Sample Puffer (4x)	Invitrogen	NP0007
ECL Western Lightning™	Perkin Elmer LAS, Inc	NEL105

Chemiluminescence Reagent Plus		
Nitrocellulose Membran Protan	Whatman/Schleicher & Schuell	4675.1
Magermilchpulver Blotting Grade	Roth	T145.2
Anti CYP3A (P6)	von Santa Cruz Biotechnology, INC.	sc-53246
Anti CYP2B1/2	Abcam plc	ab22719
Anti CYP2D1	Biomol International, LP	CR3210
Anti CYP2C6	Abcam plc	ab22723
Anti CYP2C11	Biodesign International	H732030M
Anti CYP1A1	Oxford Biomedical Research	PM 10
Anti UGT	Cypex Ltd.	CYP601
Anti 17ß-HSD2 (M-174)	Santa Cruz Biotechnology, INC	sc-32872
Anti PCNA	Abcam plc	ab29
Anti Villin (C19)	santa cruz Biotechnology, INC	sc-7672
Anti Rabbit IgG (whole molecule) peroxidase conjugated	Sigma Aldrich	A0545
Anti Sheep IgG (whole molecule) peroxidase conjugated	Sigma Aldrich	A3415
Anti Mouse IgG (Fc specific) peroxidase conjugated	Sigma Aldrich	A9309
Anti Goat IgG (whole molecule peroxidase conjugated	Sigma Aldrich	A4174
Rat CYP2B1 Supersomes™	Gentest BD Bioscience	456510
Rat CYP3A1 Supersomes™	Gentest BD Bioscience	456501
Rat CYP2C11 Supersomes™	Gentest BD Bioscience	456531
Rat CYP2C6 Supersomes™	Gentest BD Bioscience	456536
Rat CYP2D1 Supersomes™	Gentest BD Bioscience	456517
Immunhistochemie		
Formaldehydlösung min. 37 %	Merck	1.04003
Ethanol	Merck	1.00983
Isopropranolol	Merck	1.09634
Xylol	Merck	818754
Paraplast®	spi supplies	02847-AB
10x PBS-Waschpuffer	Dianova	DLN-14300
Norma goat serum (NGS)	Invitrogen	13578
Proteinblock Serumfrei	Dako	X0909
Zitratpuffer	-	-
30 % Wasserstoffperoxid	Fluka	95300

Biogenex-Kit	Dako	G53635
NOVA Detect Hämatoxylin	Dianova	DLN-15900
Hämatoxylin-Eosin-Färbung	Dianova	DLN-16757
PBS-BSA	Dianova	DLN-14222
Anti-Ki-67	DCS	3543553
NOVADetect HRPO/DAB Standard StreptAB Kit	Bionova	DLN-13154
Mountingmedium NOVAMount	Dianova	DLN-15906
metabolische Versuche/Analytik		
Perfusionspuffer	-	-
Phosphatpuffer	-	-
Apo-One-Homogenous-Caspase-3/7-Assay™	Promega	G7790
Interleukin-1ß-Converting-Enzyme-Inhibitor I; Ac-YVAD-CHO	Calbiochem	400010
Zellwaschmedium	-	-
Carbogen	Linde AG	-
ES Medium	-	-
PBS-Puffer (Ca^{2+}, Mg^{2+} frei)	Invitrogen	14190
0.4 % Trypanblau	Sigma Aldrich	T8154
Testosteron	BSP Substanzbank	-
Midazolam Maleatsalz	Sigma Aldrich	M2419
Bupropion Hydrochlorid	Calbiochem	153760
Dextromethorphan Hydrobromid	ICN Biomedicals	153544
1OH Midazolam	Fisher Scientific	NC9668221
3-Methoxymorphinan Hydrochloride	Sigma Aldrich	M187
3-Hydroxymorphinan Hydrobromide	Sigma Aldrich	H156
Androstenedion	Sigma Aldrich	46033
Testosteron-ß-D-glucuronid-Na	Sigma Aldrich	T8157
6ß-Hydroxytestosteron	BSP Substanzbank	-
16ß-Hydroxytestosteron	Sigma Aldrich	UC289
Hydroxybupropion	Calbiochem	NC9584546
Natriumhydroxid	Merck	106462
Dextrorphan	Sigma Aldrich	UC205
Stopplösung	-	-
Salzsäure rauchend 37 %	Merck	113386
Ethylacetat	Merck	1.09623
Methanol	Merck	1.06007
Acetonitril	Merck	1.00030
98-100 % Ameisensäure	Merck	1.00264

DMSO	Merck	1.09678
1-ABT	Sigma Aldrich	A3940
Caco2 Permeation		
DMEM Medium	Invitrogen	U3938
Zellkulturmedium	-	-
HBSS-Puffer (Ca^{2+},Mg^{2+} frei)	Invitrogen	U7630
Transportpuffer	-	-
Stopplösung	-	-

2.3. Zusammensetzung der Puffer

Die Substanzen, die keinen Eintrag unter der Spalte „Firma“ besitzen, wurden von VWR bestellt.

Bezeichnung	Konz.	Zusammensetzung	Firma
Waschpuffer pH 7.4	96 mM	NaCl	
	1.5 mM	KCL	
	8 mM	KH_2PO_4	
	56 mM	NaH_2PO_4	
	27 mM	Na-Citrat	Sigma Aldrich
Separationspuffer pH 7.4	137 mM	NaCl	
	2.68 mM	KCl	
	1.47 mM	KH_2PO_4	
	8.1 mM	Na_2HPO_4	
	1.5 mM	EDTA	
	0.5 mM	D/L DTT	Sigma Aldrich
	3 U/mL	Heparin	Sigma Aldrich
Homogenisierungspuffer pH 7.0	5 mM	Histidin	Sigma Aldrich
	250 mM	Saccharose	Sigma Aldrich
	0.5 mM	EDTA	
	1 Tablette auf 100 mL	Complete Protease Inhibitor	Roche
Lysispuffer pH 7.4	50 mM	Tris/HCl	Sigma Aldrich
	1.5 mM	NaCl	
	2 mM	EDTA	
	1 %	Triton-X 100	Sigma Aldrich
Zitratpuffer pH6.0	10mM	Zitronensäure	Sigma Aldrich

Perfusionspuffer pH 7.4	119 mM	NaCl	
	4.8 mM	KCl	
	1.2 mM	KH_2PO_4	
	2.5 mM	$NaHCO_3$	Riedel de Häen
	1.2 mM	$MgSO_4$ x $7H_2O$	Riedel de Häen
	5 mM	alpha D-Glucose	Serva
	0.67 mM	Glutamin	Invitrogen
	20 mM	Hepes pH 6.8-8.2	Sigma Aldrich
	2 %	Pen (100U/mL) /Strep (100µg/mL)	Invitrogen
	1 Tablette auf 100 mL	complete protease inhibitor	Roche
Zellwaschmedium pH 7.4	500 mL	Optimem (gebrauchsfertig)	Invitrogen
	5 mM	alpha D-Glucose	Serva
	0.67 mM	Glutamax (200 mM)	Invitrogen
	2 %	Pen (100U/mL)/Strep (100µg/mL)	Invitrogen
	2 %	FCS	Invitrogen
TBST-Puffer pH7.6	10 mM	Tris/ HCl	
	150 mM	NaCl	
	0.05 %	Tween 20	Sigma Aldrich
Zellkulturmedium	500 mL	DMEM Medium	Invitrogen
	10 %	FCS	Invitrogen
	1 %	Pen (100U/mL) /Strep (100µg/mL)	Invitrogen
			Invitrogen
	1 %	Glutamax (200mM)	Invitrogen
	1 %	NEAA (x100)	Invitrogen
Transportpuffer	128 mM	NaCl	
	5.4 mM	KCl	
	1 mM	$MgSO_4$*$7H_2O$	Riedel de Häen
	1.8 mM	$CaCl_2$ * $2H_2O$	Riedel de Häen
	1.2 mM	Na_2HPO4*$7H_2O$	
	0.4 mM	NaH2PO4 * H2O	
	15 mM	Hepes (pH range 6.8-8.2)	Sigma Aldrich
	20 mM	alpha D-Glucose	Serva
	4.2 mM	$NaHCO_3$	Riedel de Häen
Stopplösung	1 µM	Interner Standard MeOH (gebrauchsfertig)	

2.4. Tierhaltung

Für alle Versuche wurden männliche Han Wistar Ratten mit einem Gewicht zwischen 200 und 350 Gramm verwendet. Die Tiere wurden unter kontinuierlichen Bedingungen: 22 °C

Raumtemperatur (RT), 12 h Tag/Nacht Zyklus und freiem Zugriff zu Wasser bzw. Standardfutter gehalten

2.5. Gewebepräparation zur Analyse der Proteinexpression

Die Gewebepräparation wurde ausschließlich an Ratten vorgenommen, die mittels Isofluran betäubt und mittels Genickbruch getötet wurden.

2.5.1. Präparation von Organhomogenaten

Aus dem geöffneten Bauchraum wurden zuerst Leber, Niere, Lunge mit eiskaltem PBS-Puffer (Ca^{2+}, Mg^{2+} frei) über zuführende Gefäße perfundiert um sie blutfrei zu spülen. Nach Entnahme der Organe wurden sie gewogen und danach in eiskalten Homogenisierungspuffer überführt. Zum Schluss wurde der Darm vom Pylorus bis zum Caecum entnommen, die Nahrungsreste mittels eiskalten PBS-Puffers heraus gespült und der Darm in drei gleich große Teile geteilt. Nach Bestimmung der Gewichte wurden die einzelnen Darmstücke in eiskalten Homogenisierungspuffer überführt. Alle Organe wurden mittels Skalpell in ca. 2 x 2 mm Stücke fein zerkleinert und mittels Potter-S-Homogenisator bei 500 rpm homogenisiert. Nach 5 minütiger Zentrifugation bei 850 x *g*, 4 °C wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und das Volumen und die Proteinkonzentration (siehe Abschnitt 2.6.1) bestimmt. Bis zur Weiterverarbeitung wurden die Proben bei -80 °C in Aliquots eingefroren.

2.5.2. Herstellung von Intestinalhomogenaten

Die Präparation erfolgte nach der abgewandtelten Methode von Mohri et al. (Mohri und Uesawa 2001). Dafür wurden der gesamte Dünndarm und Dickdarm (ca. 100-120 cm) entnommen und mit eiskaltem Waschpuffer gut gespült, um Nahrungsreste zu entfernen. Beginnend am Pylorus wurde der Darm in 3 cm lange Abschnitte geteilt. Die ersten drei Abschnitte hinter dem Pylorus wurden dem Duodenum und der letzte Abschnitt vor dem Caecum dem Ileum zugeordnet. Alle Proben hinter dem Caecum wurden dem Colon zugeordnet, während die Abschnitte zwischen Duodenum und Ileum zum Jejunum gehörten, dass in der Ratte, abhängig von der Darmlänge, zwischen 23 und 27 Abschnitte einnahm (Sharp und LaRegina 1998). Während der gesamten Isolation wurde auf Eis gearbeitet und auch eiskalte Puffer verwendet. Jeder Darmabschnitt mit wurde eiskaltem Separationspuffer gespült. Die Isolierung der Zellen aus dem Darm erfolgte durch sanftes Pressen des Darms mit einer Pinzette. Dieser Ablauf wurde für jedes Segment jeweils drei Mal wiederholt. Die

isolierten Zellen wurden mit Homogenisierungspuffer gewaschen und anschließend bei 800 x *g*, 5 min, 4 °C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in neuen Homogenisierungspuffer resuspendiert und mittels Potter-S-Homogenisator bei 500 rpm, 10 Hübe aufgeschlossen. Der Überstand wurde nach abermaliger Zentrifugation (850 x *g*, 10 min, 4 °C) und Bestimmung der Proteinkonzentration (siehe Abschnitt 2.6.1) bei -80 °C weggefroren.

2.5.3. Isolation der einzelnen Enterozytenpopulationen

Für die Isolation unterschiedlicher Enterozytenpopulationen wurde nicht der gesamte Darm verwendet, sondern ein ca. 30 cm langes Stück des oberen Jejunums. Das isolierte Darmstück wurde nach dem Spülen (PBS-Puffer) mit Separationspuffer gefüllt und die Enden mit chirurgischem Faden abgebunden. Dieses Darmfragment wurde in PBS-Puffer (+ 20 % Glycerin) überführt und unter Schütteln 5 min im Brutschrank (37 °C, 5 % CO_2) inkubiert. Anschließend wurde der Darm vorsichtig massiert und geöffnet. Der Darminhalt wurde verworfen, da es sich hauptsächlich um Nahrungsreste und gelöster Mucus handelte. Danach wurde der Darm erneut mit Separationspuffer gefüllt und für weitere 10 min im Brutschrank inkubiert. Der Darm wurde abermals vorsichtig massiert, geöffnet und die isolierten Zellen in ein Falconröhrchen überführt. Diese Prozedur wurde noch drei weitere Male, unter Verwendung einer 10 minütigen Inkubationszeit wiederholt. Die daraus resultierenden Zellfraktionen wurden anschließend mikroskopisch einer Enterozytenpopulation zugeordnet und fotografiert. Alle Zellfraktionen wurden nach der Zuordnung für 5 min, bei 50 x *g* und bei 4 °C zentrifugiert und in frischen PBS-Puffer vorsichtig resuspendiert. Dieser Waschschritt wurde noch zwei weitere Male wiederholt. Von jeder Zellfraktion wurde anschließend 5 mL abgenommen, bei 100 x *g*, 5 min, 4 °C zentrifugiert und das Zellpellet mit 5 mL Lysispuffer resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Abschließend wurden die lysierten Zellen 10 min bei 10000 x *g* und 4 °C zentrifugiert, um die Zellkerne zu entfernen. Der Überstand wurde nach Bestimmung der Proteinkonzentration (siehe Abschnitt 2.6.1) bei -80 °C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

2.6. Biochemische Methoden

2.6.1. Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Menge an Protein in den jeweiligen Proben wurde mittels des „Bicinchoninsäure (BCA) Assay Protein Kit“ von Pierce bestimmt. Diese Methode beruht auf einer zwei Schritt

Reaktion. In der ersten Reaktion findet eine Chelierung von Kupfer satt und bildet einen blauen Komplex (Biuret Reaktion). In der zweiten Reaktion reagiert BCA, ein hoch sensitives und selektiv, kolorimetrisches Detektionsreagenz mit dem Kupfer. Dieser BCA/Kupfer-Komplex hat eine violette Farbe, ist wasserlöslich und zeigt bei einer Wellenlänge von 562 nm eine lineare Absorption in Abhängigkeit von der Proteinmenge der Probe. Für die Proteinmessung wurden die Proben im jeweiligen Puffer zweifach, fünffach und zehnfach in Doppelbestimmung verdünnt und der Versuch nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.6.2. LDS-Polyacrylamid-Gelektrophorese (LDS-PAGE)

Die LDS-PAGE dient dazu, Proteine anhand ihres Molekulargewichts aufzutrennen. Polyacrylamid bildet ein engmaschiges Netz, das kleine Proteine schneller überwinden können, als Größere. Lithiumdodecylsulfat (LDS) bindet an die Peptidbindungen der Proteine und bildet einen LDS-Proteinkomplex. LDS ist ein negativ geladenes Molekül und bewirkt, unabhängig von der Eigenladung der Proteine, eine negative Gesamtladung dieser Proteine mit konstantem Ladungs-Masse-Verhältnis.

Für die Gelelektrophorese wurden 100 µg Protein enthaltende Lysat- bzw. Homogenatmengen mit dem 5fachen Volumen an Aceton bei -80 °C über Nacht ausgefällt, anschließend für 5 min bei 8000 x *g*, 4 °C zentrifugiert und in 8 M Harnstoff (10 µL auf 100 µg Protein) resuspendiert. Nach Zugabe des gleichen Volumens an LDS-Probenpuffer (2 x) erfolgte die Denaturierung der Proben für 30 min bei 55 °C unter starkem Schütteln. Anschließend wurden die Proteine (100 µg Protein pro Geltasche) in einem 4-12 % Bis/Tris Gel bei 200 V für ca. 1 h unter Eiskühlung der Gelkammer aufgetrennt. Als Marker wurde eine gefärbte Proteinmischung (Seeblue Marker®, Invitrogen; 5 µL), sowie eine Proteinmischung (Magic Marker®, Inivitrogen; 2.5 µL), die durch den Sekundärantikörper erkannt wird und somit über ein Chemilumineszens-Signal verfügt, verwendet. Als Positivkontrolle wurde ein Leberhomogenat (25 µg) der Ratte eingesetzt.

2.6.3. Western Blot Detektion

Die in der LDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden durch Elektrotransfer auf eine Nitrozellulose Membran übertragen. Der Transfer erfolgte über 1 h bei konstanten 30 V in einer eisgekühlten Semidry-Blot-Apparatur. Anschließend wurden die Membranen 3 x 5 min mit TBST-Puffer gewaschen und mit 5 % (m/V) Magermilch in TBST-Puffer für 1 h bei RT unter Schütteln gesättigt. Nach wiederholtem Waschen (3 x 5 min mit TBST-Puffer) erfolgte

die Inkubation mit den Primärantikörpern in TBST-Puffer / 1 % (m/V) BSA über Nacht bei 4 °C. Unspezifisch gebundene Antikörper wurden durch mehrmaliges Waschen mit TBST-Puffer (3 x 5 min) entfernt. Die Detektion der gebundenen Antikörper erfolgte mit Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörpern. Die Inkubation der Sekundärantikörper erfolgte unter Schütteln über 1 h (RT) in TBST-Puffer/1 % (m/V) BSA. Zur Färbung der Antigen-Antikörper-Komplexe wurden die Membranen abermals mit TBST-Puffer (3 x 5 min) gewaschen, kurz getrocknet und mit 2 mL Luminol Reagenz (ECL Western Lightning™) für 1 min inkubiert. Nach Entfernen der überschüssigen Flüssigkeit wurden die chemilumineszierenden Banden mit Hilfe des ChemiDoc™ XRS detektiert und fotografiert. Die Banden wurden anschließend densitometrisch unter Zuhilfenahme der Quantity One 1-D Software™ ausgewertet. Alle verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sind unter Chemikalien (siehe Abschnitt 2.2) aufgelistet, während die eingesetzten Antikörperverdünnungen im Anhang 1 zu finden sind.

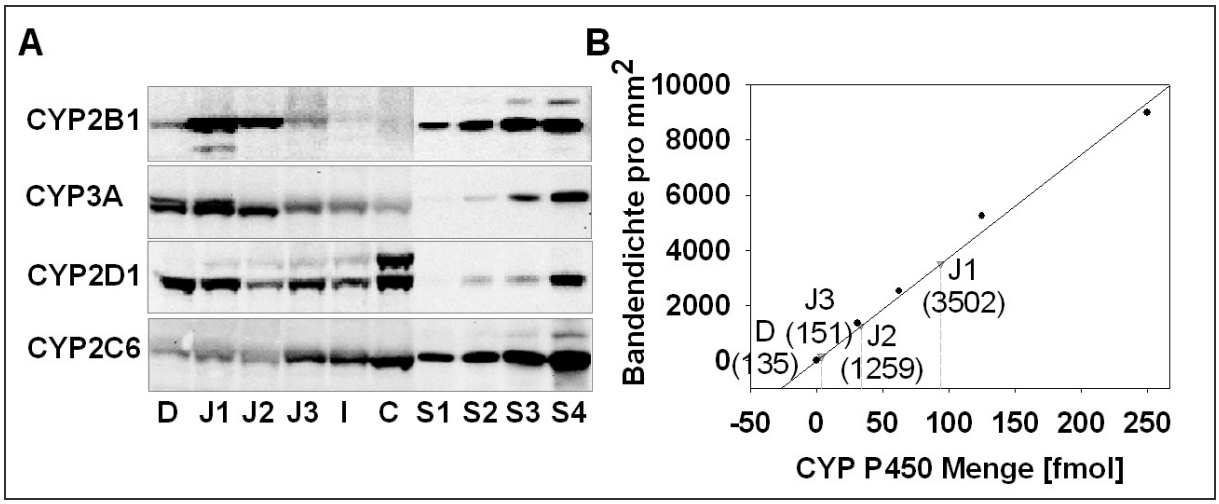


Abbildung 6: Schematische Darstellung der CYP P450 Quantifizierung mittels Supersomen™
In **A)** ist ein Beispiel eines Western Blots zur Quantifizierung von CYP 450 dargestellt (D: Duodenum; J1: oberes Jejunum; J2: mittleres Jejunum; J3: unteres Jejunum; I: Ileum; C: Colon; S1-4: Supersomen™-Standartds. Die Bandendichte der Supersomen™-Standards wurden verwendet, um daraus, wie in **B)** am Beispiel von CYP2B1 dargestellt, Standardreihen zu erstellen.

2.6.4. Quantifizierung der CYP P450 Expression

Für die absolute Quantifizierung der CYP P450 Expression wurden Supersomen™ mit rekombinanten CYP P450 Isoformen eingesetzt. Bei den Supersomen™ handelt es sich um isolierte Mikrosomen von Baculovirus infizierten Insektenzellen, die ein rekombinantes CYP P450 Enzyme der Ratte enthalten, deren Konzentration genau definiert ist (Herstellerangaben). Supersomen™ mit den Isoformen CYP3A1, 2B1, 2C6, 2D1 standen dabei für die Quantifizierung zur Verfügung. Für die Quantifizierung wurden verschiedene

Mengen einer CYP P450 Isoform in der LDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und densitometrisch ausgewertet.
Mit Hilfe der ermittelten Bandendichte der Supersomen™ und der absoluten CYP P450 Menge wurde eine Standardgerade generiert, anhand dessen die absoluten Mengen der CYP P450 Isoformen in den Darmhomogenaten und Zelllysaten berechnet werden konnte. In Abbildung 6 ist die Quantifizierung der CYP P450 Proteine entlang der horizontalen Darmachse bildlich dargestellt.

2.6.5. Immunhistochemische Färbung

Die Ratte wurde mittels Äther kurz narkotisiert und anschließend durch öffnen der Halsschlagader getötet und entblutet. Nach Öffnen des Bauchraumes wurde der Darm entnommen und ein ca. 0.5 cm lange Darmstücke direkt nach dem Pylorus (Duodenum), der Dünndarmmitte (Jejunum), direkt vor dem Caecum (Ileum), vom Caecum und direkt nach dem Caecum (Colon) herausgeschnitten und getrimmt. Diese Darmstücke wurden anschließend in 10 % Formaldehyd überführt und dort für 24 h bei RT entwässert. Die entwässerten Organstücke wurden in eine ansteigende Alkoholreihe (70 %-,80 %-, 2 x 96 %-Ethanol (EtOH), 2 x Isopropranol, 3 x Xylol, 2 x Paraffin je 10 min) weiter entwässert und somit auf das Eindecken mit Paraffin vorbereitet. Im Anschluss wurden die Organe in histologische Einbettkassetten überführt und mit Paraffin (60 °C) eingeblockt. Die Organstücke in den Paraffinblöcke wurden mit einem Mikrotom in 4-6 µm dicke Schnitte geschnitten und vorsichtig auf Objektträger (Superfrost plus®) gezogen. Bis zur immunhistochemischen Färbung wurden die Schnitte trocken und dunkel bei RT gelagert.
Grundlage der immunhistochemischen Färbung ist eine Antigen-Antikörperreaktion, die es erlaubt ein spezifisches Protein in Gewebeschnitten nachzuweisen. Hierbei wurden die Paraffinschnitte der einzelnen Darmabschnitte auf die Expression der Markerproteine Villin (maturierte Enterozyten) und Ki-67 (juvenile Enterozyten) und auf die CYP3A Expression hin untersucht. Die Immunfärbung selber erfolgte nach der Streptavidin/Biotin-Komplex-Methode (StreptABC-Methode), diese beruht auf der starken Affinität zwischen Streptavidin und Biotin.
Für die Färbung wurden die Organschnitte für 10 min in Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe (1 x Xylol, 2 x Isopropranol, 2 x 96 %-, 1 x 70 %- und 1 x 50 %-EtOH jeweils kurz gespült) hydratisiert und in destilliertes Wasser überführt. Um eine

bestmögliche Bindung zwischen Antigen und Antikörper zu gewährleisten, müssen Antigene in manchen Fällen vor der Färbung über bestimmte Vorbehandlungen konformationell renaturiert werden. Für die hier eingesetzten Antikörper wurden verschiedenen Vorbehandlungen durchgeführt, die im Anhang 2 zusammengestellt sind. Die in den Geweben befindlichen Peroxidasen wurden am Anschluss an die Vorbehandlung und eines kurzen Waschschritts in PBS-Waschpuffer mittels 3 % Wasserstoffperoxid-Lösung für 15 min, RT geblockt. Nach dem Spülen der Schnitte in PBS-Waschpuffer wurden sie mit Ziegenserum (Anti-CYP3A) bzw. Proteinblock (Anti-Ki-67, Anti-Villin) 10 min bei RT inkubiert, um die unspezifischen Bindungen zu sättigen. Danach erfolgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper. Dazu wurden alle Schnitte mit 50 µL der jeweiligen Primärantikörperverdünnung (in PBS-BSA) versetzt und für 40 min bei RT inkubiert. Nach einem kurzen Waschschritt (PBS-Waschpuffer) wurden die Organschnitte mit 50 µL einer Sekundärantikörperlösung (in PBS-BSA) für 20 min bei RT inkubiert. Nach einem weiteren Waschschritt erfolgte die Inkubation der Schnitte mit dem präformierten Streptavidin-Peroxidase-Konjugat für 20 min bei RT. Danach erfolgten ein erneuter Waschschritt und die Inkubation der Schnitte mit Diaminobenzidin-Lösung (DAB-Lösung) für 2-3 min bei RT. Durch die an den Konjugaten gebundene Peroxidase wurde die Färbung der markierten Proteine in den Schnitten, über DAB-Oxidation ausgelöst. Im Anschluss wurden die Schnitte, nach einem kurzen Waschschritt (PBS-Waschpuffer) in Hämatoxylin-Lösung 5-10 min gegengefärbt.

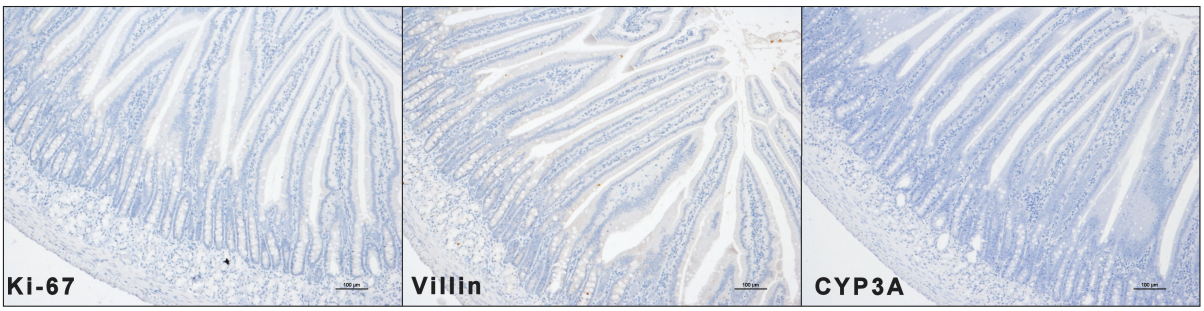


Abbildung 7: Negative Kontrollen der Immunhistologischen Detektion
Die negativen Kontrollen der einzelnen Antikörperbehandlungen wurden jeweils nur im Duodenum durchgeführt. Die Proben wurden nicht mit Primärantikörper behandelt und sollen auf unspezifische Bindungen der Sekundärantikörper mit dem Organ oder mit Blockproteinen hinweisen.

Zur besseren Darstellung der Darmmorphologie wurden zusätzliche, unbehandelte Paraffinschnitte aller Darmregionen erst über eine Alkoholreihe (siehe oben) hydratisiert und geklärt. Diese wurden anschließend für 10 min in Hämatoxylin-Eosin-Lösung gefärbt. Alle Schnitte wurden dann erneut kurz in destilliertem gewaschen und über eine kurze Alkoholreihe und Xylol (1 x 1 min 95 % EtOH, 2 x 3 min 100 % EtOH, 2 x 5 min Xylol)

dehydriert und geklärt. Abschließend wurden die gefärbten Schnitte mit Eindeckmedium ein- und mit Deckgläsern ab-gedeckt. Die Spezifität der Sekundärantikörper wurde anhand von Gewebeschnitten des Duodenums überprüft. Es konnten keine unspezifischen Bindungen festgestellt werden (siehe Abbildung 7). Die verwendeten Kits und genauen Antikörperverdünnungen sind im Anhang 2 aufgelistet.

2.7. Funktioneller Assay mittels primären Enterozyten-Modell

2.7.1. Isolation der maturierten, primären Ratten-Enterozyten

Aufgrund des sehr hohen Sauerstoffbedarf der Enterozyten müssen alle verwendeten Puffer und Medien vor Versuchsbeginn carbogenisiert werden (Kight und Fleming 1993; Saravi et al. 1997). Nach Tötung der mit Isofluran betäubten männlichen Ratten mittels Genickbruch wurde ein 30 cm langes Darmstück des oberen Jejunums entnommen und mit 37 °C warmen Perfusionspuffer gut gespült. Danach wurde der Darm in Perfusionspuffer, der 5 µM des Apoptosehemmers Interleukin-1ß-Converting-Enzyme-Inhibitor-I (ICE-Inhibitor-I) enthielt, überführt und dort bis zum Beginn der Isolation inkubiert (ca. 10 min). Zur Isolation der Enterozyten wurde das Darmstück mit 0.5 mM DTT in Perfusionspuffer (37 °C) gefüllt und die Enden mit chirurgischem Faden abgebunden. Danach wurde das Darmstück in Perfusionspuffer überführt, unter Schütteln 5 min im Brutschrank (37 °C, 5 % CO_2) inkubiert, danach vorsichtig massiert und geöffnet. Der Inhalt dieser ersten Fraktion wurde verworfen, da diese hauptsächlich Nahrungsreste und gelösten, durch DTT reduzierten Mucus enthielt. Danach wurde die Prozedur wiederholt, allerdings mit einer verlängerten Inkubationszeit (20 min). Anschließend wurde der Darm erneut vorsichtig massiert und geöffnet. Der Darminhalt, der nun hauptsächlich isolierte Enterozyten enthielt, wurde in ein Falconröhrchen überführt und zwei Mal mit frischem Zellwaschmedium gewaschen (50 x *g*, 5 min, RT). Danach wurde die Zellsuspension mit gleichem Volumen 0.25 % Trypsin/EDTA-Lösung versetzt und für 2-3 min trituiert. Die Trypsinaktivität wurde durch Zugabe von 10 % FCS in Zellwaschpuffer gestoppt. Die Zellen wurden danach für 5 min bei 100 x *g*, RT herunter zentrifugiert und in frischen Zellwaschpuffer resuspendiert. Zur Bestimmung der Zellzahl in der Suspension wurde ein Aliquot der Zellsuspension im Verhältnis 1 + 4 mit Trypanblaulösung (0.4 %) gemischt, und die Zellzahl mikroskopisch mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Für den sich anschließenden metabolischen Assay wurde die Zellfraktion auf 3 Millionen (Mio) Zellen/mL mit Zellwaschpuffer verdünnt. Außerdem

wurde auch die Proteinkonzentration der Zellverdünnung bestimmt. Dazu wurden 15 Mio Zellen (5 mL) entnommen, für 5 min bei 150 x *g*, RT zentrifugiert, das Zellpellet in 5 mL Lysispuffer aufgenommen und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Proben wurden danach, zur Abtrennung der Zellkerne, erneut für 10 min, bei 10000 x *g*, 4 °C zentrifugiert und die Proteinkonzentration (siehe Abschnitt 2.6.1) des Überstands bestimmt.

2.7.1.1. Vitalitätsbestimmung der Enterozyten

Zur Überprüfung der Vitalität der primären Ratten-Enterozyten wurde die Caspaseaktivität bestimmt. Dazu wurde ein kommerziell erhältlicher Assay eingesetzt. Die Caspaseaktivität wird reflektiert durch die Generierung eines fluoreszierenden Spaltungsprodukt aus einem nicht-fluoreszierenden Caspasesubstrat (Rhodamin 110 Derivat; Z-DEVD-R110) und korreliert direkt mit der Apoptoserate der Enterozyten. Die Durchführung des Assays erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Zellen wurden auf 20000 bzw. 40000 Zellen/mL verdünnt und davon jeweils 50 µL auf schwarze lichtundurchlässige 96-Loch-Platten pipettiert. Zu den Zellen wurden 50 µL Assayreagenz gegeben und der Ansatz für 30 min, RT, unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Fluoreszenz im GENios Plattenreader (Ex. 485 nm/Em. 535 nm) detektiert. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt. Ein Caspasewert unterhalb von 2000 Counts/40000 Zellen reflektiert eine niedrige Apoptoseaktivität und wurde daher als Akzeptanzkriterium festgelegt.

2.7.2. Metabolischer Stabilitätsassay mit primären Ratten-Enterozyten

Zur Darstellung der Funktionalität des primären Ratten-Enterozyten-Modells wurde die metabolische Aktivität der Zellen anhand verschiedener Test-Substanzen über mehrere Zeitpunkte hinweg bestimmt. Der Assay wurde in einer 48-Loch-Zellkulturplatte durchgeführt. Zu Beginn des Experiments wurden in die Plattenvertiefungen jeweils 150 µL einer 1.67fach konzentrierter Substanzlösung in Zellwaschmedium (bezogen auf die Endkonzentration im Ansatz) für 8 Zeitpunkte vorgelegt. Die 0 min-Werte wurden sofort mit 250 µL eiskalter Stopplösung abgestoppt. Zum Start der Reaktion wurden 100 µL der Enterozytenverdünnung (3 Mio Zellen/mL) zu jeder Substanzlösung gegeben und der Ansatz in einem Brutschrank (37 °C, 5 % CO_2) unter Schütteln inkubiert. Die 0 min-Werte wurden sofort auf eine 96-Tiefloch-Platte überführt, dicht verschlossen und bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C (mindestens 12 h) weggefroren. Zu den jeweiligen Zeitpunkten wurden die Ansätze durch Zugabe von je 250 µL eiskalter Stopplösung abgestoppt, die

Proben in eine 96-Tiefloch-Platte überführt und bei -20 °C bis zur Weiterverarbeitung (mindestens 12 h) weggefroren. Zur Weiterverarbeitung wurden die Proben für 15 min, bei 1600 x *g*, 4 °C zentrifugiert, der Überstand in HPLC- bzw. LC-MS/MS-Gefäße überführt und die Substrat- und Metabolitenkonzentrationen analytisch bestimmt.

2.7.3. Auswertung des funktionellen Enterozyten-Assays

Die Peakflächen der HPLC bzw. der LC-MS/MS Analytik wurden mittels Standardkurven in Konzentrationen umgewandelt.

2.7.3.1. Bestimmung der Initialgeschwindigkeit

Die Initialgeschwindigkeit einer enzymatischen Reaktion gibt an wie gut ein Substrat vom Enzym erkannt und umgesetzt wird, bevor andere Faktoren, wie Energiemangel, Vitalität der Zellen, Substratverbrauch die Reaktion verlangsamen. Um die Initialgeschwindigkeit zu bestimmen, wurde die Substanzkonzentration der Substrate in Stoffmenge abgebauter Substanz pro mg Enterozyten-Protein (E-Protein) bzw. pro 1 Mio Zellen umgerechnet (siehe Formel 1). Die Konzentration der Metaboliten wurde nach der gleichen Formel in Stoffmenge gebildeter Substanz pro mg E-Protein bzw. pro 1 Mio Zellen umgewandelt, wobei die Ausgangskonzentration hier den Wert 0 einnimmt. Die berechneten Stoffmengen wurden in Konzentrations-/Zeitdiagramme dargestellt und dann die Steigung der linearen Phase als Initialgeschwindigkeiten abgelesen.

$$n_t = \frac{C_{oh} - C_t}{Z} \quad oder \quad n_t = \frac{C_{oh} - C_t}{P}$$

Formel 1: Berechnung der metabolisierten und gebildeten Stoffmengen.
$\mathbf{n_t}$: abgebaute oder gebildete Stoffmenge [pmol/1 Mio Zellen]oder [pmol/mg E-Protein]; $\mathbf{C_{0h}}$: Ausgangskonzentration [pmol/mL]; $\mathbf{C_t}$**:** Konzentration Substrat zum Zeitpunk t [pmol/mL]; **P:** Proteinmenge im Versuch in [mg/mL]; **Z:** Zellzahl im Versuch in [Zellen/mL]

2.7.3.2. Berechnung intrinsischen Clearance der primären Enterozyten ($CL_{int\ pE}$)

Die CL_{int} reflektiert die Fähigkeit des Darms eine Substanz zu metabolisieren ohne Einflussfaktoren, wie Blutfluss, Proteinbindung, Absorption etc. Der Quotient aus der Stoffmenge der metabolisierten Substanz und der Fläche unter der Konzentrations-/Zeit-Kurve (AUC) ergibt die $CL_{int\ pE}$ der Substanz. Die Stoffmenge an metabolisierter Substanz wurde mittels Formel 1 berechnet, wobei hier C_t der Konzentration des letzten Inkubationszeitpunkt entspricht. Die AUC wurde anschließend über die Formel 2 berechnet.

$$AUC_{1\to n} = \sum_{1\to n}\left\{\left(\frac{C_n + C_{n+1}}{2}\right)\times\left(t_{n+1} - t_n\right)\right\}$$

Formel 2: Berechnung der Fläche unter der Konzentrations-/Zeit-Kurve mittels Trapezregel.
C: Konzentration unmetabolisierter Substanz [nmol/µL]; t: Inkubationszeit [min]; $AUC_{1\ n}$: Fläche unter der Konzentration/Zeit-Kurve [(nmol x min)/µL]

2.8. Funktioneller Assay mittels „Everted Sac" Modell

2.8.1. Isolation von „Everted Sacs"

Als „Everted Sac" bezeichnet man umgestülpte und gefüllte Darmsegmente, die zur Charakterisierung der intestinalen Stabilität und Permeation von Arzneimittelkandidaten über die Darmwand eingesetzt werden. Vor dem Versuch wurden wiederum alle verwendeten Puffer und Medien 10 min carbogenisiert. Für die Präparation der „Everted Sacs" wurde das, mit eiskalter isotonischer Natriumchloridlösung (supplementiert mit 5 mM Glutamin und 2 % Pen/Strep) gespülte Jejunum eingesetzt. Zum Umstülpen des Darms wurde durch das Darmlumen ein Draht gezogen und der Darm mittels Drahthaken umgestülpt. Der umgestülpte Darm wurde in 37 °C warmen ES-Medium (supplementiert mit 5 µM Apoptosehemmer ICE-Inhibitor-I) überführt, dort ca. 10 min inkubiert, anschließend mit ES-Medium prall gefüllt und an den Enden mit chirurgischem Faden abgebunden. Von diesem abgebundenen Darm wurden aus verschiedenen Bereichen des Jejunums 2-3 cm lange Darmstücke („Everted Sacs") abgeschnürt, die dann für die funktionellen Assays eingesetzt wurden.

2.8.2. Metabolischer Stabilitätsassay mit „Everted Sacs"

Für jeden Versuch wurden 4-8 präparierte „Everted Sacs" (ES) verwendet. Inkubationsgefäße (Packard Gefäße) wurden mit 10 mL Zellwaschmedium (37 °C, frisch carbogenisiert) gefüllt und mit Substanz versetzt. Gleich nach Zugabe der Substanz wurden drei Aliquots entnommen (**0 h-Wert**). Danach wurden die frisch präparierten „Everted Sacs" zu den Inkubationsgefäßen gegeben und anschließend bei 37 °C unter Schütteln und dicht verschlossen inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die „Everted Sacs" aus dem Medium entfernt, vom Medium drei Aliquots entnommen (**mukosale Seite**). Die entnommenen „Everted Sacs" wurden mit isotonischer Natriumchloridlösung gut gespült, auf einem Papiertuch abgetupft, abgewogen, aufgeschnitten und der Inhalt in Eppendorfgefäße überführt. Von dem Inhalt (**serosale Seite**) wurde jeweils ein Aliquot entnommen. Der

entleerte Darm wurde mittels isotonischer Natriumchloridlösung gut gespült, auf einem Papiertuch abgetupft, erneut abgewogen und anschließend mit 5 mL 1 M Natriumhydroxid-Lösung (NaOH-Lösung; 37 °C) unter Schütteln 2 h lang verdaut. Danach wurde der Verdau mittels 6 M HCL neutralisiert und drei Aliquots entnommen (**Darmproben**). Ein weiteres Aliquot (500 µL) wurde zur Proteinkonzentrationsbestimmung (siehe Abschnitt 2.6.1) verwendet. Die jeweiligen Konzentrationen der Test-Substanzen im Ansatz und die Volumina der abgenommenen Aliquots sind in Tabelle 2 dargestellt. Außerdem wurden alle Substanzen und deren Metaboliten auf die Stabilität in 1 M Natriumhydroxid-Lösung hin getestet und waren alle ausnahmslos stabil.

Tabelle 2: Konzentration der Test-Substanzen im Ansatz und in der Stammlösung bzw. Volumina der entnommenen Aliquots.

Substanz	$C_{Stammlsg.}$ [mM]	C_{Assay} [µM]	Analytik	Probe	$V_{Aliquots}$ [µL]
MDZ,DEX, BUPR	**10**	**3**	LC-MS/MS	0 h-Wert	200
				mukosale Seite	200
				serosale Seite	200
				Darmprobe	200
TESTO	**50**	**25**	HPLC	0 h-Wert	750
				mukosale Seite	750
				serosale Seite	600
				Darmprobe	750

V: Volumen; C: Konzentration; MDZ: Midazolam; DEX: Dextromethorphan; BUPR: Bupropion; TESTO: Testosteron

2.8.2.1. Probenaufarbeitung für die LC-MS/MS

Alle entnommenen Aliquots wurden mit gleichen Volumina an Stopplösung versetzt und sofort bei -20 °C bis zur Weiterverarbeitung weggefroren. Für die Weiterverarbeitung wurden die Proben für 15 min, bei 1600 x *g*, 4 °C zentrifugiert, der Überstand in LC-MS/MS-Gefäße überführt und die Substrat- und Metabolitenkonzentration analytisch bestimmt.

2.8.2.2. Probenaufarbeitung für die HPLC

Alle entnommenen Aliquots wurden mit gleichen Volumina an Ethylacetat versetzt, 15 min auf einem Überkopfschüttler extrahiert und anschließend für 10 min bei 5000 x *g*, 4 °C zentrifugiert, um die Phasen zu trennen. Die organische Phase wurde vorsichtig abgenommen, unter Stickstoff abgedampft und abschließend die getrockneten Proben mit MeOH/Wasser (1 + 1) versetzt. Die serosalen Proben bzw. Darmproben wurden in 250 µL, während die mukosalen Proben bzw. die 0 h-Werte in 350 µL MeOH/Wasser (1 + 1) aufgenommen

wurden. Anschließend wurden die Proben 10 s auf einer Whirlmixer gut gemischt, um die trockenen Proben aufzulösen, in HPLC-Gefäße überführt und analytisch vermessen. Außerdem wurde die Extraktionsrate von TESTO und seinen Metaboliten in Ethylacetat ermittelt. Alle untersuchten Substanzen zeigten eine Extraktionsrate zwischen 80-100 % über einen Konzentrationsbereich von 25-0.4 µM (TESTO) bzw. 10-0.14 µM (Metabolite). Die Extraktion wurde daher als vollständig angesehen (siehe Anhang 3).

2.8.3. Auswertung der funktionellen Assays mittels „Everted Sacs“

2.8.3.1. Berechnung der metabolisierten und gebildeten Stoffmenge

Zur Berechnung der metabolischen Aktivität wurden die Substratkonzentrationen mittels HPLC-, bzw. der LC-MS/MS-Analytik bestimmt. Für die Berechnung der Stoffmengen in den entnommen Proben (mukosale, serosale Probe, 0 h-Wert und Darmprobe) wurden die Peakflächen der Analytik und Formel 3 herangezogen. In der Formel 3 berechnet sich das Probevolumen (V_{Probe}) der serosalen Probe aus der Differenz des gefüllten und leeren Darmgewichts, wobei das Gewicht des Inhalts näherungsweise als Volumen der Probe verwendet wird.

$$n = \frac{FE_{Probe}}{m_{SR}} \times VF \times V_{Probe}$$

Formel 3: Berechnung der unmetabolisierten Stoffmenge bzw. Stoffmenge an entstandenen Metaboliten in den „Everted Sac“ Proben.
n= Stoffmenge in der Probe [pmol]; m_{SR}: Anstieg der Standardgeraden [FE/ pM]; VF Verdünnungsfaktor (gilt nur für die HPLC Analytik); V_{Probe}= mukosales Probevolumen [L]; FE: Peakflächen der HPLC bzw. LC-MS/MS Analytik

Im Falle der Darmprobe wird in Formel 3 ein Probevolumen (V_{Probe}) von 0.006 L verwendet, weil durch Zugabe der Darmstücke und der HCL zur Neutralisation ungefähr dieses Volumen erreicht wurde. Es gibt keinen Verdünnungsfaktor für die Proben aus der LC-MS/MS Analytik, weil sowohl die Proben, als auch die Standardreihen mit dem doppelten Volumen an Stopplösung versetzt wurden. Für die extrahierten Proben der HPLC Analytik wurde der Quotient aus Volumen an MeOH/Wasser (1 + 1) zur Auflösung der getrockneten Probe und Volumen des ursprünglich entnommenen Aliquots berechnet und als Verdünnungsfaktor in Formel 3 eingesetzt. Die Summe der Stoffmengen aller entnommenen Proben (mukosale, serosal und Darm-Probe) wurde gebildet und die Differenz zum 0 h-Wert ergibt die abgebaute Stoffmenge. Um alle Darmstücke miteinander vergleichen zu können, wurde die abgebaute Stoffmenge auf 1 mg Gesamtprotein des verwendeten Darmstücks bezogen. Die Bildung der

Metaboliten wurde auf die gleiche Weise berechnet, jedoch ohne den Vergleich zum 0 h-Wert zu ziehen.

Die Methode erlaubt, zusätzlich zur metabolischen Aktivität, Aussagen darüber zu treffen, in welchem Kompartiment eine Substanz oder deren Metaboliten sich anreichern. Dafür wurden die Konzentrationen der serosalen Probe und der mukosalen Probe auf 1 mg „Everted Sac" Proteins (ES-Protein) des verwendeten Darmstücks bezogen, berechnet und miteinander verglichen.

Der metabolische Assay mit dem „Everted Sac"-Modell wurde standardmäßig über den Gesamtproteinanteil der jeweiligen „Everted Sacs" ausgewertet. Daher können die Daten nicht direkt mit dem primären Ratten-Enterozyten-Modell verglichen werden, wo den Daten ausschließlich Enterozyten-Protein (E-Protein) zugrunde liegt. Um einen Vergleich der metabolischen Methoden mit dem jeweiligen Zellmodell zu gewährleisten, wurde in einem zusätzlichen Experiment der Anteil der Proteinmenge der Enterozyten an den „Everted Sacs" bestimmt. Dafür wurden jeweils 5-10 benachbarte Darmstücke (ca. 3 cm) aus dem mittleren Jejunum isoliert, gewogen und entweder im Ganzen mittels 5 mL 1 M NaOH verdaut oder die Enterozyten mittels Spatel abgeschabt und diese ebenfalls in 5 mL 1 M NaOH verdaut. Die Verdauung der Darmstücke bzw. Enterozyten erfolgte unter Schütteln für 2 h bei 37 °C. Anschließend wurden die Proben mittels Zugabe von 6 M HCL neutralisiert und eine Proteinbestimmung (siehe Abschnitt 2.6.1) durchgeführt. Der Quotient aus dem Gesamtproteinmenge der „Everted Sacs" und der Proteinmenge der Enterozyten wurde gebildet (siehe Anhang 4). Ein Vergleich der Daten ergab, dass die Enterozyten circa ein Drittel (1/3.2) der „Everted Sac" Proteinmenge ausmachen. Daher wurden für die Berechnung der Initialgeschwindigkeiten und für die K_m, V_{max} und $CL_{int\ ES}$ die Werte, sowohl für Gesamtprotein der „Everted Sacs", als auch für Proteinmenge der Enterozyten berechnet.

2.8.3.2. Berechnung enzymkinetischer Daten von Testosteron

Der K_m- und V_{max}-Wert wurden nur für den Abbau von TESTO und die Entstehung der TESTO-Metabolite durchgeführt. Dafür wurde der TESTO-Metabolismus über einen Konzentrationsbereich von 5 bis 100 µM über mehrere Zeitpunkte (10, 20, 30, 60 min) verfolgt. Sowohl vom TESTO-Abbau, als auch von der Entstehung seiner Metabolite wurden Konzentrations-/Zeitdiagramme angefertigt und die Initialgeschwindigkeiten im linearen Bereich der Kurven ermittelt. Mittels der Initialgeschwindigkeiten und den zugehörigen Konzentrationen wurde mit Hilfe des Simple-Ligand-Binding-Tool von Sigma Blot™ unter

Annahme einer einseitigen Sättigung, der K_m- und V_{max}-Wert der enzymatischen Reaktion berechnet. Die $CL_{int\ ES}$ wurde darauf aus dem Quotient von V_{max} und K_m für TESTO berechnet.

2.8.3.3. Berechnung der *„First pass" in vivo* Clearance des Test-Substanzen

Um die $CL_{FP\ DR}$ des Darms zu berechnen, braucht man die intrinsische Clerance ($CL_{int\ DR}$) der Test-Substanzen in den einzelnen Darmregionen, die sich aus den metabolischen Abbauraten und der intrinsichen Clearance der „Everted Sacs" ($CL_{int\ ES}$) skalieren lässt. Die $CL_{int\ ES}$ kann sowohl aus den enzymkinetischen Daten V_{max} und K_m, als auch über den Abbau der Substanz bei Verwendung von nur einer Substratkonzentration mittels Formel 4 berechnet werden. Nach Integration ergibt sich daraus die einfacher zu handhabende Formel 5, die hier für die Berechnung der $CL_{int\ ES}$ verwendet wurde (De Kanter et al. 2004).

$$CL_{\text{int}} = V \times \left(\frac{\frac{dC}{dt}}{C} \right)$$

Formel 4: Berechnung der intrinischen Clearance ($CL_{int\ ES}$).
C: eingesetzte Substratkonzentration; V: Volumen

Die $CL_{int\ ES}$ wurde ausgegeben pro mg Protein des eingesetzten „Everted Sac". Um die intrinsische Clearance für die Test-Substanzen der gesamten Darmregion des oberen, mittleren und unteren Jejunums ($CL_{int\ OJ}$, $CL_{int\ MJ}$, $CL_{int\ UJ}$) zu berechnen wurde die $CL_{int\ ES}$ mit einem Skalierungs-Faktor multipliziert. Dabei wurde die Skalierungs-Faktoren aus der Masse der Organstücke, der „Everted Sacs", sowie der Masse an Protein der einzelnen „Everted Sac" Proben berechnet (siehe Tabelle 3). Das Jejunum von drei 200-250 g Ratten wurde dafür entnommen und in drei gleich lange Teile zerlegt, anschließend die Feuchtgewichte aller Teilstücke bestimmt und der Mittelwert der Teilstücke errechnet.

$$CL_{\text{int } ES} = V \times \left(\frac{\ln\left(\frac{C_{initial}}{C_t} \right)}{t} \right)$$

Formel 5: Integrierte Form der intrinischen Clearanceberechnung ($CL_{int\ ES}$) für die „Everted Sacs"
$C_{initial}$**:** Ausgangskonzentration des Substrats; $\mathbf{C_t}$**:** Substratkonzentration zum Zeitpunkt **t**: Inkubationszeitpunkt t; V: Inkubationsvolumen

Die „Everted Sac" selber wurden in jedem Versuch ebenfalls gewogen und der Gesamtproteingehalt der jeweiligen „Everted Sacs" ermittelt. Aus der Multiplikation des

Anteils Protein am Gesamtgewicht der „Everted Sac“ ($F_{Protein\ an\ ES}$) und der Feuchtgewichte der gesamten Darmstücke (m_{Organ}) ergaben sich die in Tabelle 3 zusammengefassten Skalierungs-Faktoren.

Die Berechnung der $CL_{FP\ DR}$ der Test-Substanzen im Darm kann nicht nach dem gleichen Schema erfolgen, wie für die $CL_{FP\ L}$ der Test-Substanzen in der Leber. Die $CL_{FP\ L}$ errechnet sich aus dem Blutfluss, der skalierten intrinsischen Clearance ($CL_{int\ L}$) und dem freien, nicht an Plasmaprotein gebundenen Substanzanteil (fu).

Tabelle 3: Skalierungs-Faktoren der einzelnen Darmregionen der Ratte
Durch Multiplikation des Anteils der Proteinmasse an der Gesamtmasse der „Everted Sacs“ und des Gesamtgewichts des Organstücks wurden die Skalierungs-Faktoren berechnet.

Darmregion	m_{Organ} [mg]	$F_{Protein\ an\ ES}$	Skalierungs-Faktor
oberes Jejunum (oJ)	3430	0.050	172
mittleres Jejunum (mJ)	3125	0.050	156
unteres Jejunum (uJ)	2965	0.052	154

F= Anteil der Proteinmenge am Gesamtgewicht der „Everted Sacs“, M_{Organe}: Feuchtgewichte der Dünndarmdrittel

Der Blutfluss ist für die $CL_{FP\ DR}$ nicht von großer Bedeutung, weil dieser nicht die zu metabolisierenden Substanzen dem Darm zur Verfügung stellt, sondern die absorbierten und metabolisierten Substanzen abtransportiert. Damit ist auch die Proteinbindung an Plasmaproteine für die $CL_{FP\ DR}$ unerheblich und eher die Bindung der Substanz an Proteine des Darminhalts von Bedeutung (fu_{Gut}), die aber in den folgenden Rechnungen vernachlässigt wurde. Um die $CL_{FP\ DR}$ der Ratte zu berechnen wurde das „Q_{Gut} Model“ verwendet, das von Yang et al. im Jahr 2007 vorgestellt wurde und einen angepassten Blutfluss des Darms beinhaltet (siehe Formel 6) (Yang et al. 2007).

$$CL_{FP\ DR} = \frac{Q_{Gut} \times CL_{\text{int } DR}}{Q_{Gut} + CL_{\text{int } DR}}$$

Formel 6: Berechnung der first pass in vivo Clearance des Darms
CL_{DR}: Clearance der jeweiligen Darmregion, Q: Blutfluss im Darm; $CL_{int\ DR}$: intrinischen Clearance der jeweiligen Darmregion

Der Blutfluss des Darms (Q_{Gut}) der hier verwendet wurde, ist ein Hybrid aus der Permeation der Substanz über die Enterozyten (P_{eff}) und dem Blutfluss, der durch die Zotten fließt. Der $P_{eff,\ Mensch}$ Wert wurde mittels Converter aus dem $P_{app,\ Mensch}$ Wert, der wiederum mittels Caco-2 Permeationsdaten (a b) ermittelt wurde, berechnet. Unter Zuhilfenahme von Gastroplus® wurde der $P_{eff,\ Mensch}$ Wert in den $P_{eff,\ Ratte}$ umgewandelt. Mittels der Permeation der Substanz lässt sich aufgrund der Formel 7 die Permeations-Clearance berechnen, woraus wiederum mittels der Formel 8 der Blutfluss des Darms errechnet werden kann (Q_{Gut}) (Yang et al. 2007).

Die einzelnen $P_{eff\ Mensch}$, $P_{eff\ Ratte}$ und $P_{app\ Mensch}$ Werte für die Substanzen sind im Anhang 5 zusammengetragen.

$$CL_{Perm} = P_{eff,Ratte} \times A$$

Formel 7: Berechnung der Permeations-Clearance.
$P_{eff,\ Ratte}$: effektive Permeabilität [cm/s] und A: Dünndarmoberfläche der Darmregion [66 cm^2/Darmregion] für die Ratte (Pappenheimer 1998).

Der in Formel 8 verwendete Blutfluss der Zotten errechnete sich aus dem Blutfluss der mesenterischen Arterie (11.1 mL/min), die den Dünndarm versorgt, von dem 80 % im nüchternen Zustand der Ratten auf den mukosalen Blutfluss kommen und von diesem wiederum 60 % die Epithelzellen der Zotten versorgen. Damit ergibt sich ein Blutfluss von ca. 5.3 mL/min für die Zotten (Q_{Villi}) einer ca. 200 g Ratte. Aus der berechneten $CL_{FP\ DR}$ kann man zusätzlich, durch Division dieser mit den $CL_{int\ DR}$ Daten, die Fraktion berechnen, die die Darmwand unverändert übertritt (F_G) und die Pfortader erreicht.

$$Q_{Gut} = \frac{Q_{Villi} \times CL_{Perm}}{Q_{Villi} + CL_{Perm}}$$

Formel 8: Berechnung des Blutflusses des Darms.
Q_{Villi}: Blutfluss durch die Zotten (5.3 mL/min); CL_{Perm}: Permeations-Clearance (mL/min)

2.9. Funktioneller Permeationsassay mittels Caco-2-Modell

2.9.1. Caco-2 Zellkultur

Die Caco-2 Zelllinie ist eine humane epitheliale Adenokarzinomzelle des Kolons, die sich unter *in vitro* Kultivierungsbedingungen wieder zu einer enterozytenähnlichen Zelle differenziert. Sie entwickelt innerhalb eines Zeitraums von ca. 2-3 Wochen eine ausgeprägte Zellpolarität durch die Ausbildung einer apikalen und basolateralen Membrandomäne, die durch *„Tight Junctions“* voneinander abgegrenzt sind. Durch die Kultivierung auf Filtereinsätzen sind sowohl die apikale, als auch die basolaterale Seite zugänglich (siehe Abbildung 8), so dass mit diesem Modell die Permeation von Arzneimitteln untersucht werden kann.

Alle nachfolgend beschriebenen Arbeitsschritte wurden unter aseptischen Bedingungen in einer Lamina-Air-Flow Arbeitsbank durchgeführt. Die Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO_2, 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Für die Kultivierung wurden 100 mL Zellkulturflaschen verwendet. Das Medium wurde drei Mal wöchentlich gewechselt.

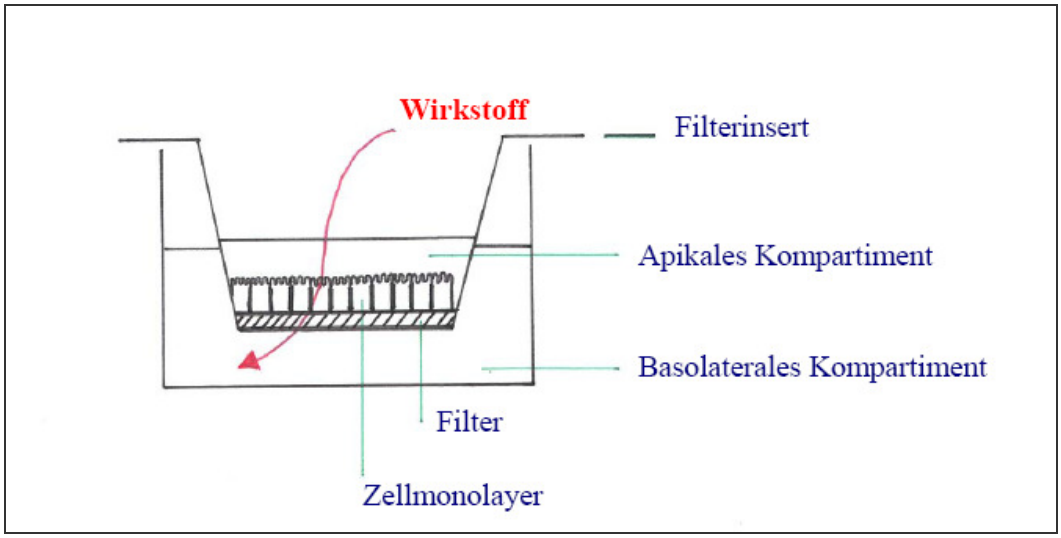


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Caco-2 Permeationsversuch.
Dargestellt ist ein Plattenfilter mit ausgesäten Caco-2 Zellen, die ein einschichtiges Epithel auf dem Filter bilden. Die Filter hängen in einer 12-Loch-Zellkulturplatte.

Für die Aussaat auf Transwell-Filtereinsätzen wurden die Zellen in Suspension gebracht, in dem sie mit HBSS-Puffer (Ca^{2+}, Mg^{2+} frei) gewaschen wurden und danach für 10 min mit 0.25 % Trypsin/EDTA-Lösung im Brutschrank inkubiert wurden. Nach Zentrifugation der Zellen (5 min bei 200 x *g*) wurde das Zellpellet in Zellkulturmedium resuspendiert und die Anzahl der Zellen in der Neubauer-Zählkammer bestimmt (siehe Abschnitt 2.7.1).

2.9.2. Permeationsexperiment mit Caco-2 Zellen

Für die Permeationsstudien wurden Caco-2 Zellen mit einer Zellzahl von 300000 Zellen/mL auf Transwell®-Clear-Filtereinsätzen (Polyester; Porengröße: 0.4 µm) in 12-Loch-Zellkulturplatte für mindestens 14 Tage in Zellkulturmedium (1.5 mL) im Brutschrank (37 °C, 5 % CO_2, 95 % Luftfeuchtigkeit) kultiviert. Drei Mal wöchentlich wurde das Zellkulturmedium gewechselt. Vor dem Versuch wurde der Transepitheliale Widerstand (TEER-Wert) des Zellmonolayers in frischem Zellkulturmedium bestimmt. Nur Zellmonolayer mit einem Teerwert größer als 400 Ω/cm^2 wurden für den Versuch verwendet. Anschließend wurde das Zellkulturmedium durch 37 °C warmen Transportpuffer ersetzt (0.5 mL apikal, 1.5 mL basolateral) und die Zellen für 5 min bei 37 °C auf die neue Pufferumgebung equilibriert.

Für das Transportexperiment wurden pro Substanz zwei parallele Permeationsstudien (Doppelbestimmung) apikal nach basolateral (a b) bzw. basolateral nach apikal (b a) durchgeführt. Alle Substanzen wurden in einer Endkonzentration von 2 µM in Transportpuffer (Transportlösung) eingesetzt. Von den Transportlösungen werden je zwei

Aliquots (**T_L-Lösung**) entnommen und in eine 96-Tiefloch-Platte überführt. Je nach Richtung des untersuchenden Transports wurden basolateral 1.5 mL (a b) oder apikal 0.5 mL Transportpuffer (b a) vorgelegt und anschließend die Transportlösung in das jeweilige Kompartiment (a b, 0.5 mL apikal; b a, 1.5 mL basolateral) pipettiert. Danach wurden die Zellfilter für 5 min, bei 37 °C vorinkubiert. Gleich im Anschluss wurde, je nach Versuch, apikal (a b) bzw. basolateral (b a) eine Aliquot (**A_{0min}** bzw. **B_{0min}**) entnommen, auf eine 96-Tiefloch-Platte überführt und das jeweils andere Kompartiment (a b; basolateral; b a, apikal) durch frischen Transportpuffer ersetzt. Die Filter wurden anschließend bei 37 °C unter sanftem Schütteln für 90 min inkubiert.

$$P_{app} = m_{Akzeptor\ 0\rightarrow 90\min} \times \frac{V_{Akzeptor}}{A_{Filter} \times FE_{Donor\ 0\min}}$$

Formel 9: Berechnung des Permeation (P_{app}-Wert) der Test-Substanzen
m: Anstieg zwischen den Peakflächen der Test-Substanzen in den Proben $FE_{Akzeptor\ 0\ min}$ und $FE_{Akzeptor\ 90\ min}$ [FE/s]; $V_{Akzeptor}$: Volumen auf der Akzeptorseite [cm^3]; A_{Filter}: Fläche des Filters [cm^2]; $FE_{donor\ 0\ min}$: LC-MS/MS Peakfläche der Substanzen des Donors $T_{0\ min}$ [FE]

Danach wurde ein Aliquot aus beiden Seiten (**A_{90min}, B_{90min}**) entnommen und auf eine 96-Tiefloch-Platte überführt. Die restliche Transportlösung auf den Zellen wurde durch 200 µL Trypsin/EDTA ersetzt und für 5 min bei 37 °C inkubiert, um die Zellen vom Filter abzulösen. Die abgelösten Zellen (**Zellen**) wurden auf eine 96-Tiefloch-Platte überführt. Alle Proben wurden mit dem gleichen Volumen an Stopplösung versetzt und über Nacht bei -20 °C ausgefällt. Zur Weiterverarbeitung wurden die Proben bei 1600 x *g*, 15 min, 4 °C zentrifugiert, der Überstand in LC-MS/MS Gefäße überführt und analytisch vermessen.

2.9.3. Auswertung Caco-2 Permeation

Über die Peakflächen der LC-MS/MS-Analytik wurden über Formel 9 die P_{app}-Werte der Test-Substanzen für den a b und b a Ansatz berechnet. Um unspezifische Bindungen der Substanzen an den Zellen, Plastik etc. und die metabolische Aktivität der Zellen beurteilen zu können, wurde zusätzlich die Wiederfindung der Substanzen über Formel 10 berechnet.

$$R = \frac{FE_{Akzeptor\ 90\min} + FE_{Donor\ 90\min} + FE_{Zellen}}{FE_{T_L}} \times 100\%$$

Formel 10: Berechnung der Substanzwiederfindung im Caco-2 Experiment.
R: Substanzwiederfindung; $FE_{Rezeptor\ 90\ min}$: LC-MS/MS Peakflächen der Test-Substanzen des Akzeptors bei t = 90 min [FE]: $FE_{Donor\ 90\ min}$: LC-MS/MS Peakflächen der Test-Substanzen des Donors bei t = 90 min [FE]; FE_{Zellen}: LC-MS/MS Peakflächen der Substanzen in den Zellen [FE]; FE_{TL}: LC-MS/MS Peakflächen der Substanzen in der Transportlösung [FE]

2.10. Analytik

2.10.1. HPLC-Analytik

Die Analytik der HPLC beruht auf den unterschiedlichen Affinitäten der Substanzen mit dem Säulenmaterial und mit dem Laufmittel. Zusätzlich führt der hohe Druck in der HPLC-Anlage dazu, dass die Analysezeiten stark verkürzt werden können und dass die Nachweisgrenze der Substanzen, durch sehr schmale Peaks, verringert werden kann. Die Analytik der einzelnen von der Säule eluierten Substanzen erfolgt mittels UV/VIS Absorption. Die HPLC-Analytik hier fand auf einer Agilent 1100C statt. Die Trennung erfolgte auf einer Reversed-Phase-C18-Säule und mittels eines Laufmittelgemischs aus Acetonitril (ACN)/Wasser versetzt mit jeweils 0.05 % Ameisensäure. Die Auftrennung des Probengemischs erfolgte bei einer Flussrate von 0.4 mL/min und mittels Laufmittelgradienten von 10 % ACN auf 65 % ACN innerhalb von 7 min. Der ACN-Anteil wurde anschließend innerhalb von 0.1 min auf 95 % erhöht und über 1.9 min gehalten, um besonders lipophile Substanzen von der Säule zu eluieren. Danach wurde der ACN-Anteil auf das Ausgangsgemisch (10 % ACN) zurückgefahren und somit die Säule für die Trennung einer neuen Probe vorbereitet. Dieser Gradient wurde gewählt, da mit diesem die TESTO-Metaboliten vom Hauptpeak TESTO getrennt wurden.

Von den Proben wurden 20 µL auf die Säule gegeben. Die von der HPLC-Säule aufgetrennten Substanzen wurden mittels Diodenarraydetektor (λ = 210-400 nm) in der Lichtzelle vermessen. Die Flächen aller Substanzpeaks wurden bei 240 nm (Absorptionsmaximum) ausgewertet. Zusätzlich zu den Proben wurden auch Standardreihen von allen Substanzen vermessen und deren Peakflächen bestimmt. Die Retentionszeiten der Substanzen sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 4: HPLC Retentionszeiten von Testosteron und seinen Metaboliten

Substanz	Retentionszeit [min]
6ßOH-TESTO	5.80
TESTO-GLUC	6.44
16ßOH-TESTO	6.64
TESTO	7.93
Androstenedion	8.22

6ßOH-TESTO: 6ß-Hydroxtestosteron; TESTO-GLUC: Testosteron-Glucuronid; 16ßOH-TESTO: 16ß-Hydroxytestosteron

2.10.2. LC-MS/MS-Analytik

Die LC-MS/MS-Analytik ist eine Kopplung von HPLC und Tandem-Massenspektroskopie, die die Molekülkonzentrationen in Abhängigkeit vom Masse-Ladungsverhältnis bestimmt. Die vorgeschaltet HPLC trennt die Substanzen aufgrund ihrer Polarität und leitet sie anschließend in die Elektronensprayquelle, wo die Proben zu feinen Aerosolen zerstäubt werden. In den anschließenden Quadropolen werden die Ionen nach dem Masse zu Ladungsverhältnis getrennt. Im Quadropol-1 erfolgt die erste Selektion des Molekülions („Mutter-Ion“), das im zweiten Massenspektrometer durch Kollision mit einem Gas in mehrere Bruchstücke („Tochterionen“) fragmentiert wird. Der Quadropol-2 dient der Beschleunigung der fragmentierten Tochterionen, während der Quadropol-3 das spezifische Fragment selektiert, das anschließend im Detektor registriert wird.

Von jeder Probe wurden 5 µL auf die „Reversed-Phase-C18“-Säule aufgetragen. Die HPLC Trennung erfolgte mittels eines ACN/Wasser-Gemischs, jeweils mit 0.1 % Essigsäure versetzt und einer Flussgeschwindigkeit von 0.3 mL/min. Die Trennung erfolgte mittels Laufmittelgradienten von 25 % ACN auf 95 % ACN in 4 min, der anschließend bei 95 % ACN für 1.35 min konstant gehalten wurde. Dann wurde der Gradient wieder auf den Ausgangswert 25 % ACN zurückgefahren. Die Eigenschaften der MS/MS Detektion variierten unter den analysierten Substanzen und sind im Anhang 6 zusammengefasst.

In allen detektierten Proben befand sich zusätzlich noch ein interner Standard, der mit der Stopplösung (siehe Abschnitt 2.7.2, 2.8.2 und 2.9.2) zu den Proben gegeben wurde. Der interne Standard dient der Kontrolle der Injektion, die aufgrund des kleinen Volumens Schwankungen unterworfen ist. Deswegen wird die Fläche des Substanzpeaks immer ins Verhältnis zur Fläche des internen Standards gesetzt.

2.11. Statistik

Eine statistische Auswertung wurde mit den Daten des „Everted Sac“ Assay erhoben. Die statistische Auswertung erfolgte über den U-Test nach Mann Whitney, einem parameterfreien statistischen Test. Er dient zur Überprüfung, ob zwei unabhängige Gruppen zur selben Population gehören. Hat man zwei Stichproben (Stichprobe A und B), vergleicht man mit dem U-Test jeden Wert der Stichprobe A mit jedem Wert der Stichprobe B. Es gibt also n(a) mal n(b) viele Vergleiche. Als Nullhypothese (H(o)) wird angenommen, dass es keinen Unterschied zwischen den Stichproben gibt, d.h. A = B. Die Auswertung erfolgte mittels der

statistischen Software *StatPlus*® (AnalystSoft) und die verwendete Irrtumswahrscheinlichkeit betrug 0.05.

3. Ergebnisse

3.1. CYP P450 Expression in verschiedenen Organen

Es ist bekannt, das CYP P450 Enzyme nicht nur in der Leber, sondern auch in anderen Organen exprimiert werden. Auch CYP3A, das für den metabolischen Abbau vieler Arzneistoffe verantwortlich ist, wird relativ ubiquitär exprimiert. Um zu überprüfen in welchen Proteinmengen CYP3A in den verschiedenen Organen vorliegt, wurden die Organe: Leber, Niere, Lunge und Darm der Ratte entnommen (siehe Abschnitt 2.5.1), homogenisiert und nachfolgend im quantitativen Western Blot auf die CYP3A Expression analysiert. Der Darm wurde dabei in drei gleichgroße Abschnitte geteilt, da bekannt ist, dass sich die Expression entlang des Darms verändern kann. Ein repräsentativer Western Blot ist in Abbildung 9 unten und die quantifizierten Daten sind in Abbildung 9 oben graphisch dargestellt. Die quantifizierten Daten stellen jeweils Mittelwerte aus drei untersuchten Tieren dar.

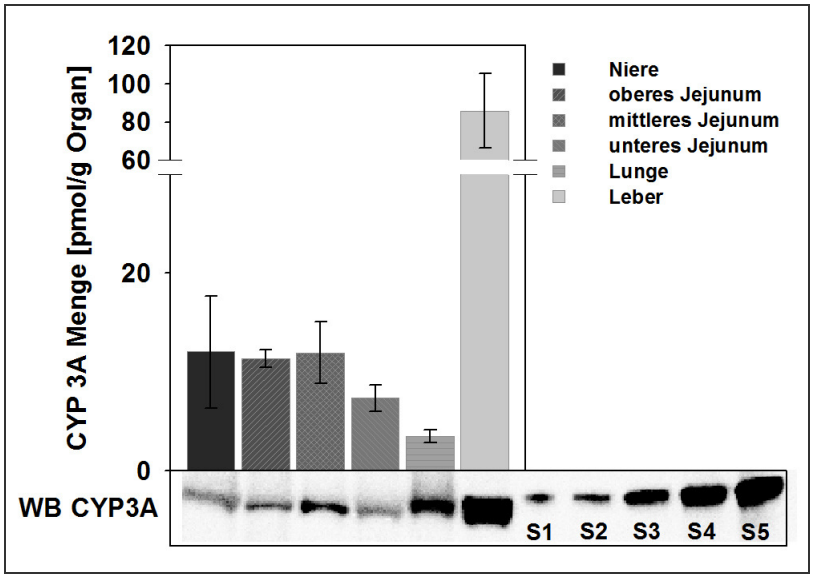


Abbildung 9: CYP3A Expression in verschiedenen Organen.
Im Bild unten ist ein repräsentativer Western Blot zur Detektion von CYP3A dargestellt, während darüber die, aus drei Tieren gemittelten, quantitativen Daten von CYP3A pro g Organgewicht dargestellt sind. Die Bestimmung der CYP3A Mengen pro 100 µg aufgetragenes Organhomogenat erfolgte mittels einer CYP3A Supersomen™ Standards (S1-S5; 6.25, 12.5, 25, 50, 100fmol) und wurde mittels bekanntem Organgewichte auf g Organ skaliert.

Wie man im Immunblot erkennen kann, wurde in allen untersuchten Organproben eine immunreaktive Bande bei einem Molekulargewicht von 55 kDa detektiert, wobei die Stärke zwischen den Organproben erheblich variierte. Die Leber zeigte die stärkste immunreaktive

Bande, gefolgt vom mittleren Jejunum und der Lunge. Die anderen Darmabschnitte und die Niere zeigten im Immunblot dagegen nur sehr schwache Banden. Nach densitometrischer Auswertung der Banden, Berechnung der CYP3A Menge und Skalierung auf das Organgewicht zeigte die Leber mit der stärksten Immunbande auch die höchste CYP3A Menge mit 86 pmol pro g Leber. Obwohl in den Proben der Niere nur sehr schwache CYP3A Immunbanden auf dem Immunblot sichtbar waren, errechnete sich, aufgrund der jeweiligen Organgewichte, genauso viel CYP3A, wie in den beiden oberen Darmdrittel (12 pmol pro g Organ). Dagegen zeigten der letzte Darmabschnitt und die Lunge mit 7.5 bzw. 4 pmol pro g Organ die geringsten CYP3A Mengen. Zusammengefasst kann man sagen, dass die Leber deutlich höhere Mengen an CYP3A enthielt, als die anderen untersuchten Organe. Des Weiteren zeigte die Leber auch das größte Organgewicht, so dass die Gesamtmenge an CYP3A ebenfalls in der Leber am Höchsten und in der Lunge am Kleinsten ausfiel.

3.2. Proteinexpression entlang des Rattendarms

3.2.1. CYP P450 Expression entlang des Rattendarms

Zur detaillierten Analyse der CYP P450 Expression entlang des Darms (ca. 100-120 cm) wurde der Darm von vier männlichen Ratten in 3 cm lange Abschnitte zerlegt und daraus Homogenate (30-35 Proben) hergestellt (siehe Abschnitt 2.5.2). Die Expression von verschiedenen CYP P450 Proteinen (CYP3A, 2B1, 2D1, 2C6, 1A1, 2C11) wurde mittels Western Blot analysiert.

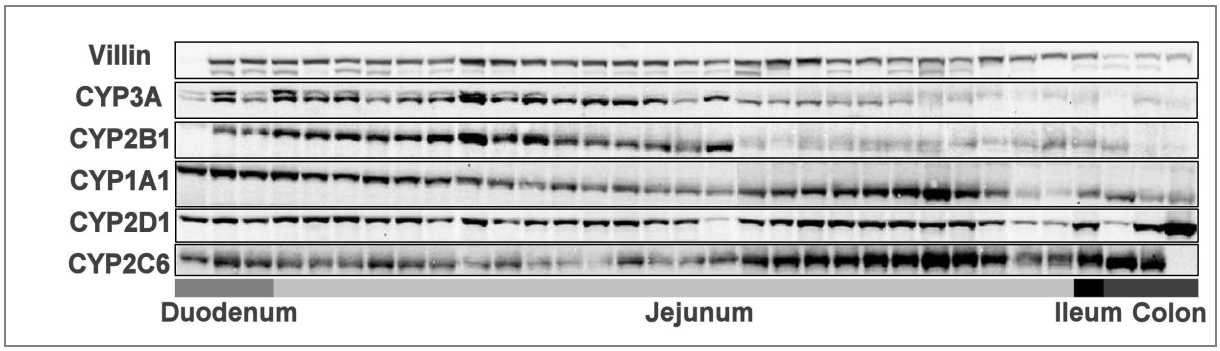


Abbildung 10: Repräsentative Western Blots der CYP P450 Expression entlang des Rattendarms
Dargestellt sind die Western Blot Immunbanden aller untersuchter CYP P450 Isoenzyme (ca. 55 kDa) und Villin (ca. 90 kDa) von einem beispielhaften männlichen Tier. Insgesamt wurden auf diese Weise vier männliche Tiere untersucht Die Zerlegung des Darms führte zu ca. 30-34 Proben, wobei hier beispielhaft ein Tier mit 32 Segmenten dargestellt ist. Villin stellt dabei ein Markerprotein für die Enterozyten dar.

Dazu wurden jeweils 100 µg der Intestinalhomogenate in einem 4-12 %igem Bis/Tris-Gradientengel aufgetrennt, geblottet und nachfolgend mit Antikörpern, gerichtet gegen die

einzelnen CYP P450 Isoformen, behandelt (siehe Abschnitt 2.6.2-3). Ein vergleichbar aufgearbeitetes Leberhomogenat diente in allen Western Blots als Positivkontrolle (Daten nicht dargestellt), während als Referenzprotein Villin verwendet wurde. Ein repräsentativer Western Blot ist in Abbildung 10 dargestellt. CYP2C11 konnte im Darm nicht nachgewiesen werden. Alle anderen CYP P450 Isoformen zeigten im Western Blot immunreaktive Banden um 55 kDa, während die Villinbande bei ca. 90 kDa detektiert wurde. Man kann in Abbildung 10 erkennen, dass alle untersuchten Proteine Expressionsveränderungen entlang des Darms zeigten. Während CYP3A und 2B1 nur im oberen Darmbereich detektiert wurden, konnte die Expression der anderen CYPs entlang des gesamten Darms dargestellt werden. Interessanterweise detektierte der CYP3A Antikörper zwei Proteinbanden im Intestinalhomogenat. Es liegt die Vermutung nahe, dass es sich dabei um unterschiedliche Isoformen der CYP3A Familie handelt. Allerdings konnte im Rahmen dieser Doktorarbeit die detektierten Isoformen der CYP3A Familie nicht genauer untersucht werden.

Zur Vergleichbarkeit der ermittelten Expressionsdaten von verschiedenen Tieren wurde die relative Verteilung berechnet, die einen Vergleich des Expressionssignals jeder einzelnen CYP P450 Isoform in jeder einzelnen Probe mit dem Median, berechnet aus den Signalen einer CYP P450 Isoform eines Tieres, darstellt. In Abbildung 11 sind die relativen Verteilungen der einzelnen CYP P450 Isoformen in den Einzeltieren abgebildet. Die Signale der CYP3A Doppelbande wurden für diese Auswertung zusammengefasst. **CYP3A und 2B1** zeigten entlang des Rattendarms ein vergleichbares Expressionsprofil. Beide CYP P450 Isoformen wurden stark in den Darmregionen Duodenum und proximales Jejunum exprimiert und hingegen nur sehr schwach oder überhaupt nicht in den distalen Darmregionen Ileum und Colon. Es zeigten sich allerdings inter-individuelle Unterschiede in den Expressionsprofilen. Im Darm einiger Ratten wurde die höchste CYP3A Expression gleich im proximalen Duodenum detektiert, während in anderen Tieren die Expression vom Pylorus bis zur Mitte des proximalen Jejunums anstieg und dann erst wieder abzusinken begann. Im Darm aller Tiere verschwand das CYP3A immunreaktive Signal im unteren Jejunum, wobei die exakte Lokalisation zwischen den Tieren erheblich variierte. CYP2B1 dagegen wurde in der proximalen Darmregion relativ gleichmäßig exprimiert und ab der Mitte des Jejunums war, mit Ausnahme eines Tieres, keine Expression mehr nachweisbar. Im Gegensatz zu CYP3A und 2B1 zeigten alle anderen untersuchten CYPs (**CYP1A1, 2C6 und 2D1**) relativ gleichbleibende Proteinexpressionen über alle Darmsegmente hinweg.

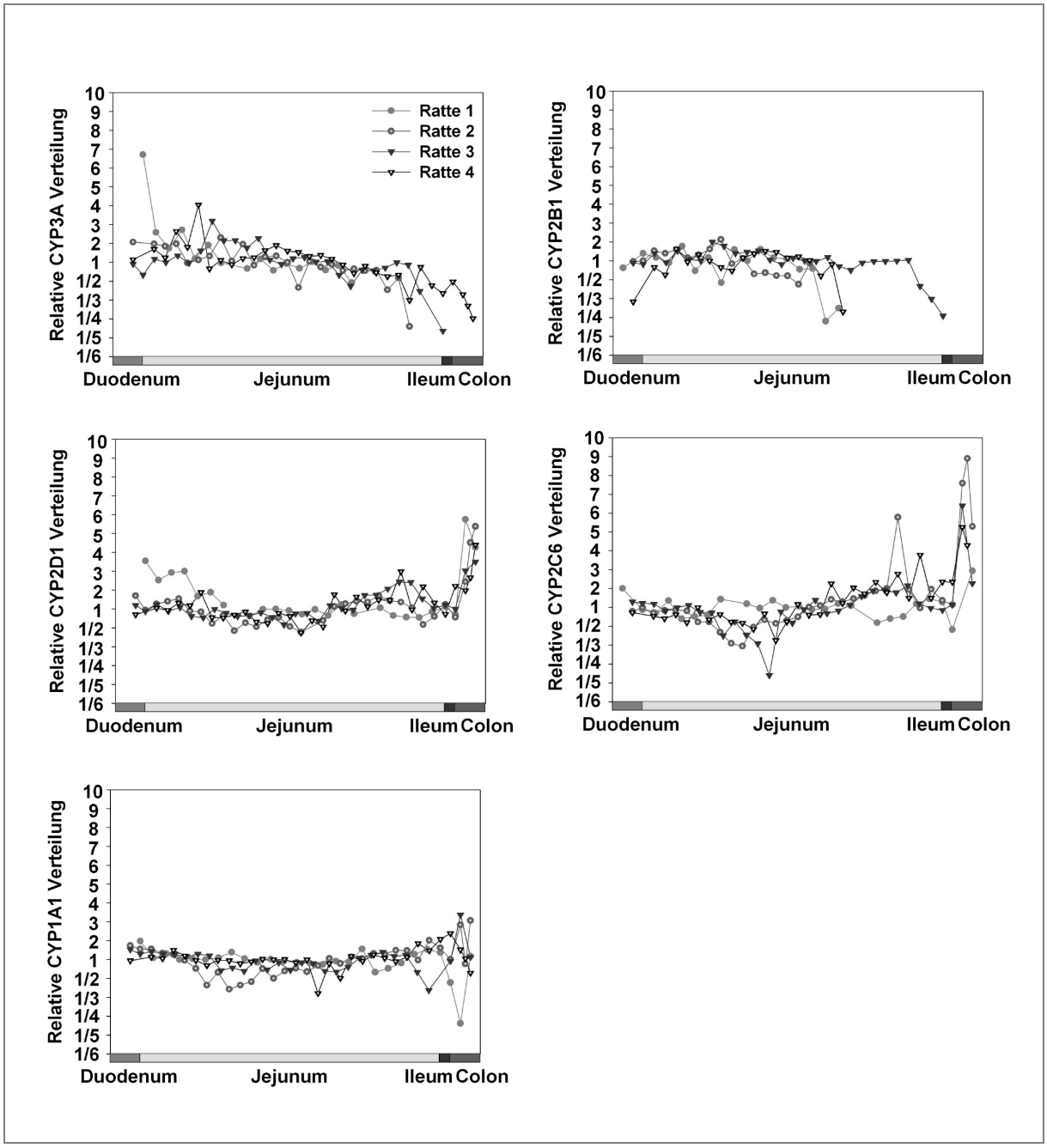


Abbildung 11: Expressionsprofile der CYP P450 Isoenzyme entlang des gesamten Rattendarms
Dargestellt sind die relativen CYP P450 Verteilungen in den jeweiligen Darmsegmenten, die hier ihren größeren Darmregionen auf der x-Achse zugeordnet wurden. Die Western Blot Signale wurden dafür densitometrisch ausgewertet und mittels des Villin Signals derselben Probe normalisiert. Der Median wurden aus allen normalisierten Werten eines Tieres gebildet und dem Wert 1 zugeordnet. Alle anderen Proben wurden mit dem Median verglichen und dementsprechend angeglichen. Insgesamt wurden vier männliche Tiere auf diese Weise untersucht und die Kurven aller Einzeltiere dargestellt.

Nur an den Darmenden (gleich nach Pylorus bzw. Colon) kam es zu Expressions-veränderungen, die aber auch durch hohe inter-individuelle Schwankungen gekennzeichnet waren. Alle drei CYP P450 Isoformen wiesen eine Zunahme der Expression in der unteren Darmregion (Ileum/Colon) auf, die bei CYP1A1 im Vergleich zu CYP2C6 und 2D1 viel

schwächer ausfiel. CYP2D1 und 2C6 zeigten zudem eine leichte Abnahme der Expression im proximalen Duodenum gleich nach dem Pylorus, die wiederum bei CYP2C6 viel schwächer ausgeprägt war.

3.2.2. 17ß-HSD2 und UGT Expression entlang des Rattendarms

Neben den CYPs wurde in den gleichen Intestinalhomogenaten auch die Proteinexpression von zwei weiteren Enzymen 17ß-HSD2 und UGT untersucht, die ebenfalls dafür bekannt sind im Rattendarm metabolisch aktiv zu sein. 17ß-HSD2 stelle, wie die Familie der CYPs, ein Phase-I-Enzym dar, während die UGTs zu den Phase-II-Enzymen zählen und Glucuronisierungen katalysieren. Die Expression dieser Proteine wurde nur in den Darmproben von zwei männlichen Ratten untersucht und für die Analyse nur jedes zweite Darmsegment verwendet, wobei die verschiedenen Darmregionen alle abgebildet wurden.

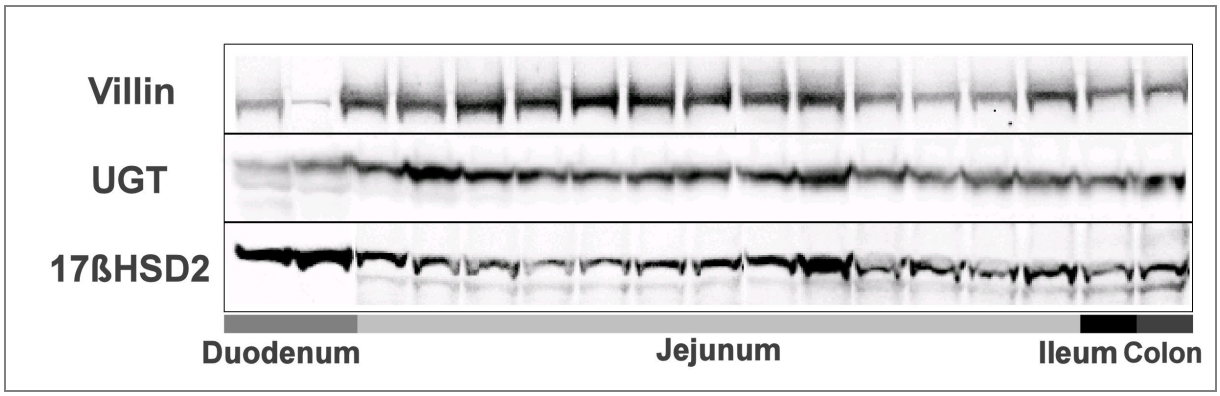


Abbildung 12: Repräsentative Western Blots der 17ß-HSD2 und UGT Expression entlang des Rattendarms
Dargestellt sind die Western Blot Immunbanden von UGT (55 kDa), 17ß-HSD2 (70 kDa) und Villin von einem beispielhaften männlichen Tier. Insgesamt wurden zwei Tiere auf ihre UGT und 17ß-HSD2 Expression untersucht. Villin stellt ein Markerprotein für die Enterozyten dar.

Die Western Blot Analyse erfolgte, wie bereits unter Abschnitt 3.2.1 beschrieben. Für die Immundetektion wurden Antikörper verwendet, die gegen 17ß-HSD2 bzw. UGT und Villin (Referenzprotein) gerichtet sind. Der für die Western Blot Analyse verwendete UGT Antikörper erkannte dabei nicht nur eine spezifische Isoform der UGT Familie, sondern die gesamte UGT Familie. Im Immunblot wurden so Banden im Bereich von 70 kDa bzw. 55 kDa sichtbar, die den Proteinen 17ß-HSD2 bzw. UGT zugeordnet werden konnten. Repräsentative Western Blot sind in Abbildung 12 für beide Enzyme und Villin dargestellt. Die dazugehörigen berechneten relativen Verteilungen sind in den Expressionsprofilen (Abbildung 13) zusammengefasst. Die relative Verteilung stellt auch hier den Vergleich des 17ß-HSD2 bzw. UGT Expressionssignals jeder einzelnen Probe mit dem Median, berechnet aus den Signalen aller Proben eines Tieres, dar.

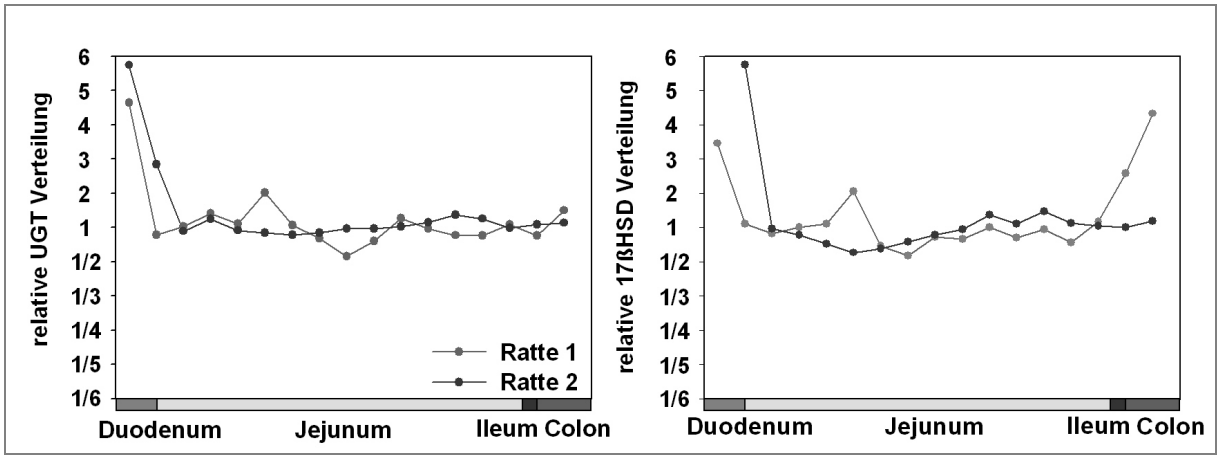


Abbildung 13: Expressionsprofile von 17ß-HSD2 und UGT entlang des Rattendarms
Dargestellt ist die relative 17ß-HSD und UGT Verteilung entlang in den jeweiligen Darmsegmenten, die hier ihren größeren Darmregionen auf der x-Achse zugeordnet wurden. Die Western Blot Signale wurden dafür densitometrisch ausgewertet und mittels des Villin Signals derselben Probe normalisiert. Der Median wurden aus allen normalisierten Werten eines Tieres gebildet und dem Wert 1 zugeordnet. Alle anderen Proben wurden mit dem Median verglichen und dementsprechend ausgegeben.

Beide Enzyme wurden entlang des gesamten Darms exprimiert. Die höchste Proteinexpression wurde im Duodenum detektiert. Danach sank die Expresssion ab (ca. 6fach) und verblieb auf einem gleichbleibenden Expressionslevel über alle anschließenden Darmregionen hinweg. Zusätzlich zeigte eine Ratte einen Anstieg der 17ß-HSD2 Proteinexpression in distalen Darmregionen (Ileum/Colon), so dass sich für dieses Tier ein wannenförmiges Expressionsprofil ergab. Ansonsten waren nur geringe inter-individuellen Expressionsschwankungen für diese beiden Proteine 17ß-HSD2 und UGT detektierbar.

3.3. CYP P450 Quantifizierung

Zur Quantifizierung der CYP P450 Proteine wurden jeweils sechs Intestinalhomogenate aus den verschiedenen Darmregionen (Duodenum, oberes, mittleres und unteres Jejunum, Ileum, Colon) von drei Ratten eingesetzt. Für das Jejunum wurden drei Homogenate ausgewählt, weil es in der Ratte mit 80-90 cm die längste Darmregion darstellt. Unter Zuhilfenahme einer Standardreihe von Supersomen™ im quantitativen Western Blot Verfahren wurde die CYP P450 Mengen in diesen Proben vermessen (siehe Abschnitt 2.6.4). Zum Vergleich wurden außerdem die Mengen der verschiedenen CYP P450 Isoformen in Leberhomogenaten von drei verschiedenen männlichen Tieren unter Verwendung der gleichen Methode bestimmt.

3.3.1. Reproduzierbarkeit der Methode

Bevor die Quantifizierung durchgeführt wurde, musste die verwendetet Methode auf ihre Verlässlichkeit überprüft werden. Hierfür wurden die CYP P450 Mengen von einem Tier dreifach mittels untereinander unabhängiger Western Blots ermittelt und die Standardabweichungen errechnet. In Tabelle 5 sind die Daten exemplarisch für zwei verschiedene CYPs (CYP3A und 2D1) angegeben. Wie aus der Tabelle hervorgeht, waren die Schwankungen der Methode in einem vertretbaren Bereich von 10-20 %, so dass man die Methode für die Quantifizierung der CYP P450 Proteine verwenden konnte. Die anderen zwei Isoformen (CYP2B1 und 2C6) wurden auf die gleiche Weise analysiert und zeigten vergleichbare Streuwerte (Daten nicht dargestellt).

Tabelle 5: Reproduzierbarkeit der CYP P450 Quantifizierung mittels Western Blot

	CYP3A (fmol/mg Protein)					**CYP2D1** (fmol/mg Protein)				
	Wiederholung			**MW**	**SD**	**Wiederholung**			**MW**	**SD**
	1	**2**	**3**			**1**	**2**	**3**		
Duodenum	165	173	163	**167**	**5**	46	59	63	**56**	**9**
oberes Jejunum	188	235	257	**227**	**35**	63	62	62	**63**	**1**
mittleres Jejunum	171	191	163	**175**	**14**	41	52	37	**43**	**8**
unteres Jejunum	175	186	160	**174**	**13**	23	27	20	**23**	**3**
Ileum	-	-	-	**-**	**-**	35	39	27	**33**	**6**
Colon	-	-	-	**-**	**-**	62	53	40	**51**	**11**

MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung

3.3.2. CYP P450 Quantifizierung

Im Anschluss an die Methodenvalidierung erfolgte die eigentliche CYP P450 Quantifizierung im Rattendarm und in der Leber. In Tabelle 6 sind die berechneten CYP P450 Mengen für die männliche Ratte dargestellt. **CYP2B1** und **3A** waren die dominierenden CYP P450 Proteine im Duodenum und Jejunum des Rattendarms, während beide Isoformen im Ileum und Colon keine nennenswerte Expression aufwiesen. Beide Isoformen zusammen machten ca. 90 % der Summe der untersuchten CYP P450 Mengen im Duodenum und Jejunum aus. Der größte Anteil fiel dabei mit ca. 350 fmol/mg Protein auf CYP2B1, während CYP3A mit ca. 150 fmol/mg Protein exprimiert wurde. Im Vergleich zu CYP2B1 und 3A steuerten **CYP2D1** und **2C6** nur einen geringen Anteil zur Summe der CYP P450 Menge im Duodenum und Jejunum bei. Im Ileum und Colon hingegen, war CYP2D1 das Hauptenzym

mit 44-71 fmol/mg Protein, weil CYP3A und 2B1 in diesen Regionen nicht mehr nachgewiesen werden konnten.

Tabelle 6: CYP P450 Quantifizierung entlang des Darm und in der Leber der Ratte
Die Daten stellen Mittelwerte der CYP P450 Mengen des Homogenats aus drei verschiedenen männlichen Tieren mit ihrer jeweiligen Standardabweichung dar. Die Zahlen in den Klammern darunter stellt den prozentualen Anteil des jeweiligen CYPs an der Gesamtsumme der hier untersuchten CYP P450 Mengen dar.

	Duodenum	**oberes Jejunum**	**mittleres Jejunum**	**unteres Jejunum**	**Ileum**	**Colon**	**Leber**
			fmol/mg Protein				
CYP2B1	338 ± 113 (62%)	392 ± 102 (66%)	346 ± 106 (67%)	332 ± 46 (64%)	-	-	1718 ± 992 (23%)
CYP3A	150 ± 20 (28%)	153 ± 52 (26%)	141 ± 35 (27%)	135 ± 41 (26%)	-	-	1458 ± 540 (20%)
CYP2D1	51 ± 21 (9%)	46 ± 8 (8%)	25 ± 9 (5%)	46 ± 30 (9%)	44 ± 37 (86%)	71 ± 17 (88%)	1897 ± 307 (25%)
CYP2C6	4 ± 1 (1%)	4 ± 1 (<1%)	4 ± 1 (1%)	5 ± 3 (1%)	7 ± 4 (14%)	10 ± 6 (12%)	2373 ± 288 (32%)
Summe CYPs	543 ± 155	595 ± 163	516 ± 151	518 ± 120	51 ± 41	81 ± 23	7446 ± 2127

MW ± SD: Mittelwert ± Standardabweichung

Eine untergeordnete Rolle spielte CYP2C6 mit 4-10 fmol/mg Protein in allen Darmregionen und trug nur ca. 1 % zur Gesamtmenge an CYP P450 im Duodenum/Jejunum bzw. 13 % im Ileum/Colon bei.

Wie erwartet, enthielt die Leber viel höhere CYP P450 Konzentrationen, als der Darm. Die Gesamtsumme der CYP P450 Mengen betrug in der Leber ca. 7500 fmol/mg Protein, wobei das Duodenum/Jejunum mit ca. 550 fmol/mg Protein nur ein fünfzehntel und das Ileum/Colon mit ca. 75 fmol/mg Protein nur ein hundertstel der Menge enthielten. Zudem ergab sich, im Vergleich zum Darm, im Rattenleberhomogenat eine deutlich andere CYP P450 Verteilung. Hier wurden alle untersuchten CYP P450 Isoformen in vergleichbar hohen Mengen exprimiert. CYP2C6 stellte mit 2373 fmol/mg Protein das Hauptenzym dar, während CYP3A mit 1458 fmol/mg Protein die geringste Expression zeigte. CYP2D1 und 2B1 ordneten sich mit 1897 bzw. 1718 fmol/mg Protein zwischen CYP2C6 und 3A ein.

3.4. CYP P450 Expression in den einzelnen Enterozytenpopulationen

In den vorangegangen Abschnitten konnte die unterschiedliche Expression der CYP P450 Isoformen entlang des Darms dargestellt werden. Allerdings geht aus diesen Analysen nicht hervor welcher Zelltypus für die Expression der CYP P450 Proteine verantwortlich ist. Es ist

bekannt, dass sich Enterozyten aus juvenilen Zellen in den Krypten zu maturierten Enterozyten in den Zotten differenzieren.

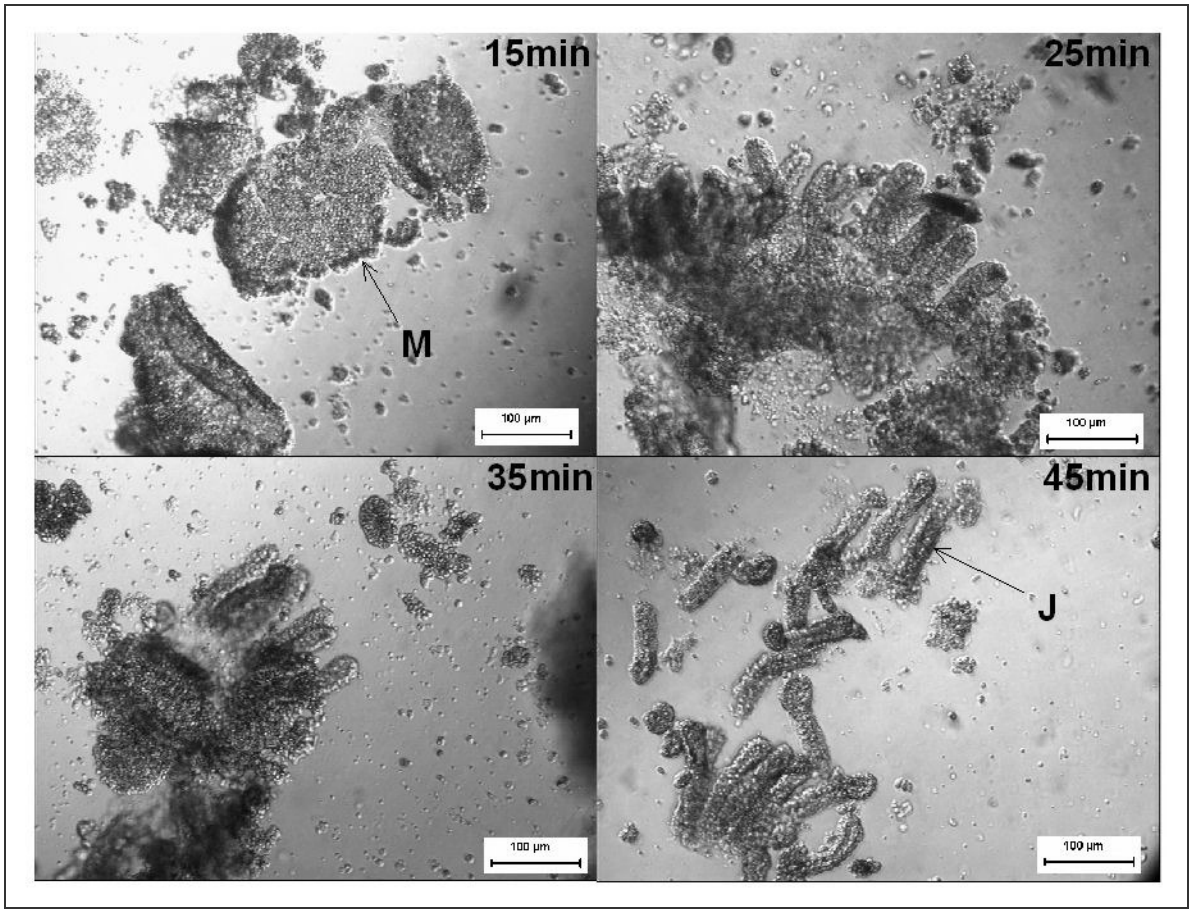


Abbildung 14: Isolation der unterschiedlichen Enterozytenpopulationen des Rattendarms
Die Zellisolation erfolgte mittels EDTA über mehrere Inkubationsschritte (15, 25, 35 und 45 min). Diese Vorgehensweise bewirkte, dass die ersten Fraktionen die maturierten Zellen der Zotten enthielten und erst in späteren Fraktionen die juvenilen Zellen der Krypten auftraten. (J: juvenile Zellen der Krypten, M: maturierte Zellen der Zotten)

Daher wurden in der folgenden Versuchsbeschreibung die einzelnen Enterozytenpopulationen voneinander getrennt. Die Trennung erfolgte zeitabhängig mittels EDTA, wobei die Zellen der Darmzotten zu früheren Zeitpunkten, als die Krypten von der Darmwand gelöst werden konnten (siehe Abschnitt 2.5.3). Es ergaben sich somit vier verschiedene Fraktionen, (Inkubationszeit: 15, 25, 35, 45 min) die im Mikroskop den verschiedenen Zellschichten zugeordnet wurden und in Abbildung 14 dargestellt sind. Die erste Fraktion (15 min) enthielt hauptsächlich Zotten. Die folgenden zwei Fraktionen stellten Mischfraktionen dar und setzten sich sowohl aus Zotten, als auch aus Krypten zusammen, wobei die zweite Fraktion (25 min) mehr Zotten und die dritte Fraktion (35 min) mehr Krypten enthielt. In der letzten Fraktion (45 min) waren ausschließlich Krypten zu finden. Wie in Abbildung 14 dargestellt, konnte man zungenähnliche Lappen in der „15 min Fraktion“ erkennen, die die Zotten darstellen und

die maturierten Enterozyten enthalten. In der „25 min Fraktion“ sieht man in Abbildung 14 den unteren Bereich einer Zotte und die daran haftenden, fingerförmigen Krypten, wobei an jeder Zotte ca. 10 Krypten haften (Komuro und Hashimoto 1990). In der „45 min Fraktion“ waren keine Zotten mehr vorhanden, sondern nur noch abgetrennte Krypten, die juvenile, zur Zellteilung befähigte Enterozyten enthalten. Alle Fraktionen wurden im Anschluss mittels Western Blot auf die Expression von spezifischen Markerproteinen hin untersucht, die die genaue Zuordnung der Fraktionen zu den Zelltypen ermöglichte.

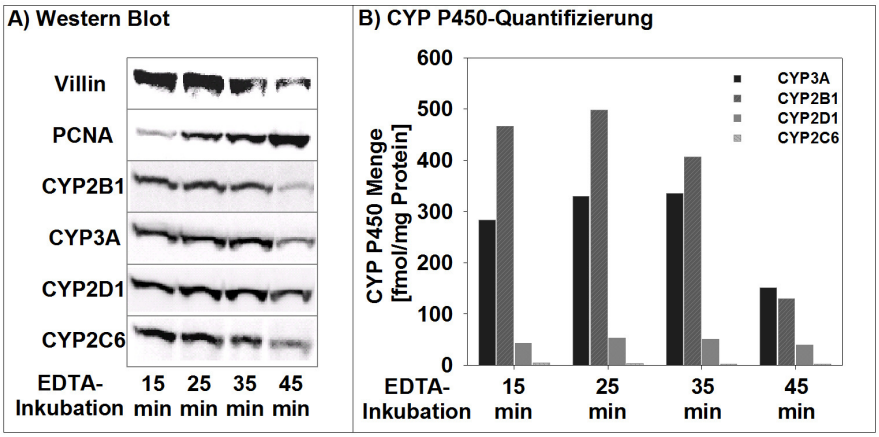


Abbildung 15: CYP P450 Expression in den einzelnen Enterozytenpopulationen
In A) sind die immunreaktiven Western Blot Banden der einzelnen CYP P450 Isoformen und der verwendeten Markerproteine (PCNA, Villin) in den Enterozytenpopulationen dargestellt. In B) sind die quantitativen CYP P450 Mengen, berechnet anhand von Supersomen™-Standards (siehe Abschnitt 2.6.4), zusammengetragen.

3.4.1. Expression von Markerproteinen in den Enterozytenpopulationen

Als Markerproteine wurden Villin und PCNA ausgewählt. Villin, ein Protein der Bürstensaummembran, stellt dabei das Markerprotein für die maturierten Enterozyten dar. Dagegen bildet PCNA, ein Protein der DNA-Replikation, die juvenilen Zellen der Krypten ab. Für die Western Blot Analyse wurden die Zellfraktionen in Lysispuffer aufgeschlossen und anschließend in der Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Immundetektion erfolgte mittels Antikörpern, die jeweils gegen Villin bzw. PCNA gerichtet waren (siehe Abschnitt 2.6.2-3). Im Immunblot wurden Expressionssignale für beide Proteine nachgewiesen, die in Abbildung 15A dargestellt sind, wobei die Villin- bzw. PCNA-Bande bei 90 bzw. 30 kDa detektiert wurde. Wie zu erwarten war, zeigten beide Proteine unterschiedlich starke immunreaktive Banden in den einzelnen Zellfraktionen. Es zeigte sich, dass Villin die stärkste immunreaktive Bande in der ersten Fraktion (15 min) aufwies, die nur maturierte Enterozyten enthielt. In der letzten Fraktion (45 min), die Zellen der Krypten enthielt, war nur noch eine schwache Villinexpression zu erkennen. Wie weiterhin zu erwarten, zeigte PCNA einen im Vergleich zu

Villin gegensätzlichen Expressionsverlauf mit der stärksten immunreaktiven Bande in der letzten Fraktion (45 min), die nur noch Zellen der Krypten enthielt. Somit konnte die phänotypische Einteilung in juvenile und maturierte Enterozytenpopulation auch auf Proteinebene bestätigt werden.

3.4.2. Expression von CYP P450 in den Enterozytenpopulationen

Um die Lokalisation der CYP P450 Proteine zu analysieren, wurden die einzelnen Zellfraktionen auf verschiedene CYP P450 Isoformen untersucht. Die Analyse der Zelllysate erfolgte, wie bereits oben beschrieben, wobei die Immundetektion mit den CYP P450 Antikörpern durchgeführt wurde, die auch schon für die Quantifizierung dieser in den Intestinal- und Leberhomogenaten verwendet wurden. Die Ergebnisse der Immundetektion sind in Abbildung 15 dargestellt. Immunreaktive Banden wurden in allen Fraktionen um die 55 kDa detektiert, wobei die ersten drei Zellfraktionen (15, 25, 35 min) gleichbleibend starke immunreaktive Banden für alle untersuchten CYP P450 Isoformen zeigten. In der letzten Fraktion, die Zellen der Krypten enthielt, nahm die Stärke des immunreaktiven Signals für CYP3A, 2B1 und 2C6 ab, während für CYP2D1 in allen vier Fraktionen konstant starke Expressionsbanden detektiert wurden.

Die Quantifizierung der CYP P450 immunreaktiven Banden erfolgte, wie bereits unter Abschnitt 3.3 beschrieben, mittels Supersomen™-Standards im quantitativen Western Blot Verfahren. Dabei waren auch in den isolierten Enterozytenpopulationen CYP2B1 und 3A die dominierenden Isoformen, während CYP2D1 und 2C6 nur untergeordnete Rollen spielten (siehe Abbildung 15B). In den ersten drei Fraktionen, die maturierte Enterozyten enthielten, änderte sich die CYP2B1, 3A und 2C6 Proteinkonzentration nicht wesentlich und verblieb bei ca. 500, 300 bzw. 4 fmol/mg Protein. In der letzten Fraktion, die nur aus Krypten bestand, sank die CYP2B1 Menge um das 4fache, während die CYP3A und 2C6 Mengen um das 2fache absanken. Somit kann man sagen, dass die Zellen der Zotten die Hauptmenge dieser CYP P450 Isoformen enthalten. Interessanterweise zeigte CYP2D1 eine konstante Expression (ca. 50 fmol/mg Protein) in allen Enterozytenpopulationen.

3.5. Immunhistochemie

Zur Bestätigung der biochemischen CYP P450 Daten wurde eine immunhistochemische Analyse zur Untersuchung der CYP P450 Expression entlang des Rattendarms (horizontale Achse) und innerhalb der Enterozytenpopulationen (vertikale Achse) durchgeführt.

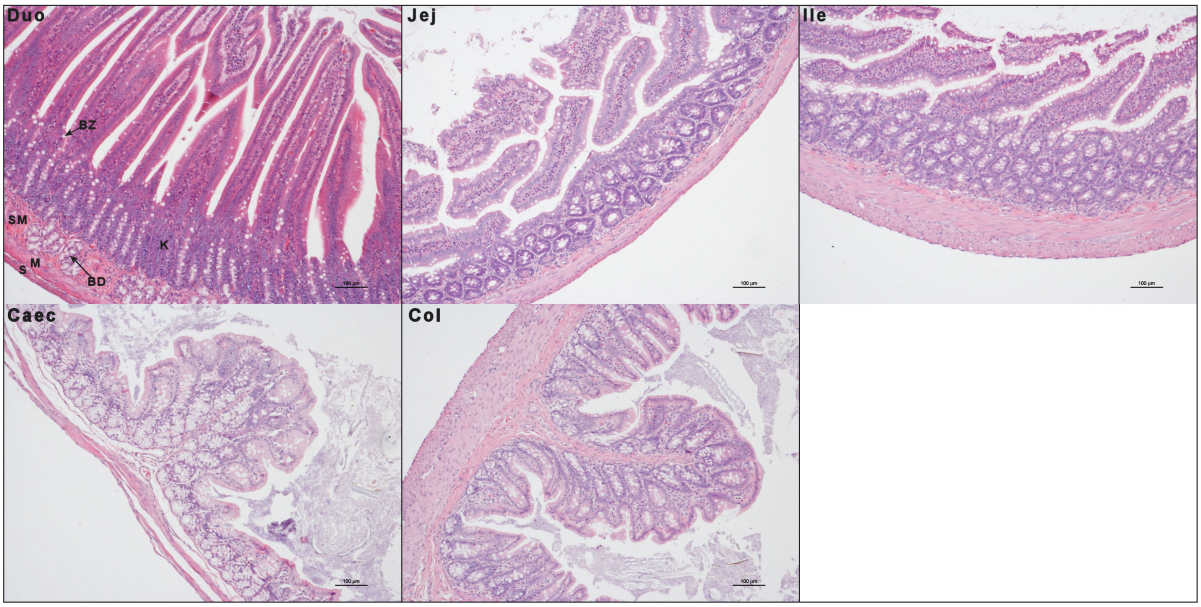


Abbildung 16: Darstellung der Darmmorphologie der Ratte anhand von gefärbten Paraffinschnitten
Die Paraffinschnitte (4-6 µm) von Proben aus den fünf großen Darmregionen (Duodenum (Duo), Jejunum (Jej), Ileum (Ile), Caecum (Caec) und Colon (Col)) wurden mit Hämatoxylin-Eosin angefärbt. (K: Krypten; Z: Zotten; M: Muskelschicht; S: Serosa; SM: Submukosa; BD: Brunnersche Drüsen; BZ: Becherzellen)

Dafür wurden 0.5 cm lange Proben aus dem Duodenum, Jejunum, Ileum, Caecum und Colon isoliert, histologische Paraffinpräparate angefertigt und nachfolgend mit Hämatoxylin-Eosin bzw. mit verschiedenen Antikörpern gefärbt (siehe Abschnitt 2.6.5).

3.5.1. Phänotypische Beurteilung der Darmmorphologie

Um die Darmmorphologie besser beurteilen zu können, wurde eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung durchgeführt. Die Phasenkontrastaufnahmen der Gewebefärbungen sind in Abbildung 16 zusammengestellt. Dort sind Ausschnitte aus Querschnitten der Darmwand dargestellt, wobei das Darmlumen zum oberen Rand (außer Colon) der Bilder gerichtet ist. Die Darmwand selber ist, vom Lumen aus, aus folgenden Schichten aufgebaut: Mukosa, Submukosa, Muskelschicht und Serosa. Die Mukosa setzt sich wiederum aus Zotten, Krypten und Lamia Propia zusammen. Wie man in Abbildung 16 erkennen kann, veränderte sich die Morphologie der Darmwand entlang des Rattendarms. Besonders deutliche Unterschiede sind in den Zotten erkennbar. Während sie im Duodenum noch eine langgestreckte Form aufwiesen, nahmen sie zum Dickdarm hin an Länge und Anzahl stark ab. Auch die Krypten waren im Duodenum länglich geformt und zeigten ab dem Jejunum ein eher rundes Profil. Die Anzahl der Krypten war im Ileum am Größten und im Colon am Geringsten. Auch die Submukosa zeigte deutliche regionale Unterschiede: Im Duodenum war sie sehr dick und im Ileum und Caecum relativ dünn ausgebildet. Die unter der Submukosa gelegene

Längsmuskelschicht war hingegen im Colon, gefolgt von Ileum und Duodenum am Stärksten ausgeprägt und im Jejunum und Caecum nur als sehr dünne Schicht erkennbar. Auch die unter dem Muskel gelegene Serosa veränderte sich entlang des Darms und zeigt die stärkste Ausprägung im Ileum und Colon, während sie im Jejunum und Caecum sehr dünn ausfiel.
Neben den Schichten der Darmwand veränderte sich auch die Zusammensetzung der Zellpopulationen entlang des Darms. So nahm die Anzahl der Becherzellen entlang des Darms weiter zu und ist im Caecum und Colon am Größten, während die Anzahl an Enterozyten entlang des Darms abnahm, wie auch schon im Western Blot anhand des Referenzprotein Villin zu erkennen (siehe Abbildung 10). Wie zu erwarten, enthielt auch nur die stark ausgeprägte Submukosa des Duodenums die Brunnerschen Drüsen. Diese Drüsen produzieren Bikarbonat, um den sauren Mageninhalt zu neutralisieren.
Zusammenfassend kann man sagen, dass sich die Morphologie der Darmwand durch starke regionale Unterschiede auszeichnet, die sich direkt auf das Absorptionsvermögen der einzelnen Regionen und auch auf die Expression von spezifischen Proteinen auswirken könnte.

3.5.2. Immunhistochemische Analyse der Markerproteine Villin und Ki-67

Zur Charakterisierung der einzelnen Zellpopulationen wurden die Gewebeschnitte mit Antikörper gegen Ki-67 und Villin immunhistochemisch untersucht (siehe Abschnitt 2.6.5). Ki-67 stellt genau wie PCNA einen Proliferationsfaktor dar, der ausschließlich in Zellen exprimiert wird, die sich im Zellzyklus (G1, S, G2 Phase) befinden und nicht in ausdifferenzierten Zellen (G0 Phase). Villin ist, wie oben bereits erwähnt, ein Markerenzym für Enterozyten und wird dort vor allem entlang der Bürstensaummembran exprimiert.
In Abbildung 17 ist das Verteilungsmuster und die Lokalisation von Ki-67- und Villin-positiven Zellen in ausgewählten Abschnitten des Rattendarms dargestellt. Daraus ist ersichtlich, dass Ki-67 hauptsächlich in den Krypten, eine Region in der undifferenzierte, noch proliferationsfähige Enterozyten überwiegen, exprimiert wurde. Entlang der langgestreckten Zotten nahm die Anzahl der Ki-67-positiven Zellen immer weiter ab und konnte schließlich in den Zottenspitzen nicht mehr detektiert werden. Eine vergleichbare Verteilung ergab sich bei der immunhistochemischen Analyse der Gewebeschnitte von Duodenum, Jejunum und Colon. Unterschiede zeigten sich jedoch in der Analyse der Ileums und Caecums. Während im Ileum sowohl die Zotten, als auch die Krypten vergleichsmäßig

stark mit dem Ki-67 Antikörper gefärbt wurden, wurden im Caecum nur einzelne Bereiche der Krypten durch Ki-67 angefärbt.

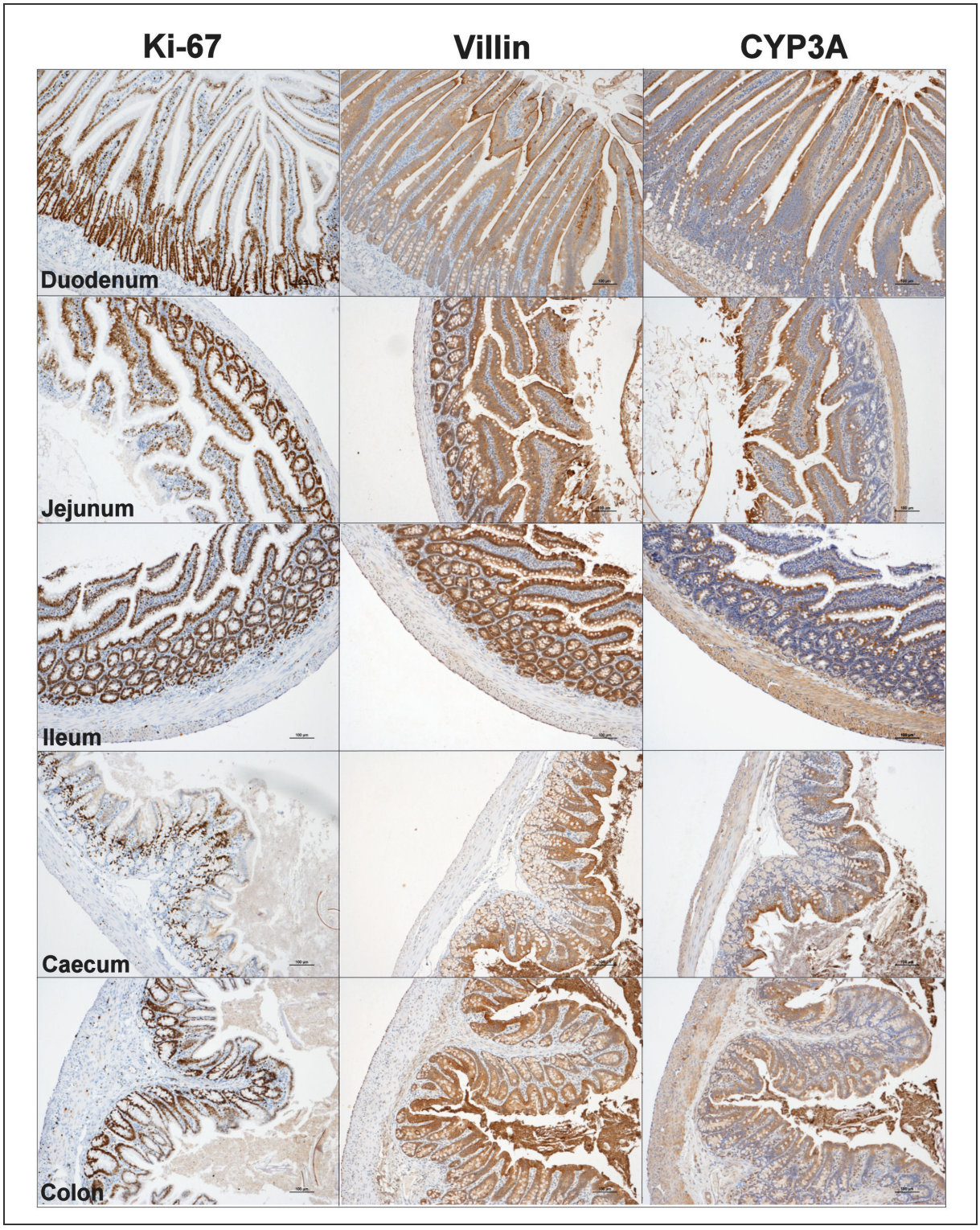


Abbildung 17 Immunhistoschemische Färbung von Ki-67, Villin und CYP3A entlang des Rattendarms. Paraffinschnitte (4-6 µm) von Darmstücken aus fünf verschiedenen Regionen (Duodenum, Jejunum, Ileum, Caecum und Colon) wurden immunhistochemisch mittels Antikörper gegen Ki-67, Villin und CYP3A gefärbt und anschließend mit Hämatoxylin gegen gefärbt. Ki-67 und Villin sind Markerproteine für Krypten bzw. Zotten.

Im Gegensatz zu Ki-67 wurde Villin in den Krypten aller Darmregionen, mit Ausnahme des Ileums, nur sehr gering exprimiert, jedoch sehr stark in den Zotten. Besonders im Duodenum ist die Expression von Villin entlang der Bürstensaummembran besonders gut erkennbar gewesen. In den Gewebeschnitten des Ileums konnte, wie auch schon für Ki-67 beschrieben, sowohl in den Krypten, als auch in den Zotten eine vergleichsweise starke Villinfärbung detektiert werden. Beide Markerproteine wurden entlang des gesamten Darms exprimiert. Die Zahl der Zellen dagegen schien entlang des Darms durch die Verringerung der Zotten- und der Kryptenlänge deutlich abzunehmen. Dagegen wurden Ki-67 und Villin, wie zu erwarten, nur in den Epithelzellen der Mukosa exprimiert und nicht in den Zellen der Lamina Propia, Längsmuskulatur und Serosa. Die Submukosa dagegen zeigte eine geringe Villin-Färbung, jedoch keine Ki-67-Färbung. Die Becherzellen zeigten weder Ki-67-, noch Villin-Färbung.
Im Rahmen der immunhistochemischen Untersuchung konnte gezeigt werden, dass Villin stärker in den Zotten und Ki-67 stärker in den Krypten in den untersuchten Darmregionen exprimiert wurde. Eine Ausnahme stellte jedoch das Ileum dar, dort wurden beide Proteine sowohl in den Krypten, als auch in den Zotten in vergleichbaren Mengen exprimiert.

3.5.3. Immunhistochemischen Analyse der CYP3A Expression

Da CYP3A in den Western Blot Analysen der stärksten Expressionsveränderung entlang des Darms unterlag, wurde CYP3A für die immunhistochemische Verifizierung der Western Blot Daten ausgewählt. Für die Lokalisationsexperimente in den verschiedenen Gewebeschnitten wurde der Antikörper Anti-CYP3A (P6) (Santa Cruz™) eingesetzt. In Abbildung 17 sind die Phasenkontrastaufnahmen der Antikörperbehandlung von Paraffinschnitten der einzelnen Darmabschnitte zusammengetragen. Es zeigten sich deutliche Expressionsunterschiede zwischen Duodenum, Jejunum und Ileum. Nichtsdestotrotz, wurde CYP3A in allen Darmregionen beinahe ausschließlich in den Zotten und nur im sehr geringen Umfang in den Krypten exprimiert. Am Deutlichsten war dies in den Gewebeschnitten von Duodenum und Jejunum erkennbar. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Ergebnissen aus der Proteinexpressionsanalyse der unterschiedlichen Enterozytenpopulationen (siehe Abschnitt 2.5.3). Auch hier konnte in den maturierten Enterozyten die stärkste CYP3A nachgewiesen werden. Im Ileum war nur eine sehr schwache CYP3A Färbung von einigen Enterozyten dektierbar, was wiederum im Einklang mit den Proteinexpressionsdaten der Intestinalhomogenaten steht (siehe Abschnitt 3.2.1). Auch dort konnte eine starke Abnahme der CYP3A Expression zum distalen Darmende beobachtet werden. Im Colon und Caecum

stieg die zelluläre Expression von CYP3A im Vergleich zum Ileum wieder etwas an, blieb aber deutlich unter der Expression des Duodenums und Jejunums. Die Lamina Propia, die Submukosa, die Längsmuskulatur und die Serosa zeigten eine geringe Expression von CYP3A, während die Becherzellen und Brunnerschen Drüsen kein CYP3A exprimierten. Zusammenfassend kann man sagen, dass die CYP3A Expression entlang des Dünndarms stark abnimmt und im Ileum kaum CYP3A exprimiert wird.

3.6. Intestinaler Metabolismus mit dem primären Enterozyten-Modell

Da die Anwesenheit von CYP P450 Proteinen nicht unbedingt gleichbedeutend mit deren metabolischen Aktivität ist, ist die Überprüfung der Funktionalität von erheblicher Bedeutung. Für die Überprüfung wurden sowohl isolierte Enterozyten, als auch Darmsstücke eingesetzt. Für die Analyse der metabolischen Aktivität mittels Enterozyten musste zunächst eine geeignete Methode gefunden werden, um die Enterozyten aus dem Darm zu isolieren.

3.6.1. Methodenentwicklung

In Vorversuchen wurden verschiedene Zellisolationsmethoden, z.B. Isolation mittels Vibromixer, Abschaben der Enterozyten und die Isolation mittels EDTA ausgetestet.

Isolation mit dem Vibromixer:
Bei der Methode wurde eine Metallschraube verwendet, auf die ein umgestülpter Darm aufgezogen wurde. Durch Vibrationen sollten sich die Zellen aus dem Gewebeverband herauslösen. Mit dieser Methode konnten jedoch auch nach 45 minütiger Vibration nicht genügend Zellen isoliert werden. Außerdem führte das Aufziehen des Darms auf die Metallschraube zu Verletzungen des Darmgewebes.
Abschaben der Darmwand:
Durch einfaches Abschaben der Zellen von der Darmwand konnten zwar ausreichende Zellmengen erzielt werden, allerdings wiesen die Zellen nur eine ungenügende Vitalität (45-50 %) auf.
Als beste Isolationsmethode erwies sich die EDTA-Methode (siehe Abschnitt 2.7.1). Bei dieser Methode wurde EDTA verwendet, um die Zell-Zell-Interaktionen zu lösen. Die isolierten Enterozyten wiesen nach der Isolation noch eine Zellvitalität, von 70-80 % auf. Die Methode wurde weiter hinsichtlich des Testosteron-(TESTO)-Abbaus optimiert. TESTO

unterliegt einem starken intestinalen Metabolismus und kann mittels HPLC-Analytik schnell und einfach quantifiziert werden.

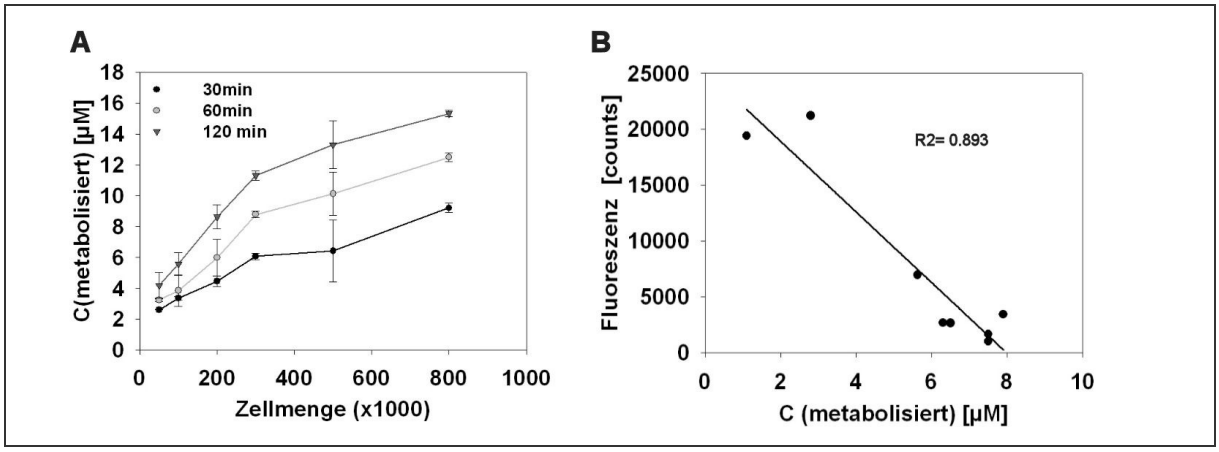


Abbildung 18: Optimierung des metabolischen Assays mittels des primären Enterozyten-Modells
In A) ist die abgebaute TESTO-Konzentration der eingesetzten Zellmenge gegenübergestellt, wobei die Daten für drei verschiedene Inkubationszeiten gezeigt sind. In B) ist die metabolisierte TESTO-Konzentration bei einer Zellmenge von 300 000 der Caspaseaktivität gegenübergestellt. Die Caspaseaktivität ist hier als Fluoreszenzsignal des Apo-One-Homogenous-Caspase-3/7-Assay™ bei einer Zellmenge von 40 000 ausgegeben, wobei gilt je höher die Fluoreszenz, desto aktiver sind die Caspasen.

Die Optimierung erfolgte in verschiedenen Schritten:

Zuerst wurde festgestellt, dass die Enterozyten mehr TESTO metabolisierten, wenn sie während der Inkubation geschüttelt wurden (Daten nicht dargestellt). Anschließend wurde die optimale Zellmenge für den Aktivitätsassay bestimmt. Dazu wurde der TESTO-Abbau von verschiedenen Zellmengen in 48-Loch-Zellkulturplatten über mehrere Zeitpunkte hinweg verfolgt und die Konzentration an abgebautem TESTO errechnet. Die Ergebnisse dieser Studie sind in Abbildung 18A graphisch zusammengefasst. Daraus kann man entnehmen, dass mit steigender Enterozytenzahl ein linearer Anstieg des TESTO-Abbaus erfolgt. Bei der Verwendung von mehr als 300 000 Zellen pro Vertiefung einer 48-Loch-Zellkulturplatte stieg der TESTO-Metabolismus zwar weiter an, jedoch nicht mehr im linearen Bereich. Deswegen wurde eine Zellmenge von 300 000 Zellen pro Vertiefung einer 48-Loch-Zellkuturplatte für alle weiteren Versuche verwendet. Zu Beginn zeigte sich bereits, dass die metabolische Aktivität von unterschiedlichen Isolationen sehr stark schwankte und bisweilen die Zellen völlig metabolisch inaktiv waren. Es ist bekannt, dass Enterozyten sehr schnell die Apoptose einleiten, wenn sie aus ihrem Zellverband gelöst werden. Daher wurde der apoptotische Status der isolierten Enterozyten mittels Messung der Caspaseaktivität (Apoptosemarker) überprüft. Es zeigte sich tatsächlich, dass die Höhe der Caspaseaktivität mit der metabolischen Aktivität der Enterozyten korrelierte (siehe Abbildung 18B).

Tabelle 7: Haupt- und Nebenmetabolite von Testosteron
Ein Hauptmetabolit hat eine Umsatzrate von mehr als 1 nmol an hydroxylierten Metabolit/min/nmol aufgereinigter CYP P450 Isoform. Die Abkürzungen beziehen sich auf die monohydroxylierten Testosteronmetabolite (z.B. 6ß steht für 6ß-Hydroxytestosteron). Die Ausnahmen stellen A für Androstenedion und 6DHT für 6-Dehydrotestosteron dar (Arlotto et al. 1991).

beteiligte CYP P450 Enzyme	Hauptmetabolit	Nebenmetabolite
CYP1A1	6ß	2ß
CYP1A2	-	6ß
CYP2A1	7α, 6α	6DHT
CYP2A2	15α, 18, 6ß, 7α	A, 15ß
CYP2B1	16α, 16ß, A	-
CYP2B2	A	16α, 16ß
CYP2C7	-	16α
CYP2C11	2α, 16α, A	6ß
CYP2C12	-	1α, 15α
CYP2C13	6ß	15α, 16α
CYP3A1	2ß, 6ß, 15ß, 6DHT	18, 1ß, 16ß, A
CYP3A2	2ß, 6ß	2α, 16ß, A

Je höher die Caspaseaktivität stieg, desto geringer wurde die TESTO-Abbaurate. Aufgrund dieser Beobachtung wurde ein Schwellenwert für die Caspaseaktivität festgelegt (2000 counts bei 40 000 Zellen), der nicht übertreten werden darf, wenn ein metabolischer Assay durchgeführt werden soll. Um die Apoptose zu vermindern, wurden verschiedene, kommerziell erhältliche Apoptoseinhibitoren auf ihre Caspaseinhibition hin überprüft. Letztendlich wurde der irreversible wirkende ICE-Inhibitor-I (5 µM) als Mediumzusatz ausgewählt. Er führte zur stärksten Inhibition der Caspaseaktivität. Die Enterozyten zeigten in Gegenwart dieses Inhibitors eine gleichbleibende metabolische Aktivität gegenüber TESTO.

3.6.2. Intestinaler Metabolismus mit dem primären Enterozyten-Modells

Für die Charakterisierung des intestinalen Metabolismus wurden vier verschiedene Substrate auf ihren Abbau durch die Enterozyten hin untersucht.

Als ein Test-Substrat wurde TESTO ausgewählt. TESTO kann auf verschiedene Wege metabolisiert werden, aber unter anderem auch durch diverse CYP P450 Enzyme (siehe Tabelle 7). Neben den CYP P450 Enzymen unterliegt TESTO auch dem Metabolismus von anderen Enzymen, wie z.B. 17ß-HSD2 und Enzymen des Phase-II-Metabolismus, wie z.B. UGTs und SULTs (Chung und Coffey 1977; Schanzer 1996).

Des Weiteren wurden Dextromethorphan (DEX), Midazolam (MDZ) und Bupropion (BUPR) für das Test-Set ausgesucht, weil sie jeweils von einem spezifischen CYP P450 Protein, im Falle von DEX von zwei CYP P450 Isoenzymen metabolisiert werden. DEX ist ein mit

Morphin und Codein verwandter Hustenblocker (Antitussivum) und kann über zwei verschiedene Abbauwege oxidativ demethyliert werden (siehe Abbildung 19). Zum einem kann DEX über eine O-Demethylierung zu Dextrorphan metabolisiert werden. Diese Reaktion wird vor allem durch CYP P450 Enzyme der CYP2D Unterfamilie katalysiert. Zum anderem kann DEX über eine N-Demethylierung zum 3-Methoxymorphinan (3-MM) umgewandelt werden, wobei diese Reaktion vor allem von Mitgliedern der CYP3A Unterfamilie katalysiert wird. Beide Metaboliten können in einer folgenden N-Demethylierung (Dextrorphan) bzw. O-Demethylierung (3-MM) weiter zu 3-Hydroxymorphinan (3-HM) umgewandelt werden, wobei wieder die jeweiligen Enzyme CYP3A bzw. 2D am Abbau beteiligt sind (Zysset et al. 1988; Kerry et al. 1993; Witherow und Houston 1999). Sowohl Dextrorphan, als auch 3-HM können anschließend einem Phase-II-Metabolismus unterliegen und jeweils Glucuronidierungen durchlaufen (Zysset et al. 1988).

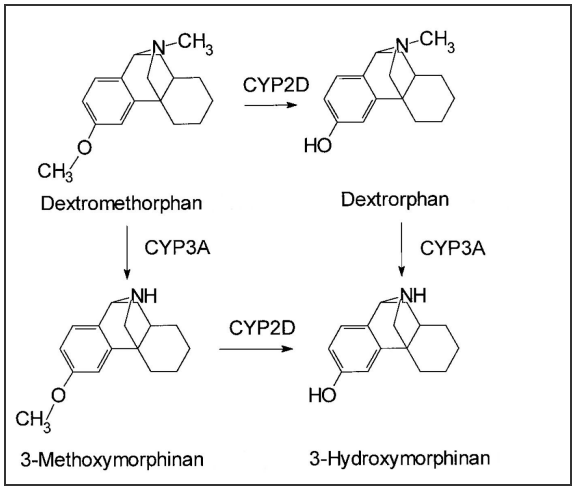


Abbildung 19: Metabolimus von Dextromethorphan über CYP P450 Enzyme

MDZ dagegen ist ein Arzneistoff aus der Gruppe der Benzodiazepine und wird unter anderem als Hypnotikum in der Anästhesie und im Rettungsdienst als Bestandteil der Narkose eingesetzt. MDZ wird hauptsächlich zu 1-Hydroxy- (1OH-MDZ) und 4-Hydroxymidazolam (4OH-MDZ) metabolisiert (Strukturen siehe Anhang 7), wobei hier in der Ratte vor allem CYP3A und zu einem ganz geringen Anteil auch CYP2C, und 2D verantwortlich sind (Kobayashi et al. 2002).

Das letzte Substrat BUPR ist ein selektiver Noradrenalin- und Dopamin- (geringfügig auch Serotonin-) Wiederaufnahmehemmer aus der Gruppe der atypischen Antidepressiva. BUPR wird in der humanen Leber zu 1-Hydroxybupropion (1OH-BUPR) umgewandelt (Strukturen siehe Anhang 7), wobei im Menschen hauptsächlich CYP2B6, 2E1 und im viel geringeren

Maße auch CYP3A4 für den Metabolismus von BUPR verantwortlich sind (Faucette et al. 2000). In Hepatozyten der Ratte korreliert ebenfalls die Bupropionhydroxylierung mit der CYP2B1 Expression (Richert et al. 2008). Die Proteinexpression aller am Metabolismus der Test-Substanzen beteiligten CYP P450 Enzyme wurde in den Expressionsstudien dargestellt (siehe Abschnitt 3.2).

Tabelle 8: $V_{Initial}$ und CL_{int} der Test-Substrate im primären Enterozyten-Modell.
Dargestellt sind die gemittelten Werte aus drei verschiedenen unabhängigen Versuchen und die dazugehörigen Standardabweichungen. Die Werte wurden mit einer Zellmenge von 300 000 und einer Substratkonzentration von 25 µM (Testosteron) bzw. 3 µM ermittelt.

Substanz	$V_{Initial}$ des Abbaus		CL_{int} primäre Enterozyten	
	pmol/min/ mg E-Protein	*pmol/min/ 1 Mio Zellen*	*µL/min/ mg E-Protein*	*µL/min/ 1 Mio Zellen*
TESTO	642.2 ± 80.3	475.3 ± 59.4	10.11 ± 0.54	7.48 ± 0.40
DEX	22.1 ± 0.8	8.7 ± 0.5	1.18 ± 0.18	0.65 ± 0.10
MDZ	61.2 ± 8.7	35.7 ± 2.0	2.01 ± 0.52	1.29 ± 0.34
BUPR	43.0 ± 13.2	31.8 ± 9.7	2.09 ± 0.55	1.55 ± 0.42

MW ± SD; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; TESTO: Testosteron; DEX: Dextromethorphan; MDZ: Midazolam; BUPR: Bupropion; E-Protein: Enterozytenprotein

Im Versuchsansatz wurden frisch isolierte Enterozyten mit jeweils 3 µM (DEX, MDZ und BUPR) bzw. 25 µM (TESTO) Substanz versetzt und bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Die Reaktionen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten abgestoppt und die Menge an metabolisierter Substanz bzw. die Menge an gebildetem Metaboliten mittels HPLC- bzw. LC-MS/MS-Analytik bestimmt (siehe Abschnitt 2.10). Im Konzentrations-/Zeit-Diagramm wurden die Initialgeschwindigkeiten der metabolischen Reaktionen bestimmt, während die $CL_{int\ pE}$-Werte mit der unter Abschnitt 2.7.3.2 vorgestellten Berechnung ermittelt wurden.
Die Ergebnisse zum Substratabbau sind in Tabelle 8 zusammengetragen. Die Initialgeschwindigkeiten wurden normalisiert auf 1 Mio Zellen bzw. 1 mg Enterozytenprotein (E-Protein) angegeben. Beide Normalisierungswerte wurden dargestellt, um die Daten direkt mit den Ergebnissen der „Everted Sacs" Versuche vergleichen zu können. TESTO zeigte mit 642 pmol/min/mg E-Protein die schnellste Abbaugeschwindigkeit und eine $CL_{int\ pE}$ von 10 µL/min/mg E-Protein. Die anderen Substrate wurden mit 10-20fach geringeren Initialgeschwindigkeiten abgebaut. Es wurden daher auch deutlich geringere $CL_{int\ pE}$-Werte (1-2 µL/min/mg E-Protein) für die anderen Substanzen errechnet. Die Initialgeschwindigkeiten auf 1 Mio Zellen bezogen, waren dabei immer etwas niedriger, als die Geschwindigkeiten, die sich auf 1 mg E-Protein bezogen (siehe Tabelle 8). In den Proben konnten zudem diverse Metaboliten identifiziert werden. Die Ergebnisse dazu sind in Tabelle

9 zusammengefasst. Für TESTO konnte nur der Metabolit Androstenedion nachgewiesen werden. Androstenedion kann durch verschiedene CYP P450 Isoenzyme (CYP3A, 2B1), aber auch durch 17ß-HSD2, ein weiteres Phase-I-Enzym, gebildet werden.

Tabelle 9: $V_{Initial}$ der Metabolitenentstehung im primären Enterozyten-Modell.
Dargestellt sind die gemittelten Werte aus drei verschiedenen, unabhängigen Versuchen und die dazugehörigen Standardabweichungen. Die Initialgeschwindigkeiten wurden auf jeweils auf 1 mg Protein bzw. auf 1 Mio Zellen bezogen.

Metabolit	V_{Anfang} der Entstehung	
	[pmol/min/mg E-Protein]	*[pmol/min/1 Mio Zellen]*
Androstenedion	232 ± 16	171 ± 12
3-MM	2.39 ± 0.76	0.94 ± 0.29
1OH-MDZ	0.08 ± 0.03	0.06 ± 0.02
1OH-BUPR	0.35 ± 0.05	0.26 ± 0.03

3-MM: 3-Methoxymorphinan; 1OH-MDZ: 1-Hydroxymidazolam; 1OH-BUPR: 1-Hydroxybupropion; E-Protein: Enterozyten-Protein

Androstenedion entstand mit einer Initialgeschwindigkeit von 232 pmol/min/mg E-Protein und lag somit deutlich unter der Initialgeschwindigkeit des TESTO-Abbaus, was auf die Entstehung weiterer, nicht identifizierter Metabolite schließen lässt. Für DEX konnte von drei erwarteten Metaboliten nur 3-MM, ein CYP3A Metabolit, nachgewiesen werden. Die CYP2D1 Metabolite Dextrophan und 3-HM waren in den Proben nicht nachweisbar. Eine mögliche Ursache ist die zu geringe Expression von CYP2D1 im Darm der Ratte, wodurch kein nennenswerter Metabolismus zu erzielen ist. 3-MM entstand mit deutlich geringerer Initialgeschwindigkeit (2.4 pmol/min/mg E-Protein) als Androstenedion und lag ca. 10fach unter der Initialgeschwindigkeit seines Substrats DEX. Für MDZ konnte der erwartete CYP3A Metabolit 1OH-MDZ identifiziert werden, allerdings mit einer nur sehr geringen Initialgeschwindigkeit (0.08 pmol/min/mg E-Protein), die ca. 700fach unter der MDZ-Initial-geschwindigkeit lag. Für BUPR konnte der CYP2B1 Metabolit 1OH-BUPR dargestellt werden. Dieser wurde mit einer Initialgeschwindigkeit von 0.35 pmol/min/mg E-Protein gebildet und lag damit ca. 100fach unter der Initialgeschwindigkeit seines Substrats BUPR. Die Tatsache, dass alle Substrate mit höheren Initialgeschwindigkeiten abgebaut werden, als die Metaboliten entstehen, lässt vermuten, dass noch weitere Metaboliten entstehen und/oder die Metabolite weiter abgebaut werden.

3.7. Intestinaler Metabolismus mit dem „Everted Sac-Modell

Mit dem „Everted Sac“ Modell ist es möglich, neben dem Metabolismus, auch das Permeationsverhalten der Substrate und ihrer Metabolite über die Darmwand ins

Blutkompartiment zu charakterisieren. Diese Methode spiegelt daher die *in vivo* Situation deutlich stärker wieder, als die isolierten primären Enterozyten. Die Untersuchungen erfolgten abermals mit den Test-Substraten TESTO, DEX, MDZ und BUPR. Für die Studien wurde der Darm umgestülpt, kleine Darmsäckchen („Everted Sacs“) abgebunden und mit Substratlösung über unterschiedliche Zeiträume inkubiert (siehe Abschnitt 2.8). Anschließend wurde die Substanzmenge im Darmsäckchen (serosales Kompartiment), im umgebenen Medium (mukosales Kompartiment) und im Darmgewebe mittels HPLC- oder LC-MS/MS-Analytik (siehe Abschnitt 2.10) vermessen.

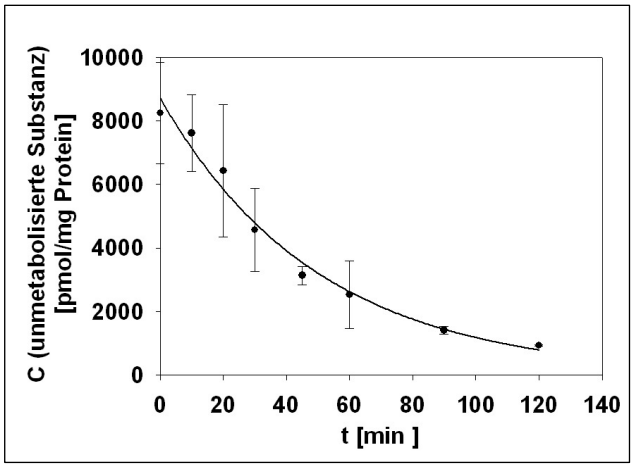


Abbildung 20: Zeitverlauf des TESTO-Metabolismus mit dem „Everted Sac“-Modell
Dargestellt sind die gemittelten Daten von drei verschiedenen Versuchen als Menge unmetabolisierter Substanz pro Gesamtprotein „Everted Sac“.

3.7.1. Zeitverläufe des intestinalen Metabolismus mit dem „Everted Sac“-Modell

Die Zeitverläufe beziehen sich auf Versuche, die ausschließlich mit „Everted Sacs“ des mittleren Jejunums gelaufen sind, da alle hier untersuchten metabolischen Enzyme dort exprimiert werden. In Abbildung 20 und 21A sind die Zeitverläufe des metabolischen Abbaus aller untersuchten Substanzen als nicht metabolisierte Substanzmenge pro Milligramm Gesamtprotein der „Everted Sacs“ (ES-Protein) dargestellt. Die dazugehörigen metabolischen Initialgeschwindigkeiten wurden anhand der Konzentrations-/Zeitprofile berechnet und sind in Tabelle 10 zusammengefasst. Die Initialgeschwindigkeiten wurden sowohl auf ES-Protein, als auch auf Protein der Enterozyten (E-Protein) alleine normiert. Dazu wurden einzelne „Everted Sacs“ entweder im Ganzen oder nur die von den „Everted Sacs“ abgeschabten Enterozyten mit NaOH verdaut. Die Proteinmenge von beiden Aufarbeitungen wurde anschließend analysiert und somit der Proteinanteil der Enterozyten an den „Everted Sacs“ bestimmt (siehe Abschnitt 2.8.3.1). Diese Vorgehensweise wurde gewählt, um die Initialgeschwindigkeiten der „Everted Sac“ Versuche direkt mit denen der primären Enterozyten vergleichen zu können. Alle Substanzen zeigten bis 30 min nach

Inkubationsbeginn einen linearen Abbau. Danach flachten die Kurven ab, was an einer Verminderung der Energievorräte, an einer Verschlechterung der Enterozytenvitalität oder einer Verringerung der Substratmenge liegen könnte.

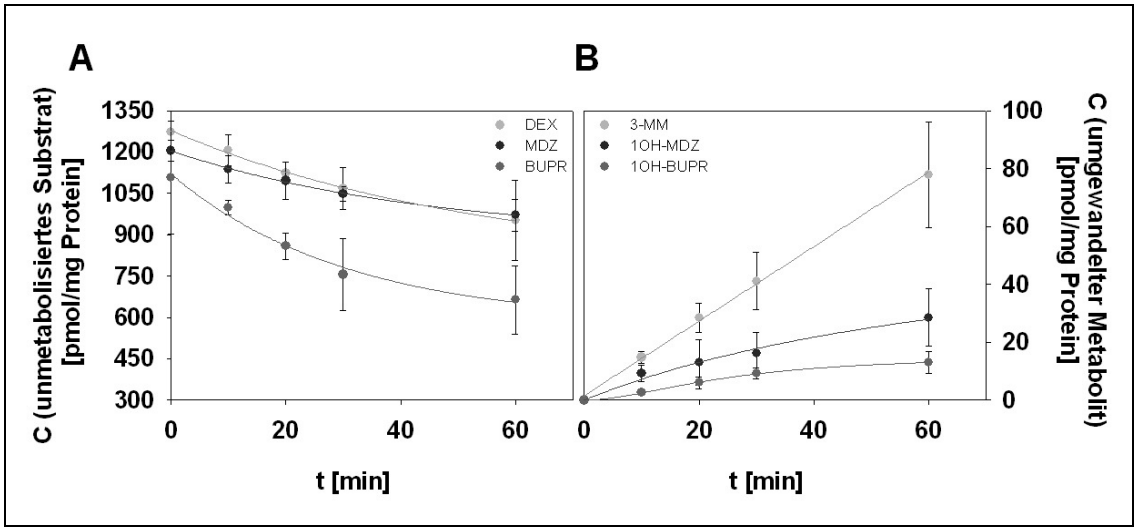


Abbildung 21: Zeitverlauf des DEX-, MDZ- und BUPR-Metabolismus mit dem „Everted Sac"-Modell
Die Zeitverläufe der Substrate (**A**) bzw. der Metabolite (**B**) als Menge unmetabolisierter bzw. gebildeter Substanz pro ES-Protein sind dargestellt. Die Daten stellen Mittelwerte von jeweils drei unabhängigen Versuchen dar. DEX: Dextromethorphan, MDZ: Midazolam; BUPR: Bupropion; 3-MM: 3-Methoxymorphinan; 1OH-MDZ: 1-Hydroxymidazolam; 1OH-BUPR: 1-Hydroxybupropion

Wie schon im Modell mit primären Enterozyten beobachtet, unterlag TESTO in diesem Versuch mit einer Initialgeschwindigkeit von 405 pmol/min/mg E-Protein dem stärksten Metabolismus. Die anderen Substanzen wurden dagegen mit weit geringeren Initialgeschwindigkeiten (siehe Tabelle 10) umgesetzt. So lag die Initialgeschwindigkeit von BUPR bei 60 pmol/min/mg E-Protein, während DEX bzw. MDZ nur noch mit einer Geschwindigkeit von 30 bzw. 17 pmol/min/mg E-Protein metabolisiert wurden.

Für alle Test-Substanzen konnten mit diesem „Everted Sac" Modell Metabolite identifiziert werden, deren Konzentrationen mit zunehmender Inkubationszeit anstiegen. DEX wurde, wie schon im Modell mit primärer Enterozyten, nur über CYP3A zum 3-MM abgebaut.

Tabelle 10: $V_{Initial}$ des intestinalen Metabolismus der TEST-Substrate mit dem „Everted Sacs" Modell
Dargestellt sind die gemittelten Werte von drei unabhängigen Versuchen und die dazugehörigen Standardabweichungen. Die Initialgeschwindigkeiten wurden jeweils für 1 mg ES-Protein und daraus die Initialgeschwindigkeit pro 1 mg E-Protein (*) nachträglich berechnet (siehe Abschnitt 2.8.3.1).

Substanz	$V_{Initial}$ „Everted Sac" *[pmol/min/mg ES-Protein]*	V_{Anfang} Enterozyten* *[pmol/min/mg E-Protein]*
TESTO	127 ± 13	405 ± 42
DEX	9 ± 2	30± 7
MDZ	5 ± 1	17± 4
BUPR	19 ± 1	60± 8

TESTO: Testosteron; DEX: Dextromethorphan; MDZ: Midazolam; BUPR: Bupropion;

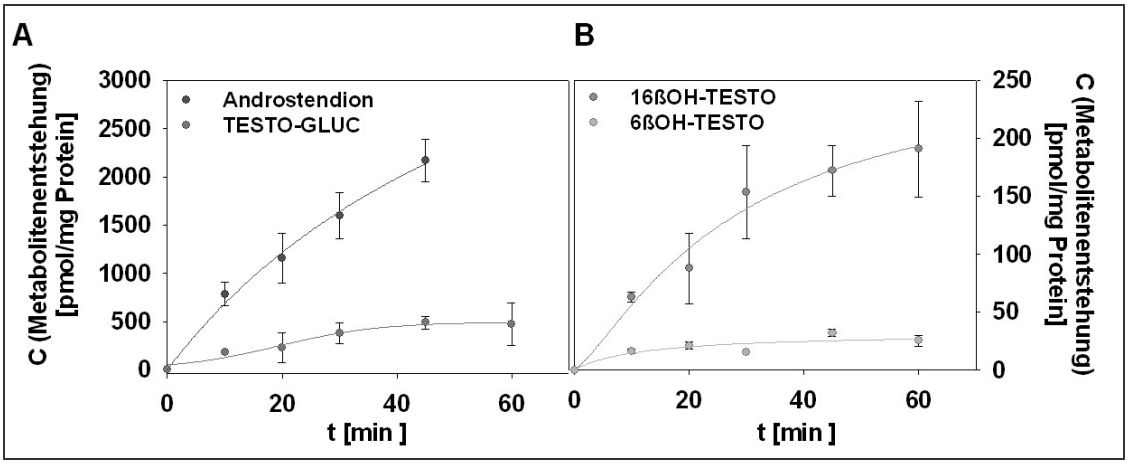


Abbildung 22: Zeitverlauf des Metabolitenentstehung von TESTO mittels „Everted Sacs"-Modell
Die Zeitverläufe der Entstehung der Testosteronmetabolite Androstenedion und TESTO-GLUC (**A**) bzw. von 16ßOH- und 6ßOH-TESTO (**B**) sind dargestellt als gebildete Substanz pro ES-Protein
TESTO-GLUC: Testosteron-Glucuronid; 16ßOH-TESTO: 16ß-Hydroxytestosteron; 6ßOH-TESTO: 6ß-Hydroxytestosteron

CYP2D1 zeigte somit auch in diesem Ansatz keine messbare Aktivität. Für MDZ bzw. BUPR konnte abermals der CYP3A bzw. 2B1 Metabolit 1OH-MDZ bzw. 1OH-BUPR nachgewiesen werden. Aus TESTO hingegen entstand mit diesem Modell eine ganze Batterie von Metaboliten, was vor allem auf die spezielle Probenaufarbeitung zurückzuführen ist. TESTO und seine Metabolite wurden mittels Ethylacetat aus den Proben heraus extrahiert, eingeengt, in Lösungsmittel aufgenommen und anschließend mittels HPLC-Analytik vermessen (siehe Abschnitt 2.8.2.2). Diese Methode hat den Vorteil, dass die Proben auf konzentriert und die biologische Matrix aus den Proben heraus extrahiert wird.

Tabelle 11: $V_{Initial}$ der Metabolitenentstehung mit dem „Everted Sac"-Modell
Dargestellt sind die gemittelten Werte von drei unabhängigen Versuchen und die dazugehörigen Standardabweichungen. Die $V_{Initial}$ wurde jeweils für 1 mg ES-Protein ermittelt und daraus die $V_{Initial}$ pro 1 mg Protein E-Protein (*) nachträglich berechnet (siehe Abschnitt 2.8.3.1).

Metabolit	**$V_{Initial}$ Darmstück** *[pmol/min/mg Protein]*	**$V_{Initial}$ Enterozyten (*)** *[pmol/min/mg Protein]*
Androstenedion	56 ± 1.9	178 ± 6
TESTO-GLUC	12 ± 2.7	37 ± 18
16ßOH-TESTO	5.0 ± 1.3	16 ± 4
6ßOH-TESTO	12 ± 0.1	3.7 ± 0.3
3-MM	1.3 ± 0.3	4.1 ± 0.9
1OH-MDZ	0.9± 0.6	2.9 ± 1.9
1OH-BUPR	0.3 ± 0.1	1.0 ± 0.3

TESTO-GLUC: Testosteron-Glucuronid; 16ßOH-TESTO: 16ß-Hydroxytestosteron; 6ßOH-TESTO: 6ß-Hydroxytestosteron; 1OH-MDZ: 1-Hydroxymidazolam; 1OH-BUPR: 1-Hydroxybupropion

Neben dem Hauptmetabolit Androstenedion (17ß-HSD2, CYP3A und 2B1) konnten so zwei weitere Phase-I-Metabolite 16ß-Hydroxytestosteron (16ßOH-TESTO; CYP2B1, 2C11) und

6ß-Hydroxytestosteron (6ßOH-TESTO; CYP3A, 1A1). Auch ein Phase-II-Metabolit, dass Testosteron-Glucuronid (TESTO-GLUC) konnte in diesem Versuchsansatz nachgewiesen werden. In Abbildung 21B und 22 sind die Zeitverläufe und in Tabelle 11 die Initialgeschwindigkeiten der Metabolitenentstehung dargestellt. Auch die Entstehung der Metaboliten verlief bis 30 Minuten nach Inkubationsbeginn linear, wobei die Zeitverläufe der TESTO-Metaboliten schon nach ungefähr 20-25 min abzuflachen schienen. Des Weiteren kann man in Tabelle 11 erkennen, dass die TESTO-Metabolite mit höheren Geschwindigkeiten gebildet wurden, als die Metaboliten der anderen Substanzen, wofür wahrscheinlich die höhere Substratkonzentration (25 µM) verantwortlich ist. Androstenedion entstand mit der höchsten Geschwindigkeit von 179 pmol/min/mg E-Protein, gefolgt von TESTO-GLUC (37 pmol/min/mg E-Protein), 16ßOH-TESTO (16 pmol/min/mg E-Protein) und 6ßOH-TESTO (4 pmol/min/mg E-Protein). Die anderen Substanzen wurden mit einer deutlich niedrigeren Konzentration (3 µM) eingesetzt. Interessanterweise wies 1OH-BUPR die geringste Entstehungsgeschwindigkeit (1 pmol/min/mg E-Protein) auf, obwohl BUPR mit der höchsten Initialgeschwindigkeit abgebaut wurde. Wie auch schon im primären Enterozyten-Modell wurden auch im „Everted Sac"-Modell die Substrate deutlich schneller abgebaut, als die Metabolite entstehen.

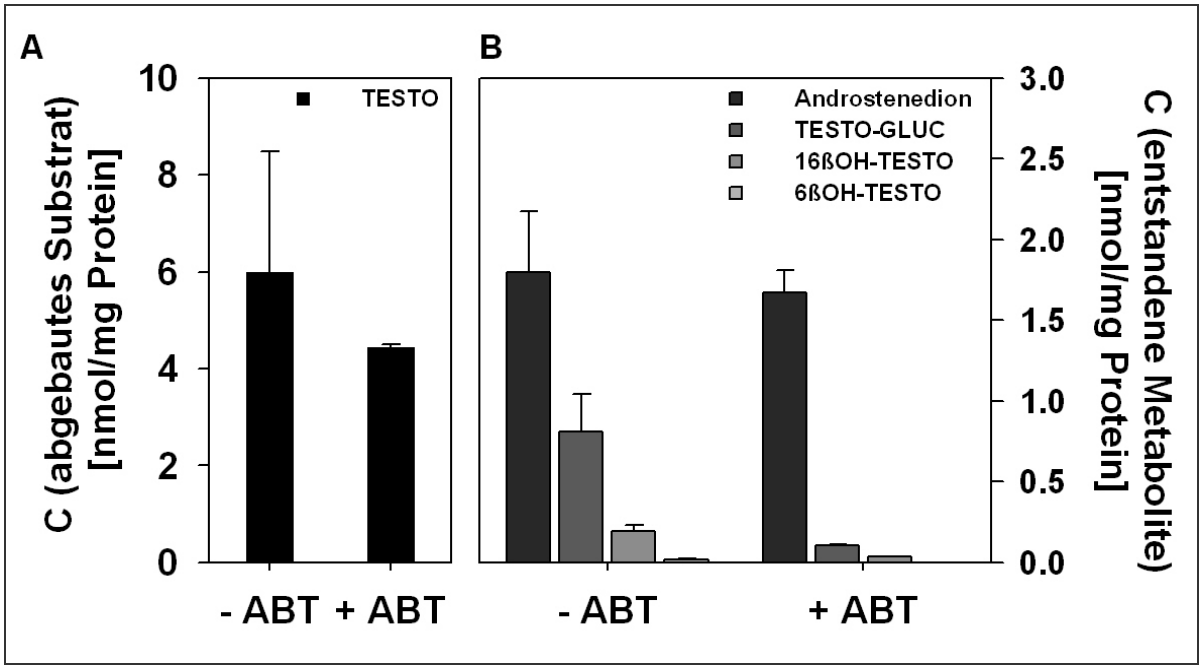


Abbildung 23: Inhibition des intestinalen TESTO-Metabolismus mittels ABT
Der Einfluss von ABT (1 mM) auf den Abbau von TESTO (25 µM, t=60 min) (**A**) bzw. die Entstehung seiner Metabolite (**B**) ist dargestellt als gemittelte Werte aus drei unabhängigen Versuchen. Die Menge an abgebauter bzw. gebildeter Substanz wurde auf 1 mg ES-Protein bezogen. TESTO: Testosteron; 16ßOH-TESTO: 16ß-Hydroxytestosteron; 6ßOH-TESTO: 6ß-Hydroxytestosteron; TESTO-GLUC: Testosteron-Glucuronid

3.7.2. Inhibition des CYP P450-vermittelten Metabolismus

Um zu beweisen, dass tatsächlich CYP P450 Enzyme für den Abbau der untersuchten Test-Substanzen verantwortlich sind, wurde der universelle, mechanistisch und irreversible wirkende CYP P450 Inhibitor Aminobenzotriazol (ABT) eingesetzt. Für die Versuche wurden abermals ausschließlich „Everted Sacs“ des mittleren Jejunums verwendet und diese mit ABT (1 mM) über eine Inkubationszeit von 60 min mit den Test-Substanzen inkubiert. In den Abbildung 23 und 24 sind die Ergebnisse der Inhibitionsversuche für alle Test-Substanzen und ihrer jeweiligen Metabolite zusammengefasst. Der Metabolismus aller Test-Substanzen, bis auf TESTO, konnte durch die Wirkung von ABT signifikant gehemmt werden. Dabei wurde der Abbau von DEX, MDZ und BUPR um ca. 70 % gehemmt. Nur eine vergleichsmäßig geringe Hemmung konnte im TESTO-Abbau erzielt werden. Aufgrund der Tatsache, dass die Entstehung von Androstenedion, dem Hauptmetabolit von TESTO, nur um etwa 7 % gehemmt werden konnte, kann geschlussfolgert werden, dass Androstenedion nur zum geringen Teil über CYP3A und 2B1. Das Hauptenzym des TESTO-Metabolismus stellt somit 17ß-HSD2 dar, da es im Gegensatz zu den CYP P450 Enzymen nicht über ABT gehemmt werden kann. Die Entstehung der anderen TESTO-Metabolite wurde durch ABT signifikant inhibiert, interessanterweise auch der Phase-II-Metabolit TESTO-GLUC, der eine fast vollständige Hemmung von ca. 87 % durch ABT zeigte. Die Entstehung der Metabolite von DEX, BUPR und MDZ wurden dagegen vergleichbar stark (80-96 %) inhibiert und zeigten eine etwas stärkere Hemmung als ihre jeweiligen Substrate.

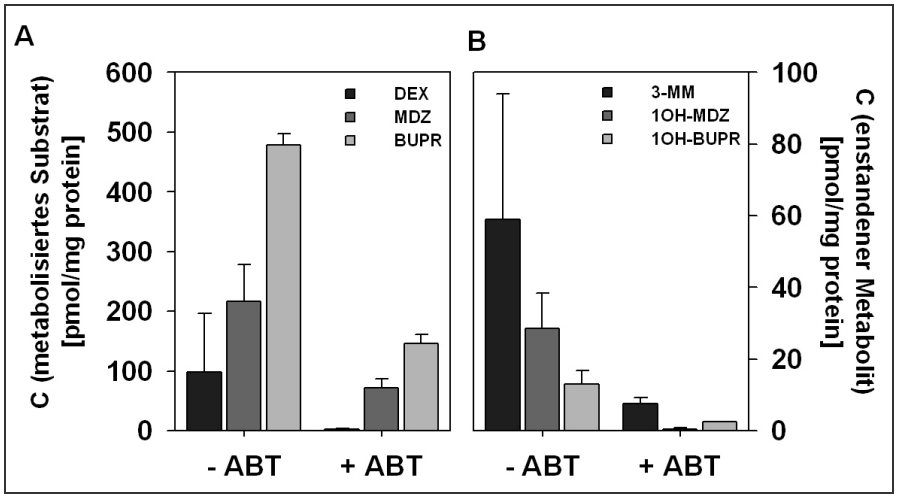


Abbildung 24: Inhibition des intestinalen DEX-, MDZ-, BUPR-Metabolismus mittels ABT
Der Einfluss von ABT (1 mM) auf den Abbau von DEX, MDZ und BUPR (3 µM, t=60 min) (**A**) bzw. die Entstehung ihrer Metabolite (**B**) ist dargestellt als gemittelte Werte aus drei unabhängigen Versuchen. Die Menge an abgebauter bzw. gebildeter Substanz wurde auf 1 mg ES-Protein bezogen. DEX: Dextromethorphan; MDZ: Midazolam; BUPR: Bupropion; 3-MM: 3-Methoxymorphinan; 1OH-MDZ: 1-Hydroxymidazolam; 1OH-BUPR: 1-Hydroxybupropion

Alle Ergebnisse zusammen belegen das intestinale CYP P450 Enzyme am Abbau der verwendeten Test-Substanzen beteiligt waren. Darüber hinaus konnte auch die Aktivität von anderen Enzymen, wie das Phase-I-Enzym 17ß-HSD2 und das Phase-II-Enzym UGT, gezeigt werden und können somit zum intestinalen Metabolismus von Arzneistoffen beitragen. CYP2D1 Aktivität konnte im Darm nicht festgestellt werden.

3.7.3. Intestinaler Metabolismus entlang des Darms

Mit dem primären Enterozyten-Modell konnte nur die metabolische Aktivität der Enterozyten des gesamten Jejunums dargestellt werden, aber kein Verlauf der Aktivität entlang des Jejunums abgebildet werden. In den folgenden Versuchen wurden daher „Everted Sac“ aus drei verschiedenen Jejunumregionen präpariert und auf ihre metabolische Aktivität hin untersucht.

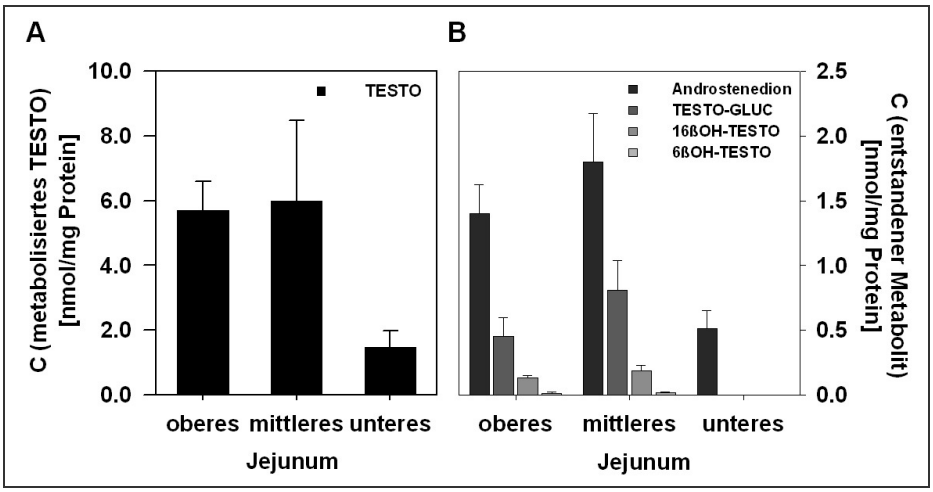


Abbildung 25: **TESTO-Metabolismus entlang des Rattendarms**
Der TESTO-Abbau (**A**) bzw. die Entstehung seiner Metabolite (**B**) ist dargestellt in drei verschiedenen Jejunumregionen als Menge an abgebauter bzw. gebildeter Substanz pro mg ES-Protein. Die Ergebnisse sind gemittelte Werte aus drei Versuchen, die mit einer TESTO-Konzentration von 25 µM über 60 min inkubiert wurden. (TESTO: Testosteron; TESTO-GLUC: Testosteron-Glucuronid, 16ßOH-TESTO: 16ß-Hydroxytestosteron, 6ßOH-TESTO: 6ß-Hydroxytestosteron)

Die Ergebnisse sind in Abbildung 25 für TESTO zusammengefasst. TESTO wurde mit ca. 6 nmol/mg „Everted Sac“ Protein (ES-Protein) im oberen und mittleren Jejunum deutlich stärker abgebaut, als im unteren Jejunum. Dort verminderte sich der TESTO-Abbau merklich auf 1.5 nmol/mg ES-Protein. Dies machte sich auch auf der Ebene der Metaboliten bemerkbar. So nahm die Bildung von Androstenedion (17ß-HSD2) vom oberen/mittleren Jejunum (1.5 bzw. 1.75nmol/mg ES-Protein) zum unteren Jejunum (0.5 nmol/mg ES-Protein) deutlich ab. UGT zeigte nur im oberen und mittleren Jejunum mit TESTO-GLUC-Umsätzen von 0.4 nmol/mg ES-Protein, bzw. 0.75 nmol/mg ES-Protein Aktivität, aber nicht im unteren

Jejunum. Interessanterweise korrelierte die Aktivität der beiden Enzyme, 17ß-HSD2 und UGT nicht mit deren Proteinexpression entlang des Darms. Es wurde dort eine relativ gleichmäßige Proteinexpression für beide Enzyme entlang des gesamten Jejunums beobachtet. 16ßOH- und 6ßOH-TESTO wurden in weitaus geringeren Mengen, als Androstenedion und TESTO-GLUC und auch nur im oberen (0.14 bzw. 0.02 nmol/mg ES-Protein) und mittleren Jejunum (0.20 bzw. 0.02 nmol/mg ES-Protein) gebildet.

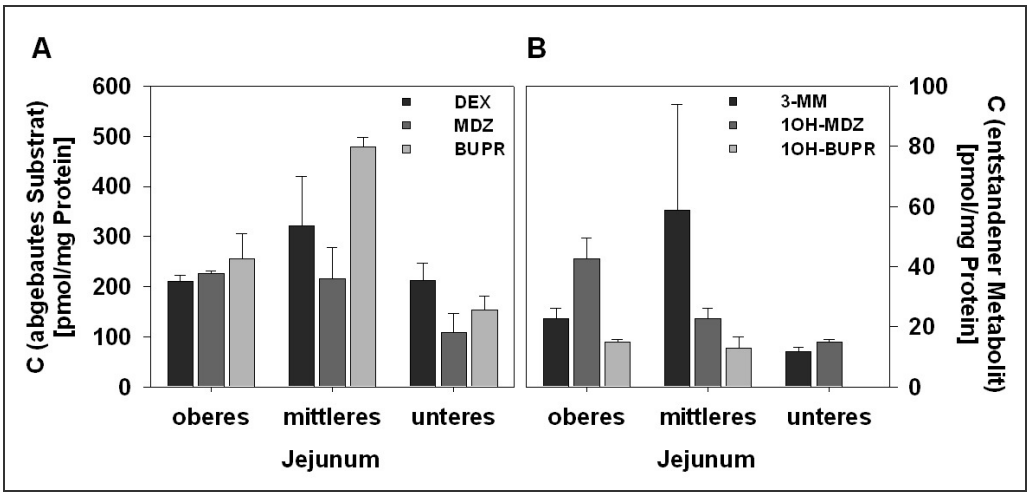


Abbildung 26: DEX- MDZ- und BUPR-Metabolismus entlang des Rattendarms
Der Abbau der Substrate (**A**) bzw. die Entstehung der dazugehörigen Metabolite (B) entlang des Rattenjejunums sind dargestellt als abgebaute bzw. gebildete Substanzmenge pro mg ES-Protein. Während. Die Ergebnisse stellen gemittelte Werte aus drei Versuchen dar (C(Substrat) = 3 µM; t = 60 min) (DEX: Dextromethorphan; MDZ: Midazolam; BUPR: Bupropion; 3-MM: 3-Methoxymorphinan, 1OH-MDZ: 1-Hydroxymidazolam; 1OH-BUPR: 1-Hydroxybupropion)

Die Ergebnisse aller anderen Test-Substanzen sind in Abbildung 26 zusammengefasst. DEX wurde im oberen und unteren Jejunum mit ca. 200 pmol/mg ES-Protein vergleichbar und im mittleren Jejunum mit 320 pmol/mg ES-Protein signifikant stärker metabolisiert. Sein Metabolit 3-MM zeigte einen ähnlichen Verlauf, wurde aber im unteren Jejunum (10 pmol/mg ES-Protein) signifikant weniger gebildet, als im oberen Jejunum (23 pmol/mg ES-Protein). MDZ wurde von den „Everted Sacs“ des oberen und mittleren Jejunums mit ca. 230 pmol/mg ES-Protein in vergleichbaren Mengen metabolisiert, während das untere Jejunum mit ca. 100 pmol/mg ES-Protein einen signifikant schwächeren Metabolismus zeigte. Dies spiegelte sich auch in der Entstehung von 1OH-MDZ wieder, welches im oberen und mittleren Jejunum mit ca. 40 bzw. 30 pmol/mg ES-Protein in signifikant höheren Mengen gebildet wurde, als im unteren Jejunum (5 pmol/mg ES-Protein). Wie zu erwarten war, ähnelt die 3-MM bzw. 1OH-MDZ Entstehung entlang des Darm dem Expressionsverhalten von CYP3A, das in distalen Darmregionen deutlich weniger exprimiert wurde. BUPR wurde dagegen im oberen und mittleren mit jeweils 250 bzw. 500 pmol/mg ES-

Protein signifikant höher, als im unteren Jejunum mit nur ca. 150 pmol/mg ES-Protein metabolisiert. 1OH-BUPR entstand, trotz der hohen Abbauraten von BUPR, nur in geringen Mengen (ca. 17 pmol/mg ES-Protein) und auch nur in im oberen und mittleren Jejunum. Auch wenn die Menge an gebildeten 1OH-BUPR nicht ganz erklärbar ist, korreliert der Verlauf der CYP2B1 Aktivität entlang des Darms doch gut mit der dazugehörigen Proteinexpression.

3.7.4. K_m-, V_{max}- und $CL_{int\ ES}$-Werte für TESTO

Im Vergleich zu den Initialgeschwindigkeiten geben die enzymkinetischen Parameter V_{max} und K_m einen besseren Einblick, wie gut ein Substrat vom Enzym erkannt und umgesetzt werden kann. Anhand des Quotienten dieser Parameter kann die $CL_{int\ ES}$ ($CL_{int\ „Everted\ Sacs“}$) berechnet werden, die angibt wie viel Mikroliter Blut von der Substanz pro Minute und Milligramm Protein befreit werden. Die $CL_{int\ ES}$ ist daher ein gut fassbarer Parameter zur Charakterisierung des Metabolismus einer Substanz. Diese Parameter wurden deswegen für den Abbau von TESTO bzw. für die Entstehung der TESTO-Metabolite (K_m und V_{max}) ermittelt. Dazu wurden metabolische Stabilitätsassays mit dem „Everted Sacs“-Modell des mittleren Jejunums (siehe Abschnitt 2.8.2) über einen Konzentrationsbereich von 5-100 µM und über einen Zeitraum von 60 min angefertigt.

Tabelle 12: Kinetik des intestinalen TESTO-Metabolismus
Der intestinale Abbau von TESTO wurde in einem Konzentrationsbereich von 5-100 µM über mehrere Zeitpunkte analysiert und die K_m- und V_{max}-Werte mittels der Initialgeschwindigkeiten und Sigma Plot 10.0 ermittelt. Die Ergebnisse stellen gemittelte Werte von zwei unabhängigen Versuchsansätzen dar.

Substanz	**K_m** *[µM]*	**V_{max}** *[pmol/min/mg ES-Protein]*	**$CL_{int\ ES}$** *[µL/min/mg ES-Protein]*
TESTO	22	220	10

TESTO: Testosteron;

Die Initialgeschwindigkeiten des Abbaus von TESTO bzw. der Entstehung seiner Metabolite wurde, wie bereits unter Abschnitt 2.8.3 beschrieben, errechnet. Mittels der Geschwindigkeiten und unter zur Hilfe der Software Sigma Plot 10.0 wurden K_m- und V_{max}-Werte für die jeweilige enzymatische Reaktion bestimmt (siehe Abschnitt 2.8.3.2). Die Ergebnisse sind in Tabelle 12 dargestellt. Der auf diese Weise berechnete Gesamt-K_m-Wert von TESTO betrug 22 µM, was ungefähr der Standardkonzentration für TESTO (25 µM) in den metabolischen Assays mit primären Enterozyten- und „Everted Sacs“-Versuchen entspricht. Die V_{max} von TESTO betrug 220 pmol/min/mg „Everted Sac“ Protein (ES-

Protein). Dabei ist zu beachten, dass der K_m- und V_{max}-Wert des Testosteronabbaus nicht die Tätigkeit eines Enzyms, sondern einer ganzen Batterie von Enzymen darstellt. Die berechnete $CL_{int\ ES}$ aus dem ermittelten K_m- und V_{max}-Wert für TESTO ergab einen Wert von 10 µL/min/mg ES-Protein. Zum Vergleich mit den Kinetikdaten des metabolischen Assays mit primären Enterozyten kann man die $CL_{int\ ES}$ auch auf Enterozytenprotein beziehen, woraus sich ein Wert von 32 µL/min/mg E-Protein (siehe Tabelle 12 und Abschnitt 2.8.3.1)
Die Entstehung der TESTO-Metabolite zeigte, das 17ß-HSD2 mit einer $CL_{int\ ES}$ von 2.3 µL/min/mg ES-Protein am schnellsten TESTO in Androstenedion umsetzte, während UGT und CYP2B1 mit jeweils 0.7 und 0.2 µL/min/mg ES-Protein deutlich langsamere Umsatzgeschwindigkeiten zeigten (siehe Tabelle 13).

Tabelle 13: Kinetik der Bildung der TESTO-Metabolite aus dem intestinalen Metabolismus von Testosteron. Der intestinale Entstehung der TESTO-Metabolite wurde in einem Konzentrationsbereich von 5-100 µM (TESTO-Konzentration) über mehrere Zeitpunkte analysiert und die K_m- und V_{max}-Werte mittels der Initialgeschwindigkeiten und Sigma Plot 10.0 ermittelt. Die Ergebnisse stellen gemittelte Werte von zwei unabhängigen Versuchsansätzen dar.

Substanz	**K_m** *[µM]*	**V_{max}** *[pmol/min/mg ES-Protein]*	**$CL_{int\ ES}$** *[µL/min/mg ES-Protein]*
Androstenedion	39	92	2.3
TESTO-GLUC	18	13	0.7
16ßOH-TESTO	130	31	0.2

TESTO-GLUC: Testosteron-Glucuronid; 16ßOH-TESTO: 16ß-Hydroxytestosteron

Für 6ßOH-TESTO konnten keine Daten ermittelt werden, weil die HPLC-Analytik nicht ausreichte, um über den gesamten TESTO-Konzentrationsbereich valide Signale zu erhalten.

3.7.5. Berechnung der intestinale *„First pass" in vivo* $CL_{FP\ DR}$

Die eben vorgestellte Berechnung der $CL_{int\ ES}$ mittels Enzymkinetik ist ein sehr genauer Weg, der aber auch mit sehr viel Aufwand verbunden ist, weil mehrere Substratkonzentrationen untersucht werden müssen. In diesem Abschnitt wird die $CL_{int\ ES}$ daher auf einem einfacheren Weg, unter Benutzung von nur einer Substratkonzentration und der dazugehörigen AUC unter dem Konzentrations-/Zeit-Profil berechnet. Daher ist es möglich die Berechnungen für alle Test-Substanzen und nicht nur für TESTO durchzuführen.
Die Berechnung der $CL_{int\ DR}$ erfolgte aus den $CL_{int\ ES}$-Daten und Skalierungsfaktoren (siehe Tabelle 3). Die Skalierung der $CL_{int\ ES}$ auf die $CL_{int\ DR}$ erfolgte mittels der Masse der Darmabschnitte, der „Everted Sac"-Proben und den dazugehörigen Masse an Protein (siehe Tabelle 3). Diese $CL_{int\ DR}$-Werte konnte anschließend verwendet werden, um die $CL_{FP\ DR}$ der

einzelnen Darmregionen, mittels der „Q_{gut} Methode“ von Yang et al. zu berechnen, wobei hier der Blutfluss der Zotten und die Permeabilität der Substanzen über die Enterozyten hinweg mit hinein floss (Yang et al. 2007). Dabei bezieht sich die $CL_{FP\ DR}$ nicht mehr nur auf das Protein des Darms sondern auf ein Kilogramm Körpergewicht und stellt somit die gesamte Clearance des jeweiligen Darmabschnitts dar. Außerdem kann man aus dieser Größe die F_G berechnen, die den Anteil der Substanz darstellt, der die Darmwand während der Absorption unmetabolisiert übertritt. Die Versuche wurden mit „Everted Sacs“ aus dem oberen, mittleren und unteren Jejunum durchgeführt und über einen Zeitraum von 60 min der intestinale Metabolismus verfolgt (siehe Abschnitt 2.8.2). Die Test-Substanzen wurden jeweils in ihren Standardkonzentrationen (TESTO: 25 µM, DEX, MDZ, BUPR: 3 µM) eingesetzt. In Tabelle 14 sind die Ergebnisse zusammengefasst. TESTO zeigte im oberen und mittleren Jejunum von allen Substanzen die höchste $CL_{int\ ES}$ mit ca. 9 µL/min/mg ES-Protein. Der $CL_{int\ ES}$-Wert der Enzymkinetik konnte somit mit dieser einfacheren Alternativmethode verifiziert werden. Im Vergleich dazu zeigte BUPR im mittleren Jejunum eine $CL_{int\ ES}$ von 5.5 µL/min/mg ES-Protein. Die anderen Substrate dagegen zeigten geringere $CL_{int\ ES}$-Werte um die 2 µL/min/mg ES-Protein.

Tabelle 14: CL_{FP} und F_G für alle Test-Substanzen
Die Daten wurden mittels metabolischen Stabilitäten unter Zuhilfenahme des „Everted Sac“-Modell ermittelt. Die Berechnung der einzelnen Größen ist in Abschnitt 2.8.3.3 beschrieben. Die gemittelten Werte von drei unabhängigen „Everted Sacs“ Versuchen und die dazugehörigen Standardabweichungen (MW ± SD) sind dargestellt.

Substanz	**Darm-region**	**$CL_{int\ ES}$** *[µL/min/mg ES- Protein]*	**$CL_{int\ DR}$** *[mL/min/ Organ]*	**$CL_{FP\ DR}$** *[mL/min/kg KG]*	**F_G**	**$CL_{FP\ Darm}$** *[mL/min/kg KG]*
TESTO	oJ	8.8 ± 1.8	8.2 ± 1.5	1.8 ± 0.08	0.22	4.70
	mJ	8.6 ± 1.9	7.4 ± 2.1	1.77 ± 0.14	0.24	
	uJ	2.6 ± 0.7	2.1 ± 0.5	1.10 ± 0.13	0.52	
DEX	oJ	1.4 ± 0.1	1.1 ± 0.1	0.68 ± 0.04	0.62	2.30
	mJ	2.1 ± 0.4	1.5 ± 0.3	0.77 ± 0.20	0.51	
	uJ	2.3 ± 0.8	1.8 ± 0.8	0.85 ± 0.30	0.47	
MDZ	oJ	1.7 ± 0.3	1.4 ± 0.3	0.80 ± 0.11	0.57	1.92
	mJ	1.3 ± 0.4	1.0 ± 0.3	0.65 ± 0.13	0.65	
	uJ	0.9 ± 0.3	0.7 ± 0.2	0.48 ± 0.14	0.68	
BUPR	oJ	2.9 ± 1.0	2.3 ± 0.8	1.16 ± 0.32	0.50	3.41
	mJ	5.2 ± 1.3	4.0 ± 1.0	1.52 ± 0.15	0.38	
	uJ	1.5 ± 0.3	1.0 ± 0.2	0.73 ± 0.11	0.73	

oJ: oberes Jejunum, mJ: mittleres Jejunum; uJ: unteres Jejunum; TESTO: Testosteron; DEX: Dextromethorphan; MDZ: Midazolam; BUPR: Buproprion; DR:Darmregion; FP: First Pass; ES: „Everted Sac“; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; KG: Körpergewicht;

Nur für TESTO und BUPR konnte ein starker Abfall der $CL_{int\ ES}$ im unteren Jejunum im Vergleich zu den anderen Darmregionen nachgewiesen werden, während die anderen Substrate vergleichbare $CL_{int\ ES}$-Werte in allen Darmregionen aufwiesen. Daraus ergab sich für TESTO eine $CL_{FP\ Darm}$ von 4.7 mL/min/kg Körpergewicht. Die anderen Substanzen zeigten im Vergleich zu TESTO mit Werten zwischen 1.9-3.4 mL/min/kg Körpergewicht geringere $CL_{FP\ Darm}$-Werte. Für TESTO und BUPR ergaben sich daraus F_G-Werte von ca. 20 % bzw. 38 % (BUPR im mittleren Jejunum), d.h. gerade mal 1/5 (TESTO) bzw. 1/3 (BUPR) der jeweiligen Substanz gelangt unmetabolisiert über die Darmwand in den Blutstrom. Für die anderen Substanzen wurden dagegen F_G-Werte um die 60 % errechnet und somit gelangt mehr als die Hälfte der Substanzen unmetabolisiert über die Darmwand. Durch den niedrigeren Metabolismus von TESTO und BUPR im unteren Jejunum stiegen die berechneten F_G-Werte dort auf 52 % bzw. 73 %, während die restlichen Substanzen zu den anderen Darmregionen vergleichbare F_G-Werte besaßen.

3.8. Permeation über die Darmwand

3.8.1. Permeation mittels „Everted Sac“-Modell

Wie anfänglich erwähnt, kann man mit der „Everted Sac“-Methode nicht nur den Metabolismus im Darm abbilden, sondern darüber hinaus auch die Permeation der Substanzen über die Darmwand verfolgen. Dabei sind zwei Unterscheidungen möglich,

1) die Wanderung der Substrate von der Lumenseite (mukosale Kompartiment) auf die Blutzugewandte Seite (serosale Kompartiment) und

2) die Verteilung der in den Enterozyten gebildeten Metabolite auf das mukosale und serosale Kompartiment.

Auf beide Punkte soll im weiteren Verlauf näher eingegangen werden.

3.8.1.1. Serosale Akkumulation der Substrate

Zur Analyse der serosalen Anreicherung wurden, wie für die metabolischen Experimente, die Test-Substrate dem mukosalen Kompartiment (Außenseite der „Everted Sacs“) zugegeben. Nach 60 minütiger Inkubation erfolgte die Quantifizierung der Test-Substrate im serosalen Kompartiment und im Darmgewebe. Diese Untersuchung wurde mit verschiedenen Darmsegmenten des Jejunums durchgeführt. Um den Metabolismuseffekt auf das Permeationsverhalten der Test-Substrate zu analysieren, erfolgte parallel das

Permeationsexperiment in Anwesenheit des CYP P450 Inhibitors ABT. In Abbildung 27 sind die Ergebnisse dieser Analyse zusammengefasst. Alle Substanzen konnten nach 60 minütiger Inkubation im serosalen Kompartiment, im Inneren der „Everted Sac“, nachgewiesen werden, wobei die Höhe der Akkumulation von der Art der Substanz und von der Darmregion abhängig war. Die beiden oberen Jejunumregionen unterschieden sich kaum in der Höhe der Akkumulation der untersuchten Test-Substanzen. TESTO zeigte interessanterweise, in diesen Regionen die geringste serosale Akkumulation (15 nM/mg Protein), obwohl die eingesetzte Substratkonzentration fast 10x so hoch lag, wie für die restlichen Test-Substanzen. BUPR wurde mit ca. 40 nM/mg Protein am stärksten im serosalen Kompartiment angereichert, während DEX und MDZ mit 20-31 nM/mg Protein vergleichbare Akkumulationen aufwiesen.

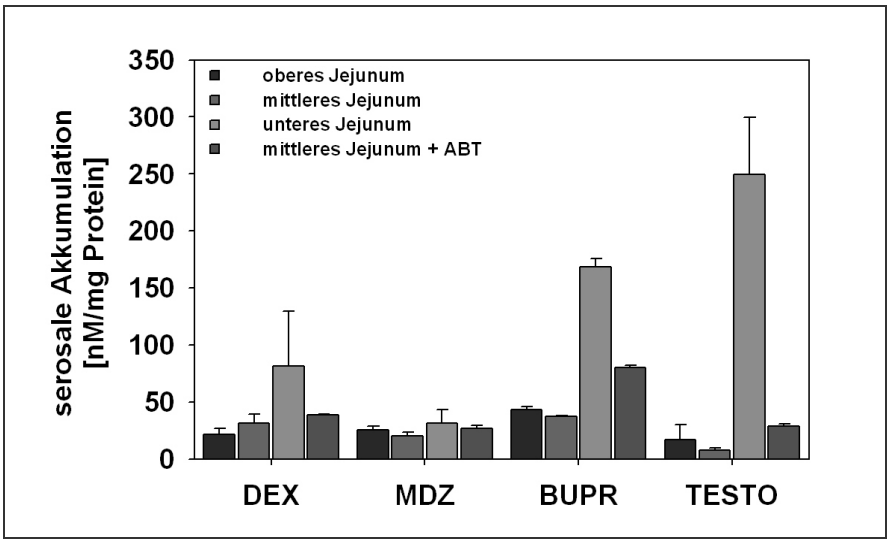


Abbildung 27: serosale Akkumulation der Test-Substanzen entlang des Jejunums
Die gemittelten Werte aus drei verschiedenen „Everted Sacs“-Versuchen sind dargestellt. Die serosale Akkumulation ist jeweils in akkumulierte Substanz pro mg ES-Protein angegeben. (C(TESTO) = 25 µM; C(DEX, MDZ, BUPR) = 3 µM; t = 60 min; ABT: Aminobenzotriazol; TESTO: Testosteron; DEX: Dextromethorphan; MDZ: Midazolam; BUPR: Bupropion

Im unteren Jejunum stieg die akkumulierte TESTO-Konzentration (15-30fach) stark an. BUPR zeigte, mit einem 4fachem Anstieg im unteren Jejunum, diesbezüglich ein ähnliches Verhalten. DEX zeigte zwar im Mittel einen 3fachen Anstieg der Akkumulation im unteren Jejunum, jedoch schwankten diese Ergebnisse stark und waren nicht signifikant. MDZ zeigte in allen untersuchten Regionen eine gleichbleibende serosale Akkumulation. Auch ABT zeigte keinen Einfluss auf die MDZ bzw. DEX Akkumulation. Dagegen stieg die Akkumulation von TESTO und BUPR in den ABT gehemmten „Everted Sacs“ des mittleren Jejunums an (4fach bzw. 2fach). Darauf kann man schließen, dass der intestinale Metabolismus die Akkumulation von BUPR und TESTO, aber nicht die von DEX und MDZ

beeinflussen kann. Allerdings konnte durch die Hemmung der CYP P450 Enzyme in den TESTO- und BUPR-Proben nicht die Akkumulation des unteren Jejunums erreicht werden, was auf zusätzliche, nicht mit dem Metabolismus verbundene, Einflussfaktoren der Akkumulation im unteren Jejunum schließen lässt. Für TESTO sind die Ergebnisse der Inhibition des Metabolismus mit ABT nicht sehr aussagekräftig, weil 17ß-HSD2, dass Hauptenzym im TESTO-Metabolismus nicht durch ABT gehemmt werden kann.

3.8.1.2. Akkumulation der Metabolite im mukosalen und serosalen Kompartiment

In den vorangegangen Studien konnte gezeigt werden, dass die Permeation von Substanzen durch den intestinalen Metabolismus beeinträchtigt werden kann. Allerdings wurde das Verhalten der entstehenden Metabolite außer Acht gelassen. Es ist anzunehmen, dass die gebildeten Metabolite oft ein ganz anderes Permeationsverhalten zeigen, als die entsprechende Muttersubstanz und auch oft nicht das Blutkompartiment erreichen, sondern sofort über den Faeces ausgeschieden werden. Die Analyse der Metabolitenpermeation wurde wie im vorhergehenden Abschnitt für die Substratpermeation beschrieben, durchgeführt. In Abbildung 28 ist die Verteilung der Metabolite aller Test-Substanzen auf das mukosale und serosale Kompartiment zusammengefasst.

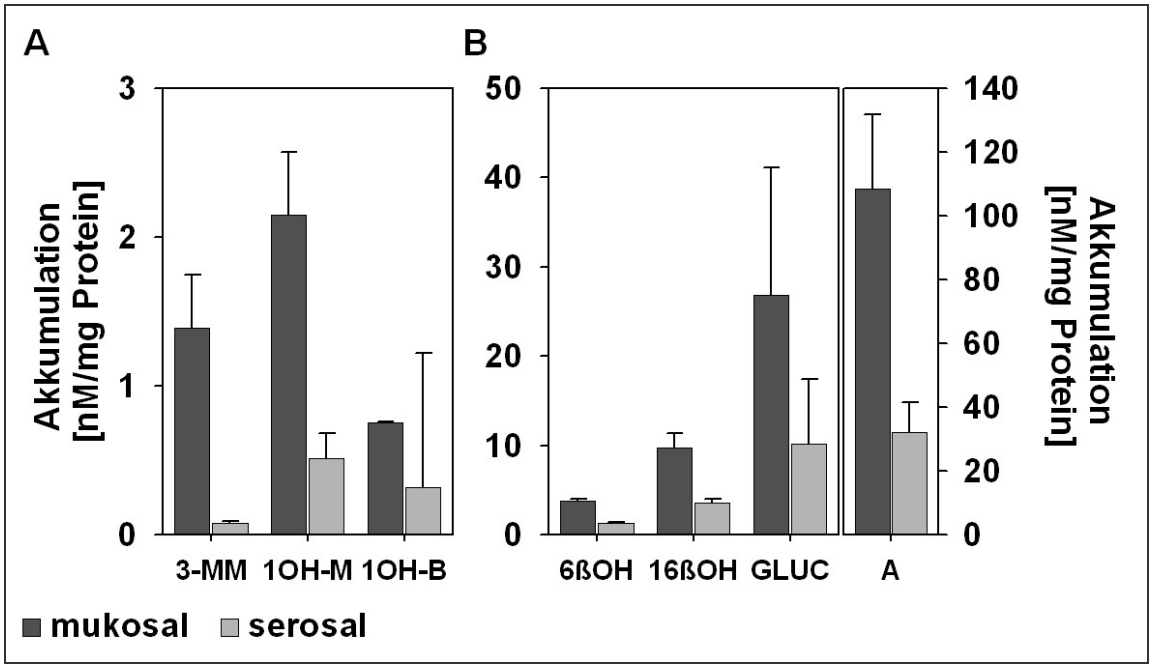


Abbildung 28: Akkumulation der Metaboliten im serosalen und mukosalen Kompartiment
Die Akkumulationen der Metabolite von DEX, MDZ und BUPR (**A**) und TESTO (**B**) sind dargestellt als Konzentration pro mg ES-Protein. Die gemittelten Werte aus drei verschiedenen Versuchsansätzen mit „Everted Sacs“ sind zusammengefasst (t = 60 min).
1OH-M: 1-Hydroxymidazolam, 3-MM: 3-Methoxymorphinan, 1OH-B: 1-Hydroxyburpropion, 6ßOH: 6ß-Hydroxytestosteron, 16ßOH: 16ß-Hydroxytestosteron, GLUC: Testosteron-Glucuronid, A: Androstenedion)

Alle Metabolite zeigten eine stärkere Anreicherung im mukosalen, als im serosalen Kompartiment, was die Theorie bestätigt, dass sie eher mit dem Faeces ausgeschieden werden. Eine besonders starke Anreicherung auf der mukosalen Seite zeigte 3-MM (14fach). Aber auch 1OH-MDZ (4fach), Androstenedion (5fach), 6ßOH-TESTO (2fach) und 16ßOH-TESTO (2fach) zeigten signifikant höhere Anreicherungen auf der mukosalen Seite. 1OH-BUPR und TESTO-GLUC zeigten auch im Mittel höhere, aber nicht signifikante höhere Konzentrationen im mukosalen Kompartiment, die zu dem mit sehr großen Schwankungsbreiten behaftet waren.

3.8.2. Caco-2-Permeation

Zur zusätzlichen Charakterisierung des Permeationsverhalten und Bestimmung der Permeationsgeschwindigkeit der Test-Substanzen und deren Metaboliten wurde der Caco-2-Permeationsassay eingesetzt. Bei der Caco-2-Zelllinie handelt es sich um Zellen, die aus einem humanen, epithelialen Adenokarzinoms des Colons gewonnen wurden. Mit Hilfe des Caco-2-Assays kann der bidirektionale Transport einer Substanz, d.h. Transport von der apikalen zur basolateralen (a b) und *vice versa*, durch eine epitheliale Zellschicht analysiert werden. Neben dem passiven Permeationsverhalten können auch Rückschlüsse auf Efflux-Transporterinteraktionen gezogen werden.

Tabelle 15: Permeation der Test-Substanzen über einen Caco-2-Monolayer
Die P_{app}-Werte sind Mittelwerte von zwei vermessenen Zellfiltern. Die in Klammern angegeben Daten sind die Wiederfindung (WF) der Substanz in dem jeweiligen Experiment. Außerdem ist der Quotient (Q) aus dem P_{app}-Werten des b a und des a b Experiments angegeben. Die log P-Werte wurde nicht im Rahmen dieser Arbeit erhoben, sondern stellen Literaturdaten dar.

Substanz	Log P	a b		b a		Q_{Papp}
		P_{app} *[nm/s]*	WF *[%]*	P_{app} *[nm/s]*	WF *[%]*	
Clonidin	1.6[1]	237	92	178	98	0.75
Digoxin	1.3[1]	8	89	130	93	16.25
Manitol	2.1[1]	5	94	4	95	0.80
6ßOH-TESTO	2.0	57	13	18	79	0.32
DEX	3.97[2]	263	79	180	97	0.68
3-MM	3.0[1]	107	80	190	93	1.78
MDZ	4.33[2]	307	80	196	89	0.63
1OH-MDZ	2.7[1]	298	79	203	93	0.68

[1] Log P Daten aus der http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/; [2] Log P-Daten aus (Arellano et al. 2007)

Für die Permeationsexperimente wurden DEX, MDZ mit ihren jeweiligen Metaboliten (3-MM, 1OH-MDZ) und der TESTO-Metabolit, 6ßOH-TESTO in einer Testkonzentration von 2 µM eingesetzt. TESTO selber wurde nicht mit vermessen, weil dazu mehrfach analysierte

Werte in der Literatur gegeben sind. Digoxin, Clonidin und Manitol wurden als Standardsubstanzen und Assaykontrollen mitgeführt.

In Tabelle 15 sind die Permeationswerte (apparente Permeation in nm/s) für die apikalen nach basolateralen (a b), als auch in umgekehrter Richtung dargestellt. Wie nicht anders erwartet, zeigte Clonidin mit einem P_{app}-Wert von 200 nm/s eine sehr hohe Permeation und Manitol, ein hydrophiler Zucker eine sehr schlechte Permeation (ca. 4 nm/s) über den Caco-2-Monolayer. Beide Substanzen zeigten keinen Efflux-Transport, d.h. das Permeationsverhalten war für beide Richtungen (a b, sowie b a) vergleichbar. Da Digoxin ein bekanntes Pgp-Substrat darstellt, erwartet man, dass die a b Permeation stark durch einen auftretenden Efflux-Transportprozess beeinträchtigt wird. Es wurde ein starker Efflux für Digoxin beobachtet, d.h. die Permeation von b a lag deutlich höher (16fach), als die Permeation von a b.

Die Permeationsgeschwindigkeiten der untersuchten Test-Substanzen waren relativ hoch. Es konnten zudem keine nennenswerten Efflux-Transportprozesse detektiert werden. Nur der Metabolit von Testosteron, 6ßOH-TESTO zeigte eine deutlich verminderte Permeation von 57 nm/s im a b Experiment und 18 nm/s im b a Experiment. Außerdem zeigte der Metabolit von DEX, 3-MM eine etwas höhere Permeation im b a Experiment (1.8fach), als im Vergleich zum b a Experiment.

4. Diskussion

Der Darm ist kein homogen aufgebautes Organ, sondern unterliegt in der Morphologie, als auch in seiner Proteinverteilung Veränderungen vom proximalen bis distalen Ende. Da der intestinale Metabolismus eine große Auswirkung auf die Bioverfügbarkeit von oral aufgenommen Arzneistoffen besitzen kann, basiert eine erfolgreiche Arzneimittelentwicklung auch auf dem umfangreichen Wissen über metabolische Enzyme entlang des Darms. Wie die Hepatozyten, enthalten ebenso die Enterozyten ein Set an verschiedenen CYP P450 Enzymen, sowie weiteren metabolisierenden Enzymen der Phase-I und -II. Eine Verminderung der Bioverfügbarkeit von oral verabreichten Arzneistoffen durch intestinalen Metabolismus wird in der Literatur häufig diskutiert. Obwohl die Expression der involvierten Enzyme für die Leber gut charakterisiert ist, existieren nur wenige Informationen über ihre Expression in der Darmwand und entlang des gesamten Darms. Einige Studien zeigten die konstitutive Expression von mehreren CYP P450 Isoformen, 17ßHSD2 und UGTs im Darm von mehreren Spezies. Diese Studien basieren in der Ratte hauptsächlich auf mRNA-Analysen (Yan und Caldwell 2001) und nur im Menschen auf Proteinexpressionsanalysen (Paine et al. 2006). Auf mRNA gestützte Expressionsanalysen können allerdings nicht die tatsächliche Proteinexpression und somit auch nicht deren Funktionalität widerspiegeln. Deswegen wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit die Proteinexpression und Funktionalität von verschiedenen metabolischen Enzymen aus den Familien CYP P450, UGT und 17ß-HSD im Darm der Ratte charakterisiert. Außerdem wurde ein Tool zur Verfügung gestellt, anhand dessen man mittels metabolischer *in vitro* Daten auf die *in vivo* Clearance von Substanzen im Darm schließen kann und zusätzlich den Anteil an Substanz, der den Darm unmetabolisiert überquert, berechnen kann.

CYP P450 Expression und Aktivität entlang des Darms

Die Proteinexpressionsanalysen mittels Western Blot ergaben, das von sechs untersuchten Mitgliedern der CYP P450 Familie CYP3A, 2B1, 2C6, 2D1 und 1A1, aber nicht CYP2C11 im Darm der Ratte auf Proteinebene exprimiert werden. Dieses Ergebnis ist weitgehend konsistent mit mRNA-Analysen von anderen Arbeitsgruppen (Hiroi et al. 1998; Kaminsky und Zhang 2003; Lindell et al. 2003). In Bezug auf die CYP2C11 Expression gibt es allerdings kontroverse Diskussionen, weil entweder schwache oder keine Signale im Western

Blot detektiert werden konnten (de Waziers et al. 1990; Zhang et al. 1996). Basierend auf diesen und eigenen Ergebnissen scheint CYP2C11, wenn überhaupt, nur in sehr geringen Mengen im Darm vorhanden zu sein.

Um Aussagen über den Verlauf der Proteinexpression der CYP P450 Enzyme entlang des Darms treffen zu können, wurden Darmhomogenate (ca. 30 Segmente pro Darm) des gesamten Darms und Darmschnitte (5 Segmente pro Darm) aus ausgewählten Darmregionen präpariert. Mittels Western Blot bzw. Immunhistochemie wurde diese Proben hinsichtlich des Expressionsverlauf der verschiedenen CYP P450 Isoformen charakterisiert. Zusätzlich wurde die Aktivität der CYP P450 Enzyme entlang des Darms mit dem „Everted Sac“ Modell analysiert. Dazu wurden Darmsegmente (3-3.5 cm) verschiedener Regionen des Jejunums entnommen und auf ihre metabolische Aktivität, ohne Zugabe von zusätzlichen Energieequivalenten, bezüglich ihres Abbaus verschiedener Test-Substanzen hin untersucht.

Entlang des Darms zeigen die Isoformen CYP3A und 2B1 vergleichbare Expressionsverläufe. Es wurden stärkere Immunosignale in proximalen Darmbereichen detektiert und deutlich schwächere Signale zu distalen Darmregionen hin, die im unteren Jejunum völlig verschwanden. Die CYP2B1 Western Blot Ergebnisse konnten auf funktioneller Ebene durch den metabolischen Abbau von Bupropion und Testosteron zu 1-Hydroxybupropion bzw. 16ß-Hydroxytestosteron verifiziert werden.

Die CYP3A Immunblot Ergebnisse hingegen wurden in der Immunhistochemie mit Darmschnitten aus den jeweiligen Darmregionen nur teilweise bestätigt. Eine Abnahme der Expression entlang des Dünndarms konnte auch hier gezeigt werden, jedoch konnte CYP3A mittels Immunhistochemie auch im Ileum, Caecum und Colon nachgewiesen werden, wenn auch im deutlich geringerem Umfang als im Duodenum und Jejunum. Es ist daher anzunehmen, dass der eingesetzte Anti-CYP3A Antikörper eine höhere Affinität für CYP3A in der Immunhistochemie, als im Western Blot besitzt. Möglicherweise muss das Antigenepitop noch eine gewisse sekundäre/tertiäre Konformation erhalten, um optimal erkannt zu werden. Für eine CYP3A Expression im unteren Jejunum sprechen auch die funktionellen Daten, die im Rahmen dieser Doktorarbeit erhoben wurden. Dort wurden die CYP3A Metabolite 1-Hydroxymidazolam und 3-Methoxymorphinan im unteren Jejunum noch nachgewiesen, wenn auch in geringeren Mengen, als in den oberen Darmregionen. Daher kann man schlussfolgern, dass CYP3A, nicht aber 2B1 noch in den unteren Darmregionen exprimiert wird, allerdings in deutlich geringeren Mengen als in proximalen Darmregionen. Vergleichbare Verläufe für CYP2B1 und 3A wurde auch von anderen

Arbeitsgruppen sowohl auf Proteinebene, als auch auf funktioneller Ebene dargestellt (Rosenberg 1991; Takemoto et al. 2003). Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde für CYP3A im Immunblot eine Doppelbande detektiert, die wahrscheinlich die Expression mehrerer CYP3A Isoformen reflektiert (CYP3A9, 3A18 und 3A62). CYP3A1 und 3A2, die Haupt-Isoformen der CYP3A Unterfamilie in der Leber, konnten von Matsubara et al. im Darm der Ratte nicht nachgewiesen werden. Matsubara et al. konnte zeigen, dass die mRNA-Expression der CYP3A Isoformen CYP3A9, 3A18 und 3A62 entlang des Darms abnimmt. Allerdings fällt CYP3A9 viel schneller und deutlicher ab, als CYP3A62. CYP3A18 dagegen ist schon auf mRNA-Ebene so gering exprimiert, das ein Nachweis auf Proteinebene fraglich ist (Matsubara et al. 2004). Aufgrund der Ergebnisse von Matsubara et al. müsste es sich bei der oberen Bande der Doppelbande im hier vorgestellten Immunblot um CYP3A9 handeln, während die untere Bande CYP3A62 zugeordnet werden könnte (siehe Abbildung 10). Diese Annahme wird sowohl durch das Molekulargewicht, als auch durch den beobachteten Expressionsverlauf beider Isoformen unterstützt. Gegen diese Hypothese sprechen allerdings die Ergebnisse von Takara et al. Diese Arbeitsgruppe zeigte, dass die mRNA-Expression von CYP3A9 entlang des Darm kaum absank (Takara et al. 2003). Takara verwendete den gleichen Rattenstamm, jedoch nüchterne Tiere und GAPDH als Referenzprotein. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zusätzliche CYP3A Expressionsanalysen mit männlichen Tieren durchgeführt, denen 48 h vor der Präparation der Intestinalhomogenate das Futter entzogen wurde, wobei sie freien Zugang zu einer 5 %igen Glucoselösung erhielten. Jedoch blieb die CYP3A Proteinexpression entlang des Darms vom Futterentzug unbeeinflusst (Daten nicht dargestellt).

Höhere CYP P450 Expressionen in proximalen Darmregionen könnten daher rühren, dass die meisten Nähr- und Arzneistoffe in dieser Region von den Darmzellen absorbiert werden. Eine weitere Erklärung könnte die Darmflora liefern. Es ist bekannt, dass nicht weniger als 1000 verschiedene Bakterienarten den Darm bevölkern. Im Duodenum und Jejunum ist die Anzahl der Bakterien noch relativ gering, steigt aber stetig entlang des Darms weiter an, wobei die größten Zellmengen im Caecum und Colon zu finden sind (Tlaskalova-Hogenova et al. 2004). Die Beziehung zwischen Darmflora und Wirt ist meistens von beiderseitigem Nutzen. Der Wirt bietet den Bakterien Nahrung und einen Lebensraum, während die Bakterien die Verdauung von unverdaulichen Kohlenhydraten unterstützen und auch am Metabolismus von Gallensäuren, Bilirubin und Cholesterin beteiligt sind (Neish 2002; Mahida 2004). Die indirekte Proportionalität von Bakterienmenge und CYP P450 Expression entlang des Darms

könnte die Theorie unterstützen, dass metabolische Enzyme der dort ansässigen Bakterien die Aufgabe der körpereigenen CYP P450 Enzyme übernehmen. Für bestimmte Isoflavone, wie Daidzein und Glycitein konnte bereits gezeigt werden, dass sie durch die Darmflora der Ratte, als auch des Menschens extensiv metabolisiert werden (Simons et al. 2005; Rafii et al. 2007).
Im Gegensatz zu CYP3A und 2B1 werden die anderen untersuchten CYP P450 Isoformen (CYP1A1, 2C6, 2D1) entlang des gesamten Rattendarms exprimiert. Die Expressionsprofile sind dabei über weite Strecken des Darms gleichmäßig und nur an den jeweiligen Enden des Darms (Duodenum bzw. Colon) treten Expressionsveränderungen auf, wobei vor allem im Colon CYP2C6 und 2D1 ansteigen. Der Expressionsverlauf dieser Enzyme unterstützt die Theorie der metabolisierenden Darmflora nicht direkt, steht aber auch nicht im Widerspruch mit ihr, weil diese Enzyme durchaus Reaktionen katalysieren können, die von der Darmflora nicht übernommen werden können. Bisher hat keine andere Arbeitsgruppe die Proteinexpressionsprofile von CYP1A1, 2C6 und 2D1 entlang des Rattendarms untersucht. Auf funktioneller Ebene, über den Abbau von Ethoxyresorufin, zeigte Takemoto et al. eine abnehmende CYP1A1 Aktivität entlang des Dünndarms der Ratte (Takemoto et al. 2003). Dies steht im Gegensatz zum gleichmäßigen CYP1A1 Expressionsprofil dieser Arbeit und kann eher mit den Expressionsprofilen von CYP3A und 2B1 dieser Arbeit verglichen werden (siehe Abbildung 11). Ethoxyresorufin ist allerdings nicht nur CYP1A1-Substrat, sondern auch CYP2B1-Substrat, wie Kobayashi et al. anhand von cDNA exprimierten CYPs zeigen konnte (Kobayashi et al. 2002). Somit bildet der intestinale Ethoxyresorufin-Metabolismus nicht nur die CYP1A1 Funktion, sondern auch die CYP2B1 Funktion ab. Im Rahmen dieser Arbeit wurde jedoch mittels quantitativen Western Blot festgestellt, dass CYP2B1 das Hauptenzym der CYP P450 Familie im proximalen Darm darstellt (65 %, 350 fmol/mg Gesamtprotein). Daher spiegelt der intestinale Metabolismus von Ethoxyresorufin eher die CYP2B1 Funktion wieder, was auch gut mit dem in dieser Arbeit gezeigten CYP2B1 Expressionsprofil übereinstimmen würde. CYP3A stellt im proximalen Rattendarm mit einem Anteil von ca. 27 % an der Gesamtheit der untersuchten CYP P450 Summe das zweite Hauptenzym der CYP P450 Familie dar, während CYP2C6 (ca.7 %) und 2D1 (ca. 1 %) dort nur untergeordnete Rollen spielen. In den distalen Darmregionen (Ileum/Colon), in denen kein CYP2B1 und 3A exprimiert wird, stellt CYP2D1 mit ca. 60 fmol/mg Protein die größte Fraktion (88 %), während CYP2C6 mit 12 % auch wieder nur eine untergeordnete Rolle spielt und es fragwürdig ist, ob diese Mengen ausreichen um für den metabolischen Abbau von Arzneistoffkandidaten relevant zu sein.

Einen Unterschied im Expressionsverlauf und in den absoluten CYP P450 Mengen zwischen weiblichen Ratten und männlichen Ratten konnte in Rahmen dieser Doktorarbeit nicht festgestellt werden (Mitschke et al. 2008). Andererseits wurden in der Literatur Expressionsunterschiede auf mRNA bzw. auf Proteinebene für eine Reihe von Isoformen der CYP3A Familie beschrieben. So wurde auf mRNA-Ebene CYP3A9 in der Leber und im Darm in höheren Mengen in männlichen Tieren gefunden, während CYP3A18 nur in der Leber in höheren Mengen auftrat (Matsubara et al. 2004; Jan et al. 2006). Auf funktioneller Ebene konnte jedoch Johnson et al., anhand der für CYP3A spezifischen 6ß-Hydroxylierung von Testosteron, im Darm keine Geschlechtspezifität beobachten, was mit den Expressionsergebnissen der hier vorliegenden Arbeit korreliert (Johnson et al. 2000).

Im Vergleich zu anderen Organen enthält der obere Darm mengenmäßig ungefähr genauso viel CYP3A wie die Niere, während die Lunge und der untere Darm nur ungefähr halb so viel CYP3A exprimieren. Die Niere stellt, wie die Leber, ein Eliminationsorgan dar und kann mit Hilfe der dort exprimierten CYP P450 Enzyme unpolare Arzneistoffe in polare umwandeln und somit über den Harn ausscheiden. Die Lunge dagegen stellt wie der Darm eine Barriere für aus der Umwelt aufgenommene Arzneistoffe dar und verhindert deren systemische Verteilung. Wie der Darm exprimieren auch Lunge und Niere verschiedene CYP3A Isoformen, wie bereits mehrere Arbeitsgruppen auf mRNA- und Protein-Ebene zeigen konnten. CYP3A18 wird demnach sowohl in der Lunge, als auch in der Niere exprimiert, während CYP3A9 nur in der Lunge nachweisbar ist (Matsubara et al. 2004). Im Vergleich zu den gerade genannten Organen enthält jedoch die Leber die größten CYP P450 Proteinmengen. Im Leberhomogenat trat ein 13fach höhere CYP P450 Gesamtproteinsumme, als in einem vergleichbar präparierten Homogenat des proximalen Darms (Duodenum /Jejunum) auf. Die Leber zeigt zudem auch eine ganz andere CYP P450 Zusammensetzung, als der Darm (siehe Abbildung 29). Während CYP2C6 und 2D1, im Gegensatz zu CYP3A und 2B1, im Darm eine eher untergeordnete Rolle spielen, stellen in der Leber alle untersuchten CYP P450 Isoformen gleichgroße Fraktionen. Die CYP2C6 Enzyme bilden dabei in der Leber der Ratte mit ca. 32 % knapp die größte Fraktion. Diese CYP P450 Verteilung ist nur teilweise in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Yan et al., der CYP2C (65 %) und 3A2 (14.6 %) als größte Fraktionen in hepatischen Rattenmikrosomen nachwies, jedoch nur geringe Mengen von CYP2B1 (1.9 %) fand (Yan und Caldwell 2001). Es gibt mehrere Erklärungsmöglichkeiten, warum Yan et al andere Anteile für CYP3A und 2C an der CYP P450 Verteilung der Leber fand, als hier im Rahmen dieser Arbeit beobachtet.

(1) Mehrere Gruppen konnten bereits zeigen, dass CYP3A2 nicht im Darm exprimiert wird. Daher kann man davon ausgehen, dass dies in der von Yan et al. verwendeten Methodik begründet liegt. Möglicherweise waren die für die Detektion gewählten CYP3A2 Primer nicht spezifisch genug für diese Isoform, sondern zeigten noch Kreuzreaktivität mit einer anderen, damals noch unbekannten CYP 3A Isoform.
(2) Die CYP P450 Verteilung von Yan et al. fasste die Expression aller CYP2C Isoformen (CYP2C6, 2C11-13) zusammen, während die Verteilungsdaten, die im Rahmen dieser Doktorarbeit erhoben wurden, nur CYP2C6 darstellen.

(3) Yan et al. vernachlässigte die Expression von CYP2D1 in der Leber der Ratte, welches jedoch im Rahmen der hier vorliegenden Studien einen Anteil von 25 % an der absoluten CYP P450 Gesamtmenge der Leber ausmacht.

Diese Punkte können jedoch nicht den geringen CYP2B1 (1.9 %) Anteil an der Gesamtsumme der CYP P450 Enzyme in der Arbeit von Yan et al Arbeit, im Vergleich zu den im Rahmen dieser Doktorarbeit erhobenen Ergebnisse (CYP2B1: 23 %) erklären. Diesen Unterschied könnte, laut Stott et al., auf der Verwendung von unterschiedlichen Rattenstämmen bzw. der unterschiedlichen Zusammensetzung der Nahrung beruhen. Stott et al. zeigte das die Aktivität von verschiedenen CYP P450 Isoformen zwischen den Rattenstämmen CDF (Fischer 344)/CrlBR and Crl:CD (SD)BR unterschiedlich ausfielen, und verschiedene Nahrungszusätze bzw. Fütterungsweisen zu unterschiedlichen CYP P450 Aktivitäten führten (Stott et al. 2004). Die im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit dargestellte Verteilung der CYP P450 Isoformen beruht alleinig auf der Summe der durch Antikörper detektierbaren CYP P450 Mengen. Neben den hier untersuchten CYP P450 Isoformen können jedoch auch noch weitere Isoformen im Darm vorhanden sein, für die leider keine Detektionswerkzeuge, d.h. spezifische Antikörper existieren. Diese weiteren, nicht detektierbaren Isoformen könnten durchaus die hier beschriebene CYP P450 Verteilung des Darms und der Leber deutlich beeinflussen. So wurde unter anderem die Expression von CYP2J3 und anderen Mitgliedern der CYP2D Familie im Darm bereits nachgewiesen, konnten aber aufgrund fehlender Antikörper in der Ratte in dieser Arbeit nicht analysiert werden (Zeldin et al. 1997; Hiroi et al. 1998). Interessanterweise wurde für den Darm und die Leber des Menschens eine gänzlich andere Zusammensetzung der CYP P450 Enzyme beschrieben. Wie schon in der Einleitung erwähnt, stellt CYP3A im Menschen die größte Fraktion, sowohl in der Leber (40 %), als auch im Darm (82 %) dar.

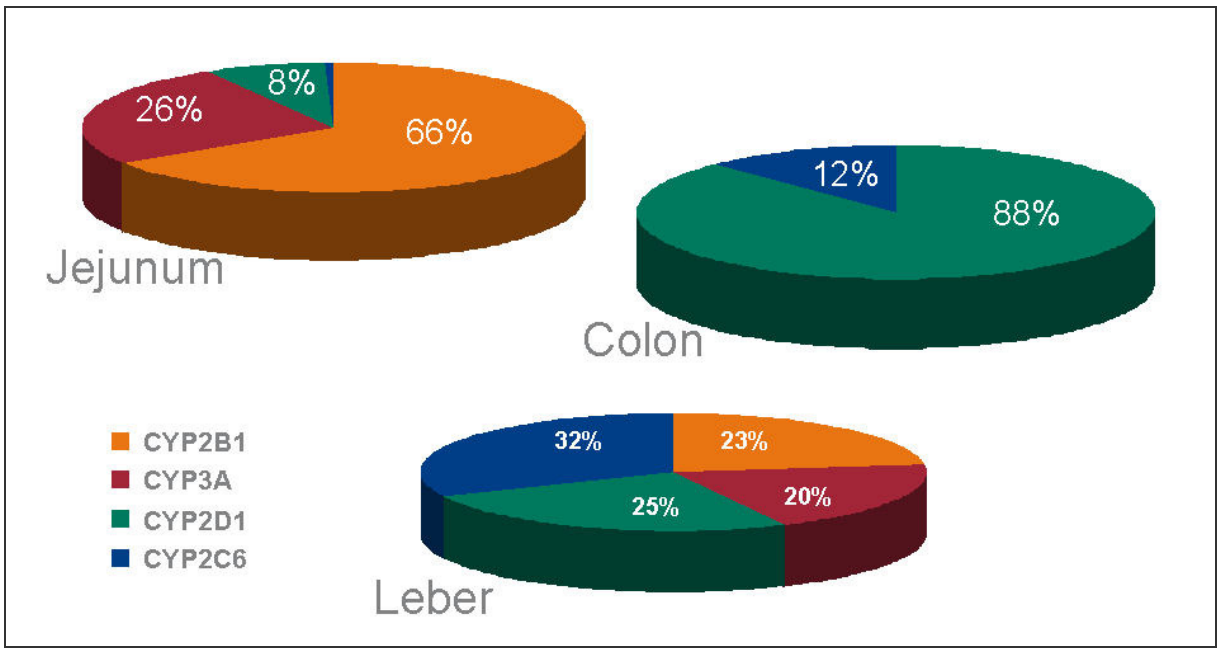


Abbildung 29: CYP P450 Zusammensetzung im Jejunum, Colon und in der Leber der Ratte.
Die Daten wurden mittels quantitativen Western Blot ermittelt und stellen eine Zusammenfassung von Tabelle 5 dar.

Die CYP2C Familie repräsentiert dabei in beiden Organen die zweitstärkste CYP P450 Fraktion, während CYP2D6 und 2B6 mengenmäßig nur eine untergeordnete Rolle in der Leber spielen und CYP2B6 im Darm überhaupt nicht exprimiert wird. Die unterschiedliche CYP P450 Zusammensetzung zwischen den Spezies kann auf unterschiedliche Nahrungsquellen zurückgeführt werden. So produzieren z.B. Pflanzen eine Vielzahl von toxischen Substanzen, die für ihren eigenen Energiestoffwechsel bedeutungslos sind, aber andere Lebewesen hindern sollen sie zu verzehren (Fraßgifte). Pflanzen verzehrende Tiere entwickelten daraufhin Schutzmechanismen, z.B. mittels CYP P450 Enzyme, um sich vor diesen toxischen Substanzen zu schützen. Jede Spezies hat somit ihr eigenes CYP P450 Set optimiert, um diese Giftstoffe ihrer Umgebung unschädlich zu machen (Lewis et al. 1998; Aktories et al. 2005). Die CYP P450 Enzyme zeigen dabei eine so hohe Substratbreite, dass sie auch viele der heute verfügbaren Arzneistoffe metabolisieren. Zu den Unterschieden in der CYP P450 Zusammensetzung zwischen den Spezies kommt außerdem noch, das gleiche CYP P450 Familien nicht immer die gleiche Reaktion in einer anderen Spezie katalysieren (Guengerich 1997; da Fonseca et al. 2007). So wird z.B. Coffein in der Ratte durch CYP1A2 hydroxyliert, während das gleiche Enzym im Menschen Coffein demethyliert (Kot und Daniel 2008). Dabei neigen einige Enzymfamilien eher zu Speziesunterschieden als andere CYP P450 Familien. Die Isoformen der CYP2D Familie katalysieren in Mensch und Ratte weitesgehend gleiche Reaktionen, während CYP3A4-Substrate im Menschen häufig durch

andere Familien metabolisiert werden, als in der Ratte. So werden Nifedipine und Lidocaine im Menschen durch CYP3A4 metabolisiert, aber in der Ratte durch Mitglieder der CYP2C Familie (Nedelcheva und Gut 1994).

CYP P450 Expression in den einzelnen Enterozytenpopulationen

Wie schon in der Einleitung erwähnt, setzt sich die Darmwand aus mehreren Zellschichten ausgehend vom Lumen zusammen: Mukosa, Submukosa, Mukosa muskularis, und Serosa. Die Mukosa selber ist wiederum in drei Bereiche, Zotten, Krypten und Lamina Propria gegliedert. Die Krypten stellen das proliferierende Kompartiment der Mukosa dar, die das nicht-proliferierende Kompartiment der Mukosa, die Zotten, ständig mit neuen Zellen versorgt. Daher enthalten die Zotten voll ausgereifte und nicht mehr zur Teilung befähigte Enterozyten, während die Krpyten hauptsächlich nicht maturierte, noch teilungsfähige Darmepithelzellen enthalten. Die unter der Mukosa gelegene Submukosa stellt das Skelett des Darms dar, welches der Darmwand die strukturelle Integrität liefert.
Um die Proteinexpression entlang des Darms zu untersuchen, wurden Intestinalhomogenate angefertigt, die eine Mischung aus mehreren Zellarten der Mukosa und der Submukosa enthielten. Damit kann keine Aussage getroffen werden, in welcher Enterozytenpopulation die CYP P450 Enzyme lokalisiert sind und ob die im Darm absorbierten Nähr- und Arzneistoffe überhaupt mit den Enzymen in Kontakt kommen. Zur Lokalisierung der CYP P450 Expression wurden Zellpopulationen isoliert, die fraktionsweise von der Darmwand des Jejunums gelöst wurden und jeweils unterschiedlich differenzierte Darmepithelzellen enthielten (siehe Abschnitt 3.4). Außerdem wurde die Lokalisation von CYP3A auch anhand von immunhistochemischen Methoden untersucht. Sowohl im Immunblot, als auch in der Immunhistochemie konnte gezeigt werden, dass CYP3A hauptsächlich in den reifen, nicht mehr proliferierenden Enterozyten der Zotten exprimiert wird. Die nicht-maturierten, noch teilungsfähigen Enterozyten der Krypten bzw. die Zellen der Submukosa, der Muskelschicht und der Serosa zeigten kaum bzw. keine Expression von CYP3A. Mittels Immunhistochemie konnte zudem die stärkste CYP3A Expression in den Zottenspitzen lokalisiert werden. Dieses Expressionsmuster wurde auch schon von anderen Arbeitsgruppen publiziert (Dubey und Singh 1988; Debri et al. 1995). Auch für CYP2B1 konnte im Immunblot eine 5fach stärkere Expression in den Zotten dargestellt werden, als im Bereich der Krypten. Vergleichbare Ergebnisse wurden bereits durch andere Arbeitsgruppen veröffentlicht (Bonkovsky et al. 1985; Rich et al. 1989). Da im oberen Drittel der Zotten die

Absorption der meisten Nähr- und Arzneistoffe stattfindet, ist es auch verständlich, dass hier die höchste Expression von CYP3A und 2B1 stattfindet. Die Zwischenräume der Zotten sind verhältnismäßig eng und die Bewegung der Flüssigkeit relativ gering. Die Wanderung von Arzneistoffen in Richtung Krypten nimmt daher zu viel Zeit ein, in der die meisten Arzneistoffe bereits absorbiert werden (Ryu und Grim 1982; Strocchi und Levitt 1993; Oliver et al. 1998). Deswegen ist eine Anreicherung der CYP P450 Enzyme an der Zottenspitze physiologisch sinnvoll. Es existieren sogar Theorien, die besagen, dass die Zotten nicht zur Oberflächenvergrößerung der Absorptionsfläche dienen, sondern zur Maturierung der Enterozyten und somit zur Ausbildung eines geeigneten Sets an CYP P450 und Transporter-Proteinen (Ryu und Grim 1982). CYP2C6 und 2D1 dagegen zeigten entlang der Zotten/Kryptenachse eine relativ gleichmäßige Expression und wurden auch entlang des gesamten Darms relativ gleichmäßig exprimiert. Solche Expressionsmuster konnte die Arbeitsgruppen von Zeldin et al. auch für CYP2J2 im humanen und murinen Darm darstellen (Zeldin et al. 1997). CYP2J2 wird dabei nicht nur in den absorptiven Zellen des Darms exprimiert, sondern auch in anderen Zellen der Mukosa und Submukosa. Dieses ubiquitäre Expressionsverhalten im Darm erklärt sich durch die Funktion der CYP P450 Isoform. CYP2J2 ist nicht am Metabolismus von Arzneistoffen beteiligt, sondern metabolisiert endogene Stoffe, wie beispielsweise Arachidonsäure. Dabei entstehen deren Epoxide, die an der Regulation der Darmmotilität, an der Freisetzung von intestinale Neuropetiden und an der Modulierung von intestinalen Elektrolyttransporten beteiligt sind (Zeldin et al. 1997). Da CYP2C6 und 2D1 im Darm einen ähnlichen Expressionsverlauf zeigen wie CYP2J2 und im Vergleich zu CYP3A und 2B1 im Darm sehr gering exprimiert sind, wäre auch eine Beteiligung dieser Enzyme an eher endogenen Prozessen, als am Abbau von Arzneistoffen denkbar.

Kooperativität der CYP P450 Proteine mit ABC-Transportern

Die Expression der CYP P450 Enzyme im Körper findet vor allem an Eintrittspforten in den systemischen Blutkreislauf statt. Daher sind die CYP P450 Proteine vor allem für die Degradation von giftigen Substanzen aus der Umwelt verantwortlich. Im Darm zeigen vor allem die Enzyme, die am stärksten exprimiert werden, CYP2B1 und 3A, ihre höchste Expression in den Zottenspitzen des Duodenums/oberen Jejunums und somit da wo die meisten oral aufgenommen Stoffe absorbiert werden. Die Mengen an CYP P450 Enzymen des Darm sind vergleichbar mit denen der Niere und viel geringer als in der Leber. Nach der

Theorie von Benet et al. wäre eine geringere Expression von CYP P450 Enzymen im Darm dahingegen vernachlässigbar, wenn die CYP P450 Enzyme mit dem im Darm exprimierten Efflux-Transportern kooperieren (siehe Abbildung 6).
In denselben Intestinalhomogenaten, in denen im Rahmen dieser Doktorarbeit die CYP P450 Expressionsprofile analysiert wurden, wurde auch die Proteinexpression mehrerer Efflux-Transporter (Pgp, Bcrp und mrp2) untersucht. Die Expression der untersuchten Tranportproteine verhielt sich mitunter gegensätzlich. Während die mrp2 Expression entlang des Rattendarms deutlich abnahm, verstärkte sich die Expression von Bcrp und Pgp (MacLean et al. 2008). Nach Benets et al. Theorie könnte somit Pgp/Bcrp die Menge an Arzneistoff in der Zelle, die den CYP P450 Enzymen zur Verfügung gestellt wird, regulieren, in dem sie die Arzneistoffe aus der Zelle zurück ins Lumen transportieren. Die transportierte Substanz kann erneut von den Enterozyten aufgenommen werden und anschließend wieder den CYP P450 Enzymen zur Verfügung stehen (Cummins et al. 2002; Benet et al. 2004). Dabei reicht in den Regionen mit höheren CYP P450 Mengen eine geringere Transporterexpression aus, um die Sättigung der Enzyme zu regulieren, als in den Regionen in denen kaum CYP P450 Enzyme vorhanden sind.

Expression von weiteren Phase-I/-II-Enzymen entlang des Darms

Die schon intensiv diskutierte CYP P450 Superfamilie ist zwar für den Metabolismus von Arzneistoffen von zentraler Bedeutung, allerdings geraten eine ganze Reihe anderer Enzyme der Phase-I/-II (siehe Einleitung 1.2) darüber häufig in Vergessenheit, die ebenfalls im Darm exprimiert werden und einen Einfluss auf die Absorption von Arzneistoffen ausüben können. So werden viele steroidale Arzneistoffe im Darm durch die Phase-I-Enzymgruppe der Aldoketoreduktasen, wie 17ß-HSD2 metabolisiert, während Raloxifen, Propranolol, Morphin und Ezetimibe Beispiele für Substanzen sind, die im Darm Glucuronidierungen unterliegen (Ritter 2007). Ezetimibe zeigte im Darm der Ratte hohe Absorptionsraten (95 %), jedoch nicht von der Muttersubstanz, sondern vom glucuronidierten Metabolit (van Heek et al. 2000). Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde daher die Expression von zwei weiteren metabolischen Enzymen 17ß-HSD2 und UGT entlang des Darms der männlichen Ratte untersucht. Es zeigte sich, dass 17ß-HSD2 am stärksten im Duodenum und ganz oberen Jejunum exprimiert wurde. Danach wurde die Expression ein wenig schwächer, verblieb aber entlang des restlichen Dünndarms auf einem relativ gleichmäßigen Level. Ein Anstieg im Dickdarm konnte nur in einem von zwei Tieren dargestellt werden, weshalb das Ergebnis nur bedingt

Allgemeingültigkeit hat. 17ß-HSD2 wurde neben dem Rattendarm auch im humanen und murinen Darm nachgewiesen, jedoch wurde bisher noch kein Proteinexpressionsprofil entlang des Darms veröffentlicht (Mustonen et al. 1998; Sano et al. 2001). Allerdings konnte in dieser Arbeit mittels funktioneller Untersuchungen im „Everted Sacs" Modell die Proteinexpression von 17ß-HSD2 nicht verifiziert werden. Die Aktivität, dargestellt anhand des Abbau von Testosteron zu Androstenedion, nahm entlang des Dünndarms stark ab, was mit bereits publizierten Daten übereinstimmt (van de Kerkhof et al. 2005). Es ist also anzunehmen, dass das im Immunblot detektierte Signal auf eine Kreuzreaktivität des Antikörpers zurückzuführen ist. Ein möglicher Kandidat wäre dabei 11ß-HSD2, das ebenfalls nachweislich im Darm exprimiert wird und 45 % Identität in der Aminosäuresequenz mit 17ß-HSD2 aufweist (Baker 1998; Takahashi et al. 1998)

Von 17ß-HSD existieren im Körper mehrere unterschiedliche Isoformen. Während das hier untersuchte 17ß-HSD2 ausschließlich durch Oxidation Geschlechtshormone in ihre inaktiven Ketoformen umwandelt, aktiviert sein Gegenpartner 17ß-HSD1 die selben Hormone durch die reduktive Rückreaktion. Welche der Isoformen in einem Organ dominant exprimiert wird, hängt davon ab, ob dieses Organ die Hormone aktiviert oder inaktiviert. Im Darm der Ratte und des Menschen wird ausschließlich 17ß-HSD2 exprimiert, wodurch der Darm als Hormoninaktivator betrachtet wird (Miettinen et al. 1996). Außerdem zeigten mehrere Arbeitsgruppen, dass die Expression von 17ß-HSD2 entlang der Zotten im Darm der Maus und des Menschen zunimmt (Mustonen et al. 1998; English et al. 2000; Sano et al. 2001). Somit liegt 17ß-HSD2 im Cytosol der absorbierenden Enterozyten vor und soll wahrscheinlich den Organismen vor in der Nahrung befindlichen oder vor bakteriell produzierten Steroiden schützen (Sano et al. 2001). 17ß-HSD2 wird zumindest im Darm der Maus konstitutiv exprimiert und zeigt auch keine Beeinflussung vom Steroidgehalt im Blut, was die Theorie des Abbaus von körperfremden Steroiden weiter stützt (Mustonen et al. 1998). Sano et al. verglich zudem das Expressionsmuster von 17ß-HSD2 mit dem Expressionsmuster von 11ß-HSD2, welches Cortisol ins inaktive Cortison umwandelt und hat ein ähnliches Expressionsmuster entlang des menschlichen Darms feststellen können. 11ß-HSD2 wird im menschlichen Darm eine Rolle bei der Entwicklung und Reifung der Epithelzellen im Colon zugesprochen (Takahashi et al. 1998). Daraus schloss Sano et al., das unter Umständen auch 17ß-HSD2 an der Entwicklung und Reifung des Darms beteiligt sein könnte (Sano et al. 2001). Diese Theorie ging auch English et al. nach, weil er 17ß-HSD2 und

4 auch in geringen Mengen in den Krypten des menschlichen Darms nachweisen konnte (English et al. 2000).

UGT zeigte in dieser Arbeit einen ganz ähnlichen Expressionsverlauf im Darm der Ratte wie 17ß-HSD2. Es zeigte ebenfalls im oberen Duodenum die höchste Expression, die sich anschließend etwas vermindert und ansonsten relativ gleichmäßig entlang des Darms verlief. Mit den funktionellen Untersuchungen im „Everted Sac“ Modell (Glucuronidierung von Testosteron) konnten, wie schon für 17ß-HSD2, die Expressionsdaten von UGT nicht verifiziert werden. Die Glucuronidierung von Testosteron nimmt entlang des Darms stark ab, wobei im unteren Jejunum kein Glucuronid von Testosteron mehr nachweisbar ist. Da, der für die Western Blot Analysen verwendete Anti-UGT Antikörper nicht isoformspezifisch ist, kann auch hier vermutet werden, dass mehrere UGT-Isoformen detektiert wurden. Es konnte bereits von anderen Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass mehrere UGT-Isoformen der Familien UGT1 und 2 mit unterschiedlichen Expressionsverhalten entlang des Darms existieren. Laut Grams et al. bzw. Kobayashi et al sind UGT1A6 bzw. UGT1A7 auf mRNA-Ebene die dominierenden Isoformen im Rattendarm (Kobayashi et al. 1998; Grams et al. 2000; Galetin und Houston 2006). Beide Isoformen sind im Duodenum am Stärksten exprimiert und zeigen einen relativ gleichmäßigen Verlauf entlang des restlichen Dünndarms. Im Dickdarm sinkt die Expression der UGT1A7 mRNA wieder ab, während für die Expression der UGT1A6 mRNA zum Rektum hin wieder ein schwacher Anstieg zu beobachten ist. Das publizierte mRNA-Expressionprofil vom Duodenum bis zum Ileum sieht somit vergleichbar zu den in dieser Arbeit erbrachten Proteindaten aus. Allerdings gibt es keine Übereinstimmung mit den funktionellen Ergebnissen. Daraus könnte man schließen, dass Testosteron nicht über die im Darm dominanten UGT Isoformen UGT1A6 und 1A7 metabolisiert wird, sondern über andere Isoformen. Peters et al. zeigte zudem, dass die UGT Expression in den Zottenspitzen am höchsten ausfällt und Dubey et al. wies nach, dass sich auch dort die größte UGT Aktivität befindet (Peters et al. 1987; Dubey und Singh 1988). Zudem konnte von Dubey et al. gezeigt werden, dass die Induktion von UGT bzw. CYP P450 am Stärksten in den Krypten ausfällt. Aufgrund der kurzen Lebensdauer der Enterozyten von nur 2-3 Tagen ist dieses Induktionsverhalten durchaus sinnvoll. Damit ist sicher gestellt, dass die maturierten Enterozyten ausreichende Mengen an Enzym zur Verfügung haben oder aber, dass die Zellen der Krypten in der Lage sind sich vor giftigen Stoffen zu schützen.

Es hat sich gezeigt, dass Phase-I-Enzyme (CYP P450, 17ß-HSD2) und Phase-II-Enzyme (UGT) von den gleichen Zellen exprimiert werden, gleiche Expressionsmuster entlang der

Zotten/Krypten Achse aufweisen und dort am Stärksten exprimiert werden, wo die meisten Nähr- und Arzneistoffe aus dem Darmlumen absorbiert werden, nämlich an der Zottenspitze. Diese Phase-I/II-Enzyme zusammen sind für den *„First pass Metabolismus"* des Darms verantwortlich, der die Bioverfügbarkeit einer ganzen Reihe von Substanzen erheblich beeinflussen kann.

Modellentwicklung zur Darstellung der metabolischen Aktivität im Rattendarm

In der pharmazeutischen Industrie werden mikrosomale Fraktionen der Leber oder des Darms routinemäßig eingesetzt, um die metabolische Stabilität von Arzneistoffkandidaten zu untersuchen. Die Verwendung von Mikrosomen hat jedoch den Nachteil, dass nur endoplasmatisch gebundene Enzyme in den Mikrosomen enthalten sind und, dass für die metabolische Aktivität ein künstliches Energiesystem zur Verfügung gestellt werden muss. Daher kommen in neuester Zeit auch immer häufiger primäre Hepatozytenkulturen zum Einsatz, um den vollständigen und möglichst physiologischen Metabolismus der Leber abzubilden. Für den Darm existieren solchen Zellisolationen bisher nicht. Zu dem zeigen besonders intestinale Mikrosomen starke Schwankungen ihrer Aktivität in Abhängigkeit von der Aufarbeitung und Lagerdauer. Aufgrund der hohen Konzentration an Verdauungsenzyme im Darm sind sie zudem besonders gefährdet während der Isolation und ihrer Lagerung degradiert zu werden, was eine Verringerung der CYP P450 Aktivität zur Folge hat (Emoto et al. 2000; Mohri und Uesawa 2001; Takemoto et al. 2003; Bruyere et al. 2009). Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher zwei alternative Zellmodelle zur Messung des intestinalen Metabolismus ausgetestet: 1) Enterozytenkulturen und 2) die bereits erwähnten „Everted Sacs". Der metabolische Assay mit dem Enterozyten-Modell wurde über den Testosteron-Metabolismus optimiert, wobei verschiedene Zellisolationen, Zellzahlen und Puffersysteme ausgetestet wurden. Des Weiteren zeigten die Experimente, dass die Zellen am Anfang der Methodenentwicklung häufig stark variierende metabolische Aktivitäten aufwiesen, d.h. manche Zellisolationen führten zu hohen metabolischen Umsätzen, während andere völlig inaktiv waren. Es ist bekannt, dass Enterozyten nur eine sehr kurze Lebensdauer haben, da sie relativ schnell die Apoptose einleiten. Allerdings ist nicht klar, ob die Zellen erst apoptotisch werden und dann ans Lumen abgegeben werden, oder ob der Vorgang andersherum stattfindet. Es gibt Untersuchungen, die beschreiben, dass die Zellen in die Apoptose eintreten, sobald sie ihren Kontakt zur extrazellulären Matrix über $ß_1$-Integrine verlieren. Dieser Prozess wird in der Literatur als „*Anoikis*" bezeichnet und führt bereits drei Stunden

nach der Zellisolation zum Zelltod (Meredith et al. 1993; Frisch und Francis 1994; Strater et al. 1996). Aufgrund dessen wurde die Caspaseaktivität in den isolierten Zellen als Apoptosemarker herangezogen. Es zeigte sich, dass das Ausmaß der Apoptose durch die Caspaseaktivität reflektiert wurde und mit dem Ausmaß der metabolischen Aktivität einherging, d.h. je höher die Caspaseaktivität ausfiel, desto geringer die metabolische Aktivität der Zellen und *vice versa*. Daher wurde der „Interleukin-Converting-Enzyme"-Inhibitor-I dem metabolischen Assay zugesetzt, der die Apoptose der Zellen irreversible und nahezu komplett unterband. In Gegenwart dieses Inhibitors wurden stabile Abbauraten von Testosteron erzielt.

Für die Charakterisierung der metabolischen Aktivität der Enterozyten wurde ein Test-Set ausgewählt, welches Dextromethorphan (DEX), Midazolam (MDZ), Bupropion (BUPR) und Testosteron (TESTO) enthielt. Von diesen Substraten ist bekannt, dass sie von einem oder mehreren Enzymen der Phase-I oder -II metabolisiert werden. Der TESTO-Metabolismus wird über sehr viele Enzyme katalysiert, woraus ein breites Spektrum an Metaboliten hervorgehen kann. Im Rahmen der hier vorliegenden Doktorarbeit konnte mit der Enterozytenisolation jedoch nur Androstenedion nachgewiesen werden, dass hauptsächlich durch 17ß-HSD2, CYP2B1 und 3A entsteht. Während von DEX drei Metabolite bekannt sind, die durch die Einwirkung verschiedener CYP P450 Isoformen entstehen können, konnten in den Enterozyten nur der CYP3A Metabolit 3-Methoxymorphinan (3-MM) dargestellt werden. Die erwarteten Metaboliten von MDZ und BUPR konnten dagegen beide im Enterozyten-Modell nachgewiesen werden. Trotz der starken metabolischen Aktivität der primären Rattenenterozyten taten sich auch einige Nachteile auf. Die Zellisolation nimmt zu viel Zeit in Anspruch, in der die Zellen bereits apoptotisch werden. Daher ist auch die Isolation von Zellen aus verschiedenen Darmregionen erheblich erschwert. Trotz Zugabe des Apoptoseinhibitors scheint die CYP P450 Aktivität nicht völlig stabil zu sein. So gab es immer wieder experimentelle Ansätze, die trotz niedrigem Caspasewert und gutem TESTO-Abbau, keine metabolische Aktivität gegenüber den anderen Substanzen, DEX, MDZ und BUPR zeigten, bzw. nur sehr geringe Mengen an Metaboliten produzierten. Eine Erklärung könnte sein, dass durch die Isolation der Zellen die CYP P450 Enzyme und/oder die Energieversorgung der Zellen beeinflusst wird, so dass die metabolische Aktivität der Zellen beeinträchtigt ist. Enterozyten sind sehr empfindliche Zellen, die wie oben schon erwähnt, durch eine Vereinzelung der Zellen schnell in Apoptose gehen (Meredith et al. 1993; Frisch und Francis 1994; Strater et al. 1996).

Daher wurde eine zusätzliche Zellmodell zur Darstellung des intestinalen Metabolismus angewendet, das deutlich stärker die physiologische Situation widerspiegelt, als isolierte Enterozyten: das „Everted Sac"-Modell. Wie bereits erwähnt, handelt es sich bei „Everted Sacs" um umgestülpte und mit Puffer gefüllte Darmsegmente, die über einen bestimmten Zeitraum mit den Test-Substanzen inkubiert werden. Mit dieser Methodik wurde das gleiche Test-Set getestet, das auch schon in den metabolischen Assays des Enterozyten-Modells zum Einsatz kam. Der metabolischen Assay mit dem „Everted Sac" Modell zeichnet sich gegenüber dem der Enterozyten durch mehrere Vorteile aus:

(1) Die Substrate werden reproduzierbar abgebaut.

(2) Mehrere Darmregionen können in einem Experiment untersucht werden.

(3) Die Ergebnisse dieses metabolischen Assays können leicht auf den gesamten Darm skaliert und damit *„First Pass" in vivo* Clearances für die Test-Substanzen im Darm berechnet werden.

(4) Das Permeationsverhalten der Substrate und Metabolite über die Darmwand kann zusätzlich untersucht werden.

Vergleichbarkeit der kinetischen Parameter der Test-Substanzen beider Zellmodelle

Beide Zellmodelle, „Everted Sacs" und primäre Enterozyten, lieferten im metabolischen Assay vergleichbare metabolische Initialgeschwindigkeiten aller Test-Substanzen. Allerdings sind die Initialgeschwindigkeiten der Metabolitenentstehung im metabolischen Assay mittels Enterozyten-Modell, besonders im Falle von 1-Hydroxymidazolam (1OH-MDZ) viel geringer (36fach), als im vergleichbaren „Everted Sac" Modell. Die Initialgeschwindigkeit der 1OH-MDZ Entstehung liegt im metabolischen Assay mit dem „Everted Sac" Modell bei 2.9 pmol/min/mg Enterozyten-Protein (E-Protein). Mittels Darmscheiben „Slices" hat Martignoni et al. für die Entstehung von 1OH-MDZ Werte von 11 pmol/min/mg Protein ermittelt, während die Geschwindigkeit in intestinalen Mikrosomen bei 4 pmol/min/mg Protein lag (Martignoni et al. 2006). Diese Werte liegen damit in vergleichbaren Größenordnungen mit hier im Rahmen dieser Doktorarbeit ermittelten Daten. Die im Vergleich dazu geringe Geschwindigkeit der 1OH-MDZ Entstehung im metabolischen Assay mit dem Enterozyten-Modell kann darin begründet liegen, dass dort 1OH-MDZ einem weiteren Metabolismus unterliegt oder, dass CYP3A in den primären Enterozyten, durch die Apoptoseeinleitung degradiert wurde. Auch in intestinalen Mikrosomen wurde bei Gefrier-/Auftauzyklen beobachtet, dass die CYP3A Aktivität schneller nachlässt, als die der anderen

Enzyme (Mohri und Uesawa 2001; Takemoto et al. 2003). Deswegen ist es durchaus denkbar, das CYP3A sehr viel empfindlicher auf die Vitalität der Zellen reagiert, als die anderen Enzyme. Die metabolischen Ansätze mit dem „Everted Sac“ Modell lieferte außerdem für TESTO eine ganze Reihe von Metaboliten, die im metabolischen Assay mit Enterozyten nicht darzustellen sind. Dies liegt allerdings auch in der Probenaufarbeitung von TESTO und seinen Metaboliten begründet. Die „Everted Sac“ Proben von TESTO wurden mit Ethylacetat extrahiert und dadurch von Matrixverunreinigungen gesäubert und aufkonzentriert, um Substanz auch noch im inneren der Sacs (serosales Kompartiment), darzustellen. Auf diese Weise konnten neben Androstenedion noch drei weitere Metaboliten Testosteron-Glucuronid (TESTO-GLUC), 16ß-Hydroxytestosteron (16ßOH-TESTO) und 6ß-Hydroxytestosteron (6ßOH-TESTO) identifiziert werden, wobei für die ßOH-TESTO-Metabolite CYP2B1 und 3A verantwortlich sind. Durch CYP P450 Inhibitionsversuche mit Aminobenzotriazol (ABT) konnte gezeigt werden, dass Androstenedion hauptsächlich über die Aktivität von 17ß-HSD2 transformiert wird und CYP P450 Enzyme nur zum geringen Anteil beteiligt sind. Auf der anderen Seite wurde die Entstehung der anderen Metabolite mittels ABT fast vollständig gehemmt, was daraufhin hinweist, dass diese Metabolite auf die Aktivität von CYP P450 Enzymen zurückzuführen ist. Die größte Initialgeschwindigkeit zeigte, wie bereits erwähnt, Androstenedion (56.3 pmol/min/mg „Everted Sac“-Protein (ES-Protein)), gefolgt von TESTO-GLUC, 16ßOH-TESTO und 6ßOH-TESTO. Martignoni et al. wies ebenfalls Androstenedion (126 pmol/min/mg Protein) als Hauptmetabolit von TESTO in Organschnitten „Slices“ nach, jedoch entstand in diesen 6ßOH-TESTO mit nur geringfügig langsamerer Geschwindigkeit (100 pmol/min/mg Protein), was ca. 100fach über der von uns detektierten Geschwindigkeit liegt (Martignoni et al. 2006). Die Organschnitte, die in der Arbeit von Martignoni et al. verwendet wurden, werden mit einem zusätzlichen Energiesystem inkubiert, dass die Aktivität der CYP P450 Enzyme beeinflussen könnte. 16ßOH-TESTO, ein Substrat von CYP2B1, entstand jedoch mit vergleichbaren Geschwindigkeiten in beiden Experimenten, was gegen die Theorie der Beeinflussung durch ein zusätzliches Energiesystem spricht. Dies könnte damit erklärt werden, dass 6ßOH-TESTO einem weiteren intestinalen Metabolismusschritt in den „Everted Sacs“ unterliegt und somit kontinuierlich weiter metabolisiert wird. Möglicherweise ist die Aktivität dieses zusätzlichen Enzyms abhängig vom Zustand des Gewebes, wodurch die Daten von Martignoni et al. erklärt werden könnten. Es könnte auch sein, dass die Inkubation mit einem zusätzlichen Energiesystem in der Arbeit von Martignoni et al., die Reaktionsrichtung der 6ßOH-TESTO

Metabolisierung verschoben hat. Ersteres wird dahingegen unterstützt, dass die Organschnitte in der Arbeit von Martignoni et al. mittels heißer Agarose eingegossen wurden, was durchaus zu irreversiblen Konformationsveränderungen von Enzymen führen kann.

Interessanterweise, liefern die hier angewendeten Zellmodelle zur Darstellung des intestinalen Metabolismus höhere Initalgeschwindigkeiten des Substratabbaus, als der Metabolitenentstehung. Im Falle von TESTO entspricht die Summe aller Initial-geschwindigkeiten der detektierten Metabolite nur circa der Hälfte der detektierten Initialgeschwindigkeit des Substratabbaus. Im Falle der anderen Substrate sind sogar noch größere Unterschiede der jeweiligen Geschwindigkeiten errechnet worden. Diese Unterschiede können nur dadurch erklärt werden, dass entweder die Metabolite weiteren Abbauschritten unterliegen und/oder die Substrate nicht nur in die untersuchten Metabolite umgewandelt werden.

Für die erste Annahme spricht, dass im metabolischen Experiment mittels primärer Enterozyten Androstenedion über einen Zeitraum von 60 min kontinuierlich an Menge zunimmt, jedoch bei noch längerer Inkubationszeit wieder abnimmt (Daten nicht gezeigt). Dies deutet daraufhin, dass durch den auftretenden Substratmangel (TESTO oder Energieäquivalent) nicht genug Androstenedion nachgebildet werden kann, aber andererseits Androstenedion selber kontinuierlich weiter metabolisiert wird. Es gibt Literaturquellen die den Metabolismus von Androstenedion bzw. auch 1OH-MDZ zu ihren Glucuronid-Metaboliten und weiteren Metaboliten beschreiben. Im Falle von 1OH-MDZ gibt es diese Daten nur für die humane Leber, allerdings weiß man, dass das verantwortliche UGT auch im Darm exprimiert wird (Kreek et al. 1963; Chung und Coffey 1977; Raju et al. 1978; Klieber et al. 2008; Zhu et al. 2008). Auch die zweite Annahme, dass noch mehr Metabolite, als die hier Aufgeführten im Darm entstehen, kann man mit Literaturquellen belegen. So kann TESTO noch zu einer ganzen Reihe anderer Metabolite, wie z.B. 2ßOH-, 16αOH- und 6αOH-TESTO metabolisiert werden, während für MDZ auch die Hydroxylierung am C4 für den Darm bekannt ist (Sohlenius-Sternbeck und Orzechowski 2004; Martignoni et al. 2006).

Zusätzlich zu den Initialgeschwindigkeiten wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit auch die kinetischen Parameter des TESTO-Metabolismus weiter untersucht. Der ermittelte K_m-Wert des TESTO-Abbaus liegt im Darm bei ca. 25 µM. In der Literatur existieren nur Vergleichswerte für den Darm des Menschen. Dieser ist mit ca. 55 µM ungefähr doppelt so hoch, wie der im Rahmen dieser Doktorarbeit ermittelte K_m-Wert (Galetin und Houston 2006). Wenn man den TESTO-Abbau auf seine unterschiedlichen metabolischen Abbauwege

herunter bricht, kann man zeigen, dass 17ß-HSD2 ($CL_{int\ E}$ = 2.3 µL/min/mg ES-Protein) > UGT > CYP2B1 ($CL_{int\ E}$ = 0.2 µL/min/mg ES-Protein) TESTO im Darm metabolisieren. Für die Entstehung von TESTO-GLUC aus TESTO sind in der Literatur K_m-Werte von ca. 9 µM im Darm und 22 µM in der Leber der Ratte bekannt, die ganz gut mit dem hier ermittelten Wert (K_m = 18 µM) übereinstimmen (Narayanan et al. 2000). Für die Bildung von Androstenedion aus TESTO wurde mit humanen 17ß-HSD2 Proteinen transfizierte Zellen ein K_m-Wert von 0.39 µM ermittelt, der weit entfernt von dem hier ermittelten Wert (K_m = 39 µM) liegt (Wu et al. 1993). Allerdings handelt es sich dabei um das humane Enzym und um transfizierte Zellen, die vielleicht nicht ganz die physiologischen Bedingungen widerspiegeln. Außerdem zeigte sich, das obwohl 17ß-HSD2 ein mikrosomales Protein darstellt, intestinale Mikrosomen nur sehr geringe 17ß-HSD2 CL_{int}-Werte aufweisen, die ca. 50-100fach unterhalb der Werte von metabolischen Ansätzen mit Enterozyten, „Everted Sacs“ und Organschnitten liegen (Sohlenius-Sternbeck und Orzechowski 2004; de Kanter et al. 2005; van de Kerkhof et al. 2005; Martignoni et al. 2006; van de Kerkhof et al. 2007). Daraus kann man schließen, dass entweder 17ß-HSD2 während der Mikrosomenpräparation durch Proteasen verdaut wird oder bestimmte Kofaktoren für dessen Aktivität in den Mikrosomen fehlen.

In den metabolischen Ansätzen mittels primärer Enterozyten wurde für TESTO eine $CL_{int\ E}$ von ca. 10 µL/min/mg E-Protein berechnet. Im metabolischen Assay mittels „Everted Sacs“ wurde TESTO mit einer zum Enterozyten-Modell etwas höheren $CL_{int\ E}$ von 32 µL/min/mg E-Protein eliminiert, daraus gibt sich eine $CL_{int\ ES}$ von 10 µL/min/mg ES-Protein, wo V_{max} und K_m als Berechnungsgrundlage dienen. Die $CL_{int\ ES}$ kann allerdings nicht nur über K_m und V_{max} bestimmt werden, sondern auch über ausgewählte Substratkonzentrationen und dem dazugehörigen Konzentration-/Zeit-Profils des Substratabbaus. Die Fläche unter dem Konzentrations-/Zeit-Profils (AUC) kann auch als Grundlage zur Berechnung der $CL_{int\ ES}$ herangezogen werden. Mittels dieser Vorgehensweise konnte für TESTO (25 µM) eine $CL_{int\ ES}$ von 10 µL/min/mg „ES-Protein“ errechnet werden, was genau dem Wert entspricht, der auch mittels K_m und V_{max} ermittelt wurde und somit die Anwendbarkeit der Berechnungsmethode untermauert.

Galetin et al errechnete für TESTO mittels humanen intestinalen Mikrosomen eine CL_{int} von 2.7 µL/min/mg Protein und liegt damit deutlich unter den, im Rahmen dieser Doktorarbeit, ermittelten Werten, was wiederum die Theorie unterstützt, das die Mikrosomen ungenügende Aktivitäten von 17ß-HSD2 enthalten und somit die CL_{int} unterschätzt wird (Galetin 2007).

Des Weiteren zeigte MDZ in den metabolischen Assays mittels primärer Enterozyten und „Everted Sacs" eine intrinsische Clearance ($CL_{int\ ES}$) von 2 µL/min/mg Protein. In der Literatur sind für den Abbau von MDZ CL_{int}-Werte von 10 µL/min/mg Protein (1OH-MDZ) und 3.4 µL/min/mg Protein (4OH-MDZ) von intestinalen Mikrosomen der Ratte publiziert worden. Diese Werte liegen, wenn man bedenkt, dass im Rahmen dieser Doktorarbeit die Werte auf Gesamtenterozytenprotein bzw. „Everted Sac" Protein bezogen wurden, ebenfalls in der gleichen Größenordnung (Komura und Iwaki 2007).

Ermittelung der „First pass" in vivo CLFP DR der Test-Substanzen

Mit Hilfe von Skalierungsfaktoren kann die $CL_{int\ ES}$ auf die $CL_{int\ DR}$ der Test-Substanzen in den einzelnen Darmregionen hochgerechnet werden (siehe Tabelle 3). Mittels der $CL_{int\ DR}$ wiederum kann mit Hilfe der „Q_{Gut} Methode" von Yang et al. die *„First pass" in vivo* Clearance ($CL_{FP\ DR}$) der Testsubstanzen in den einzelnen Darmregionen und der Anteil an Substanz, der unmetabolisiert die Darmwand überschreitet (F_G) , ermittelt werden (Yang et al. 2007). Daraus ergab sich, dass TESTO mit einer $CL_{FP\ DR}$ von 2 mL/min/kg Körpergewicht (KG) aus dem Darm eliminiert wird, was ungefähr einem F_G von 20 % einer oral verabreichten Dosis entspricht (siehe Tabelle 14). Dies bedeutet, dass nur 20 % der eingesetzten Konzentration die Pfortader erreichen würde. De Kanter et al. ermittelte in der Ratte für TESTO eine *in vivo* Clearance von ca. 20 mL/min/kg KG im Darm und ca. 40 mL/min/kg KG in der Leber, wobei er die jeweiligen Organschnitte verwendete (De Kanter et al. 2004). Allerdings errechnete er nicht die *„First pass" in vivo* Clearance des Darms, sondern die systemische Clearance mit dem „well stirred Model", das üblicherweise für die Leber verwendet wird. Auch BUPR zeigt eine vergleichbare $CL_{FP\ DR}$ zu TESTO, wobei dies zu einem F_G von ca. 38 % einer oral applizierten Dosis im mittleren Jejunum führt, wo es auch den größten intestinalen Metabolismus aufweist. Beide Substanzen werden im unteren Jejunum viel schwächer abgebaut, was dazu führt, das F_G auf 50 % bzw. 72 % ansteigt. Auf diese Weise wurden die Daten so noch nicht ermittelt, daher kann an dieser Stelle kein Vergleich mit Literaturdaten stattfinden.

Permeation der Test-Substanzen über die Darmwand

Mittels des metabolischen Assay des „Everted Sac" Modells kann auch das Permeationsverhalten der Test-Substanzen über die Darmwand hinweg ins Blutkompartiment (serosal) verfolgt werden. Interessanterweise konnte für TESTO und BUPR eine starke

Akkumulation im serosalen Kompartiment des unteren Jejunums im Vergleich zu den anderen Darmregionen verzeichnet werden, was gut mit den errechneten F_G-Werten des unteren Jejunums übereinstimmt. In Gegenwart des CYP P450 Inhibitors ABT steigt die Akkumulation von BUPR im serosalen Kompartiment deutlich gegenüber den nicht inhibierten Proben an, kann jedoch nicht den Level der Akkumulation des unteren Jejunums erreichen. Daraus kann man schließen, dass die Aktivität der CYP P450 Enzyme die Akkumulation von BUPR herabsetzt, dass es aber im unteren Jejunum auch noch andere Einflussfaktoren geben muss, die zum Anstieg der serosalen Substanzmenge von BUPR führt. In dem hier gewählten Versuchsansatz kann auch die Morphologie der Darmwand einen entscheidenden Einfluss auf die Akkumulation der Substanzen in den unterschiedlichen Darmregionen ausüben. Unter *in vivo* Bedingungen muss die Substanz nicht über die gesamte Darmwand, einschließlich Muskelschicht wandern, sondern nur durch die Mukosa und Teile der Submukosa (Aktories et al. 2005).

Die anderen Substanzen, DEX und MDZ zeigen entlang des gesamten Dünndarms vergleichbare F_G-Werte von ca. 60 %, was sich auch in der Akkumulation dieser Substanzen im serosalen Kompartiment widerspiegelt. Für MDZ wurde eine F_G-Wert von 57 % im oberen Jejunum berechnet, der auch schon von anderen Arbeitsgruppen gezeigt wurde (Olkkola et al. 1996; Paine et al. 1996; Tsunoda et al. 1999; Yang et al. 2007). Allerdings gibt es für MDZ sehr viele widersprüchliche F_G-Werte in der Literatur. So zeigte Higashikawa et al. mittels *in vivo* Versuch einen F_G von 96 % während Strelevitz et al im *in vitro* Versuch 3 % ermittelte (Higashikawa et al. 1999; Strelevitz et al. 2006). Allerdings muss man im Falle von *in vitro* Methoden einschränkend sagen, dass diese F_G-Werte auf experimentelle Bedingungen beruhen, die den Enzymen genügend Zeit liefern, die Substanzen zu metabolisieren. MDZ, wie die anderen hier verwendeten Substanzen, zeigen zudem hervorragende Permeabilitäten, wie man anhand der hier ermittelten P_{app}-Werte des Caco-2-Assays erkennen kann und unterliegen keinem bekannten Efflux-Transport im Darm. Aufgrund dessen können die hier errechneten F_G-Werte leicht überschätzt werden, weil die angewandte Methode nicht den physiologischen Bedingungen entspricht. Ein weiterer Einflussfaktor ist außerdem, dass für *in vitro* Methoden Modelle verwendet werden müssen zur Berechnung der $CL_{FP\,DR}$, die nicht alle physiologischen Bedingungen widerspiegeln können. So wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit das „Q_{Gut} Modell“ verwendet und die Bindungen der Substanzen an Proteine des Darminhalts erst einmal vernachlässigt. Eine hohe Bindung der Substanzen an Bestandteile des Darminhalts kann die Absorption einer Substanz jedoch erheblich beeinflussen, weil nur

der freie Anteil von den Enterozyten aufgenommen werden kann. Außerdem wurde die $CL_{FP\ Darm}$ des gesamten Darms berechnet, obwohl die hier verwendeten Substanzen durch ihre gute Permeabilität wahrscheinlich schon im Duodenum bzw. oberen Jejunum vollständig absorbiert werden und somit nicht bis ins untere Jejunum gelangen.

Neben den metabolischen Untersuchungen wird das „Everted Sac" Modell in der Literatur auch häufig für Absorptionsuntersuchungen bzw. für Transportercharakterisierungen des Darms verwendet. Deswegen wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit auch die Verteilung der Metabolite im inneren (serosalen) und äußeren (mukosale) Kompartiment untersucht. Die Akkumulation der Metabolite im serosalen bzw. mukosalen Kompartiment kann darüber Auskunft geben, ob diese in den Blutstrom gelangen oder mit dem Faeces ausgeschieden werden. Alle Metabolite zeigten dabei eine tendenziell höhere Anreicherung im mukosalen Kompartiment gegenüber dem serosalen Kompartiment. Daraus kann man schließen, dass die Metaboliten eher über den Faeces ausgeschiede, als in den zentralen Kreislauf aufgenommen werden. Das zeigt sich besonders deutlich im Falle von 3-MM, das im Vergleich zum serosalen Kompartiment 14fach stärker im mukosalen Kompartiment zu finden ist. Dies spiegelt sich nicht im Caco-2-Peremeationsexperiment wieder, wo nur ein Effluxverhältniss von 1.7 ermittelt wurde. Der Quotient ist dabei zu gering, so dass man einen Efflux-Transport für 3-MM in der apikalen Membran ausschließen kann. Jedoch hat nach unseren Kenntnissen noch keine Gruppe den Transport von 3-MM weiter untersucht. Arrelano et al. konnte im „Everted Sac" Experiment ebenfalls eine höhere Akkumulation von 3-MM im mukosalen Kompartiment beobachten (Arellano et al. 2007). Alle anderen Substrate und deren Metaboliten zeigen im Caco-2-Experiment eine sehr gute Permeation über die Darmzellen hinweg ohne Hinweise auf einen Efflux- oder Uptake-Transport.

Zusammenfassende Betrachtungen und Ausblick

Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnte gezeigt werden, das sowohl CYP P450 Enzyme, als auch andere Phase-I/-II-Enzyme im Darm der Ratte exprimiert werden. Außerdem wurde hier gezeigt, dass CYP2B1 und 3A eine kontinuierlich verminderte Expression entlang des Darms aufweisen, und dominant in den Enterozyten der Zottenspitze exprimiert werden, also genau dort wo die meisten Nähr- und Arzneistoffe absorbiert werden. Mengenmäßig stellen diese beiden Enzyme die dominanten CYP P450 Isoformen im Darm der Ratte dar. Dagegen spielen die Enzyme CYP2C6 und 2D1 im Darm eine eher untergeordnete Rolle, weil sie in viel zu geringeren Mengen exprimiert werden und im Rahmen dieser Doktorarbeit ihre

Aktivität nicht nachgewiesen werden konnte. Daraus ergab sich die Theorie, dass diese beiden Enzyme eher an endogenen Abbauprozessen beteiligt sind, als am Metabolismus von Arzneistoffen.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnte gezeigt werden, dass der proximale Darm im Vergleich zur Leber circa 15fach niedrigere und der distale Darm circa 100fach niedrigere CYP P450 Mengen enthält. Während im Darm CYP3A und 2B1 die dominierenden CYP P450 Enzyme darstellen, werden in der Leber alle untersuchten CYP P450 Enzyme in gleichen Mengen exprimiert.

Des Weiteren wurden zwei Modelle, primäre Enterozyten und „Everted Sacs“ angewandt, um den intestinalen Metabolismus zu charakterisieren. Beide Modelle lieferten vergleichbare Abbauraten der untersuchten Test-Substanzen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten somit CL_{int}-Werte für alle Test-Substanzen mit beiden Modellen erhoben werden, wobei TESTO den höchsten Abbau zeigt, der jedoch hauptsächlich über das Phase-I-Enzym 17ßHSD2 katalysiert wird. Die anderen Substanzen werden über CYP P450 Enzyme abgebaut, was auch in Versuchsansätzen mit dem CYP P450 Inhibitor ABT, bestätigt werden konnte. Des Weiteren konnte anhand der $CL_{int\ ES}$ der Test-Substanzen und unter Zuhilfenahme der in dieser Arbeit ermittelten Skalierungsfaktoren die $CL_{int\ DR}$ der Test-Substanzen errechnet werden. Aus diesen Ergebnissen konnten mittels dem „Q_{Gut} Modell“ die *„First pass“ in vivo* Clearances und die F_G-Werte für alle Test-Substanzen berechnet werden. Dabei zeigte sich, das TESTO (4.7 mL/min/kg KG) und BUPR (3.4 mL/min/kg KG) die größten $CL_{FP\ Darm}$-Werte aufweisen, was zu F_G-Werte von 22 % bzw. 38 % in proximalen Darmregionen führt. Im distalen Dünndarm sinkt für beide Substrate der Metabolismus stark ab, was eine Erhöhung der F_G-Werte zur Folge hat (TESTO: 52 %; BUPR: 73 %). Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnten somit $CL_{FP\ DR}$ und F_G-Daten erhoben werden, die vergleichbar mit Literaturdaten sind, die ebenfalls auf *in vitro* Daten beruhen. Die mittels *in vitro* Ansätzen erhobene $CL_{FP\ DR}$ und F_G-Daten können jedoch nicht die *in vivo* Daten vollständig ersetzten. Die hier vorgestellte Methode ist auch noch nicht ausgereift. Es bleibt offen, inwieweit es notwendig ist die Bindung der Substanzen an Proteinen des Darminhalts mittels neuer *in vitro* Methoden zu ermitteln und in die Rechnung zu integrieren.

Neben dem metabolischen Assay mittels „Everted Sac“ Modell würden sich auch Assays mittels primärer Enterozyten für Skalierungsberechnungen eigenen, jedoch bedarf dieses Modell noch Optimierungsarbeit, um die Ergebnisse reproduzierbarer zu generieren. Die schwankenden Abbauraten stehen im direkten Zusammenhang mit der schwankenden

Vitalität der isolierten Enterozyten. Der Einsatz vitaler Enterozyten könnte das „Everted Sac“ Modell durchaus ersetzen. Großer Vorteil der Verwendung von primären Enterozyten für die metabolischen Assays wäre die definierten Enterozytenzahl, die für die Skalierungsgenauigkeit eine bessere Größe darstellt, als die Proteinmenge.

.

5. Referenzen:

Aktories, K., U. Förstermann, et al. (2005). Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, Urban&Fischer München Jena.

Arellano, C., C. Philibert, et al. (2007). "The metabolism of midazolam and comparison with other CYP enzyme substrates during intestinal absorption: in vitro studies with rat everted gut sacs." J Pharm Pharm Sci **10**(1): 26-36.

Arlotto, M. P., J. M. Trant, et al. (1991). "Measurement of steroid hydroxylation reactions by high-performance liquid chromatography as indicator of P450 identity and function." Methods Enzymol **206**: 454-62.

Baker, M. E. (1998). "Evolution of mammalian 11beta- and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases-type 2 and retinol dehydrogenases from ancestors in Caenorhabditis elegans and evidence for horizontal transfer of a eukaryote dehydrogenase to E. coli." J Steroid Biochem Mol Biol **66**(5-6): 355-63.

Benet, L. Z., C. L. Cummins, et al. (2004). "Unmasking the dynamic interplay between efflux transporters and metabolic enzymes." Int J Pharm **277**(1-2): 3-9.

Bonkovsky, H. L., H. P. Hauri, et al. (1985). "Cytochrome P450 of small intestinal epithelial cells. Immunochemical characterization of the increase in cytochrome P450 caused by phenobarbital." Gastroenterology **88**(2): 458-67.

Bruyere, A., X. Decleves, et al. (2009). "Development of an optimized procedure for the preparation of rat intestinal microsomes: comparison of hepatic and intestinal microsomal cytochrome P450 enzyme activities in two rat strains." Xenobiotica **39**(1): 22-32.

Christians, U., V. Schmitz, et al. (2005). "Functional interactions between P-glycoprotein and CYP3A in drug metabolism." Expert Opin Drug Metab Toxicol **1**(4): 641-54.

Chung, L. W. and D. S. Coffey (1977). "Androgen glucuronides. I. Direct formation in rat accessory sex organs." Steroids **30**(2): 223-43.

Cummins, C. L., W. Jacobsen, et al. (2002). "Unmasking the dynamic interplay between intestinal P-glycoprotein and CYP3A4." J Pharmacol Exp Ther **300**(3): 1036-45.

da Fonseca, R. R., A. Antunes, et al. (2007). "Structural divergence and adaptive evolution in mammalian cytochromes P450 2C." Gene **387**(1-2): 58-66.

De Kanter, R., M. Monshouwer, et al. (2004). "Prediction of whole-body metabolic clearance of drugs through the combined use of slices from rat liver, lung, kidney, small intestine and colon." Xenobiotica **34**(3): 229-41.

de Kanter, R., A. Tuin, et al. (2005). "A new technique for preparing precision-cut slices from small intestine and colon for drug biotransformation studies." J Pharmacol Toxicol Methods **51**(1): 65-72.

de Waziers, I., P. H. Cugnenc, et al. (1990). "Cytochrome P 450 isoenzymes, epoxide hydrolase and glutathione transferases in rat and human hepatic and extrahepatic tissues." J Pharmacol Exp Ther **253**(1): 387-94.

Debri, K., A. R. Boobis, et al. (1995). "Distribution and induction of CYP3A1 and CYP3A2 in rat liver and extrahepatic tissues." Biochem Pharmacol **50**(12): 2047-56.

DeSesso, J. M. and C. F. Jacobson (2001). "Anatomical and physiological parameters affecting gastrointestinal absorption in humans and rats." Food Chem Toxicol **39**(3): 209-28.

Ding, X. and L. S. Kaminsky (2003). "Human extrahepatic cytochromes P450: function in xenobiotic metabolism and tissue-selective chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal tracts." Annu Rev Pharmacol Toxicol **43**: 149-73.

Dubey, R. K. and J. Singh (1988). "Localization and characterization of drug-metabolizing enzymes along the villus-crypt surface of the rat small intestine--I. Monooxygenases." Biochem Pharmacol **37**(2): 169-76.

Dubey, R. K. and J. Singh (1988). "Localization and characterization of drug-metabolizing enzymes along the villus-crypt surface of the rat small intestine--II. Conjugases." Biochem Pharmacol **37**(2): 177-84.

Ellis, S. W., K. Rowland, et al. (1996). "Influence of amino acid residue 374 of cytochrome P-450 2D6 (CYP2D6) on the regio- and enantio-selective metabolism of metoprolol." Biochem J **316 (Pt 2)**: 647-54.

Emoto, C., H. Yamazaki, et al. (2000). "Use of everted sacs of mouse small intestine as enzyme sources for the study of drug oxidation activities in vitro." Xenobiotica **30**(10): 971-82.

English, M. A., S. V. Hughes, et al. (2000). "Oestrogen inactivation in the colon: analysis of the expression and regulation of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase isozymes in normal colon and colonic cancer." Br J Cancer **83**(4): 550-8.

Fagerholm, U. (2007). "Prediction of human pharmacokinetics--gastrointestinal absorption." J Pharm Pharmacol **59**(7): 905-16.

Faucette, S. R., R. L. Hawke, et al. (2000). "Validation of bupropion hydroxylation as a selective marker of human cytochrome P450 2B6 catalytic activity." Drug Metab Dispos **28**(10): 1222-30.

Fisher, M. B., M. F. Paine, et al. (2001). "The role of hepatic and extrahepatic UDP-glucuronosyltransferases in human drug metabolism." Drug Metab Rev **33**(3-4): 273-97.

Frisch, S. M. and H. Francis (1994). "Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis." J Cell Biol **124**(4): 619-26.

Galetin, A. (2007). "Intestinal first-pass metabolism: bridging the gap between in vitro and in vivo." Curr Drug Metab **8**(7): 643-4.

Galetin, A. and J. B. Houston (2006). "Intestinal and hepatic metabolic activity of five cytochrome P450 enzymes: impact on prediction of first-pass metabolism." J Pharmacol Exp Ther **318**(3): 1220-9.

Gan, L. S., M. A. Moseley, et al. (1996). "CYP3A-like cytochrome P450-mediated metabolism and polarized efflux of cyclosporin A in Caco-2 cells." Drug Metab Dispos **24**(3): 344-9.

Grams, B., A. Harms, et al. (2000). "Distribution and inducibility by 3-methylcholanthrene of family 1 UDP-glucuronosyltransferases in the rat gastrointestinal tract." Arch Biochem Biophys **377**(2): 255-65.

Guengerich, F. P. (1997). "Comparisons of catalytic selectivity of cytochrome P450 subfamily enzymes from different species." Chem Biol Interact **106**(3): 161-82.

Guengerich, F. P. (2001). "Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity." Chem Res Toxicol **14**(6): 611-50.

Guengerich, F. P. (2004). "Cytochrome P450: what have we learned and what are the future issues?" Drug Metab Rev **36**(2): 159-97.

Hidalgo, I. J., T. J. Raub, et al. (1989). "Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability." Gastroenterology **96**(3): 736-49.

Higashikawa, F., T. Murakami, et al. (1999). "In-vivo and in-vitro metabolic clearance of midazolam, a cytochrome P450 3A substrate, by the liver under normal and increased enzyme activity in rats." J Pharm Pharmacol **51**(4): 405-10.

Higgins, C. F. (1992). "ABC transporters: from microorganisms to man." Annu Rev Cell Biol **8**: 67-113.

Hilgers, A. R., R. A. Conradi, et al. (1990). "Caco-2 cell monolayers as a model for drug transport across the intestinal mucosa." Pharm Res **7**(9): 902-10.

Hiroi, T., S. Imaoka, et al. (1998). "Tissue distributions of CYP2D1, 2D2, 2D3 and 2D4 mRNA in rats detected by RT-PCR." Biochim Biophys Acta **1380**(3): 305-12.

Isin, E. M. and F. P. Guengerich (2007). "Complex reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes." Biochim Biophys Acta **1770**(3): 314-29.

Iwao, T., K. Inoue, et al. (2002). "Metabolic extraction of nifedipine during absorption from the rat small intestine." Drug Metab Pharmacokinet **17**(6): 546-53.

Iwao, T., K. Inoue, et al. (2004). "Absorption and metabolic extraction of diltiazem from the perfused rat small intestine." Drug Metab Pharmacokinet **19**(6): 430-7.

Jan, Y. H., V. Mishin, et al. (2006). "Generation of specific antibodies and their use to characterize sex differences in four rat P450 3A enzymes following vehicle and pregnenolone 16alpha-carbonitrile treatment." Arch Biochem Biophys **446**(2): 101-10.

Johnson, T. N., M. S. Tanner, et al. (2000). "A comparison of the ontogeny of enterocytic and hepatic cytochromes P450 3A in the rat." Biochem Pharmacol **60**(11): 1601-10.

Kaminsky, L. S. and Q. Y. Zhang (2003). "The small intestine as a xenobiotic-metabolizing organ." Drug Metab Dispos **31**(12): 1520-5.

Kerry, N. L., A. A. Somogyi, et al. (1993). "Primary and secondary oxidative metabolism of dextromethorphan. In vitro studies with female Sprague-Dawley and Dark Agouti rat liver microsomes." Biochem Pharmacol **45**(4): 833-9.

Kight, C. E. and S. E. Fleming (1993). "Nutrient oxidation by rat intestinal epithelial cells is concentration dependent." J Nutr **123**(5): 876-82.

Kivisto, K. T., M. Niemi, et al. (2004). "Functional interaction of intestinal CYP3A4 and P-glycoprotein." Fundam Clin Pharmacol **18**(6): 621-6.

Klieber, S., S. Hugla, et al. (2008). "Contribution of the N-glucuronidation pathway to the overall in vitro metabolic clearance of midazolam in humans." Drug Metab Dispos **36**(5): 851-62.

Kliewer, S. A., J. T. Moore, et al. (1998). "An orphan nuclear receptor activated by pregnanes defines a novel steroid signaling pathway." Cell **92**(1): 73-82.

Kobayashi, K., K. Urashima, et al. (2002). "Substrate specificity for rat cytochrome P450 (CYP) isoforms: screening with cDNA-expressed systems of the rat." Biochem Pharmacol **63**(5): 889-96.

Kobayashi, T., H. Yokota, et al. (1998). "UDP-glucuronosyltransferase UGT1A7 induced in rat small intestinal mucosa by oral administration of 2-naphthoflavone." Eur J Biochem **258**(3): 948-55.

Komura, H. and M. Iwaki (2007). "Species differences in in vitro and in vivo small intestinal metabolism of CYP3A substrates." J Pharm Sci **97**(5): 1775-1800.

Komuro, T. and Y. Hashimoto (1990). "Three-dimensional structure of the rat intestinal wall (mucosa and submucosa)." Arch Histol Cytol **53**(1): 1-21.

Kot, M. and W. A. Daniel (2008). "Caffeine as a marker substrate for testing cytochrome P450 activity in human and rat." Pharmacol Rep **60**(6): 789-97.

Kreek, M. J., F. G. Guggenheim, et al. (1963). "Glucuronide Formation in the Transport of Testosterone and Androstenedione by Rat Intestine." Biochim Biophys Acta **74**: 418-27.

Lewis, D. F., E. Watson, et al. (1998). "Evolution of the cytochrome P450 superfamily: sequence alignments and pharmacogenetics." Mutat Res **410**(3): 245-70.

Lindell, M., M. Lang, et al. (2003). "Expression of genes encoding for drug metabolising cytochrome P450 enzymes and P-glycoprotein in the rat small intestine; comparison to the liver." Eur J Drug Metab Pharmacokinet **28**(1): 41-8.

Lipinski, C. A., F. Lombardo, et al. (2001). "Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings." Adv Drug Deliv Rev **46**(1-3): 3-26.

MacLean, C., U. Moenning, et al. (2008). "Closing the gaps: a full scan of the intestinal expression of p-glycoprotein, breast cancer resistance protein, and multidrug resistance-associated protein 2 in male and female rats." Drug Metab Dispos **36**(7): 1249-54.

Mahida, Y. R. (2004). "Microbial-gut interactions in health and disease. Epithelial cell responses." Best Pract Res Clin Gastroenterol **18**(2): 241-53.

Marez-Allorge, D., S. W. Ellis, et al. (1999). "A rare G2061 insertion affecting the open reading frame of CYP2D6 and responsible for the poor metabolizer phenotype." Pharmacogenetics **9**(3): 393-6.

Martignoni, M., G. Groothuis, et al. (2006). "Comparison of mouse and rat cytochrome P450-mediated metabolism in liver and intestine." Drug Metab Dispos **34**(6): 1047-54.

Matsubara, T., H. J. Kim, et al. (2004). "Isolation and characterization of a new major intestinal CYP3A form, CYP3A62, in the rat." J Pharmacol Exp Ther **309**(3): 1282-90.

Meredith, J. E., Jr., B. Fazeli, et al. (1993). "The extracellular matrix as a cell survival factor." Mol Biol Cell **4**(9): 953-61.

Miettinen, M. M., M. V. Mustonen, et al. (1996). "Human 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and type 2 isoenzymes have opposite activities in cultured cells and characteristic cell- and tissue-specific expression." Biochem J **314 (Pt 3)**: 839-45.

Mitschke, D., A. Reichel, et al. (2008). "Characterization of cytochrome P450 protein expression along the entire length of the intestine of male and female rats." Drug Metab Dispos **36**(6): 1039-45.

Mohri, K. and Y. Uesawa (2001). "Enzymatic activities in the microsomes prepared from rat small intestinal epithelial cells by differential procedures." Pharm Res **18**(8): 1232-6.

Mugford, C. A. and G. L. Kedderis (1998). "Sex-dependent metabolism of xenobiotics." Drug Metab Rev **30**(3): 441-98.

Mustonen, M. V., M. H. Poutanen, et al. (1998). "Mouse 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 mRNA is predominantly expressed in hepatocytes and in surface epithelial cells of the gastrointestinal and urinary tracts." J Mol Endocrinol **20**(1): 67-74.

Mutschler, E. and M. Schäfer-Korting (1997). Azneimittelwirkungen, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart.

Narayanan, R., B. LeDuc, et al. (2000). "Determination of the kinetics of rat UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) in liver and intestine using HPLC." J Pharm Biomed Anal **22**(3): 527-40.

Nedelcheva, V. and I. Gut (1994). "P450 in the rat and man: methods of investigation, substrate specificities and relevance to cancer." Xenobiotica **24**(12): 1151-75.

Neish, A. S. (2002). "The gut microflora and intestinal epithelial cells: a continuing dialogue." Microbes Infect **4**(3): 309-17.

Nelson, D. R., T. Kamataki, et al. (1993). "The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature." DNA Cell Biol **12**(1): 1-51.

Obach, R. S., Q. Y. Zhang, et al. (2001). "Metabolic characterization of the major human small intestinal cytochrome p450s." Drug Metab Dispos **29**(3): 347-52.

Oliver, R. E., A. F. Jones, et al. (1998). "What surface of the intestinal epithelium is effectively available to permeating drugs?" J Pharm Sci **87**(5): 634-9.

Olkkola, K. T., J. Ahonen, et al. (1996). "The effects of the systemic antimycotics, itraconazole and fluconazole, on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of intravenous and oral midazolam." Anesth Analg **82**(3): 511-6.

Paine, M. F., H. L. Hart, et al. (2006). "The human intestinal cytochrome P450 "pie"." Drug Metab Dispos **34**(5): 880-6.

Paine, M. F., D. D. Shen, et al. (1996). "First-pass metabolism of midazolam by the human intestine." Clin Pharmacol Ther **60**(1): 14-24.

Palm, K., K. Luthman, et al. (1999). "Effect of molecular charge on intestinal epithelial drug transport: pH-dependent transport of cationic drugs." J Pharmacol Exp Ther **291**(2): 435-43.

Palm, K., P. Stenberg, et al. (1997). "Polar molecular surface properties predict the intestinal absorption of drugs in humans." Pharm Res **14**(5): 568-71.

Pappenheimer, J. R. (1998). "Scaling of dimensions of small intestines in non-ruminant eutherian mammals and its significance for absorptive mechanisms." Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol **121**(1): 45-58.

Parrott, N. and T. Lave (2002). "Prediction of intestinal absorption: comparative assessment of GASTROPLUS and IDEA." Eur J Pharm Sci **17**(1-2): 51-61.

Peters, W. H., W. A. Allebes, et al. (1987). "Characterization and tissue specificity of a monoclonal antibody against human uridine 5'-diphosphate-glucuronosyltransferase." Gastroenterology **93**(1): 162-9.

Plauth, M., A. Raible, et al. (1991). "Effects of dexamethasone on glutamine metabolism in the isolated vascularly perfused rat small intestine." Res Exp Med (Berl) **191**(5): 349-57.

Rafii, F., L. D. Jackson, et al. (2007). "Metabolism of daidzein by fecal bacteria in rats." Comp Med **57**(3): 282-6.

Raju, U., R. J. Sklarew, et al. (1978). "Steroid metabolism in human breast cancer cell lines." Steroids **32**(5): 669-80.

Rich, K. J., D. Sesardic, et al. (1989). "Immunohistochemical localization of cytochrome P450b/e in hepatic and extrahepatic tissues of the rat." Biochem Pharmacol **38**(19): 3305-22.

Richert, L., G. Tuschl, et al. (2008). "Use of mRNA expression to detect the induction of drug metabolising enzymes in rat and human hepatocytes." Toxicol Appl Pharmacol.

Ritter, J. K. (2007). "Intestinal UGTs as potential modifiers of pharmacokinetics and biological responses to drugs and xenobiotics." Expert Opin Drug Metab Toxicol **3**(1): 93-107.

Rosenberg, D. W. (1991). "Tissue-specific induction of the carcinogen inducible cytochrome P450 isoform, P450IAI, in colonic epithelium." Arch Biochem Biophys **284**(1): 223-6.

Rozman, K. and O. Hänninen (1986). Gastrointestinal Toxicology, Elsevier, New York.

Ryu, K. H. and E. Grim (1982). "Unstirred water layer in canine jejunum." Am J Physiol **242**(4): G364-9.

Sano, T., G. Hirasawa, et al. (2001). "17 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase type 2 expression and enzyme activity in the human gastrointestinal tract." Clin Sci (Lond) **101**(5): 485-91.

Saravi, F. D., T. A. Saldena, et al. (1997). "Asymmetrical oxygen availability from serosal and luminal sides of rat distal colon epithelium." Rev Esp Fisiol **53**(4): 367-75.

Schanzer, W. (1996). "Metabolism of anabolic androgenic steroids." Clin Chem **42**(7): 1001-20.

Schinkel, A. H., J. J. Smit, et al. (1994). "Disruption of the mouse mdr1a P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs." Cell **77**(4): 491-502.

Schinkel, A. H., E. Wagenaar, et al. (1996). "P-glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs." J Clin Invest **97**(11): 2517-24.

Sharp, P. E. and M. C. LaRegina (1998). The Laboratory Rat Boca Raton, Florida US, CRC Press.

Simons, A. L., M. Renouf, et al. (2005). "Metabolism of glycitein (7,4'-dihydroxy-6-methoxy-isoflavone) by human gut microflora." J Agric Food Chem **53**(22): 8519-25.

Sohlenius-Sternbeck, A. K. and A. Orzechowski (2004). "Characterization of the rates of testosterone metabolism to various products and of glutathione transferase and sulfotransferase activities in rat intestine and comparison to the corresponding hepatic and renal drug-metabolizing enzymes." Chem Biol Interact **148**(1-2): 49-56.

Stott, W. T., H. L. Kan, et al. (2004). "Effect of strain and diet upon constitutive and chemically induced activities of several xenobiotic-metabolizing enzymes in rats." Regul Toxicol Pharmacol **39**(3): 325-33.

Strater, J., U. Wedding, et al. (1996). "Rapid onset of apoptosis in vitro follows disruption of beta 1-integrin/matrix interactions in human colonic crypt cells." Gastroenterology **110**(6): 1776-84.

Strelevitz, T. J., R. S. Foti, et al. (2006). "In vivo use of the P450 inactivator 1-aminobenzotriazole in the rat: varied dosing route to elucidate gut and liver contributions to first-pass and systemic clearance." J Pharm Sci **95**(6): 1334-41.

Strocchi, A. and M. D. Levitt (1993). "Role of villous surface area in absorption. Science versus religion." Dig Dis Sci **38**(3): 385-7.

Takahashi, K., H. Sasano, et al. (1998). "11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type II in human colon: a new marker of fetal development and differentiation in neoplasms." Anticancer Res **18**(5A): 3381-8.

Takara, K., N. Ohnishi, et al. (2003). "Expression profiles of drug-metabolizing enzyme CYP3A and drug efflux transporter multidrug resistance 1 subfamily mRNAS in small intestine." Drug Metab Dispos **31**(10): 1235-9.

Takemoto, K., H. Yamazaki, et al. (2003). "Catalytic activities of cytochrome P450 enzymes and UDP-glucuronosyltransferases involved in drug metabolism in rat everted sacs and intestinal microsomes." Xenobiotica **33**(1): 43-55.

Terao, T., E. Hisanaga, et al. (1996). "Active secretion of drugs from the small intestinal epithelium in rats by P-glycoprotein functioning as an absorption barrier." J Pharm Pharmacol **48**(10): 1083-9.

Tlaskalova-Hogenova, H., R. Stepankova, et al. (2004). "Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases." Immunol Lett **93**(2-3): 97-108.

Tsunoda, S. M., R. L. Velez, et al. (1999). "Differentiation of intestinal and hepatic cytochrome P450 3A activity with use of midazolam as an in vivo probe: effect of ketoconazole." Clin Pharmacol Ther **66**(5): 461-71.

van de Kerkhof, E. G., I. A. de Graaf, et al. (2005). "Characterization of rat small intestinal and colon precision-cut slices as an in vitro system for drug metabolism and induction studies." Drug Metab Dispos **33**(11): 1613-20.

van de Kerkhof, E. G., I. A. de Graaf, et al. (2007). "In vitro methods to study intestinal drug metabolism." Curr Drug Metab **8**(7): 658-75.

Van De Waterbeemd, H., B. Testa, et al. (2003). Drug Bioavailability, Wiley-VCH; Auflage.

van Heek, M., C. Farley, et al. (2000). "Comparison of the activity and disposition of the novel cholesterol absorption inhibitor, SCH58235, and its glucuronide, SCH60663." Br J Pharmacol **129**(8): 1748-54.

Witherow, L. E. and J. B. Houston (1999). "Sigmoidal kinetics of CYP3A substrates: an approach for scaling dextromethorphan metabolism in hepatic microsomes and isolated hepatocytes to predict in vivo clearance in rat." J Pharmacol Exp Ther **290**(1): 58-65.

Wu, C. Y., L. Z. Benet, et al. (1995). "Differentiation of absorption and first-pass gut and hepatic metabolism in humans: studies with cyclosporine." Clin Pharmacol Ther **58**(5): 492-7.

Wu, L., M. Einstein, et al. (1993). "Expression cloning and characterization of human 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2, a microsomal enzyme possessing 20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase activity." J Biol Chem **268**(17): 12964-9.

Yan, Z. and G. W. Caldwell (2001). "Metabolism profiling, and cytochrome P450 inhibition & induction in drug discovery." Curr Top Med Chem **1**(5): 403-25.

Yang, J., M. Jamei, et al. (2007). "Prediction of intestinal first-pass drug metabolism." Curr Drug Metab **8**(7): 676-84.

Zeldin, D. C., J. Foley, et al. (1997). "CYP2J subfamily cytochrome P450s in the gastrointestinal tract: expression, localization, and potential functional significance." Mol Pharmacol **51**(6): 931-43.

Zhang, Q. Y., J. Wikoff, et al. (1996). "Characterization of rat small intestinal cytochrome P450 composition and inducibility." Drug Metab Dispos **24**(3): 322-8.

Zhu, B., D. Bush, et al. (2008). "Characterization of 1'-hydroxymidazolam glucuronidation in human liver microsomes." Drug Metab Dispos **36**(2): 331-8.

Zoubi, S. A., T. M. Mayhew, et al. (1994). "Crypt and villous epithelial cells in adult rat small intestine: numerical and volumetric variation along longitudinal and vertical axes." Epithelial Cell Biol **3**(3): 112-8.

Zysset, T., T. Zeugin, et al. (1988). "In-vivo and in-vitro dextromethorphan metabolism in SD and DA rat. An animal model of the debrisoquine-type polymorphic oxidation in man." Biochem Pharmacol **37**(16): 3155-60.

6. Anhang:

Anhang 1: Verwendete Western Blot Antikörper und deren verwendete Verdünnungen.

Primär-Antikörper	Erkennung	Verdünnung	Sekundär-Antikörper	Verdünnung
Anti CYP3A (P6)	Monoclonal	1:2000	Anti Mouse IgG	1:10000
Anti CYP2B1/2		1:3000		
Anti CYP2C6		1:4000		
Anti CYP1A1		1:4000		
Anti CYP2C11		1:4000		
Anti PCNA		1:1000		
Anti UGT	Polyclonal	1:500	Anti Sheep IgG	1:20000
Anti Villin (C19)		1:5000	Anti Goat IgG	1:10000
Anti CYP2D1		1:1000	Anti Rabbit IgG	1:20000
Anti 17ß-HSD2 (M-174)		1:500		

Anhang 2: Verwendung von Vorbehandlungen und Kits für die Immunhistochemie und Verdünnung der verwendeten Antikörper und Konjugate.

Antikörper	Vor-behandlung	Kits	Verdünnung		
			Primär-AK	Sekundär-AK	Strept-HRPO-Konjugat
Anti-Ki67	Dampfgaren 20 min Zitratpuffer (pH6)	NovaDetect HRPO/DAB Standard StreptAB; Dianova 1:20	1:200	1:20	1:20
Anti-CYP3A			1:200		
Anti-Villin	-	Santa Cruz	1:120		

Anhang 3: Extraktionsraten von Testosteron und dessen Metabolite in Ethylacetat.

Substanz	Konz. [µM]	Peakfläche [mAU*min] ohne Extraktion	mit Extraktion	Widerfindung [%]
Testosteron	**25**	15.75	14.80	**99 ± 11**
	12.5	6.79	7.11	
	6.25	3.50	3.47	
	3.13	1.87	1.70	
	1.56	0.74	0.85	
	0.78	0.39	0.42	
	0.39	0.22	0.19	
Androstenedion	**10**	9.88	9.23	**90 ± 13**
	5	4.28	4.68	
	2.5	2.22	2.13	
	1.25	1.14	1.01	
	0.63	0.64	0.52	
	0.31	0.36	0.25	
	0.16	0.15	0.14	
TESTO-GLUC	**10**	4.89	4.27	**93 ± 11**
	5	2.10	1.92	
	2.5	0.91	1.00	
	1.25	0.52	0.43	
	0.63	0.26	0.21	
	0.31	0.12	0.11	
	0.16	0.05	0.05	
16ßOH-TESTO	**10**	9.74	10.00	**104 ± 7**
	5	4.35	5.07	
	2.5	2.23	2.43	
	1.25	1.11	1.19	
	0.63	0.59	0.57	
	0.31	0.28	0.28	
	0.16	0.14	0.13	
6ßOH-TESTO	**10**	5.33	5.33	**81 ± 9**
	5	3.44	2.49	
	2.5	1.62	1.26	
	1.25	0.78	0.60	
	0.63	0.38	0.30	
	0.31	0.18	0.14	
	0.16	0.06	0.05	

Anhang 4: Berechnung des Anteils der Enterozyten an den „Everted Sac" Proben.
Dazu wurden „Everted Sac" des mittleren Jejunums isoliert und entweder das gesamte „Everted Sac" in NaOH oder nur die abgeschabten Enterozyten in NaOH verdaut und die Proteinmenge bestimmt. Diese wurden mit dem Gesamtgewicht der „Everted Sac" ins Verhältnis gesetzt und daraus kann man erkennen, dass die Enterozyten ca. ein Drittel am Gesamtprotein der „Everted Sac" ausmachen.

Zellisolation	$m_{\text{„Everted Sac"}}$ [mg]	Proteinmenge [mg]	$M_{\text{„Everted Sacs"}}$/ Proteinmenge
Gesamt-„Everted Sac"	450	23.0	19.5
	510	24.7	20.7
	540	24.3	22.2
	560	26.5	21.2
	460	20.8	22.1
	450	20.9	21.5
	520	25.3	20.6
	480	23.4	20.5
	560	24.4	22.0
	540	26.2	20.6
Abgeschabte Enterozyten	520	8.7	59.8
	520	9.0	57.6
	450	6.8	66.2
	550	8.1	67.9
	430	5.2	82.7

Anhang 5: Permeationswerte (P_{eff} und P_{app}) der eingesetzten Test-Substanzen

Substanz	$P_{app\ Mensch}$ x 10^{-5}[cm/s]	$P_{eff\ Mensch}$ x 10^{-4} [cm/s]	$P_{eff\ Ratte}$ x 10^{-4} [cm/s]
Testosteron	4.94[1]	4.1	1.3
Midazolam	3.07	3.3	1.0
Dextromethorphan	2.63	3.1	0.9
Bupropion	5.68[1]	4.3	1.4

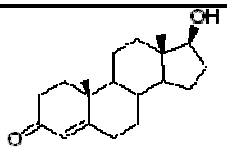
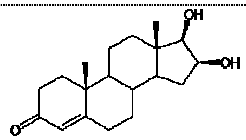
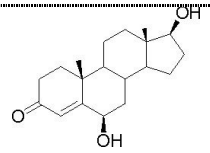
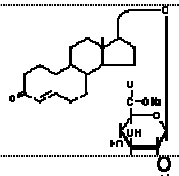
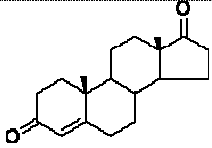
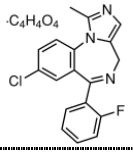
[1]) nicht selber bestimmt, sonder aus der Literatur entnommen (Arellano et al. 2007); P_{app}: apparente Permeation ermittelt aus Caco-2 Versuchen; P_{eff}: effektive Permeation

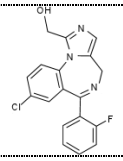
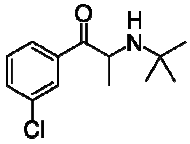
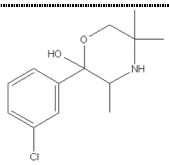
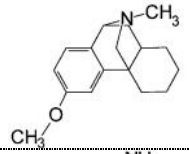
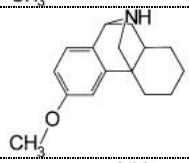
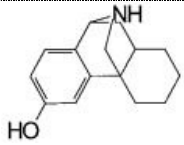
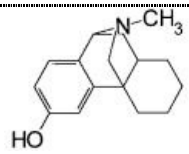
Anhang 6: Eigenschaften der MS/MS Detektion für die verschiedenen Analyten

Substanz	Retentions-zeit [min]	MS Detektion	Q1 Masse [Da]	Kollisions-energie [eV]	Q3 Masse [Da]
BUPR	3.03	positiv	241	19	185
DEX	3.21	positiv	272	33	215
MDZ	3.23	positiv	326	39	291
1OH-BUPR	2.81	positiv	256	17	238
3-MM	3.18	positiv	258	31	215
3-HM	2.67	positiv	244	49	157
1OH-MDZ	3.29	positiv	342	31	324
interner Standard	3.70	positiv	340	25	211

BUPR: Bupropion; DEX: Dextromethorphan; MDZ: Midazolam; 1OH-BUPR: 1-Hydroxy-Bupropion; 3-MM: 3-Methoxy-Morphinan; 3-HM: 3-Hydroxy-Morphinan; 1OH-MDZ; 1-Hydroxy-Midazolam

Anhang 7: Strukturformeln und Molekulare Gewichte aller Test-Substanzen und ihrer Metabolite
Die Test-Substanzen sind dick hervorgehoben und darunter befinden sich die jeweiligen Metabolite.

Substanz	Strukturformel	Molekulares Gewicht *[g/mol]*
Testosteron		288.4
16ßOH-Testosteron		304.4
6ßOH-Testosteron		304.4
Testosteron-Glucuronid-Na		486.5
Androstenedion		286.1
Midazolam-Maleat		441.8

1OH-Midazolam		341.8
Bupropion-Hydrochlorid		276.2
1OH-Bupropion		255.7
Dextromethorphan-Hydrobromide		352.3
3-Methoxymorphinan-Hydrochlorid		293.8
3-Hydroxymorphinan-Hydrobromid		324.4
Dextrorphan		257.4