

***In vitro* Zellkulturmodelle der Blut-Hirn-Schranke
zur Untersuchung der Permeation und
P-Glycoprotein-Interaktion von Arzneistoffen**

INAUGURAL – DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von
Apotheker Björn Bauer
aus Eberbach am Neckar

2002

INAUGURAL – DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht-Karls-Universität

Heidelberg

vorgelegt von

Apotheker Björn Bauer

aus Eberbach am Neckar

Tag der mündlichen Prüfung: 30.04.2002

***In vitro* Zellkulturmodelle der Blut-Hirn-Schranke
zur Untersuchung der Permeation und
P-Glycoprotein-Interaktion von Arzneistoffen**

Gutachter: Prof. Dr. Gert Fricker
Prof. Dr. Helga Möller

Meiner Familie und Anika gewidmet

*Wenn du willst, dass Menschen ein Schiff bauen,
gib ihnen nicht einen Plan oder Hammer und Nägel,
sondern entzünde in ihnen die Sehnsucht nach dem
weiten offenen Meer.*

Antoine de Saint-Exupéry

Die vorliegende Arbeit wurde am
Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie
der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
angefertigt

Herrn **Prof. Dr. Fricker** danke ich für die Überlassung des vielschichtigen und faszinierenden Themas, den nötigen Freiraum bei ausreichender Betreuung, für seine stete Ansprechbarkeit in allen Phasen der Doktorandenzeit und seinen persönlichen Einsatz, der zum Gelingen dieser Arbeit entscheidend beigetragen hat. Darüber hinaus für die Möglichkeit der wissenschaftlichen Weiterbildung bei Vorträgen und Kongressen und die einmalige Gelegenheit eines Forschungsaufenthaltes am Mount Desert Island Biological Laboratory in Maine, USA.

Frau **Prof. Dr. Möller** danke ich für das Anfertigen des zweiten Gutachtens.

Herrn **Dr. Martin Bultmann** möchte ich ganz besonders danken für seine nicht endende Geduld bei allen nur erdenklichen Fragen und Problemen, insbesondere statistischer und computertechnischer Art. Außerdem für seine offene, ehrliche und konstruktive Kritik, auch über den wissenschaftlichen Bereich hinaus.

Frau **Dr. Dillmann-Marschner** danke ich für die herzliche Aufnahme und familiäre Atmosphäre am Institut, sowie für ihre guten Ratschläge zu allen Fragen und Problemen.

Weiterhin gilt mein Dank...

- Herrn **Prof. Dr. Galla** und Frau **Sabine Hüwel** für eine hervorragende und unproblematische Zusammenarbeit.
- Herrn **Prof. Dr. Kurz** für den entscheidenden Tip bei der Auswertung der Kinetik-Daten.
- Herrn **Dr. Bernd Sorg** für seine Freundschaft, für interessante wissenschaftliche Diskussionen und das gemeinsame „Bridge-Spiel“...
- Herrn **Dr. Marc Thöle** für die geduldige Einarbeitung in die Isolierung und Kultivierung der Zellen und seine Hilfe bei Computerproblemen.
- Herrn **Dr. David Miller** für einen unvergesslichen Forschungsaufenthalt am MDIBL.
- Herrn **Dr. Delzer** und Herrn **Dr. Markert** für die gute Zusammenarbeit.
- Frau **Ana Ballester**, Frau **Jade Yong** und Herrn **Michael Cornelius** für die gemeinsamen Stunden im Labor mit viel Frust und viel Spaß und für die guten Ergebnisse.
- Frau **Yvonne Hippe** und Frau **Tina Scheuermann** für die Hilfe bei der Zellisolierung.
- den ehemaligen Kollegen „Sir“ **Dr. Tilman Rock**, **Dr. Robert Eicher** und **Dr. Martin Mauden** für eine gute Zeit am Institut und eine Freundschaft darüber hinaus.
- **Anne**, **Annette**, **Elke**, **Julia**, **Jörg**, **Markus**, **Mattias**, **Melanie**, **Steffi**, **Thilo** und **Vito** für viel Spaß am Institut und lustige Abende, darüber hinaus Vito für die gute Laboratmosphäre „unter Männern“.
- einigen **ehemaligen Kollegen**.
- Frau **Annette Bartmann** für die gute Organisation des Blut-Hirn-Schranke Expertentreffens und ein hervorragendes Übersichtsdiagramm zur „BBB *in vitro*“.
- **Frau Hoffmann**, **Frau Szeles**, **Herrn Bernickel** und **Herrn Höfer**.
- all jenen, die ich in der Danksagung vergessen habe.
- **meinen Eltern** für die finanzielle Unterstützung, ohne die mein Studium und somit diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.
- **Anika** - nur sie alleine weiß, wofür...

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht oder vorgetragen:

Bauer, B.; Fricker, G.

Standardization of an in vitro transport model of the blood-brain barrier

DPhG-Jahrestagung, Münster, 2000

Archiv der Pharmazie, Pharmaceutical and Medicinal Chemistry 333, Suppl. 2, 2000

Bauer, B.; Yong, J.; Fricker, G.

Application of an in vitro blood-brain barrier model as a compound profiling system for drug interactions with p-glycoprotein, DPhG-Doktorandentagung, Frankfurt, 2001

Archiv der Pharmazie, Pharmaceutical and Medicinal Chemistry 333, Suppl. 1, 2001

Bauer, B.; Miller, D.S.; Fricker, G.

Transport of paclitaxel in isolated functionally intact brain microvessels and cultured brain capillary endothelial cells, Pharmakologietagung, Mainz, 2001

Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology 363, Suppl., R8 (2001)

Bauer, B.; Yong, J.; Miller, D.S.; Cornelius, M.; Fricker, G.

Compound profiling in a MDR-model of the blood-brain barrier

IVth International Conference of Cerebral Vascular Biology, Cambridge, 2001

Bauer, B.; Droulle, L.; Grohoski, N.; Fricker, S.; Fricker, G.; Miller, D.S.

Isolated fish brain capillaries: a comparative model to study blood-brain barrier function and its regulation, MDIBL/NIEHS Center Symposium „Intracellular sensors of environmental chemicals“

Mount Desert Island Biological Laboratory, Maine, USA, 2001

Bauer, B.; Miller, D.S.; Fricker, G.

Transport of paclitaxel in isolated brain capillaries and cultured brain capillary endothelial cells, AAPS

PharmSci, Vol 3, No. 3, Annual Meeting, Denver, 2001

Bauer, B.; Fricker, G.

Compound profiling in an in vitro-model of the blood-brain barrier

AAPS PharmSci, Vol. 3, No. 3, Annual Meeting, Denver, 2001

Bauer, B.; Fricker, G.; Miller, D.S.

Regulation of xenobiotic transport in killifish brain capillaries

The Bulletin, 41, 2002, Mount Desert Island Biological Laboratory, Maine, USA

Cornelius, M.; Bauer, B.; Fricker, G.

Interactions of Hypericum perforatum L. compounds with p-glycoprotein in an in vitro model of the blood-brain barrier, DPhG-Doktorandentagung, Frankfurt, 2001

Archiv der Pharmazie, Pharmaceutical and Medicinal Chemistry 333, Suppl. 1, 2001

Fricker G., Bauer B., Török M., Gutmann H., Drewe J., Miller D.S.

Drug transport across isolated brain microvessels, 3rd FEBS Advanced Lecture Course

"ATP-Binding Cassette (ABC) Proteins: From Multidrug Resistance to Genetic Disease", Gosau 2001

Hutzler, C., Kracht, J., Mayer, M., Graichen, F., Bauer, B., Schreiber, E., Bollwein, S., Bernhardt, G.,

Dove, S., Fricker, G., Buschauer, A., *N^o-acylated argininamides: highly potent selective NPY Y1 receptor antagonists with special properties*, DPhG-Jahrestagung, Halle, 2001

Fellner, S.; Bauer, B.; Miller, D.S.; Schaffrik, M.; Spruß, M.; Bernhardt, G.; Färber, L.; Gschaidmeier, H.; Buschauer, A.; Fricker, G.

Transport of Paclitaxel (Taxol) across the blood-brain barrier

submitted an Journal of Clinical Investigation

Bauer, B.

Arzneistoff-Interaktionen mit P-Glycoprotein – Compound Profiling in einem Modell der Blut-Hirn-Schranke, 3. Blut-Hirn-Schranke Expertentreffen, Bad Herrenalb, 2001

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Die Blut-Hirn-Schranke	2
1.1.1	Von der Entdeckung der Blut-Hirn-Schranke bis heute	2
1.1.2	Anatomie, Biologie und Physiologie der Blut-Hirn-Schranke	4
1.1.3	Arzneistoff-Transport durch die Blut-Hirn-Schranke	17
1.1.4	<i>In vitro</i> Modelle der Blut-Hirn-Schranke	18
1.2	P-Glycoprotein	25
1.2.1	Die Entdeckung von P-Glycoprotein	25
1.2.2	Vorkommen und Funktion von P-Glycoprotein	26
1.2.3	Molekularbiologie, Proteinstruktur, Funktionsmechanismus und Substraterkennung von P-Glycoprotein	31
1.2.4	Modelle zur Untersuchung von P-Glycoprotein	39
2	PROBLEMSTELLUNG UND ZIELSETZUNG	41
3	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	43
3.1	Isolierung, Kultivierung und Charakterisierung von PBCEC	44
3.1.1	Isolierung von PBCEC	44
3.1.2	Kultivierung von PBCEC	50
3.1.3	Charakterisierung kultivierter PBCEC	59
3.1.4	Zusammenfassung	81
3.2	Charakterisierung des <i>in vitro</i> Permeationsmodells der Blut-Hirn-Schranke	82
3.2.1	Permeationsversuche mit Parazellulär-Markern	83
3.2.2	Permeationsversuche mit Modell-Substanzen	107
3.2.3	Zusammenfassung	122
3.3	Untersuchungen mit dem Calcein-AM-Assay	124
3.3.1	Untersuchungen mit dem Calcein-AM-MDR-Assay	130
3.3.2	Untersuchungen mit dem Calcein-AM-Kinetik-Assay	160
3.3.3	Zusammenfassung	167
4	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	169

5	MATERIALIEN UND METHODEN	172
5.1	Substanzen	172
5.2	Verbrauchsmaterialien	179
5.3	Geräte, Geräteeinstellungen, Software	179
5.4	Zellkultur	183
5.4.1	Vorarbeiten für die Zellkultur	183
5.4.2	Isolierung von PBCEC	184
5.4.3	Kultivierung von PBCEC	188
5.4.4	Charakterisierung von PBCEC	193
5.5	Charakterisierung des <i>in vitro</i> Permeationsmodells der Blut-Hirn-Schranke	198
5.5.1	Durchführung von Permeationsversuchen	198
5.5.2	Berechnung des apparenten Permeationskoeffizienten P_{app}	204
5.5.3	Bestimmung des Verteilungskoeffizienten $P_{Oktanol/Puffer}$	207
5.6	Calcein-AM-Assay	209
5.6.1	Calcein-AM-MDR-Assay	209
5.6.2	Berechnung des konzentrationsabhängigen Effekts einer im Calcein-AM-MDR-Assay untersuchten Testsubstanz	210
5.6.3	Berechnung der EC_{50} einer im Calcein-AM-MDR-Assay untersuchten Testsubstanz nach dem E_{max} -Modell	211
5.6.4	Calcein-AM-Kinetik-Assay	212
5.6.5	Berechnung der Inhibitionskonstante K_i	213
5.7	Fehlerbetrachtung, Statistik	217
6	ANHANG	218
7	LITERATURVERZEICHNIS	231

Abkürzungsverzeichnis

ρ	gr. rho, Symbol für die Dichte
λ_{Em}	Emissionswellenlänge
λ_{Ex}	Excitationswellenlänge
2,4-DNP	2,4-Dinitrophenol
ABC	ATP-binding-cassette
ACM	astrocyte-conditioned medium
Ak	Antikörper
BSA	Bovines Serum Albumin
BSE	bovine spongiforme Encephalopathie
CF	Carboxyfluorescein
DMEM	Dulbecco's minimal essential medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DANN	Desoxy-Ribonukleinsäure
dpm	decays per minute
EG-GMP	EG-Regeln - „Good Manufacturing Practices“
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
GBq	Giga-Bequerel
GFAP	glial fibrillary acidic protein
h	Stunde
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HTS	high throughput screening
Ig	Immunglobulin
KG	Körpergewicht
LTC4	Leukotrien C4
MG	Molekulargewicht
min	Minute
Mio.	Million
Mrp	multidrug resistance associated protein
N	normal (Konzentrationsangabe)
P_{app}	apparenter Permeationskoeffizient
PBCEC	porcine brain capillary endothelial cell
PBS	phosphate buffered salines
P_{eff}	effektiver Permeationskoeffizient
PenStrep	Penicillin/Streptomycin
P_{Fil}	Filter-Permeationskoeffizient
P-gp	permeability-glycoprotein
PS	Pferdeserum
QSAR	quantitative structure-activity relationship
r.F.	relative Feuchte
S.D.	standard deviation (Standardabweichung)
SpM	Schüttelbewegungen pro Minute
TBq	Tera-Bequerel
TPGS	Tocopheryl-Polyethylenglycol-Succinat
TR ⁻	transporter-deficient-mutant-rat-strain
UpM	Umdrehungen pro Minute
vWF	von Willebrand Faktor
ZNS	Zentralnervensystem

1 Einleitung

Das Gehirn ist die zentrale Schaltstelle des Organismus. Als Bestandteil des Zentralnervensystems (ZNS) werden hier alle Sinnesreize aufgenommen, verarbeitet und weitergeleitet sowie sämtliche Funktionen des Körpers koordiniert und gesteuert. Erkrankungen des ZNS, wie die Alzheimer Krankheit, das Parkinson-Syndrom, HIV-Enzephalitis, Gehirntumoren und viele mehr, stellen deshalb einen gravierenden Einschnitt in die Funktionsfähigkeit des gesamten Organismus dar. Für eine Therapie von ZNS-Erkrankungen sind Arzneistoffe erforderlich, die in das Gehirngewebe gelangen müssen, um wirken zu können. In vielen Fällen steht dem jedoch die Blut-Hirn-Schranke entgegen, die aufgrund ihrer ausgeprägten Barriere- und Schutzfunktion einerseits das ZNS vor irreversiblen Schädigungen durch Xenobiotika schützt, andererseits aber auch die Hirngängigkeit zahlreicher hochwirksamer ZNS-Therapeutika deutlich einschränkt.

Einen wesentlichen Anteil an der Blut-Hirn-Schranke hat das Transportprotein P-Glycoprotein, das lipophile Substanzen im cerebralen Kapillarendothel abfängt und durch auswärtsgerichteten aktiven Transport zurück in das Gefäßlumen pumpt. Daneben hat P-Glycoprotein weitere pharmakokinetische Auswirkungen, wie die Verringerung der intestinalen Absorption sowie die Erhöhung der biliären und renalen Elimination von Arzneistoffen. Außerdem ruft P-Glycoprotein bei vielen Krebserkrankungen das als *multidrug resistance* bekannte Phänomen von Cytostatika-Kreuzresistenzen hervor, was eine wirksame Chemotherapie verhindert.

Um sowohl neu entwickelte Arzneistoffe als auch neuartige *drug targeting*- und *drug delivery*-Strategien zur Therapie von ZNS-Erkrankungen zu testen sowie die Mechanismen des Arzneistofftransports durch die Blut-Hirn-Schranke als auch die Eigenschaften von P-Glycoprotein aufzuklären, werden in der Grundlagenforschung und der pharmazeutischen Industrie *in vitro* Zellkulturmodelle der Blut-Hirn-Schranke benötigt, mit denen die Permeation und P-Glycoprotein-Interaktion von Arzneistoffen untersucht werden können.

1.1 Die Blut-Hirn-Schranke

1.1.1 Von der Entdeckung der Blut-Hirn-Schranke bis heute

Der heutige Wissensstand über die Blut-Hirn-Schranke ist das Ergebnis jahrzehntelanger Forschungsarbeiten, die bis in das 19. Jahrhundert zurückreichen.

Der Mediziner Paul Ehrlich gilt als der Entdecker der Blut-Hirn-Schranke. Im Jahr 1885 beobachtete er, dass bei Versuchstieren durch intravenös verabreichte Farbstofflösungen alle Organe, nicht jedoch das Gehirn, angefärbt wurden [Ehrlich, 1885]. Edwin Goldmann, ein Schüler Ehrlichs, wiederholte die Versuche 1909 und stellte nach i.v. Injektion von Farbstoffen eine deutliche Färbung des Plexus choroideus im Gegensatz zum umgebenden Gehirngewebe der Versuchstiere fest [Goldmann, 1909]. Damit bestätigte er Jahre zuvor gemachte Beobachtungen von Ehrlich und anderen Wissenschaftlern [Loewit, 1881; Biedl und Kraus, 1898; Roux und Borrel, 1898; Lewandowsky, 1900]. 1913 führte er weitere Experimente durch. Nach intravenöser Verabreichung hochkonzentrierter Farbstofflösungen war das Gehirn bis auf die Epithelzellen des Plexus choroideus nie, das restliche Körpergewebe jedoch immer intensiv gefärbt. Nach subarachnoidaler Injektion ergab sich der umgekehrte Fall. Goldmann folgerte, das Plexusepithel müsse die Barriere sein, die den Übertritt der Farbstoffe in das Gehirn verhindere [Goldmann, 1913].

Die Physiologin Lina Stern konnte 1921 in Tierexperimenten beobachten, dass nach i.v. Injektion einige der Untersuchungssubstanzen im Gehirn und der Cerebrospinalflüssigkeit wiederzufinden waren, andere dagegen nicht und bezeichnete dieses Phänomen mit dem Begriff „barrière hématoencéphalique“ [Stern, 1921]. 1923 stellte Spatz die Behauptung auf, die Blut-Hirn-Schranke sei in dem Endothel der Gehirnkapillaren lokalisiert und löste damit eine langjährige Diskussion aus. Wenige Jahre später forderten Spatz und andere Wissenschaftler eine deutliche Definition und strikte Trennung der Begriffe „Blut-Hirn-Schranke“ und „Blut-Liquor-Schranke“ [Behn- sen, 1926; Spatz, 1933; Walter, 1929; Walter, 1933]. Die erste wissenschaftliche Abhandlung mit dem damals provokanten Titel „Die Bluthirnschranke“ wurde 1929 von Förtig veröffentlicht [Förtig, 1929]. 1946 schaltete sich August Krogh in die Diskussion um die Frage ein, wie die Nährstoffversorgung des Gehirns erfolgen solle, wenn die Blut-Hirn-Schranke eine impermeable Barriere sei und vermutete eine Beteiligung aktiver Transportprozesse [Krogh, 1946]. Dennoch galt bis Mitte der 50er Jahre die vorherrschende Meinung, dass die Schrankenfunktion nicht von Kapillarendothelzel-

len, sondern nur von den, die cerebralen Kapillaren umgebenden Gliazellen ausgeübt werden könne [Dempsey und Wislocki, 1955; Maynard et al., 1957]. Mitte der 1960er Jahre führte Crone physiologische Versuche durch, die auf eine Beteiligung cerebraler Kapillaren an der Barrierefunktion hindeuteten [Crone, 1963; Crone, 1965]. Die Lokalisation der Blut-Hirn-Schranke im cerebralen Kapillarendothel wurde 1967 schließlich von Reese und Karnovsky per Elektronenmikroskopie von Hirnschnitten nachgewiesen [Reese und Karnovsky, 1967]. Endgültige Sicherheit brachten weitere 1969 durchgeführte elektronenmikroskopische Aufnahmen [Brightman und Reese, 1969]. Damit konnte die Barrierefunktion der Blut-Hirn-Schranke ohne jeden Zweifel den Kapillarendothelzellen der cerebralen Blutgefäße zugeordnet werden. Seitdem ist die Blut-Hirn-Schranke Objekt zahlreicher Forschungsarbeiten, bei denen in den letzten 50 Jahren verschiedene *in vivo*- und *in vitro*-Methoden von der Vitalfärbung bis zu heutigen molekularbiologischen Methoden entwickelt wurden. Abbildung 1.1 zeigt die Entwicklung der Blut-Hirn-Schranke-Methodologie.

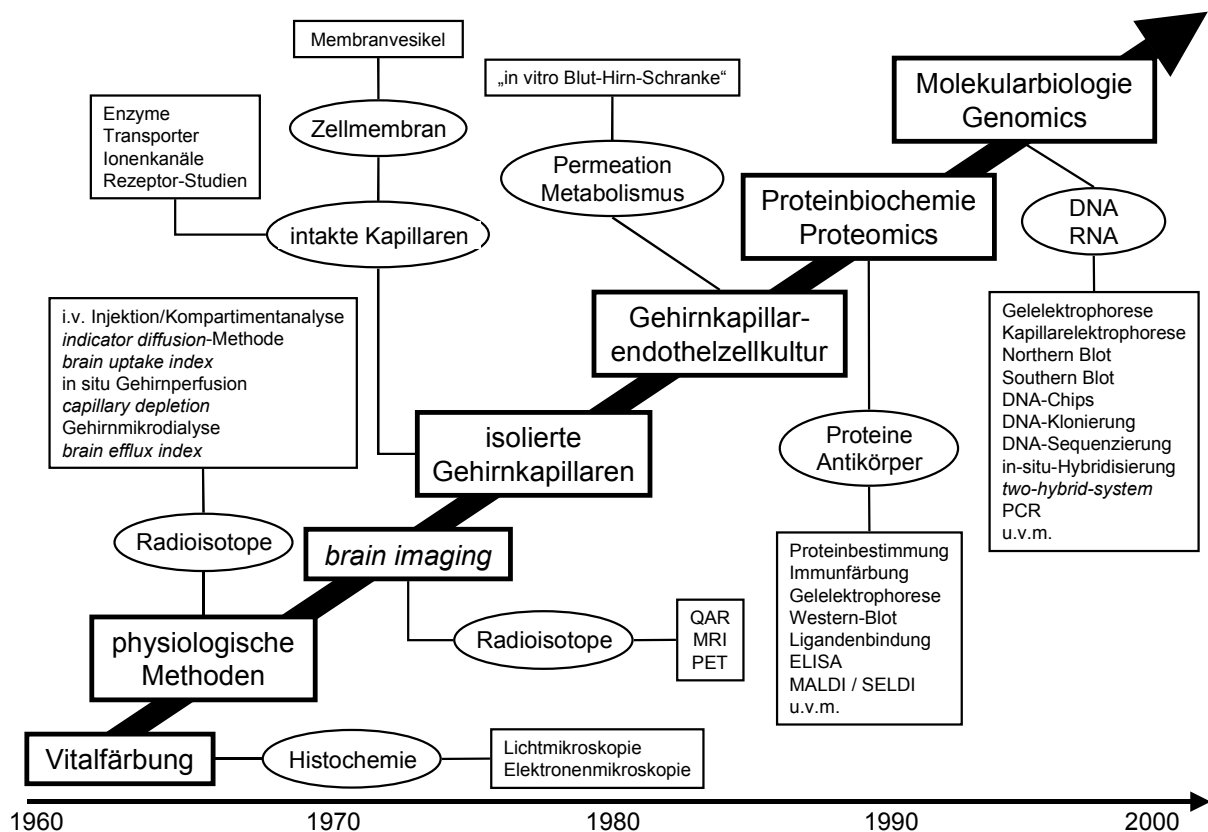


Abbildung 1.1

Entwicklung der Blut-Hirn-Schranke Methodologie [nach Pardridge, 1999]

QAR: **q**uantitative **A**utoradiographie, MRI: **M**agnet **R**esonanz **I**maging, PET: **P**ositronen **E**missions **T**omographie, ELISA: **e**nzyme **l**inked **i**mmuno **s**orbent **a**ssay, MALDI: **m**atrix-**a**ssisted **l**aser-**d**esorption **i**onization, SELDI: **s**urface **e**nhanced **l**aser **d**esorption **i**onization, PCR: **p**olymerase **c**hain **r**eaction

1.1.2 Anatomie, Biologie und Physiologie der Blut-Hirn-Schranke

Die Entwicklung der Blut-Hirn-Schranke

Die cerebralen Kapillarendothelzellen der Blut-Hirn-Schranke haben ihren Ursprung in dem mittleren Keimblatt des Embryos, dem Mesoderm [van Bree et al., 1992a]. Gleichzeitig mit der Migration und Proliferation der Kapillarendothelzellen zur Ausbildung des cerebralen Kapillargefäßsystems erfolgt die Prägung der Zellen auf den Blut-Hirn-Schranke-Phänotyp, wobei Induktion durch die zelluläre Umgebung eine wichtige Rolle spielt [Risau und Wolburg, 1990; Saunders et al., 1991; Nico et al., 1994; Kniesel et al., 1996]. Die Bedeutung der zellulären Umgebung für die Entwicklung der Barrierefunktion der Blut-Hirn-Schranke wurde zum ersten Mal 1981 von Stewart und Wiley demonstriert, indem sie embryonales Hirngewebe von Wachteln in embryonales Darmgewebe von Hühnern und umgekehrt transplantierten [Stewart und Wiley, 1981]. Das Gehirntransplantat wurde von intestinalen Gefäßen des Darms vaskularisiert, in denen dadurch Eigenschaften der Blut-Hirn-Schranke induziert wurden (Abbildung 1.2). Für die transplantierten Gehirngefäße konnten wegen der fehlenden neuronalen Umgebung im Darmgewebe keine Eigenschaften der Blut-Hirn-Schranke nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass cerebrale Kapillarendothelzellen extraneuronalen Ursprungs sind und ihre Eigenschaften nicht vorprogrammiert sind, sondern vielmehr durch die zelluläre Umgebung induziert werden. Außerdem wurde damit gezeigt, dass Hirngewebe die Fähigkeit besitzt, Blut-Hirn-Schranke-Eigenschaften auch in nicht-cerebralen vaskulären Endothelzellen zu induzieren [Schlosshauer, 1993].

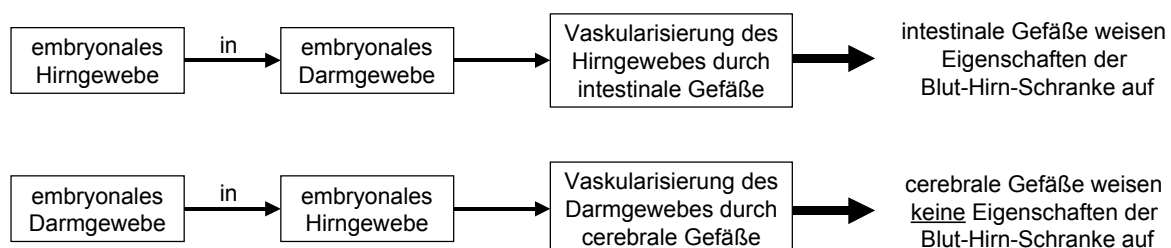


Abbildung 1.2

Transplantationsversuche von Stewart und Wiley [aus Lund, 1999]

Wieso brauchen wir eine Blut-Hirn-Schranke ?

Für die Funktionsfähigkeit des Gehirns ist die Aufrechterhaltung der inneren Homöostase, sowie eine konstante und intensive Sauerstoff- und Nährstoffversorgung über das Blut erforderlich. Das Gehirn des Menschen, das mit 1200 – 1400 g nur etwa 2% des Körpergewichts ausmacht, verbraucht bei einer Gehirndurchblutung von etwa 650 – 750 ml/min bzw. 15% des Herzminutenvolumens rund 20% der Gesamtenergie des Stoffwechsels. Dies entspricht einem Bedarf von etwa 75 mg Glucose und 50 ml Sauerstoff pro Minute. Wird die Sauerstoffzufuhr vollständig unterbrochen, tritt schon nach 7 – 10 Sekunden Ohnmacht ein, nach wenigen Minuten resultieren ernste, meist irreparable Schäden des Gehirns [Abbott und Romero, 1996; Wolf et al., 1996; Forth et al., 1998; Drewes, 1999; Thews et al., 1999].

Für die interneuronale Kommunikation im Gehirn finden komplexe elektrochemische und biochemische Vorgänge an den Neuronen statt, die nur in einem konstanten extrazellulären Milieu möglich sind. Schwankungen des pH-Wertes wie sie unter Belastung im Blut auftreten, dürfen nicht an das Gehirn vermittelt werden. Änderungen der Ionenkonzentration der Interstitialflüssigkeit – insbesondere der K^+ -Ionen – hätten drastische Auswirkungen auf das Membranpotential der Nervenzellen. Auch peripher zirkulierende Neurotransmitter, die mit zentralen Synapsen interagieren könnten, dürfen nicht in das ZNS eindringen. Andererseits müssen zentrale Neurotransmitter und Neurohormone, die für eine lokale Wirkung nur in sehr niedrigen Konzentrationen freigesetzt werden auf das Gehirn beschränkt bleiben. Außerdem muss zum Schutz der empfindlichen, nicht zur Regeneration befähigten Neuronen vor irreversiblen Schädigungen ein Eindringen körperfremder Substanzen (Xenobiotika) in das cerebrale Gewebe unbedingt vermieden werden [Goldstein und Betz, 1986; Ghersi-Egea et al., 1988; Minn et al., 1991; Abbott, 1992; Bradbury, 1993; Schlosshauer, 1993; Abbott und Romero, 1996; Wolf et al., 1996].

Um einerseits eine ausreichende Energie- und Sauerstoffversorgung über den Blutstrom sicherzustellen, andererseits aber auch die Aufrechterhaltung der cerebralen Homöostase sowie einen Schutz vor Xenobiotika zu gewährleisten, muss das Gehirn durch eine dynamische Barriere isoliert sein, die einen selektiven Stoffaustausch zwischen Blut und Gehirn erlaubt. Hierfür ist ein Gefäßsystem mit besonderen Eigenschaften erforderlich.

Das cerebrale Gefäßsystem

Die Kapillardichte im Gehirn, vor allem in der grauen Substanz der Großhirnrinde, ist sehr hoch, die mittlere Entfernung zwischen einzelnen Kapillaren beträgt nur 40 μm . Das cerebrale Kapillarnetzwerk hat eine Gesamtlänge von etwa 600 – 650 km und nimmt ca. 25% des Hirnvolumens ein. Die mittlere Blutströmungsgeschwindigkeit liegt bei unter 0,1 cm/s, der mittlere intravasale Blutdruck liegt zwischen 15 – 35 mmHg. Die Gesamtoberfläche der luminalen Gefäßinnenseite (dem Innenraum der Kapillare zugewandte Seite) des Gehirnkapillarendothels der Blut-Hirn-Schranke ist mit 15 – 30 m^2 rund 5000-mal größer als die der ebenfalls im Gehirn lokalisierten Blut-Liquor-Schranke des Plexus choroideus (30 – 60 cm^2) und stellt neben dem Dünndarm (300 – 400 m^2), der Lunge (60 – 90 m^2) und der Körperoberfläche (2 m^2) eine weitere Austauschfläche für Arzneistoffe dar [Crone, 1963; Lierse und Horstmann, 1965; Steinhausen, 1993; Abbott und Romero, 1996; de Boer und Breimer, 1996; Wolf et al., 1996; Zlokovic und Apuzzo, 1998; Drewes, 1999]. Abbildung 1.3 zeigt eine Plastination des cerebralen Gefäßsystems vom Menschen.

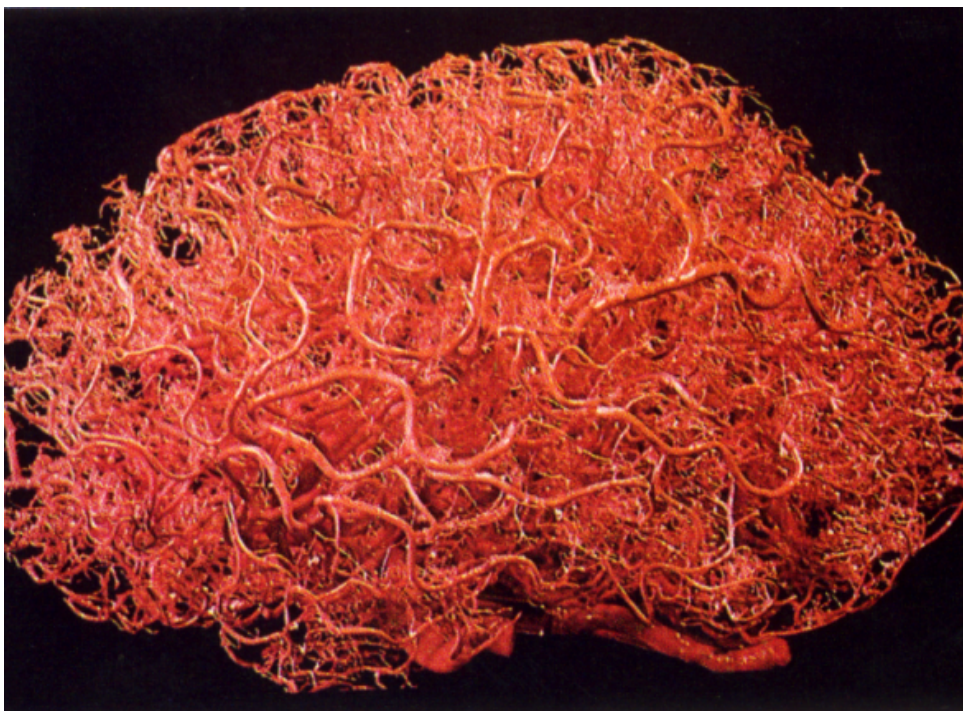


Abbildung 1.3

Plastination des cerebralen Gefäßsystems vom Menschen
[aus Zlokovic und Apuzzo, 1998]

Mikroanatomie cerebraler Kapillaren

Cerebrale Kapillaren sind mit einem Durchmesser von 3 – 7 μm die kleinsten Blutgefäße. Eine neurogene oder humorale Steuerung des Kapillardurchmessers ist unwahrscheinlich, da glatte Gefäßmuskulatur fehlt. Die abluminale Oberfläche (dem Interstitium zugewandte Seite) cerebraler Kapillaren ist zu 80 – 99% fast vollständig mit Astrocytenfortsätzen bedeckt (Abbildung 1.4, A) [White et al., 1981; Goldstein und Betz, 1986; Schlosshauer, 1993; Golden und Pardridge, 1999; Thews et al., 1999]. Astrocyten sind die größten Gliazellen, sie regulieren die extrazelluläre Ionenkonzentration, vor allem den K^+ -Gehalt, und versorgen die Neuronen, mit denen sie in Kontakt stehen, mit Nährstoffen. Bei höheren Vertebraten haben Astrocyten keine Schrankenfunktion. Allerdings gilt es als gesichert, dass Astrocyten über einen oder mehrere noch nicht identifizierte Faktoren endothelzellspezifische Eigenschaften der Blut-Hirn-Schranke in cerebralen Kapillarendothelzellen induzieren [Janzer und Raff, 1987; Maxwell et al., 1987; Paulson und Newman, 1987; Tao-Cheng et al., 1987; Brightman, 1992; Bénistant et al., 1995; Igarashi et al., 1999; Pardridge, 1999; Schroeter et al., 1999; Staddon und Rubin, 1999; Gaillard et al., 2000].

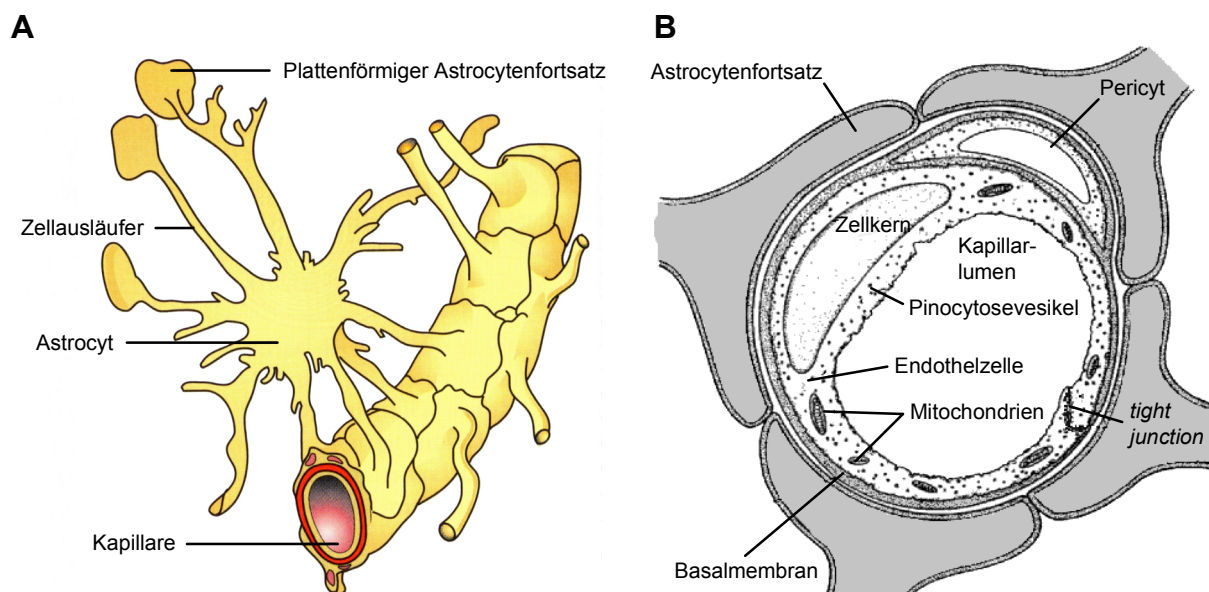


Abbildung 1.4

A: Cerebrale Kapillare mit Astrocytenfortsätzen bedeckt [aus Thews et al., 1999]

B: Querschnitt einer cerebralen Kapillare; 3-Zellen-Modell mit Endothelzelle, Pericyt und Astrocyten [aus Goldstein und Betz, 1986]

Die Wand cerebraler Kapillaren besteht nur aus Endothelzellen, dabei umschließt eine einzige Zelle den ganzen Kapillarumfang (Abbildung 1.4, B). Den Kapillarendothelzellen sind auf der abluminalen Gefäßseite Pericyten in einem Abstand von weniger als 20 nm aufgelagert, mit denen sie über die Basalmembran verwachsen sind [Schor und Schor, 1986; Sims, 1986; Schlosshauer, 1993]. Pericyten bedecken etwa 20% der Kapillaroberfläche und befinden sich vor allem an den Kontaktstellen zwischen zwei Endothelzellen, weshalb man eine Funktion bei der mechanischen Stabilisierung der Hirnkapillaren annimmt. Außerdem wird vermutet, dass die mit Kapillarendothelzellen assoziierten Pericyten aufgrund des hohen Anteils an kontraktilen Proteinen das Gegenstück zur glatten Muskulatur größerer Gefäße darstellen und mittels ihrer Zellfortsätze den Kapillardurchmesser und somit den Blutdruck beeinflussen können [Sims, 1986; Risau et al., 1992; Pardridge, 1999]. Möglicherweise liegt eine Hauptaufgabe von Pericyten auch in der Phagozytose von Molekülen, die die Endothelzellschicht der Blut-Hirn-Schranke bereits passiert haben. Pericyten werden deswegen auch als „*second line of defense*“ – als zweite Abwehrfront – bezeichnet [Abbott, 1992; Wolf et al., 1996]. Die genaue Funktion von Pericyten an der Blut-Hirn-Schranke ist jedoch nach wie vor ungeklärt. Als dritter Zelltyp stehen auch Neuronen, über deren Zellfortsätze die abluminale Membran der Kapillaren direkt innerviert wird, mit dem cerebralen Gefäßsystem in Kontakt [Pardridge, 1995].

Zum Schutz des cerebralen und neuronalen Gewebes sowie zur Aufrechterhaltung einer konstanten Homöostase, weisen Gehirnkapillaren zahlreiche morphologische Besonderheiten auf. Der Funktion nach kann die Blut-Hirn-Schranke als mechanische, metabolische als auch immunologische Barriere betrachtet werden.

1.1.2.1 Die Blut-Hirn-Schranke als physikalische Barriere

Aufgrund der Ultrastruktur von Kapillarendothelien unterscheidet man verschiedene Kapillartypen. Kapillaren im peripheren Gewebe sind durch 50 – 70 nm große Fenestrierungen und 0,1 – 1 µm weite Interzellularspalte im Kapillarendothel und der Basalmembran gekennzeichnet (Abbildung 1.5, periphere Kapillare). Periphere Kapillaren sind deshalb gut durchlässig für Wasser und große, hydrophile Moleküle, so dass ein freier Austausch mit der Extrazellulärflüssigkeit stattfinden kann. Auch eine Passage von Blutzellen (Diapedese) ist möglich [de Boer und Breimer, 1999; Forth et al., 1998; Thews et al., 1999].

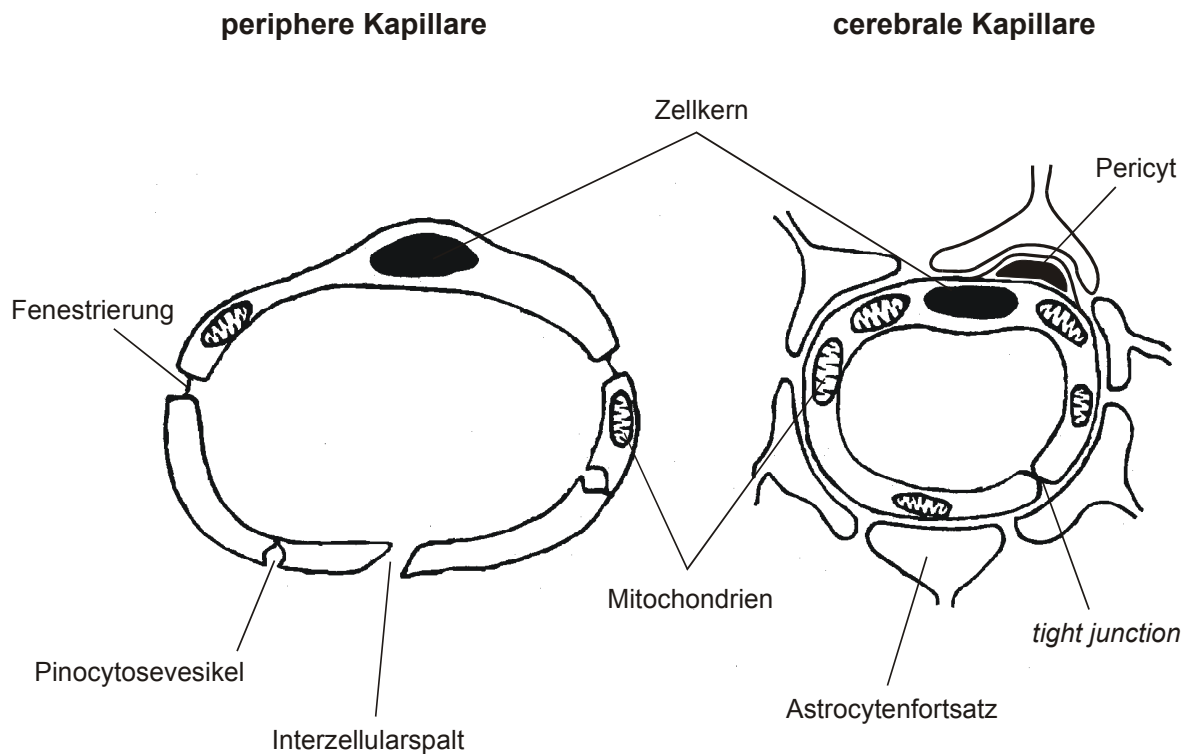


Abbildung 1.5

Vergleich von peripherer und cerebraler Kapillare [aus van Bree et al., 1992a]

Cerebrale Kapillaren stellen einen Sonderfall des kontinuierlichen Kapillartyps dar, der nur im Gehirn und im Rückenmark vorkommt und morphologisch deutlich von Kapillaren anderer Gewebe abweicht [Williams et al., 1980; Forth et al., 1998; Thews et al., 1999]. Cerebrale Kapillaren weisen im Gegensatz zu peripheren Kapillaren keine Fenestrierungen oder Interzellularräume auf (Abbildung 1.5, cerebrale Kapillare). Die Pinocytose- und Endocytose-Aktivität in Gehirnkapillarendothelzellen ist im Vergleich zu Kapillarendothelzellen peripherer Gefäße nur sehr gering [Goldstein und Betz, 1983; Bradbury, 1985; Cornford und Hyman, 1999; Staddon und Rubin, 1999]. Das wichtigste morphologische Merkmal cerebraler Kapillaren gegenüber peripheren Kapillaren, das hauptsächlich für die Barrierefunktion der Blut-Hirn-Schranke verantwortlich ist, sind dichte Zell-Zell-Verbindungen, sog. *tight junctions*, zwischen angrenzenden Endothelzellen. Bei der *tight junction* oder *zonula occludens* handelt es sich um eine hochdynamische, bandförmige Verschmelzung der äußeren Schichten der Zellmembran von benachbarten Zellen (Abbildung 1.6, A). Der Interzellularraum ist an der Stelle der Zell-Zell-Verbindung unterbrochen, wodurch ein Substanztransport durch den Interzellularraum behindert wird [Reese und Karnovsky, 1967; Brightman und Reese, 1969; Wolburg et al., 1994; Kniessel et al., 1996].

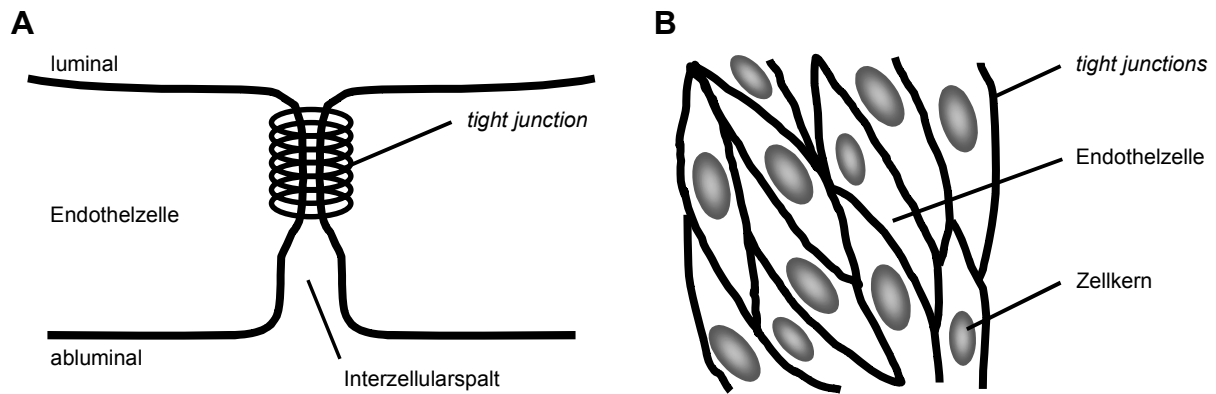


Abbildung 1.6

A: schematische Darstellung einer *tight junction* zwischen benachbarten Endothelzellen (Querschnitt)
 B: kontinuierliche Membranfusion angrenzender Endothelzellen durch *tight junctions* (Aufsicht)

Benachbarte Gehirnkapillarendothelzellen sind an den Zellgrenzen durch *tight junctions* zusammengeschrumpft, die Membranfusion ist kontinuierlich (Abbildung 1.6, B). Das Kapillarendothel ist damit auf der luminalen Blutseite dicht versiegelt, so dass das Interstitium des Gehirns strikt vom Kapillarlumen getrennt ist [Goldstein und Betz, 1983; Krause et al., 1991; Cecchelli et al., 1999]. Funktionell bedeutet die Dichtigkeit des cerebralen Kapillarendothels eine vollständige Impermeabilität der Blut-Hirn-Schranke für hydrophile Moleküle mit einem Molekülradius größer als 0,2 nm. Hierzu zählen Zucker, Aminosäuren, Proteine und andere polare organische Moleküle, darunter auch zahlreiche Arzneistoffe. Essentielle Nährstoffe wie Aminosäuren und D-Glucose werden über spezielle Carrier in das Gehirn transportiert. Hydrophobe Substanzen gelangen über passive Diffusion durch die Blut-Hirn-Schranke [Crone, 1965; Oldendorf, 1974b; Robinson und Rapoport, 1992; Bradbury, 1993; Drewes, 1999]. Für anorganische Ionen ist die Blut-Hirn-Schranke geringfügig permeabel, was sich in einem hohen spezifischen Widerstand des cerebralen Kapillarendothels, dem sog. transendothelialen elektrischen Widerstand (*transendothelial electrical resistance*, TEER) äußert [Smith und Rapoport, 1986; Rutten et al., 1987; Wegener et al., 1996]. Für die Blut-Hirn-Schranke *in vivo* wurde ein TEER von rund $1900 \Omega\text{cm}^2$ bestimmt, was weit über dem Wert peripherer Kapillaren liegt [Crone und Olesen, 1982]. Neben der Barrierefunktion dienen *tight junctions* auch der Aufrechterhaltung der Asymmetrie cerebraler Kapillarendothelzellen bzw. der polaren Verteilung von Membranproteinen zwischen luminaler und abluminaler Membran der Zellen, was wichtig für den intrazellulären vektorialen Transport ist [Török, 1999].

1.1.2.2 Die Blut-Hirn Schranke als metabolische Barriere

Ein weiteres morphologisches Merkmal cerebraler Kapillarendothelzellen ist die etwa 5 – 10mal höhere Mitochondriendichte im Vergleich zu peripheren Endothelzellen (Abbildung 1.5) [Bradbury, 1985]. Dadurch verfügen Gehirnkapillarendothelzellen über einen intensiven Stoffwechsel und eine umfangreiche Enzymausstattung, was sich in einer gesteigerten metabolischen Aktivität auswirkt [Gherzi-Egea et al., 1988; Minn et al., 1991; Schlosshauer, 1993; Drewes, 1999]. Cerebrale Kapillarendothelzellen enthalten sowohl Enzyme für Funktionalisierungsreaktionen der Phase-I-Biotransformation als auch Enzyme für Konjugationsreaktionen der Phase-II-Biotransformation, die Substanzen bei der Permeation durch die Blut-Hirn-Schranke inaktivieren. Dadurch wird einerseits verhindert, dass peripher zirkulierende Neurotransmitter, andere neuroaktive Substanzen, Giftstoffe, aber auch Arzneistoffe in das ZNS eindringen und andererseits, dass zentrale Neurotransmitter und Neurohormone aus dem ZNS austreten. Die Blut-Hirn-Schranke stellt somit eine metabolische Barriere zum effektiven Schutz des ZNS hauptsächlich vor lipophilen Substanzen dar [Gherzi-Egea et al., 1988; Minn et al., 1991; Pardridge, 1995b; de Boer und Breimer, 1996; Wolf et al., 1996; Forth et al., 1999; Lund, 1999; Mutschler et al., 2001]. Tabelle 1.1 führt die bislang in Gehirnkapillarendothelzellen identifizierten metabolischen Enzyme auf.

Tabelle 1.1: Metabolische Enzyme cerebraler Kapillarendothelzellen*

Phase-I-Biotransformation	Phase-II-Biotransformation	Metabolismus endogener Stoffe
Cytochrom P-450-Monooxygenasen	UDP-Glucuronyltransferase	Angiotensin-Konversions-Enzym
NADPH-Cytochrom P-450-Reduktase	Phenol-Sulfotransferase	Monoaminoxidase A und B
Alkoholdehydrogenase	Catechol-O-Methyltransferase	γ-Glutamyltranspeptidase
Aldehyddehydrogenasen	Glutathion-S-Transferase	Cholinesterasen
Ketondehydrogenase		Carboanhydrase
Epoxidhydrolase		Aminopeptidase A und M
L-Aminosäure-Decarboxylase		Enkephalinase
Alkalische Phosphatase		

* [Caldwell et al., 1976; DeBault und Cancilla, 1980; Joo, 1985; Gherzi-Egea et al., 1988; Bowman et al., 1990; Guillot und Audus, 1990; Minn et al., 1991; Pardridge, 1991; Audus et al., 1996; Joo, 1992; Schlosshauer, 1993; Roux et al., 1994; Abbott und Romero, 1996; de Boer und Breimer, 1996; Drewes, 1999; Lawreson et al., 1999; Lund, 1999]

1.1.2.3 Die Blut-Hirn-Schranke als immunologische Barriere

Cerebrale Kapillaren sind unter physiologischen Bedingungen undurchlässig für im Blutkreislauf zirkulierende Pathogene, für Proteine der unspezifischen humoralen Abwehr, für Antikörper und für Leukocyten. Deshalb wird der Blut-Hirn-Schranke eine Funktion als immunologische Barriere zugeschrieben (Abbildung 1.7, A) [Risau et al., 1990; Brightman, 1992; Brosnan et al., 1992]. Unter pathophysiologischen Bedingungen jedoch (z.B. Schlaganfall, Multiple Sklerose, HIV-Enzephalitis) fungieren Gehirnkapillarendothelzellen als Antigen-präsentierende Zellen und exprimieren Zelladhäsions-Moleküle wie das *immune cell adhesion molecule* ICAM-1, das *platelet endothelial cell adhesion molecule* PECAM-1, das *vascular cell adhesion molecule* VCAM-1 sowie E- und P-Selektin. T-Lymphocyten binden an die Zellen und gelangen in das ZNS, indem sie das cerebrale Kapillarendothel nach einem bislang noch unbekanntem Mechanismus passieren (Abbildung 1.7, B). Durch Öffnung der *tight junctions* sowie verstärkte Pinocytose- und Endocytose-Aktivität verliert die Blut-Hirn-Schranke ihre Barrierefunktion, was weitere Schäden zur Folge hat (Abbildung 1.7,C) [Risau et al., 1990; Brightman, 1992; Brosnan et al., 1992; Male, 1992; Staddon und Rubin, 1996; Seetharaman et al., 1998b].

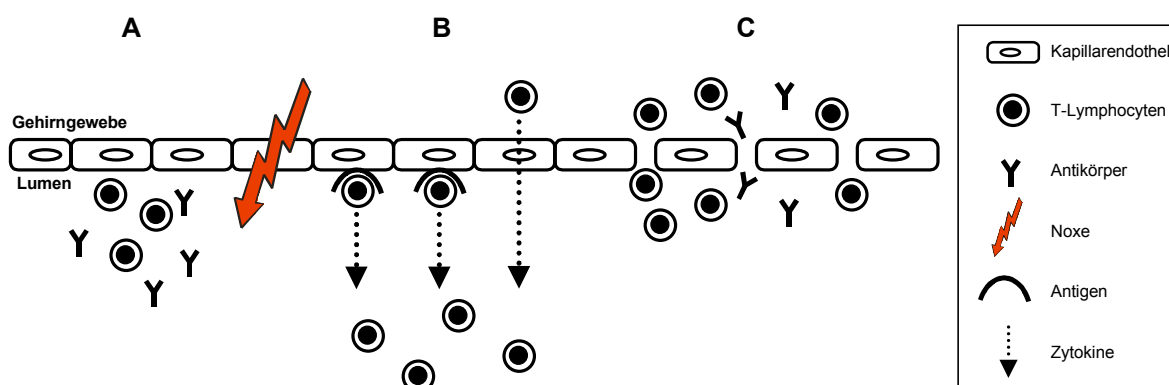


Abbildung 1.7 [modifiziert nach de Boer und Breimer, 1996]

- A: Die Blut-Hirn-Schranke ist als immunologische Barriere undurchlässig für T-Lymphocyten und Antikörper
 B: Nach einer Noxe präsentieren Gehirnkapillarendothelzellen Antigene auf der Zelloberfläche, T-Lymphocyten erkennen diese und binden daran, nach einem noch unbekanntem Mechanismus passieren T-Lymphocyten das Kapillarendothel und sezernieren Zytokine, wodurch weitere Immunzellen aktiviert werden
 C: Die Blut-Hirn-Schranke verliert ihre Barrierefunktion, T-Lymphocyten, Antikörper und andere Immunzellen gelangen ungehindert in das ZNS, wodurch weitere Schäden verursacht werden

1.1.2.4 Transportprozesse an der Blut-Hirn-Schranke

Trotz der ausgeprägten Barrierefunktion der Blut-Hirn-Schranke darf das Gehirn nicht vollständig vom allgemeinen Kreislauf isoliert sein, da es ausreichend mit Nährstoffen versorgt werden muss. Deshalb verfügt das hochpolarisierte Gehirnkapillarendothel über zahlreiche Transportproteine in der luminalen und abluminalen Zellmembran sowie über andere Transportsysteme, über die ein dynamisch-kontrollierter sowie selektiver Stofftransport vom Blut in das Gehirn stattfindet (Abbildung 1.8).

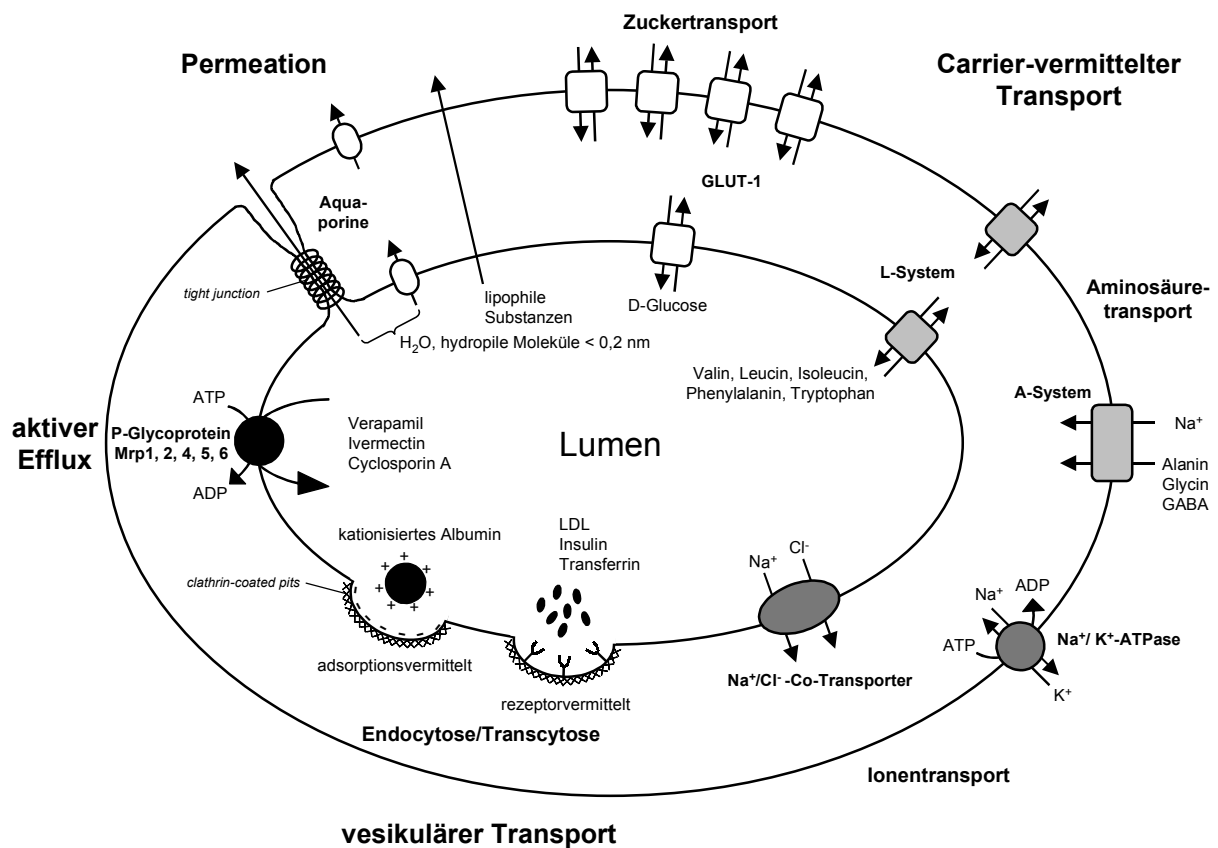


Abbildung 1.8

Transportprozesse an der Blut-Hirn-Schranke

Permeation

Über passive Diffusion durch die Blut-Hirn-Schranke (Permeation) gelangen fast ausschließlich Substanzen in das Gehirn, die lipophil genug sind, um die Lipid-Doppelschicht der Endothelzellmembran zu überwinden, wie lipophile Vitamine und einige Arzneistoffe. Auch für Wasser und im Blut gelöste Gase, z.B. O_2 und CO_2 , stellt die Blut-Hirn-Schranke kein Permeationshindernis dar. Kleine polare Moleküle

wie Ethanol, Glycerin oder Harnstoff (Molekülradius $< 0,2$ nm) permeieren durch *tight junctions* und wasserführende Kanäle, sog. Aquaporine (Abbildung 1.8, Permeation). Die Permeation durch diese „Poren“ ist allerdings vernachlässigbar. Für Substanzen wie Sucrose und Inulin ist die Blut-Hirn-Schranke gänzlich impermeabel, weshalb diese als Kontroll-Marker für parazelluläre Permeation eingesetzt werden [van Bree et al., 1992a; Abbott und Romero, 1996; Drewes, 1999].

Carrier-vermittelter Transport

Die Nährstoffversorgung des Gehirns mit D-Glucose und Aminosäuren erfolgt über Carrier-vermittelten Transport (erleichterte Diffusion, Abbildung 1.8).

D-Glucose wird über den GLUT-1-Transporter in das Gehirn transportiert, der mit einer etwa 4-mal höheren Dichte in der abluminalen Membran gegenüber der luminalen Membran vorkommt (Abbildung 1.8, Zuckertransport) [Lund, 1999]. Treibende Kraft bei diesem energieunabhängigen Transport ist allein das Konzentrationsgefälle. Der GLUT-1-vermittelte Glucose-Transport ist stereospezifisch, Na^+ - sowie Insulin-unabhängig und bei hohen Glucose-Konzentrationen sättigbar [Goldstein und Betz, 1983; Weiler-Güttler et al., 1989; Orte et al., 1999].

Für Aminosäuren sind 5 Transportsysteme an der Blut-Hirn-Schranke bekannt. Das auf beiden Membranseiten lokalisierte L-System transportiert große neutrale Aminosäuren sowie die für die Neurotransmittersynthese im Gehirn essentiellen aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin (Abbildung 1.8, Aminosäuretransport). Das L-System funktioniert stereospezifisch, kompetitiv und Na^+ -unabhängig [Betz und Goldstein, 1978; Cancilla und DeBault, 1983; Audus und Borchardt, 1986b].

Das A-Transportsystem befindet sich ausschließlich in der abluminalen Membran (Abbildung 1.8, Aminosäuretransport). Dort befördert es kleine neutrale Aminosäuren wie Alanin im Co-Transport mit Na^+ entlang des elektrochemischen Gradienten aus dem Gehirn in die cerebralen Kapillarendothelzellen. Transportiert werden auch Glycin und GABA (*γ -aminobutyric acid*, γ -Aminobuttersäure), die im ZNS als Neurotransmitter dienen. Daneben existieren Transportsysteme für saure, basische und kationische Aminosäuren [Laterra und Goldstein, 1992; Wolf et al., 1996].

Ionenkanäle und Ionentransporter dienen der Aufrechterhaltung der Ionenkonzentrationsgradienten zwischen dem Cytoplasma der Endothelzellen und der Interstitialflüssigkeit. In der abluminalen Membran des cerebralen Kapillarendothels ist die

Na^+/K^+ -ATPase lokalisiert (Abbildung 1.8, Ionen-transport). In der luminalen Membran befinden sich Na^+/Cl^- -Co-Transporter. Weiterhin wurden Na^+/H^+ -Antiporter zur intrazellulären pH-Regulation sowie Na^+ -, K^+ - und Ca^{++} -Ionenkanäle identifiziert [Goldstein und Betz, 1983; Laterra und Goldstein, 1992; Wolf et al., 1996; Lund, 1999].

Vesikulärer Transport

Große Moleküle (z.B. Proteine) und Molekülkomplexe (z.B. Lipoproteine) werden über Endocytose in cerebrale Kapillarendothelzellen aufgenommen und vesikulär durch die Zellen hindurch transportiert (Transcytose). Dabei unterscheidet man zwischen rezeptorvermittelter und adsorptionsvermittelter Endocytose (Abbildung 1.8, vesikulärer Transport) [Abbott und Romero, 1996].

Bei der *rezeptorvermittelten Endocytose* binden Moleküle hochspezifisch an luminale Membran-Rezeptoren in *clathrin-coated pits* (Abbildung 1.8, rezeptorvermittelte Endocytose). Durch die Internalisierung des beladenen Rezeptors bilden sich intrazellulär Transportvesikel, die entweder in der Zelle mit Lysosomen verschmelzen oder über Transcytose durch die Zellen befördert werden und auf der gegenüberliegenden Zellseite mit der abluminalen Membran verschmelzen, wobei das gebundene Molekül wieder freigesetzt wird [de Vries et al., 1993; Abbott und Romero, 1996; Friden, 1996]. Nach diesem Mechanismus werden das Cholesterin-transportierende Lipoprotein LDL (*low density lipoprotein*), das Eisen-transportierende Protein Transferrin sowie Insulin in Gehirnkapillarendothelzellen aufgenommen [Pardridge et al., 1985; Bradbury, 1993; de Vries et al., 1993; Abbott und Romero, 1996; Friden, 1996]. Möglicherweise handelt es sich bei der rezeptorvermittelten Transcytose sogar um einen generellen Mechanismus zum Transport von Polypeptiden, Polypeptidhormonen und Zytokinen durch die Blut-Hirn-Schranke [Wolf et al., 1996].

Bei der *adsorptionsvermittelten Endocytose* kommt es zu elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen positiv-geladenen Proteinen und der durch kohlenhydratreiche Glycoproteine negativ aufgeladenen Zelloberfläche (Abbildung 1.8, adsorptionsvermittelte Endocytose). Eine Aufnahme in Gehirnkapillarendothelzellen über adsorptionsvermittelte Endocytose konnte für kationisiertes Albumin gezeigt werden [Raub und Audus, 1990; Triguero et al., 1990; Thöle, 2000].

Aktiver Efflux

Neben Transportmechanismen, die den Zugang von Nährstoffen, Ionen und Proteinen in das Gehirn ermöglichen, sind in der luminalen Membran des cerebralen Kapillarendothels auch Efflux-Transportproteine lokalisiert, die das Eindringen zahlreicher Substanzen in das Gehirn verhindern und somit aktiv an der Barrierefunktion der Blut-Hirn-Schranke teilhaben (Abbildung 1.8, aktiver Efflux). Diese Efflux-Transporter gehören zur Familie der ABC-Transportproteine (***ATP-binding-cassette Transportproteine***), die Substanzen aktiv unter ATP-Verbrauch gegen einen Konzentrationsgradienten durch auswärtsgerichteten Transport aus dem cerebralen Kapillarendothel in das Gefäßlumen befördern. In Gehirnkapillarendothelzellen wurden bisher die Transporter P-Glycoprotein (*permeability-glycoprotein, P-gp*), Mrp1, Mrp2, Mrp4, Mrp5 und Mrp6 (***multidrug resistance associated protein***) identifiziert [Cordon-Cardo et al., 1989; Thiebaut et al., 1989; Huai-Yun et al., 1998; Régina et al., 1998; Gutmann et al., 1999a; Zhang et al., 1999; Miller et al., 2000; Bauer et al., 2001a; Bauer et al., 2002].

Sonstige Transportproteine in der Blut-Hirn-Schranke

Im cerebralen Kapillarendothel sind zahlreiche weitere Transportproteine lokalisiert, die am Stofftransport durch die Blut-Hirn-Schranke beteiligt sind.

Hierzu zählen Transporter für Monocarbonsäuren, wie MCT-1 und MCT-2 (***monocarboxylicacid-transporter***), sowie Amin-Transporter für Cholin und Cholin-verwandte Substanzen [Takakura et al., 1991; Audus et al., 1992; Cornford und Hyman, 1999]. Weitere Carrierproteine existieren für den Neurotransmitter Serotonin [Bradbury, 1993; Brust et al., 1995], das Schilddrüsenhormon Trijodthyronin T₃ [van Bree et al., 1992a], das lipophile Vitamin B₁ Thiamin [Audus et al., 1992; Abbott und Romero, 1996] sowie für Folsäure, Myoinositol, Purine und Nucleoside [Takakura et al., 1991; Drewes, 1999; Wu und Pardridge, 1999]. Außerdem gibt es Hinweise auf die Anwesenheit von organischen Anionen- und Kationen-Transportern der OAT-, OATP- und OCT-Gruppe (***organc anion transporter, organic anion transporter polypeptide, organic cation transporter***) [Kusuhara und Sugiyama, 2002].

1.1.3 Arzneistoff-Transport durch die Blut-Hirn-Schranke

Erkrankungen des ZNS erfordern eine Therapie mit Arzneistoffen, die in das Gehirngewebe gelangen müssen um dort zu wirken. Um die Blut-Hirn-Schranke für therapeutische Zwecke zu umgehen, wurden bereits unterschiedliche Ansätze verfolgt. Hierzu zählen invasive Methoden wie die intraventrikuläre Infusion, das Einsetzen intracerebraler Implantate und die osmotische Öffnung des cerebralen Kapillarendothels. Eine weitere Möglichkeit besteht in der chemischen Modifizierung von Arzneistoffen, indem die Lipophilie der Moleküle erhöht wird, was zu einer verbesserten Hirngängigkeit führt [Pardridge, 1995a; Begley, 1996; Cornford und Hyman, 1999]. Für ein gezieltes *drug targeting* von Arzneistoffen an das cerebrale Kapillarendothel und ein effizientes *drug delivery* dieser Arzneistoffe durch die Blut-Hirn-Schranke wurden neue Strategien entwickelt, die sich physiologische Transportmechanismen zu Nutze machen [Terasaki und Tsuji, 1994; Pardridge, 1995a; Abbott und Romero, 1996; Friden, 1996; Cornford und Hyman, 1999]. Dabei wird beispielsweise versucht, Arzneistoff-Glyco-Konjugate über den GLUT-1-Transporter, saure organische Arzneistoffe über Monocarbonsäure-Transporter und Aminosäure-ähnliche Arzneistoffe über Aminosäure-Transporter in das Gehirn zu schleusen. Ein hervorragendes Beispiel für ein solches *drug delivery* stellt der Transport von Levodopa über das L-System in das Gehirn bei der Therapie des Parkinson-Syndroms dar [Pardridge, 1995b; Abbott und Romero, 1996; Begley, 1996; Cornford und Hyman, 1999; Tsuji und Tamai, 1999]. Ein weiterer, vielversprechender Ansatz besteht darin, Peptid-Arzneistoffe über endocytotische Transportmechanismen durch die Blut-Hirn-Schranke in das Gehirn zu befördern. Hierbei verwendet man entweder chimere Peptide, bei denen der Arzneistoff an ein physiologisches Peptid gekoppelt ist, das endocytotisch von Gehirnkapillarendothelzellen aufgenommen wird; man koppelt den Arzneistoff direkt an einen Antikörper, der spezifisch gegen Rezeptoren in der Blut-Hirn-Schranke gerichtet ist und über rezeptorvermittelte Endocytose im cerebralen Kapillarendothel internalisiert wird; oder man schließt den Arzneistoff in Liposomen ein, die mit einem Antikörper konjugiert sind [Davis et al., 1995; Pardridge, 1995b; Cornford und Hyman, 1999; Matsuo et al., 2001]. Mit diesen sog. *Immunoliposomen*, die mit Antikörpern gegen den Transferrin- oder Insulin-Rezeptor gekoppelt sind, konnten bereits erste Erfolge verzeichnet werden [Pardridge, 1995c; Abbott und Romero, 1996; Friden, 1996; Huwyler et al., 1996b; Cerletti et al., 2000].

1.1.4 *In vitro* Modelle der Blut-Hirn-Schranke

In vitro Modelle bieten die Möglichkeit, komplexe Zusammenhänge isoliert und unter definierten Bedingungen zu betrachten. Dies vereinfacht oftmals die Interpretation von Ergebnissen und erlaubt konkrete Schlussfolgerungen über Abläufe *in vivo*, wodurch zumindest teilweise auf zeit- und kostenintensive sowie umstrittene Tierversuche verzichtet werden kann [Audus et al., 1990; Borchardt et al., 1996; Galla, 2000; www.verbraucherministerium.de]. Auch für Untersuchungen der Blut-Hirn-Schranke wurden in den letzten Jahren zahlreiche *in vitro* Modelle etabliert. Hierzu zählen isolierte Gehirnkapillaren, vor allem aber Zellkulturmodelle der Blut-Hirn-Schranke, die ein breites Anwendungsgebiet in der Grundlagenforschung und der pharmazeutischen Industrie gefunden haben [Pardridge et al., 1990; Takakura et al., 1991; Abbott et al., 1992; van Bree et al., 1992b; de Boer und Breimer, 1996; Eddy et al., 1997; Gumbleton und Audus, 2001].

1.1.4.1 Isolierte Gehirnkapillaren

Der Vorteil isolierter Gehirnkapillaren liegt in ihrer einfachen Gewinnung und Handhabung. Frisch isolierte cerebrale Kapillaren sind metabolisch aktiv und werden deshalb für biochemische Untersuchungen von Transportprozessen verwendet. Aufgrund des weitgehend intakten Zellgewebes können auch Funktion und Regulation von Enzymen, Carrier-Proteinen und Arzneistoff-Transportern der Blut-Hirn-Schranke untersucht werden [Kolber et al., 1979; Goldstein et al., 1984; Betz, 1985; Pardridge et al., 1985; Joo, 1992; Bauer et al., 2001a; Bauer et al., 2002]. Zur Bestimmung der Aufnahme von Arzneistoffen in cerebrale Kapillarendothelzellen sind isolierte Gehirnkapillaren jedoch nicht geeignet, weil die Untersuchungssubstanz nur über die leicht zugängliche, „falsche“ abluminale Membranseite in die Zellen gelangt, was aber nicht der Situation *in vivo* entspricht. Durch die Verunreinigung mit Fremdzellen kann es außerdem zu Fehlinterpretationen von Ergebnissen kommen [White et al., 1981]. Eine weitere Einschränkung dieses Modells stellt die nur kurze Viabilität cerebraler Säugerkapillaren dar. Um dieses Problem zu umgehen, wurde ein neues Modell mit Gehirnkapillaren von Fischen etabliert [Takakura et al., 1991; Jolliet-Riant und Tillement, 1999; Bauer et al., 2001a; Bauer et al., 2002; Miller et al., 2002].

1.1.4.2 *In vitro* Zellkultur cerebraler Kapillarendothelzellen

1.1.4.2.1 Isolierung cerebraler Kapillarendothelzellen

Als Ausgangsmaterial zur Isolierung cerebraler Kapillarendothelzellen wird hauptsächlich Rinder- und Schweinehirn verwendet [Bowman et al., 1983; Mischeck et al., 1989; Pardridge et al., 1990; Huwyler et al., 1996a; Fischer und Kissel, 2001]. Daneben wird auch die Isolierung aus Gehirngewebe von Ratte [Spatz et al., 1980], Maus [Tontsch und Bauer, 1989], Affe [Shi und Audus, 1994] und Ziege [Faso et al., 1994] beschrieben. Aus wissenschaftlicher Sicht ist die Verwendung von menschlichem Gehirngewebe sehr interessant. Humanhirn ist allerdings nur unter strengen Auflagen und in sehr geringer Menge erhältlich [Dorovini-Zis et al., 1991; Rubin et al., 1991; Biegel et al., 1995; Seetharaman et al., 1998a].

Für die Isolierung cerebraler Kapillarendothelzellen stehen hauptsächlich 3 Methoden zur Verfügung: die mechanisch-enzymatische Methode nach Rubin [Rubin et al., 1991], die rein mechanische Methode nach Cecchelli [Méresse et al., 1989; Cecchelli et al., 1999] und die rein enzymatische Methode nach Bowman [Bowman et al., 1983]. Durch mechanische Homogenisierung und/oder enzymatische Inkubation sowie verschiedene Filtrations- und Zentrifugationsschritte des Hirngewebes werden zunächst die Gehirnkapillaren angereichert, aus denen dann die Gehirnkapillarendothelzellen isoliert werden. Mit der Methode nach Bowman werden höhere Ausbeuten mit besserer Zell-Viabilität gegenüber anderen Methoden erzielt, weshalb die rein enzymatische Methode bevorzugt zur Isolierung cerebraler Kapillarendothelzellen eingesetzt wird [van Bree et al., 1992b; Garberg, 1998].

1.1.4.2.2 Kultivierung cerebraler Kapillarendothelzellen

Bei der Kultivierung cerebraler Kapillarendothelzellen wird zwischen dem Zellpopulationstyp (Primärkultur, Primärzelllinie, Zelllinie) und dem Kultivierungstyp (Monokultur, Co-Kultur) unterschieden.

Zellpopulationstyp Primärkultur

Primärkulturen cerebraler Kapillarendothelzellen stellen den häufigsten Zellpopulationstyp von *in vitro* Zellkulturmodellen der Blut-Hirn-Schranke dar [Gumbleton und Audus, 2001]. Hierbei handelt es sich um die Kultivierung von direkt dem Gehirngewebe entnommener Endothelzellen, die in Kultur viele Eigenschaften der Blut-Hirn-

Schranke *in vivo* beibehalten. Nach Ausbildung eines konfluenten Zell-Monolayers hören Wachstum und Differenzierung der Zellen durch Kontaktinhibition auf [Holley, 1975; Wieser et al., 1990; Reiners et al., 1992; Aoki et al., 1991]. Geringfügige Fremdzell-Kontaminationen primärkultivierter Kapillarendothelzellen sind nicht zu vermeiden. Eine Möglichkeit zur Entfernung von Fremdzellen besteht in dem Passagieren cerebraler Kapillarendothelzellen [van Bree et al., 1992b; Tewes et al., 1997; Franke et al., 1999; Fischer und Kissel, 2001].

Zellpopulationstyp Primärzelllinie

Nach der ersten Passage bezeichnet man eine Primärzellkultur als Primärzelllinie. Primärzelllinien cerebraler Kapillarendothelzellen können bis zu 50 Subkulturen passagiert werden, was der Vermehrung von Zellmasse dient sowie zeit- und kostenintensive Zellisolierungen einspart. Durch das Passagieren kann es allerdings zu einem Verlust endothelzellspezifischer Eigenschaften kommen [Dehouck et al., 1990; Shi und Audus, 1994; Eddy et al., 1997; Cecchelli et al., 1999].

Zellpopulationstyp Zelllinie

Eine Zelllinie ist ein zeitlich unbegrenzt kultivierbarer Zellpopulationstyp, der entweder von Tumorzellen abstammt oder durch Immortalisierung erzeugt wurde. Bekannte Zelllinien cerebraler Kapillarendothelzellen sind MBEC (*mouse brain endothelial cells*), RBE4 (*rat brain endothelial cells*, Klon 4) und PBMEC (*porcine brain microvessel endothelial cells*) [Morgan und Darling, 1994; Gumbleton und Audus, 2001]. Der Vorteil cerebraler Kapillarendothel-Zelllinien liegt in der unproblematischen Kultivierung und dem leichten Passagieren der Zellen. Allerdings gehen mit zunehmender Passagezahl viele natürliche Eigenschaften des Ursprungsgewebes verloren, so dass auch Zelllinien der Blut-Hirn-Schranke viele endothelzellspezifische Merkmale nicht mehr aufweisen. Deshalb ist die Verwendung von Zelllinien cerebraler Kapillarendothelzellen als *in vitro* Zellkulturmodell der Blut-Hirn-Schranke sehr fragwürdig [Garberg, 1998; Mitsunaga et al., 2000; Fischer und Kissel, 2001].

Kultivierungstyp Monokultur

Grundlage der meisten *in vitro* Zellkulturmodelle der Blut-Hirn-Schranke sind Monokulturen cerebraler Kapillarendothelzellen [Garberg, 1998; Galla, 2000; Gumbleton und Audus, 2001]. Die Zellen wachsen auf der Kulturfläche zu konfluenten Monolayern heran und sind, wie *in vivo*, morphologisch und funktionell polarisiert. Man unter-

scheidet zwischen apikaler (luminal) und basolateraler (abluminal) Seite (Abbildung 1.9).

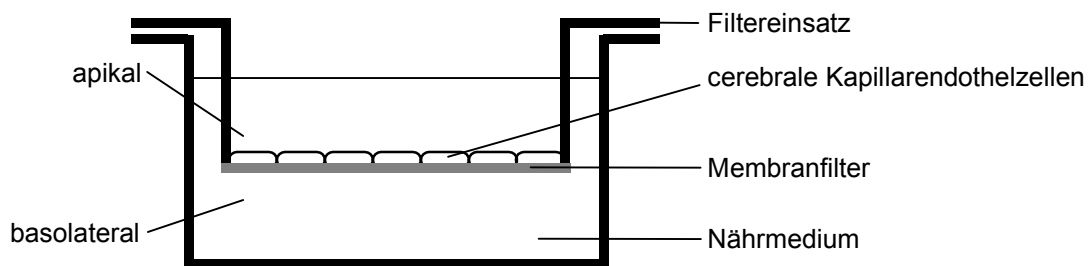


Abbildung 1.9

Monokultur cerebraler Kapillarendothelzellen

Kultivierungstyp Co-Kultur

Um einen Verlust endothelzellspezifischer Eigenschaften bei der Kultivierung cerebraler Kapillarendothelzellen zu vermeiden, können Monokulturen der Zellen mit Astrocyten-konditioniertem Medium behandelt werden. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Co-Kultivierung mit Astrocyten, die hierzu entweder auf die Unterseite des Membranfilters (Direkt-Co-Kultur) oder auf den Boden des Zellkulturgefäßes (Transfilter-Co-Kultur) ausgesät werden (Abbildung 1.10) [Tao-Cheng et al., 1987; Dehouck et al., 1992; Ghazanfari und Stewart, 2001; Bénistant et al., 1995; Cecchelli et al., 1999; Galla, 2000].

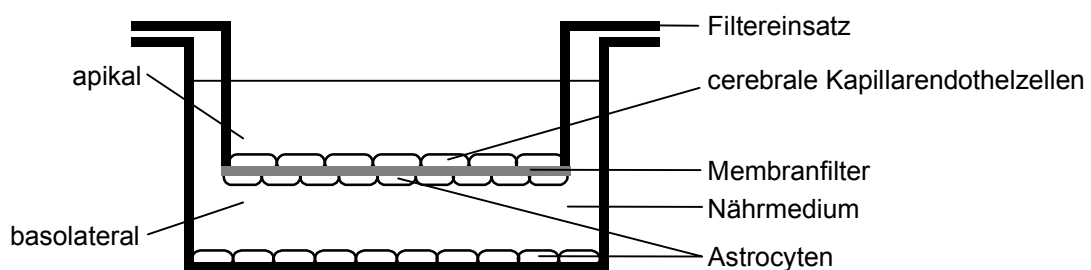


Abbildung 1.10

Co-Kultur cerebraler Kapillarendothelzellen mit Astrocyten

Direkt-Co-Kultur: Astrocyten auf der Unterseite des Membranfilters

Transfilter-Co-Kultur: Astrocyten auf dem Boden des Zellkulturgefäßes

Unter Berücksichtigung der räumlichen Geometrie cerebraler Kapillaren und des kapillären Blutstroms wurde ein dynamisches Co-Kulturmodell der Blut-Hirn-Schranke entwickelt. Bei diesem Modell werden cerebrale Kapillarendothelzellen auf der Innenseite einer permeablen Mikroröhre kultiviert, Astrocyten werden auf der Außenseite kultiviert. Die Versorgung der Zellen mit Nährmedium erfolgt über eine pulsierende Pumpe, um den kapillären Blutstrom *in vivo* möglichst realitätsgetreu nachzuahmen [Stanness et al., 1996; Stanness et al., 1997].

Um den Einfluss von Neuronen auf die Blut-Hirn-Schranke zu untersuchen wurden außerdem Tripel-Zellkulturmodelle etabliert. Dabei ist allerdings fraglich, ob die Kombination aus einer humanen Kapillarendothelzelllinie, einer Ratten-Astrocytom-Zelllinie und primärkultivierten Ratten-Neuronen sinnvoll ist. [Stanness et al., 1999; Dobbie et al., 2001].

1.1.4.2.3 Experimenttypen

Zur Untersuchung von Testsubstanzen werden mit *in vitro* Zellkulturmodellen der Blut-Hirn-Schranke 2 Arten von Experimenttypen, Aufnahme- und Permeationsversuche, durchgeführt [Audus et al., 1990; Takakura et al., 1991].

Experimenttyp Aufnahmeversuch

Zur Bestimmung der Aufnahme einer Testsubstanz in Gehirnkapillarendothelzellen erfolgen Aussaat und Kultivierung der Zellen auf den Boden von Zellkulturplatten. Der konfluente Zell-Monolayer wird mit Testsubstanz inkubiert. Analog zur Situation *in vivo* findet die Substanzaufnahme auf der apikalen (luminal) Membranseite statt (Abbildung 1.11).

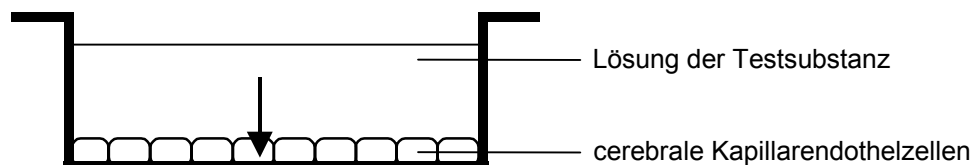


Abbildung 1.11

Prinzip von Aufnahmeversuchen

Experimenttyp Permeationsversuch

Zur Bestimmung der Permeation einer Testsubstanzen durch die Blut-Hirn-Schranke *in vitro*, werden Gehirnkapillarendothelzellen auf permeablen Membranfiltern kultiviert. Aufgrund des Versuchsaufbaus sind Permeationsexperimente in 2 Richtungen möglich: von apikal nach basolateral (Blut → Gehirn) und umgekehrt (Gehirn → Blut) (Abbildung 1.12). Diesem Experimenttyp kommt besondere Beachtung bei der Entwicklung von ZNS-Therapeutika zu [Audus et al., 1990; van Bree et al., 1992b].

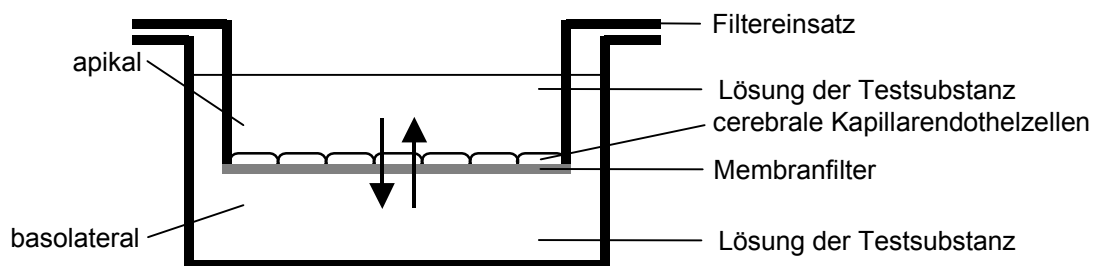


Abbildung 1.12

Prinzip von Permeationsversuchen

Als Maß für die Permeation einer Substanz durch den Zell-Monolayer wird der Permeationskoeffizient nach folgender Gleichung berechnet:

$$\frac{1}{P_{\text{app}}} = \frac{1}{P_{\text{eff}}} + \frac{1}{P_{\text{Fil}}}$$

Dabei setzt sich der apparente Permeationskoeffizient P_{app} , der die Permeation der Testsubstanz durch den Zell-Monolayer und den Membranfilter beschreibt, aus dem effektiven Permeationskoeffizienten P_{eff} (Permeation der Testsubstanz nur durch den Zell-Monolayer) und dem Filter-Permeationskoeffizienten P_{Fil} (Permeation der Testsubstanz nur durch den Membranfilter) zusammen.

1.1.4.3 Anwendung von *in vitro* Zellkulturmodellen der Blut-Hirn-Schranke

In vitro Zellkulturmodelle der Blut-Hirn-Schranke kommen in verschiedenen Bereichen der Grundlagenforschung und der pharmazeutischen Industrie zur Anwendung. Forschungsschwerpunkte sind die Regulation der Blut-Hirn-Schranke über Zell-Zell-Verbindungen, Rezeptoren und Signaltransduktionsmechanismen; die Enzym- und

Transporterausstattung des cerebralen Kapillarendothels; Zell-Zell-Interaktionen sowohl zwischen Kapillarendothelzellen untereinander, mit umgebenden Gliazellen als auch mit Zellen des Immunsystems; die Bedeutung der Blut-Hirn-Schranke bei Erkrankungen des ZNS sowie die Entwicklung neuer Arzneistoffträgersysteme für ein *drug targeting* und *drug delivery* bei ZNS-Erkrankungen.

In der pharmazeutischen Industrie setzt man *in vitro* Zellkulturmodelle der Blut-Hirn-Schranke in der präklinischen Phase der Arzneimittelentwicklung als Screening Systeme zur Charakterisierung von Arzneistoffen ein [van Bree et al., 1988b; Shah et al., 1989; Borchardt et al., 1996; Eddy et al., 1997; Garberg, 1998; Henthorn et al., 1999; Otis et al., 2001]. Hierzu werden neben Permeationsuntersuchungen mit dem Ziel von *in vitro-in vivo*-Korrelationen zur Vorhersage der Hirngängigkeit der Substanzen auch Metabolismus- und Toxizitäts-Studien durchgeführt. Die Anwendung der Modelle beim *compound profiling* neuer Arzneistoffe erfordert deren umfassende und detaillierte Charakterisierung, wobei neben zellspezifischen auch material- und methodenspezifische Einflussfaktoren berücksichtigt werden müssen (Abbildung 1.13) [Audus et al., 1990; Pardridge et al., 1990; Takakura et al., 1991; van Bree et al., 1992b; de Boer und Breimer, 1996; Gumbleton und Audus, 2001].

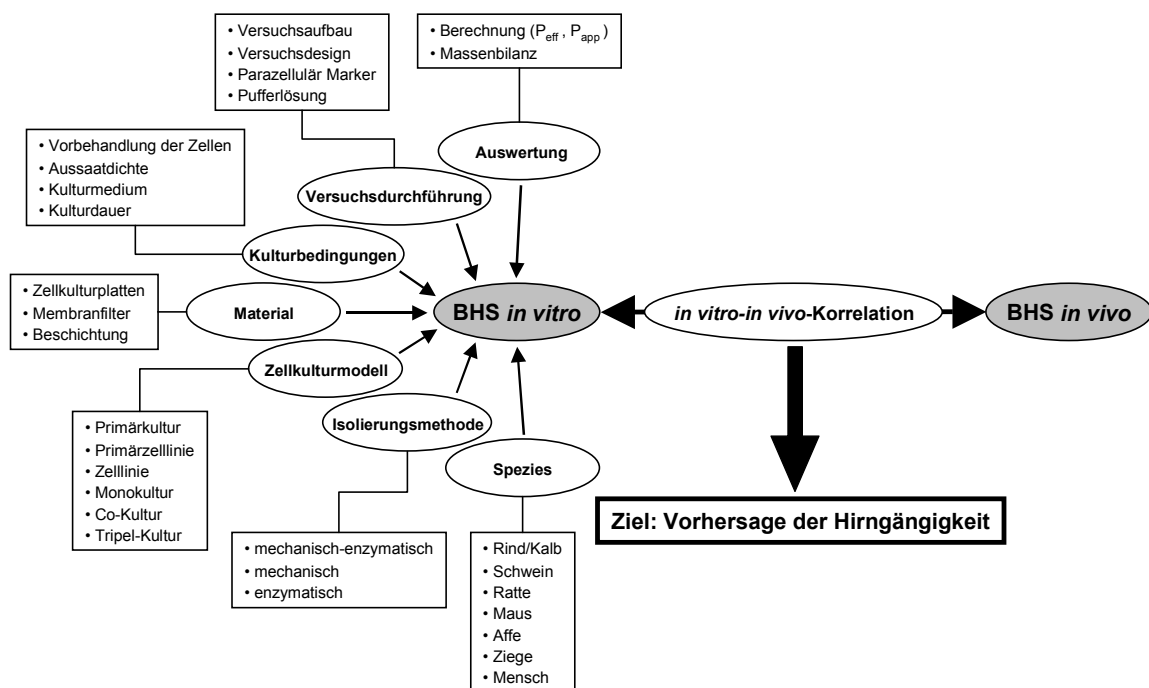


Abbildung 1.13

Zusammenhang zwischen Einflussfaktoren auf die Blut-Hirn-Schranke *in vitro*, *in vitro-in vivo*-Korrelation und der Vorhersage der Hirngängigkeit von Arzneistoffen [nach Bartmann und Bauer, 2000]

1.2 P-Glycoprotein

1.2.1 Die Entdeckung von P-Glycoprotein

Die Entdeckung von P-Glycoprotein geht auf Forschungsarbeiten zu Arzneistoff-Resistenz-Phänomenen Anfang der 1960er Jahre zurück. Die ersten Arzneistoff-Resistenzen wurden damals in gramnegativen Bakterien und Säugerzelllinien *in vitro* beobachtet [Goldstein et al., 1960; Polsinelli et al., 1964; Slotnick und Sells, 1964; Goldstein et al., 1966]. 1970 entdeckten Biedler und Riehm in Hamsterzelllinien Kreuzresistenzen gegen mehrere Arzneistoffe [Biedler und Riehm, 1970]. Danø untersuchte das Resistenz-Phänomen an Tumorzellen und fand, dass die beobachtete Arzneistoff-Resistenz durch einen auswärtsgerichteten Transport der Substanzen hervorgerufen wird. Als Grund dafür vermutete er eine aktive Arzneistoff-Pumpe [Danø, 1973]. Diese Arzneistoff-Pumpe wurde 1976 von Juliano und Ling in resistenten Hamsterovarzellen entdeckt. Da Juliano und Ling als Resistenz-Mechanismus jedoch anstelle eines auswärtsgerichteten Arzneistofftransports eine verringerte Permeabilität der Zellmembran für die untersuchten Arzneistoffe annahmen, bezeichneten sie das Protein unglücklicherweise als Permeabilitäts-Glycoprotein (P-Glycoprotein, P-gp) [Juliano und Ling, 1976; Schinkel und Borst, 1991; Borst, 1997]. Mit der Entdeckung von P-Glycoprotein konnte auch das Phänomen der *multidrug resistance* (MDR) vieler Krebserkrankungen erklärt werden. Hierbei handelt es sich um eine Cytostatika-Kreuzresistenz, die auf P-gp-Überexpression in Tumorzellen zurückzuführen ist, wodurch eine wirksame Chemotherapie verhindert wird [Germann, 1996]. 1981 entdeckten Tsuruo et al. die P-gp-hemmende Wirkung des Ca-Kanalblockers Verapamil, mit dem das *multidrug resistance*-Phänomen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zum ersten Mal aufgehoben werden konnte [Tsuruo et al., 1981; Spoelstra et al., 1994; Ford, 1996]. 1987 wurde P-Glycoprotein in gesundem Gewebe, wie dem Intestinaltrakt, der Leber und der Niere, gefunden, die Expression von P-gp in der Blut-Hirn-Schranke wurde 1988 nachgewiesen [Thiebaut et al., 1987; Thiebaut et al., 1989; Cordon-Cardo et al., 1989].

Mit P-Glycoprotein wurde der erste ABC-Transporter (*ATP-binding-cassette-Transporter*) in Eukaryonten entdeckt. ABC-Transporter stellen eine Super-Familie hochkonservierter Proteine dar, die über gemeinsame Strukturmerkmale verfügen und in Mikroorganismen, Pflanzen und Tieren vorkommen. Bis heute wurden über 200 dieser Proteine identifiziert, davon alleine 48 beim Menschen. ABC-Transporter

sind Enzyme, die unter ATP-Hydrolyse eine Konformationsänderung durchlaufen und dadurch Substrate transportieren können. Neben P-Glycoprotein gehören die Proteine CFTR (*cystic fibrosis transmembrane regulator*) sowie die Transporter der MRP-Gruppe in die Familie der ABC-Proteine [Higgins et al., 1986; Cole et al., 1992; Higgins, 1992; Barrand et al., 1994; Deeley und Cole, 1997; Cole und Deeley, 1998; van Veen et al., 1998; Cole et al., 1999; Borst et al., 2000a; Higgins und Linton, 2001].

Bis heute sind weder die genaue Proteinstruktur, der exakte Transportmechanismus, noch die intrazelluläre Regulation von P-Glycoprotein bekannt. Auch über das breite Substratspektrum und die physiologische Funktion dieses faszinierenden Transportproteins wird nach wie vor spekuliert [Gottesman und Pastan, 1988; Endicott und Ling, 1989; Georges et al., 1990; Schinkel und Borst, 1991; Ford und Hait, 1993; Higgins et al., 1997; Sarkadi und Müller, 1997; Stein, 1997; Ambudkar et al., 1999; Ueda et al., 1999].

1.2.2 Vorkommen und Funktion von P-Glycoprotein

1.2.2.1 P-Glycoprotein und *multidrug resistance* bei Krebserkrankungen

P-Glycoprotein wird in Tumorzellen verschiedener Krebserkrankungen exprimiert. Hierzu zählen Gehirntumore, Brustkrebs, Ovarialtumore, Nieren- und Kolonkarzinome sowie akute lymphatische und myeloische Leukämie u.v.m. [Black, 1991a; Black, 1991b; Broxterman et al., 1996; Ferry, 1998; Legrand et al., 1998; Sargent et al., 1998; Schaaf, 2000; Demeule et al., 2001; Régina et al., 2001]. Bei der Behandlung vieler Krebserkrankungen ist das Phänomen der *multidrug resistance* von klinischer Bedeutung, weil die Krebszellen aufgrund einer P-gp-Überexpression resistent gegenüber Cytostatika sind und nicht auf die Chemotherapie ansprechen. Dabei unterscheidet man zwischen intrinsischer MDR, bei der Krebszellen eine genetisch bedingte Cytostatika-Resistenz aufweisen, und erworbener MDR, bei der die P-gp-Überexpression erst durch die einsetzende Chemotherapie induziert wird [Ling, 1987; Ramu et al., 1989; Schinkel und Borst, 1991; Germann, 1996; Krishan et al., 1997; Hosoi et al., 1998; di Pietro et al., 1999; Karászi et al., 2001].

1.2.2.2 P-Glycoprotein im gesunden Organismus

Außer in Krebszellen kommt P-Glycoprotein auch in zahlreichen gesunden Geweben vor. Abbildung 1.14 zeigt die Gewebeverteilung von P-Glycoprotein beim Menschen.

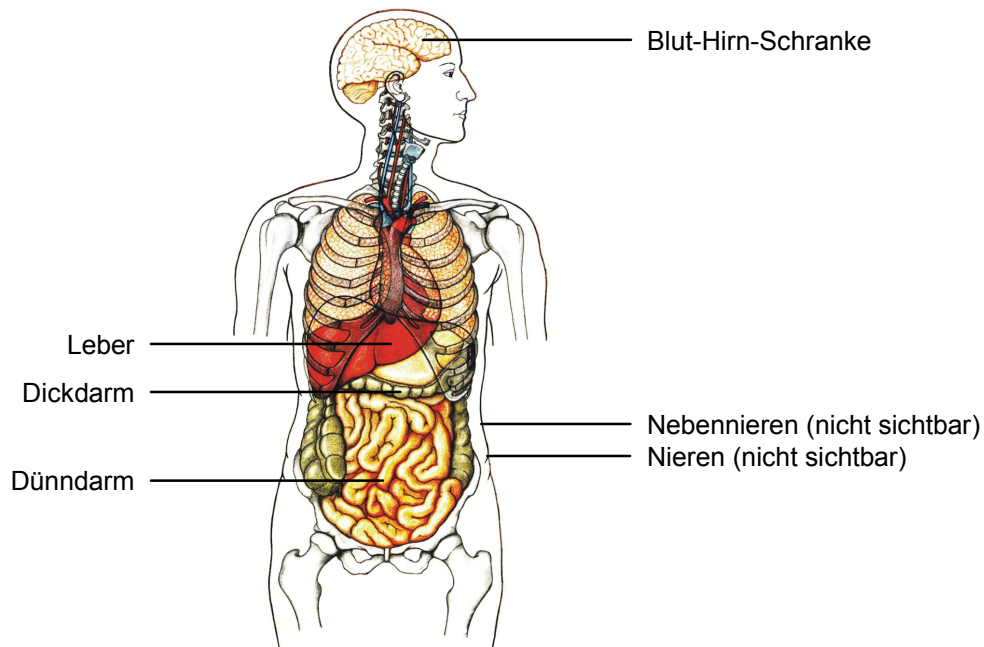


Abbildung 1.14

Gewebeverteilung von P-Glycoprotein beim Menschen [aus Rohen et al., 1998]

Intestinaltrakt

Im Intestinaltrakt kommt P-Glycoprotein in der apikalen Bürstensaummembran sowohl von Enterocyten des Dünndarmepithels als auch von Epithelzellen des Dickdarms vor. Aufgrund dieser Lokalisation schränkt P-gp die intestinale Aufnahme von Xenobiotika stark ein und verhindert deren Eintritt in den Blutkreislauf. Deshalb wird als physiologische Funktion ein Schutz- und Abwehrmechanismus gegen Toxine, die peroral über die Nahrung aufgenommen werden, vermutet. Diesen Sachverhalt bezeichnet man auch als *first line of defense*, als erste Verteidigungslinie zum Schutz des Organismus gegenüber exogenen Giftstoffen. Darüber hinaus wird P-gp im Intestinaltrakt eine weitere physiologische Funktion bei der intestinalen Elimination von Stoffwechselendprodukten zugeschrieben [Borst et al., 1993; Schinkel, 1997; Fromm, 2000; Tanigawara, 2000]

Leber

In der Leber ist P-Glycoprotein in der apikalen Membran der Gallenkanälchen lokalisiert. Eine Beeinflussung des hepatischen Metabolismus und der hepatischen Clearance durch P-gp wurde nachgewiesen. Man geht davon aus, dass P-Glycoprotein an der biliären Elimination von Arzneistoff-Metaboliten sowie Giftstoffen beteiligt ist und eine detoxifizierende Funktion hat. In diesem Zusammenhang wird P-gp in Ergänzung zur Phase-I- und Phase-II-Biotransformation als Phase-III-Eliminationssystem bezeichnet [Thiebaut et al., 1989; Ishikawa, 1992; Tsuji und Tamai, 1997; Kusuhara et al., 1998a; Chiou et al., 2000; van Tellingen, 2001].

Niere

Vergleichbar der Detoxifikationsfunktion in der Leber wird für P-gp auch eine Beteiligung an der Elimination von Stoffwechselprodukten in der Niere angenommen, da eine aktive Transportfunktion von P-Glycoprotein in der apikalen Bürstensaummembran proximaler Tubuli nachgewiesen wurde [Thiebaut et al., 1989; Borst et al., 1993; Miller et al., 1997; Schinkel et al., 1997; Fricker et al., 1998; Tanigawara, 2000].

Blut-Hirn-Schranke

In der Blut-Hirn-Schranke kommt P-Glycoprotein in der apikalen Membran der cerebralen Kapillarendothelzellen vor [Thiebaut et al., 1987; Thiebaut et al., 1988; Cordon-Cardo et al., 1989; Beaulieu et al., 1995; Stewart et al., 1996; Schumacher und Mollgård, 1997; Matsuoka et al., 1999]. P-gp trägt aktiv zur Barrierefunktion der Blut-Hirn-Schranke bei, indem es lipophile Substanzen durch auswärtsgerichteten Transport aus dem cerebralen Kapillarendothel in das Gefäßlumen an der Permeation vom Blut in das Gehirn hindert. Dadurch stellt P-Glycoprotein in der Blut-Hirn-Schranke als *second line of defense* einen zusätzlichen Abwehrmechanismus nach dem Intestinaltrakt dar, über den das empfindliche Gehirn vor irreversiblen Schädigungen geschützt wird [Tatsuta et al., 1992; Lechardeur et al., 1996; Tsuji, 1998; Schinkel, 1999; Fromm, 2000; Huisman et al., 2001]. Eine weitere physiologische Funktion von P-gp in der Blut-Hirn-Schranke besteht möglicherweise im aktiven Transport zentraler Neuropeptide und Neurohormone aus dem Gehirn in den allgemeinen Blutkreislauf, womit P-Glycoprotein am hormonalen Kommunikationssystem zwischen dem Zentralnervensystem und peripheren Erfolgsorganen beteiligt wäre [Edwards, 2001; King et al., 2001].

Nebennieren

P-Glycoprotein wird in hoher Konzentration sowohl im Nebennierenmark als auch in der Nebennierenrinde exprimiert. Die physiologische Funktion in der Nebennierenrinde besteht wahrscheinlich in der Sekretion von Steroidhormonen, vermutlich aber auch darin, Steroid-sezernierende Zellen vor hohen lokalen Steroidkonzentrationen zu schützen. Die Funktion von P-Glycoprotein im Nebennierenmark ist dagegen unbekannt [Borst et al., 1993; Tsuji und Tamai, 1997; Tanigawara, 2000].

Darüber hinaus ist P-Glycoprotein in zahlreichen anderen Geweben des Körpers zu finden. Tabelle 1.2 fasst das Vorkommen und die möglichen physiologischen Funktionen von P-Glycoprotein zusammen.

Tabelle 1.2: Vorkommen und physiologische Funktionen von P-Glycoprotein*

Vorkommen	physiologische Funktion von P-Glycoprotein
Intestinaltrakt (Dünndarm, Dickdarm)	Schutzfunktion, intestinale Elimination
Leber, Niere	Elimination, Detoxifikation
Blut-Hirn-Schranke Blut-Hoden-Schranke Ovarien Plazentaschranke Blut-Nerven-Schranke Knochenmark	Schutzfunktion, hormonales Kommunikationssystem ? } Schutzfunktion
Nebenniere	Steroidtransport, Schutz Steroid-sezernierender Zellen
Endometrium	Steroidtransport ?
Immunsystem • Lymphocyten • natürliche Killerzellen • dendritische Zellen	Zytokintransport ? ?
große Arterien	Cholesterintransport ?
Plexus choroideus Pankreas	? ?
	kombinierter Eliminationsmechanismus mit CYP450-System ? Regulation der Apoptose ? Lipidtransport ? Regulation des Zellvolumens ?

* [Valverde et al., 1992; Higgins, 1995; Wachter et al., 1995; Borst und Schinkel, 1996; Valverde et al., 1996; Schinkel et al., 1997; Tsuji und Tamai, 1997; Kusuhara et al., 1998a; Ito et al., 1999; Kim et al., 1999; Matsuoka et al., 1999; Johnstone et al., 2000; Katoh et al., 2000; Tanigawara, 2000; Huismann et al., 2001; Katoh et al., 2001; Owen et al., 2001; Paneitz und Kroemer, 2001]

1.2.2.3 Auswirkungen von P-Glycoprotein auf die Pharmakokinetik von Arzneistoffen und Bedeutung für die Pharmakotherapie

Aufgrund der Transportfunktion von P-Glycoprotein wird die Arzneistoff-Pharmakokinetik deutlich beeinflusst. Entsprechend der Gewebeverteilung im Körper bewirkt P-Glycoprotein eine Verringerung der Absorption aus dem Intestinaltrakt oral applizierter Arzneistoffe, eine Einschränkung der Hirngängigkeit von ZNS-Therapeutika sowie eine Erhöhung der intestinalen, renalen und biliären Elimination von unveränderten und metabolisierten Substanzen. Hiervon betroffen sind zahlreiche Arzneistoffe unterschiedlicher pharmakologischer Indikation (s. auch Tabelle 1.4, *1.2.3.4 Substraterkennung und Substratspektrum von P-Glyco-protein*) [Paneitz und Kroemer, 2001]. Für die Pharmakotherapie ist das Verständnis P-gp-vermittelter Transportvorgänge außerordentlich wichtig, weil Plasmakonzentration und Plasma-halbwertszeit, somit auch Wirksamkeit und Wirkungsdauer eines Arzneistoffs, direkt von dessen pharmakokinetischem Verhalten abhängig sind. Dabei kann die gleichzeitige Gabe eines oder mehrerer anderer Arzneistoffe, die ebenfalls eine Affinität zu P-gp haben, diese Faktoren wesentlich beeinflussen [Schinkel et al., 1997; Kusuhara et al., 1998a; Chiou et al., 2000; Fromm, 2000; Tanigawara, 2000; Huisman et al., 2001; Kusuhara und Sugiyama, 2002].

Das wohl bekannteste Beispiel für Interaktionen dieser Art stellt die gleichzeitige Gabe von Arzneistoffen wie Chinidin, Cyclosporin A oder Verapamil mit dem Herzglykosid Digoxin dar. Hierbei kann es zu einer 2- bis 3-fachen Erhöhung des Digoxin-Plasmaspiegels kommen, was zu starken toxischen Nebenwirkungen bis hin zum Tod führt. Auch das pharmakokinetische Verhalten des ansonsten zentral-unwirksamen Antidiarrhoikums Loperamid kann durch Co-Applikation mit anderen P-gp-interagierenden Arzneistoffen verändert werden, indem es in das ZNS gelangt und typische Opioid-Wirkungen auslöst [Schinkel et al., 1995b; Sarkadi und Müller, 1997; Scheulen, 1998; Schinkel, 1998; Fromm et al., 1999; Moltke und Greenblatt, 2001; Paneitz und Kroemer, 2001]. Dieses Prinzip macht man sich bei der Pharmakotherapie von HIV-Infektionen zu Nutze. Das im Jahr 2001 auf dem Markt erschienene Arzneimittel Kaletra[®] enthält 2 Proteaseinhibitoren, Lopinavir und Ritonavir. Durch die gleichzeitige Applikation beider Arzneistoffe kommt es zu einem synergistischen Effekt: Plasmaspiegel und Hirngängigkeit von Lopinavir werden erhöht, die Elimination wird verringert.

Eine Induktion von P-Glycoprotein, z.B. durch Rifampicin, kann aber zu auch einer verminderten oralen Bioverfügbarkeit, und somit zu einer subtherapeutischen und deshalb wirkungslosen Plasmakonzentration co-applizierter Arzneistoffe führen. In gleicher Weise wie Rifampicin soll auch Johanniskraut-Extrakt wirken. Außerdem gibt es Hinweise, dass Nahrungsmittelbestandteile, wie z.B. verschiedene Flavonoide im Grapefruitsaft oder Curcumin im Curry die Funktion von P-Glycoprotein beeinflussen und somit Auswirkungen auf die Pharmakokinetik und Pharmakotherapie haben [Romiti et al., 1998; Schinkel, 1999; Mitsunaga et al., 2000; Paneitz und Kroemer, 2001; Sorg, 2001; Spahn-Langguth und Langguth, 2001; Wang et al., 2001a].

1.2.3 Molekularbiologie, Proteinstruktur, Funktionsmechanismus und Substraterkennung von P-Glycoprotein

1.2.3.1 Molekularbiologie von P-Glycoprotein

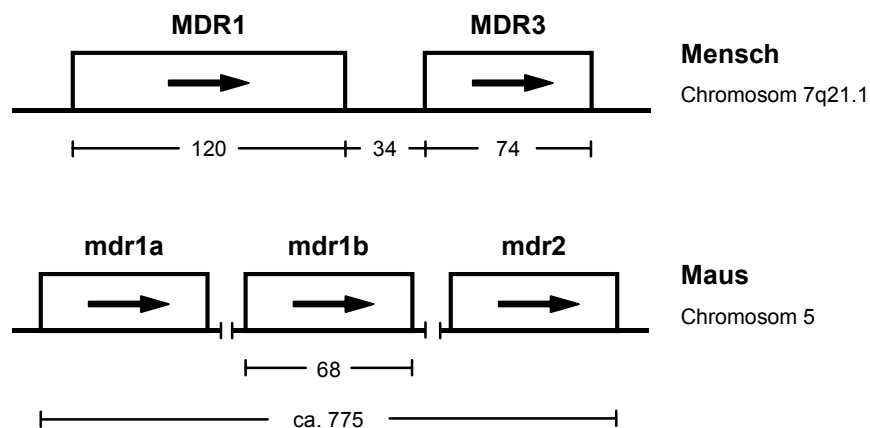
P-Glycoprotein ist das Genprodukt des MDR1-Gens (*multidrug resistance*-Gen), das 1986 entdeckt wurde und zu einer kleinen Familie homologer MDR-Gene zählt. Diese werden in 3 Klassen unterteilt, wobei die Genprodukte der Klasse I und II als Arzneistoff-Transporter fungieren und die Genprodukte der Klasse III Phospholipid-Transporter darstellen. Beim Menschen gibt es neben dem für P-Glycoprotein kodierenden MDR1-Gen (Klasse I und II) noch das MDR3-Gen (auch MDR2 genannt, Klasse III). Bei Ratte und Maus kodieren *mdr1a* (auch *mdr3*, Klasse I) und *mdr1b* (auch *mdr1*, Klasse II) für P-gp, *mdr2* (Klasse III) kodiert für den Phospholipid-Transporter. Beim Hamster werden die Gene als *pgp1* (Klasse I), *pgp2* (Klasse II) und *pgp3* (Klasse III) bezeichnet. Beim Schwein unterscheidet man zwischen *Pgp1* (Isoformen A, B, C und D, Klasse I und II) und *Pgp3* (Klasse III) [Ueda et al., 1986; Schinkel et al., 1991; Smit et al., 1993; Baggetto, 1998; Preiss, 1998].

Tabelle 1.3 zeigt die Klassifizierung und Nomenklatur der MDR-Genfamilie.

Tabelle 1.3: Klassifizierung und Nomenklatur der MDR-Genfamilie [Klein et al., 1999]

Spezies	P-Glycoprotein		neue Nomenklatur	Phospholipid- transporter Klasse III	neue Nomenklatur
	Klasse I	Klasse II			
Mensch	MDR1		ABC B1	MDR3 (MDR2)	ABC B4
Maus	mdr1a (mdr3)	mdr1b (mdr1)	mMdr1a mMdr1b	mdr2	mMdr2
Ratte	mdr1a	mdr1b	rMdr1a rMdr1b	mdr2	rMdr2
Hamster	pgp1	pgp2		pgp3	
Schwein	Pgp1 (A, B, C und D)			Pgp3	

Am besten untersucht sind das MDR1-Gen vom Menschen und das mdr1b-Gen der Maus. MDR1 befindet sich auf Chromosom 7, Gen-Lokus q21.1 und enthält 28 Exons bei einer Länge von 120 kb. Der Abstand zum 74 kb MDR3-Gen beträgt 34 kb (Abbildung 1.15). Das mdr1b-Gen der Maus ist auf Chromosom 5 lokalisiert und 68 kb lang, die intergenetischen Abstände zwischen mdr1a, mdr1b und mdr2 sind nicht bekannt. Ebenfalls unbekannt sind die Größen von mdr1a und mdr2 (Abbildung 1.15) [Schinkel und Borst, 1991; Borst, 1997; Baggetto, 1998; Preiss, 1998].

**Abbildung 1.15**

Schematische Zeichnung der P-Glycoprotein Gen-Loci beim Menschen und der Maus (Angaben in kb, die Pfeile geben die Richtung bei der Transkription an) [nach Borst et al., 2000b]

1.2.3.2 Proteinstruktur von P-Glycoprotein

P-Glycoprotein ist beim Menschen ein integrales 170kDa *single chain* Membranprotein, bestehend aus 1280 Aminosäuren. P-gp setzt sich aus 2 homologen Hälften zusammen (6+6-Helix-Modell), mit jeweils einer hydrophoben Transmembran-Domäne (TMD) am N-Terminus und einer hydrophilen Nukleotid-bindenden Domäne (NBD) am C-Terminus (Abbildung 1.16). Jede TMD besteht vermutlich aus 6 α -Helices, die über extra- bzw. intrazelluläre *loops* miteinander verbunden sind. Der erste extrazelluläre *loop* zwischen Helix 1 und 2 ist an den Aminosäuren 91, 94 und 99 glykosyliert. Die NBD sind für die ATPase-Funktion und neben Bereichen in den Helices 5-6 und 11-12 auch für die Transportaktivität von P-Glycoprotein verantwortlich. An beiden NBD wird ATP mit hoher Affinität gebunden und hydrolysiert, wodurch es zu einer Konformationsänderung kommt, die für den Substanztransport entscheidend ist. Durch sog. *vanadate-trapping* von ATP an einer der beiden NBD wird die ATP-Hydrolyse an beiden Stellen unterbrochen. Die NBD sind durch 3 hochkonservierte Struktursequenzen, das Walker A- und Walker B-Motiv, sowie die *ABC-family-signature*, charakterisiert, die in allen ABC-Transportern vorkommen. Dennoch sind die Aminosäuren in den intrazellulären *loops*, die für die Bindung und Hydrolyse von ATP zuständig sind noch nicht exakt identifiziert [Walker et al., 1982; Pastan, 1991; Schinkel et al., 1993; Jones und George, 1998; Preiss, 1998; Blott et al., 1999; Loo und Clark, 1999; Sharom et al., 1999; Jones und George, 2000].

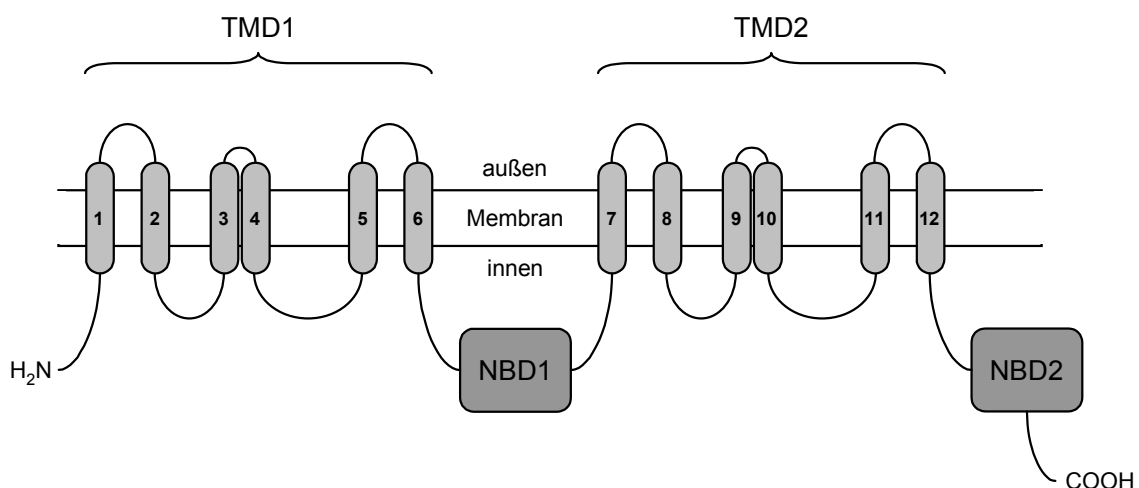


Abbildung 1.16

6 + 6-Helix-Modell von P-Glycoprotein mit TMD und NBD [aus Jones und George, 2000]

Die Tertiärstruktur von P-Glycoprotein wurde über Elektronenmikroskopie und digitale Bildanalyse mit einer Auflösung von 2,5 nm bestimmt. Die Rekonstruktion der Daten ergab einen Zylinder mit einem Gesamtdurchmesser von 10 nm und einer Gesamthöhe von 8 nm (Abbildung 1.17). In der Aufsicht von der extrazellulären Membranseite (außen) weist P-gp eine ringförmige Geometrie auf. Die extrazellulären *loops* sind zu einem annähernd hexagonalen Proteinring angeordnet, der eine große Zentralpore mit einem Durchmesser von etwa 5 nm umschließt. Im Querschnitt betrachtet verengt sich die Zentralpore, die auf der cytoplasmatischen Membranseite (innen) gegen das Cytoplasma abgeschlossen ist. Aufgrund dieser Tassen-ähnlichen Form von P-Glycoprotein ergibt sich in der Membran eine wassergefüllte Kammer, die wahrscheinlich von den 12 α -Helices gebildet wird. Diese Kammer ist durch einen Spalt im Proteinring geöffnet und von der Lipidphase der Membran zugänglich. Auf der cytoplasmatischen Seite des Proteins befinden sich zwei Ausbuchtungen von etwa 3 nm Größe, die vermutlich die Nukleotid-bindenden Domänen darstellen und neben den cytoplasmatischen *loops* die Zentralpore von der intrazellulären Membranseite her verschließen [Higgins et al., 1997; Rosenberg et al., 1997; Jones und George, 1998; Ueda et al., 1999; Jones und George, 2000].

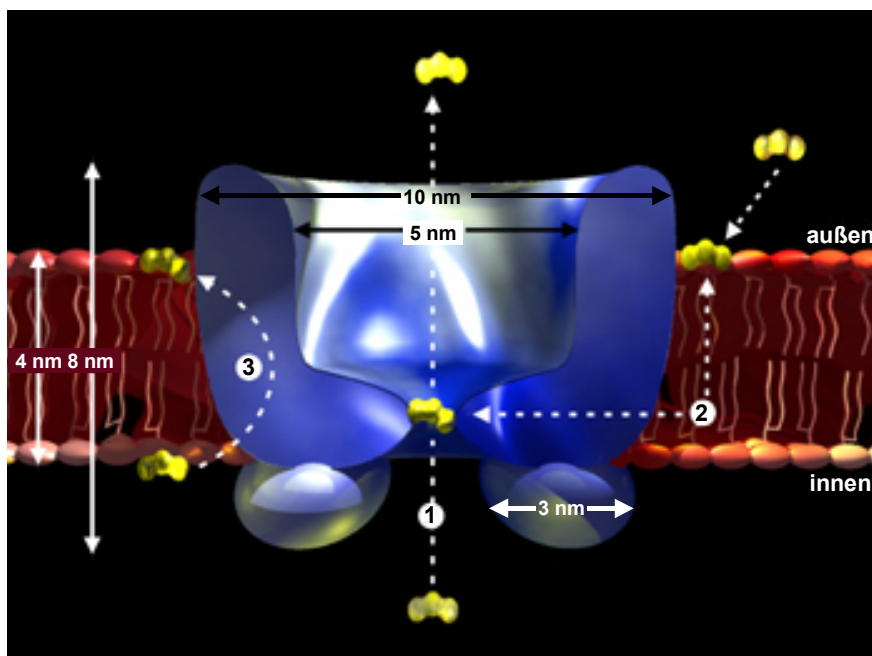


Abbildung 1.17

3D-Struktur von P-Glycoprotein (Querschnitt durch die Membran)

1: Porenmodell; 2: *vacuum-cleaner*-Modell; 3: Flippase-Modell

[aus www.med.rug.nl/mdl/structure.htm]

Für die Funktion von P-Glycoprotein wurden bislang 3 Modelle angenommen, von denen das Porenmodell, bei dem Substanzen durch eine Zentralpore aus dem Cytoplasma heraustransportiert werden (Abbildung 1.17, 1), aufgrund der ermittelten Tertiärstruktur von P-gp allerdings keine Gültigkeit mehr hat. Aktuell diskutiert werden das *vacuum-cleaner* Modell und das Flippase-Modell (Abbildung 1.17, 2 und 3). In beiden Fällen geht man davon aus, dass Substanzen bereits in der Zellmembran abgefangen werden und erst gar nicht in das Cytoplasma der Zelle gelangen [Higgins und Gottesman, 1992; Homolya et al., 1993; Ueda et al., 1999; Shapiro et al., 1999; Sharom, 1997; Eytan et al., 1996; Lu et al., 2001]. Beim *vacuum cleaner* Modell vergleicht man P-Glycoprotein mit einem Staubsauger, der Substanzen aus der Membran „aufsaugt“ und über die Zentralpore auswirft (Abbildung 1.17, 2) [Raviv et al., 1990; Higgins und Gottesman, 1992; Lu et al., 2001]. Das Flippase-Modell kommt Ergebnissen experimenteller Untersuchungen am nächsten. Es wird angenommen, dass P-Glycoprotein lipophile Substanzen, die sich in der Zellmembran verteilt haben, von der inneren Membranhälfte (inneres *leaflet*, cytoplasmatische Seite) in die äußere Membranhälfte (äußeres *leaflet*, extrazelluläre Seite) der Lipid-Doppelschicht „flipp“ und so deren Permeation in die Zelle verhindert (Abbildung 1.17, 3). Entscheidend hierbei ist die Rückverteilung einer Substanz vom äußeren in das innere *leaflet*. Erfolgt dieser Vorgang nur sehr langsam (Minuten, Stunden), kann der Konzentrationsgradient der Substanz zwischen äußerer und innerer Membran von P-gp aufrechterhalten werden. Der P-gp-*turnover* und die ATP-Hydrolyserate sind dabei niedrig, es resultiert eine Resistenz.

Verteilt sich eine Substanz jedoch sehr schnell zwischen äußerer und innerer Membran (Milli-Sekunden, Sekunden), gerät P-Glycoprotein in einen sinnlosen „Teufelskreis“. Substanzmoleküle werden unentwegt bei einem hohen *turnover* und einer hohen ATP-Hydrolyserate vom inneren *leaflet* in das äußere *leaflet* geflippt, ohne dass dabei ein Konzentrationsgradient, und somit Resistenz, entsteht [Higgins und Gottesman, 1992; Eytan et al., 1996; Ford, 1996; Higgins et al., 1997; Rosenberg et al., 1997; Sharom, 1997; Ueda et al., 1999].

1.2.3.3 Funktionsmechanismus von P-Glycoprotein

Der molekulare Funktionsmechanismus des Substrattransports durch P-Glycoprotein ist ein komplizierter und bislang noch nicht in alle Einzelheiten entschlüsselter Vorgang. Die derzeit gültige Arbeitshypothese ist in Abbildung 1.18 dargestellt [Ambudkar et al., 1992; Michelson und Slate, 1992; Senior und Gadsby, 1997; Ambudkar et al., 1999; Ueda et al., 1999; Sauna und Ambudkar, 2000; Kerr et al., 2001].

Im ersten Schritt binden ATP und ein Substratmolekül an P-Glycoprotein (Schritt I). Es folgt die Hydrolyse von ATP zu ADP und P_i , was mit einer Konformationsänderung des Proteins einhergeht und die Translokation des gebundenen Substrats von einer hoch-affinen Bindungsstelle zu einer niedrig-affinen Bindungsstelle bewirkt (Schritt II). Nach der ATP-Hydrolyse werden sowohl das transportierte Substratmolekül als auch P_i freigesetzt (Schritt IIIa). Wird dem System anorganisches Vanadat V_i zugegeben, kommt es zur Bildung eines stabilen P-gp-ADP- V_i -Komplexes, was man auch als *vanadate trapping* bezeichnet (Schritte III b und III c). Die ADP-Freisetzung, die zur Regeneration von P-Glycoprotein notwendig ist, scheint der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des katalytischen Zyklus zu sein. Hierfür wird ein weiteres Molekül ATP gebunden (Schritt IV). Durch anschließende ATP-Hydrolyse sowie Freisetzung von ADP und P_i geht P-Glycoprotein in den Ausgangszustand zurück (Schritte V und VI). Demnach sind für den Transport eines Substratmoleküls 2 Moleküle ATP notwendig. Im Grundzustand beträgt der *turnover* von P-Glycoprotein etwa 1/s, der bei Substrat-Aktivierung auf 10-15/s gesteigert werden kann [Ambudkar et al., 1992; Eytan et al., 1996; Senior und Gadsby, 1997; Ambudkar et al., 1999; Ueda et al., 1999; Sauna und Ambudkar, 2000; Kerr et al., 2001].

Der angenommene Funktionsmechanismus verkompliziert sich allerdings durch die für P-Glycoprotein postulierten mehreren Substrat-Bindungsstellen. Diese werden der Funktion nach in transportierende und regulatorische Bindungsstellen unterteilt und wechseln über allosterische Interaktionen zwischen hoch- und niedrig-affinen Konformationen, so dass außerdem von negativer und positiver Kooperativität zwischen den Bindungsstellen ausgegangen werden muss [Sharom, 1997, 380; Ueda et al., 1997, 285; Shapiro et al., 1999, 254; Martin et al., 2000, 248].

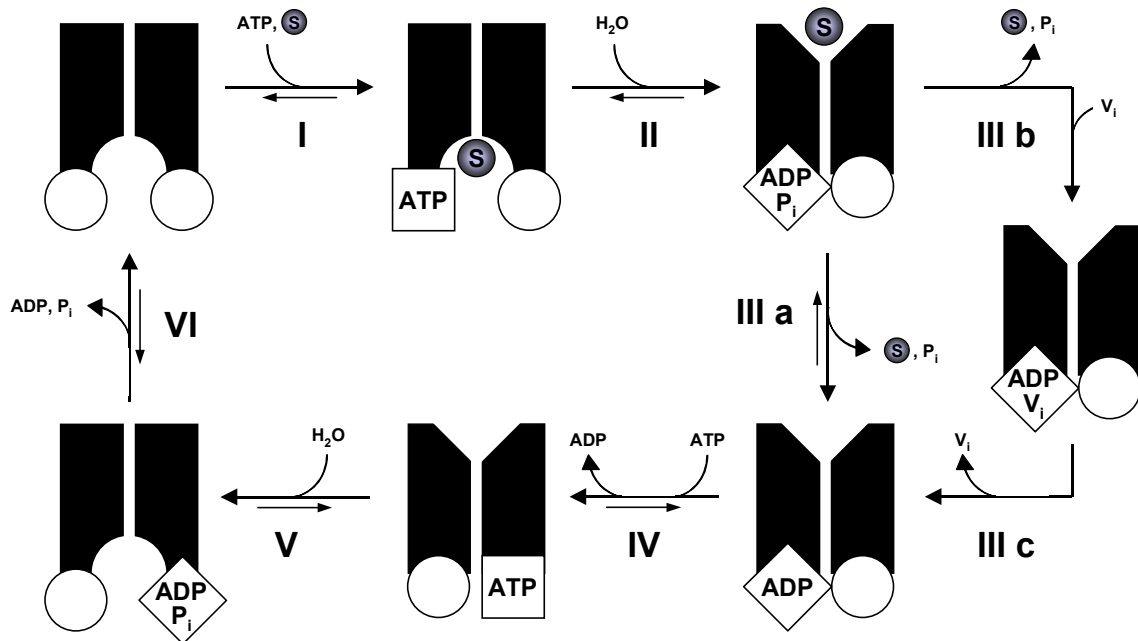


Abbildung 1.18

- I : Bindung von ATP und Substrat an P-Glycoprotein
- II : Hydrolyse von ATP bewirkt eine Konformationsänderung und die Translokation des Substrats von einer hoch-affinen zu einer niedrig-affinen Bindungsstelle
- III : Substrat und P_i werden freigesetzt, durch Zugabe von V_i kommt es zum *vanadate trapping*
- IV : ADP wird zur Regeneration von P-Glycoprotein freigesetzt, ein zweites ATP-Molekül bindet
- V : Hydrolyse von ATP bewirkt eine Konformationsänderung
- VI : Freisetzung von ADP und P_i , P-Glycoprotein geht in den Ausgangszustand zurück

1.2.3.4 Substraterkennung und Substratspektrum von P-Glycoprotein

Ein nach wie vor ungelöstes Rätsel bleibt die Substraterkennung von P-Glycoprotein, die äußerst breit ist, aber dennoch eine gewisse Spezifität aufweist. In das Substratspektrum von P-gp fallen neben zahlreichen Cytostatika auch sehr viele Substanzen gänzlich anderer Wirkung und chemischer Struktur (Tabelle 1.4). Bei den mit P-gp interagierenden Substanzen handelt es sich hauptsächlich um lipophile bis amphiphile Moleküle mit einem Molekulargewicht von etwa 250 Da bis 2000 Da. Allerdings können auch relativ hydrophile Substanzen schwache P-gp-Substrate darstellen [Ueda et al., 1997; Seelig, 1998; Seelig und Landwojtowicz, 2000].

Tabelle 1.4: Substratspektrum von P-Glycoprotein (Auswahl aus *)

Substanzklasse	Beispiele
Cytostatika	
• Antibiotika	Actinomycin D, Mitomycin C, Puromycin
• Anthracycline	Doxorubicin, Daunorubicin, Epirubicin, Idarubicin
• Vinca-Alkaloide	Vinblastin, Vincristin, Vinorelbin
• Epipodophyllotoxine	Etoposid, Teniposid
• Sonstige	Colchicin, Methotrexat, Taxol
Antiarrhythmika	Amiodaron, Chinidin
Antibiotika	Erythromycin, Gramicidin D, lipophile Cephalosporine
Beta-Blocker	Acebutolol, Celiprolol, Talinolol
Ca-Kanalblocker	Bepridil, Diltiazem, Verapamil, Nicardipin, Nifedipin
HIV-Therapeutika	Indinavir, Ritonavir, Saquinavir
Hormone	Aldosteron, Cortison, Cortisol, Dexamethason, Tamoxifen
Immunsuppressiva	Cyclosporin A, FK506, Rapamycin
Lipidsenker	Atorvastatin, Fluvastatin, Pravastatin
Opioide	Loperamid, Morphin,
Psychopharmaka	Chlorpromazin, Promazin, Trifluoperazin
Sonstige	Calcein-AM, Cimetidin, Digoxin, Dipyridamol, Hoechst 33342, Ivermectin, Reserpin, Rhodamin 123, Rifampicin, Yohimbin, kleine Peptide (3-15 Aminosäuren)

* [Ford und Hait, 1993; Chikhale et al., 1994; Chikhale et al., 1995; Ford, 1996; Ueda et al., 1997; Seelig, 1998; Seelig und Landwojtowicz, 2000; Bogman et al., 2001; Wang et al., 2001c]

Aufgrund der *multidrug resistance* bei Krebserkrankungen hofft man mit der Entwicklung von P-gp-Inhibitoren auf den Durchbruch bei der Behandlung Cytostatika-resistenter Tumorzellen. Eine MDR-aufhebende Wirkung wurde erstmals 1981 bei Verapamil und in den folgenden Jahren bei weiteren Substanzen entdeckt, was zu Begriffen wie *MDR reversal agent*, *MDR-chemosensitizer* und *P-gp modulator* geführt hat [Sikic, 1993; Ford, 1996; Sarkadi und Müller, 1997; Theis et al., 1998].

Zur 1. Generation von *MDR reversern* zählen Verapamil, Chinidin und Cyclosporin A. Die zur P-gp-Hemmung notwendigen Konzentrationen sind jedoch sehr hoch, was toxische Nebenwirkungen der Substanzen zur Folge hatte. Deshalb wurden *MDR reverser* der 2. Generation, wie das nicht immunsuppressive Cyclosporin A-Derivat PSC-833 und das Acridoncarboxamid GF120918, entwickelt. Beide Substanzen haben eine hohe Affinität zu P-Glycoprotein und bewirken eine spezifische, non-

kompetitive Hemmung. Dadurch erhöht sich zwar die Cytostatika-Konzentration im Tumorgewebe, allerdings steigt auch die Konzentration im allgemeinen Kreislauf, wodurch die therapeutische Breite der Chemotherapeutika verringert wird. *MDR reverser* der 3. Generation sind das Benzazepin-Derivat R101933 und das Anthranilsäure-Derivat XR9576, die P-Glycoprotein mit hoher Selektivität in Tumorgewebe inhibieren und einen nur geringen Einfluss auf die Pharmakokinetik applizierter Cytostatika haben. Die klinische Relevanz dieser Substanzen bei der Behandlung von Krebserkrankungen wird sich in den nächsten Jahren herausstellen [Tsuruo et al., 1981; Twentyman, 1992; Ford, 1996; Lemaire et al., 1996; Arboix et al., 1997; Scheulen, 1998; Theis et al., 1998; Wigler, 1999; van Zuylen et al., 2000; Mistry et al., 2001; Reichel, 2001].

1.2.4 Modelle zur Untersuchung von P-Glycoprotein

P-Glycoprotein stellt in der pharmazeutischen Industrie ein notwendiges aber auch potentiell lukratives, und in der Grundlagenforschung ein faszinierendes Forschungsobjekt dar. Zur Untersuchung von P-gp und seiner Interaktionen mit Arzneistoffen wurden sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Modelle entwickelt, die für verschiedene Fragestellungen eingesetzt werden [Reichel, 2001].

In vitro Modelle zur Untersuchung von P-Glycoprotein

In vitro Modelle zur Untersuchung von P-Glycoprotein lassen sich unterteilen in Modelle, bei denen subzelluläre Fraktionen wie Membranvesikel oder das isolierte Protein verwendet werden und Modelle, bei denen Zellkulturen eingesetzt werden [Reichel, 2001]. Membranvesikel P-gp-überexprimierender Zelllinien werden zur Durchführung von ATPase-Assays eingesetzt, mit denen die Aktivierung der P-gp-ATPase durch Testsubstanzen indirekt über die ATP-Hydrolyse bestimmt wird [Scarborough, 1995; Litman et al., 1997a; Litman et al., 1997b; Litman et al., 1997c; Garrigues et al., 2001]. Für Radioligandenbindungs- sowie Radioligandenverdrängungs-Assays wird das Protein selbst isoliert, um die Affinität von Testsubstanzen zu P-gp zu untersuchen [Döppenschmitt et al., 1999a; Döppenschmitt et al., 1999b; Neuhoff et al., 2000]. Mit *in vitro* Zellkulturmodellen werden Substanzen auf ihre P-gp-inhibitorische Wirkung getestet. Hierbei werden in Abhängigkeit zugegebener P-gp-Inhibitoren die Wirkung von Cytostatika auf die Proliferation von P-gp-überexprimierenden Tumor-

zellen, die Akkumulation von Arzneistoffen in Zellen sowie der vektorielle Arzneistoff-Transport durch Zell-Monolayer bestimmt [Jetté et al., 1998; Döppenschmitt et al., 1999b; Eneroth et al., 2001; Polli et al., 2001; Yamazaki et al., 2001].

In vivo Modelle zur Untersuchung von P-Glycoprotein

Als *in vivo* Modelle werden sowohl normale Mäuse als auch *P-gp-knock-out* Mäuse, die kein P-Glycoprotein exprimieren, eingesetzt. Hierbei wird der Einfluss von P-gp auf Absorption, Verteilung, Metabolismus und Elimination von Arzneistoffen mit oder ohne Inhibitoren bestimmt und zwischen normalen Mäusen und *P-gp-knock-out* Mäusen verglichen. *P-gp-knock-out*-Mäuse werden außerdem zur Untersuchung der physiologischen Funktion von P-Glycoprotein verwendet [Schinkel et al., 1994; Schinkel et al., 1995a; de Lange et al., 1998; Schinkel, 1998; Fromm et al., 1999; Jonker et al., 1999; Kawahara et al., 1999; Matsuzaki et al., 1999].

2 Problemstellung und Zielsetzung

2.1 Problemstellung

Die Blut-Hirn-Schranke stellt eine selektive Barriere dar, die für viele Substanzen undurchlässig ist, weil sie deren Verteilung vom Blut in das Gehirn verhindert. Auch zahlreiche Arzneistoffe werden dadurch in ihrer Hirngängigkeit stark eingeschränkt, was zu einem deutlichen Wirkungsverlust von ZNS-Therapeutika führen kann [Audus et al., 1992; Robinson und Rapoport, 1992; Abbott und Romero, 1996; Wolf et al., 1996]. Einen wesentlichen Anteil zur Barrierefunktion der Blut-Hirn-Schranke trägt der ABC-Transporter P-Glycoprotein bei, der eine Vielzahl strukturell unterschiedlicher Xenobiotika durch aktiven Transport aus den cerebralen Kapillarendothelzellen zurück in das Blut befördert [Tatsuta et al., 1992; Tsuji und Tamai, 1997; van Asperen et al., 1997a; Schinkel, 1999; Terasaki und Hosoya, 1999]. Daneben beeinflusst P-gp die Pharmakokinetik vieler Arzneistoffe durch Verringerung der intestinalen Resorption und Erhöhung der renalen und biliären Elimination [Schinkel, 1997; Kusuhabara et al., 1998a; Fromm, 2000; Chiou et al., 2000; Tanigawara, 2000]. Außerdem ruft die bei vielen Krebserkrankungen auftretende P-gp-Überexpression das als *multidrug resistance* bekannte Phänomen von Cytostatika-Kreuzresistenzen hervor und verhindert so eine wirksame Chemotherapie [Ling, 1987; Borst et al., 1993; Sikic, 1993; Germann, 1996; Schinkel und Borst, 1997]. In Anbetracht dieser Tatsachen besteht seitens der medizinisch-pharmazeutischen Grundlagenforschung und der pharmazeutischen Industrie ein großes Interesse an Zellkulturmodellen zur Untersuchung der Hirngängigkeit von Forschungssubstanzen und deren Interaktionen mit P-Glycoprotein [Audus et al., 1990; Abbott et al., 1992; Sarkadi und Müller, 1997; Polli et al., 2001; Wang et al., 2001b]. Auf dieser Grundlage wurde die Problemstellung der vorliegenden Arbeit formuliert und wie folgt gegliedert:

- 1) Isolierung, Kultivierung und Charakterisierung cerebraler Kapillarendothelzellen vom Schwein als Modellzellen für Zellkulturmodelle
- 2) Charakterisierung eines *in vitro* Permeationsmodells der Blut-Hirn-Schranke auf der Basis primärkultivierter PBCEC
- 3) Entwicklung eines Screening-Modells zur Untersuchung von Arzneistoff-Interaktionen mit P-Glycoprotein auf der Basis primärkultivierter PBCEC.

2.2 Zielsetzung

Zielsetzung der Isolierung, Kultivierung und Charakterisierung cerebraler Kapillarendothelzellen vom Schwein war deren Anwendung als Modellzellen für *in vitro* Screening-Modelle zur Untersuchung der Arzneistoff-Permeation durch die Blut-Hirn-Schranke sowie zur Untersuchung von Arzneistoff-Interaktionen mit P-Glycoprotein. Hierzu sollten PBCEC nach einer in der Literatur beschriebenen Methode isoliert und kultiviert werden. Mit mikroskopischen und histochemischen Methoden waren Zellwachstum und Erscheinungsbild, Fremdzell-Kontaminationen, Differenzierungszustand und endothelialer Charakter der Zellen sowie die Expression der ABC-Transporter Mrp2 und P-Glycoprotein zu untersuchen.

Ziel der Charakterisierung des *in vitro* Permeationsmodells der Blut-Hirn-Schranke war die Auswirkung zellspezifischer sowie material- und methodenspezifischer Einflussfaktoren auf die Permeation von Testsubstanzen zu untersuchen und diese zu optimieren, um eine spätere Anwendung als industrietaugliches Permeationsscreening-Modell zu ermöglichen. Um die Trennleistung des Modells hinsichtlich der Unterscheidung zwischen gut und schlecht permeierenden Substanzen beurteilen zu können, war die Permeation bekannter Modell-Substanzen mit unterschiedlichem Permeationsvermögen zu untersuchen. Durch Variation der Versuchsbedingungen bei der Durchführung von Permeationsexperimenten sollten verschiedene in der Literatur beschriebene Permeationsmodelle nachvollzogen werden, um die Vergleichbarkeit und Übertragbarkeit von Permeationsdaten zu bewerten.

Im dritten Teil der Arbeit sollte ein Screening-Modell zur Untersuchung von Arzneistoff-Interaktionen mit P-Glycoprotein auf der Basis primärkultivierter PBCEC als Modellzellen entwickelt werden. Hierzu musste zunächst ein geeignetes Indikatorsystem zur Detektion von Wechselwirkungen zwischen Testsubstanzen und P-gp gefunden werden. Die Validierung des P-gp-Screening-Modells sollte anhand von Substanzen erfolgen, die bezüglich ihrer Interaktionen mit P-gp aus der Literatur bereits bekannt sind. Dabei sollte auch die Untersuchung möglicher Störfaktoren sowie die Untersuchung verschiedener P-gp-Eigenschaften miteinbezogen werden. Außerdem sollte getestet werden, ob die Art der Hemmung von P-Glycoprotein durch Arzneistoffe mit diesem Screening-Modell bestimmt werden kann.

3 Ergebnisse und Diskussion

Bis zur Durchführung von Experimenten waren zunächst verschiedene Vorarbeiten zu leisten. Das Fließschema in Abbildung 3.1 gibt hierzu einen Überblick aller Arbeitsschritte.

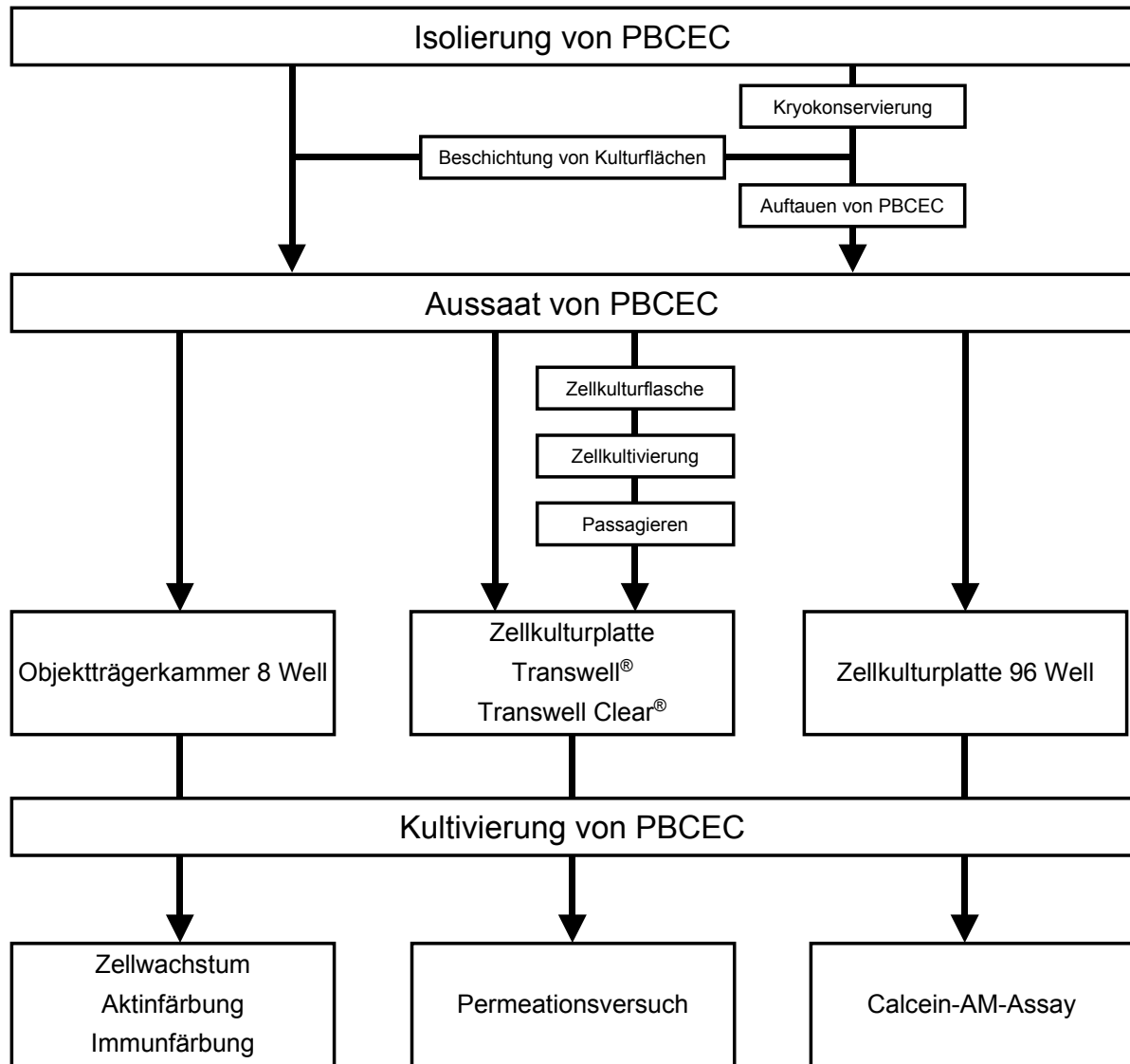


Abbildung 3.1

Gesamtübersicht aller Arbeitsschritte

3.1 Isolierung, Kultivierung und Charakterisierung cerebraler Kapillarendothelzellen vom Schwein

3.1.1 Isolierung von PBCEC

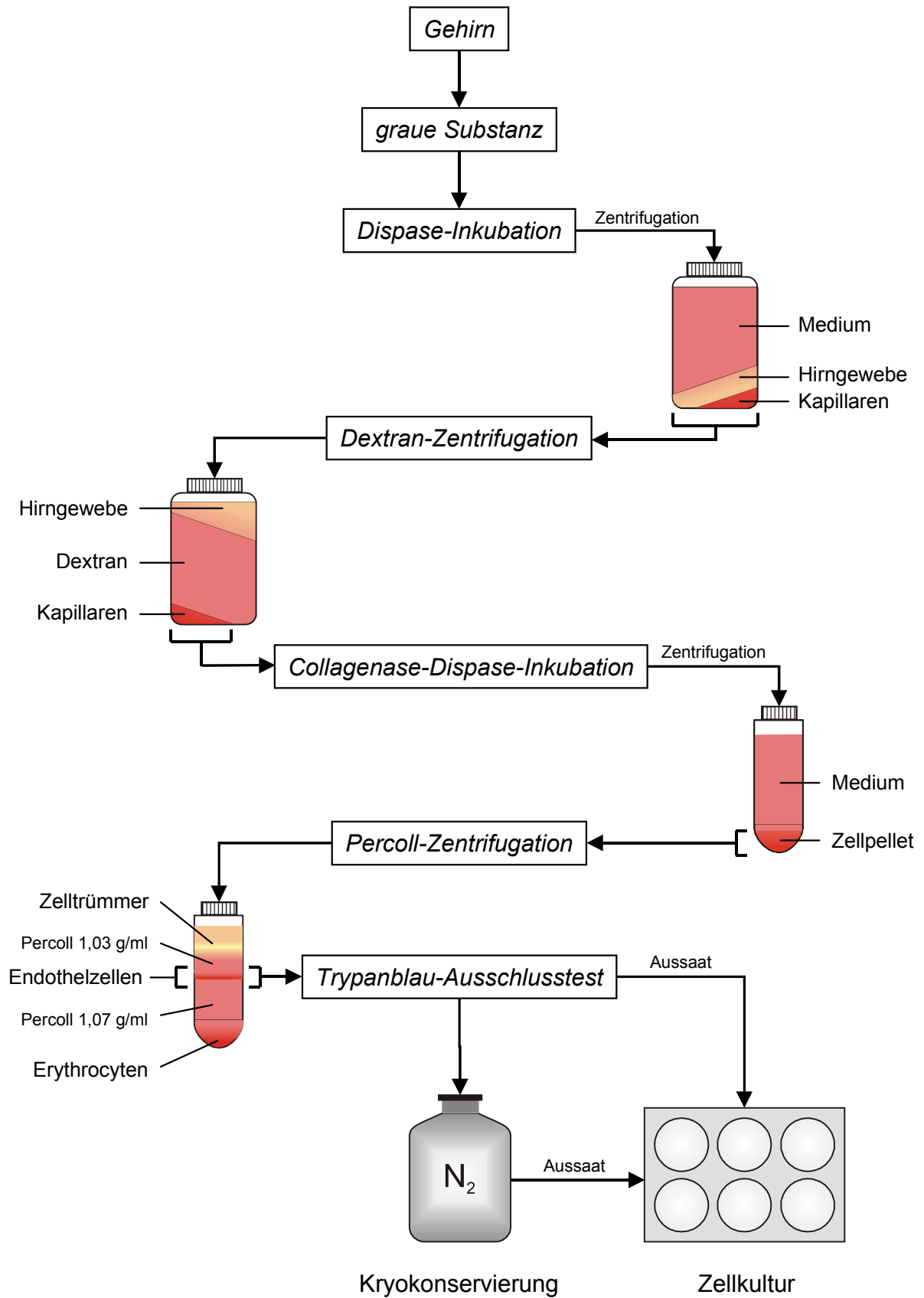
Die Isolierung cerebraler Kapillarendothelzellen erfolgte nach der Vorschrift von Bowman, der Endothelzellen zum ersten Mal 1981 aus Rattenhirn und 1983 aus Rinderhirn isolieren konnte [Bowman et al., 1981; Bowman et al., 1983]. Die Methode wurde von Audus und Borchardt [Audus und Borchardt, 1986a; Audus und Borchardt, 1987] weiterentwickelt und von Mischeck [Mischeck et al., 1989], Huwyler [Huwyler et al., 1996a], Tewes [Tewes et al., 1997] und Franke [Franke et al., 1999] modifiziert. Weitere kleine Änderungen wurden in dieser Arbeit vorgenommen. Abbildung 3.2 stellt schematisch die wichtigsten Schritte zur Isolierung cerebraler Kapillarendothelzellen aus Schweinehirn dar.

Ausgangsmaterial Gehirn

Als Ausgangsmaterial zur Isolierung cerebraler Kapillarendothelzellen wurde Schweinehirn verwendet. Hierfür gibt es mehrere Gründe:

- 1.) Es herrscht große Übereinstimmung zwischen dem Genom des Schweins und dem des Menschen [www.toulouse.inra.fr/lgc/pig/compare/compare.htm; Gellin et al., 2000; www.informatics.jax.org].
- 2.) Das Schwein wie auch der Mensch zählen zu den Omnivoren (Allesfresser), weshalb Ähnlichkeiten in Stoffwechselprozessen beider Spezies bestehen [Kummer-Fremgen, 1993; Tewes et al., 1997].
- 3.) Es konnte jederzeit frisches Schweinehirn im Schlachthof besorgt werden und war dort stets in ausreichender Menge kostenfrei verfügbar.

Die vor jeder Schlachtung durchgeführten tierärztlichen Kontrollen und eingehenden Laboruntersuchungen von Organproben gewährleisteten die Unbedenklichkeit des Materials, so dass zu keinem Zeitpunkt Infektionsgefahr bestand. Sondergenehmigungen für den Umgang mit Schweinehirn waren nicht erforderlich [Haag, 2001, persönliche Mitteilung]. Für das praktische Arbeiten während der Präparation war die Größe der Hirne gut zu handhaben. Die Hirnhäute (Pachymeninx, harte Hirnhaut, Dura mater encephali und Leptomeninx, weiche Hirnhaut, bestehend aus Arachnoidea encephali und Pia mater encephali) wurden sorgfältig mit Pinzetten entfernt, um Verunreinigungen durch Endothelzellen peripherer Gefäße auszuschließen.

**Abbildung 3.2**

Schematische Darstellung der Isolierung cerebraler Kapillarendothelzellen aus Schweinehirn [aus Audus und Borchardt, 1996; modifiziert nach Thöle, 2000]

Danach wurde die kortikale graue Substanz (Substantia grisea, Großhirnrinde) mit Skalpell abgezogen und zerkleinert. Die graue Substanz ist wegen des höheren Gehalts an Mikrokapillaren etwa 5-mal besser durchblutet als andere Hirngewebe und wurde deshalb für die Isolierung cerebraler Kapillarendothelzellen eingesetzt [Lierse und Horstmann, 1965; Phillips et al., 1979; Steinhausen, 1993; Wolf et al., 1996]. Restliches Hirngewebe wurde verworfen. Ganzhirn oder weiße Substanz wurden nie zur Isolierung von Endothelzellen verwendet, weil darin enthaltenes Myelin und Neuronenkerne nur schwierig abgetrennt werden können und zu Verunreinigungen mit Oligodendrocyten führen [Kummer-Fremgen, 1993].

Dispase-Inkubation

Die am häufigsten angewandte Vorschrift zur Isolierung cerebraler Kapillarendothelzellen beruht auf der Kombination von zwei aufeinanderfolgenden enzymatischen Behandlungsschritten [Garberg, 1998]. Diese rein enzymatische Isolierungsmethode wurde einer mechanisch-enzymatischen bzw. einer rein mechanischen Methode vorgezogen, da höhere Ausbeuten mit besserer Zell-Viabilität erreicht werden können [Garberg, 1998].

Für die erste enzymatische Behandlung wurde das Enzym Dispase verwendet. Dispase ist eine neutrale, unspezifische Protease, die speziell zur Gewebedisaggregation eingesetzt wird [Matsumura et al., 1975]. Durch die Dispase werden im Gegensatz zu Enzymen wie Trypsin, Collagenasen und Pronasen Zellmembranen nicht verletzt [Takaoka et al., 1975; Produktinformation Dispase, Roche, 1999]. Während der Enzym-Inkubation wurde das Gehirngewebe der grauen Substanz schnell und effektiv abgebaut. Dadurch erfolgte die Freisetzung cerebraler Kapillaren aus dem Gewebe. Nach 2-stündiger Inkubation wurde zentrifugiert. Das Pellet bestand aus Gehirnkapillaren und verdautem Hirngewebe.

Dextranzentrifugation

Die Abtrennung der Gehirnkapillaren von verdautem Hirngewebe erfolgte durch Dichtezentrifugation mit 15%iger Dextranlösung. Wegen der geringeren Dichte flotierten die sehr lipidhaltigen Gewebestandteile aus Zelltrümmern, Gliazellen, Neuronen und Fett auf der Dextranlösung und wurden mit dieser abgesaugt. Die Gehirnkapillaren blieben als Niederschlag zurück.

Collagenase-Dispase-Inkubation

Mit dem zweiten enzymatischen Behandlungsschritt folgte der Aufschluss der Gehirnkapillaren. Das Kapillargewebe stellt eine Matrix aus Collagenen und anderen extrazellulären Proteinen, wie Glycoproteinen und Proteoglycanen dar und unterliegt *in vivo* einer komplexen Organisation [Yamada, 1983]. Zur Isolierung von Gehirnkapillarendothelzellen musste diese Extrazellulär-Matrix schonend aufgelöst werden, ohne dabei zelluläre Strukturen zu beschädigen. Daher wurde für die Gewebedisaggregation eine Kombination von collagenolytischen und proteolytischen Enzymen benötigt. Die hochwirksame Collagenase-Dispase vereinigt die Vorteile der spezifischen und wirksamen Collagenase mit der milden proteolytischen Wirkung der Dispase und wird für die Isolierung von Zellen aus vielen Geweben verwendet [Produktinformation Collagenase-Dispase, Roche, 1999; Bowman et al., 1981; Dietel et al., 1987; DuBois et al., 1981; Abken et al., 1986; Malan-Shibley und Iype, 1981; Hoshi et al., 1987].

Die Enzymmischung Collagenase-Dispase löste die bestehende Basalmembran der Gehirnkapillaren auf, dadurch wurden einzelne Endothelzellen freigesetzt. Den Kapillaren anhaftende Gliazellen konnten durch die enzymatische Behandlung beseitigt werden. Das Pellet nach Zentrifugation bestand aus Kapillarendothelzellen, Gehirnkapillarfragmenten, Zelltrümmern, Erythrocyten, Pericyten und Astrocyten.

Percoll[®]-Dichtezentrifugation

Das Zell-Gemisch wurde zur Auftrennung in die einzelnen Zell-Faktionen einer weiteren Dichtezentrifugation unterzogen. Als Dichtegradientenmedium wurde Percoll[®] verwendet. Hierbei handelt es sich um ein kolloidales Medium aus heterogenen SiO₂-Partikeln, die mit Polyvinylpyrrolidon überzogen und gegenüber biologischem Material inert sind. Percoll[®] besitzt gegenüber den früher verwendeten Zentrifugationsmedien wie Sucrose, Sucrose/Gelatine, Albumin oder Ficoll[®] einige Vorteile. Basierend auf der Dichte von Percoll[®] ist eine isopyknische Trennung mit guter Trennleistung verschiedener Zellen möglich. Des Weiteren ist das Medium aufgrund niedriger Osmolalität und Viskosität mit vielen physiologischen Pufferlösungen mischbar und somit kompatibel mit lebenden Zellen. Dadurch ist gewährleistet, dass neben der Zell-Morphologie auch die damit verbundenen Zell-Funktionen erhalten bleiben [Enerbäck und Svensson, 1980; Dalet et al., 1982; Kreamer et al., 1986]. Zellen können somit in hoher Reinheit, Ausbeute und Vitalität isoliert werden [Pertoft et al., 1977].

Gemäß der Original-Vorschrift nach Bowman wurde ein 50%iger kontinuierlicher Percoll[®]-Gradient eingesetzt [Bowman et al., 1981]. Allerdings war bei Verwendung dieses Gradienten die Trennleistung nicht zufriedenstellend. Endothelzellen und Zelltrümmer waren nicht klar aufgetrennt, so dass es beim Abernten zu Verunreinigungen kam. Außerdem war zur Ausbildung des kontinuierlichen Gradienten eine zeitaufwendige Vorzentrifugation nötig. Diese Nachteile konnten durch die Verwendung eines diskontinuierlichen Percoll[®]-Gradienten umgangen werden. Der diskontinuierliche Gradient war aus zwei Percoll[®]-Lösungen unterschiedlicher Dichte zusammengesetzt, einer Unterphase mit 1,07 g/ml und einer Oberphase mit 1,03 g/ml [Tewes et al., 1997]. Während der Zentrifugation bildeten sich 3 Fraktionen: Erythrocyten waren als Pellet in der Unterphase, Zelltrümmer und Verunreinigungen flotierten auf der Oberphase. Gehirnkapillarendothelzellen sammelten sich in der Interphase zwischen beiden Percoll[®]-Lösungen an und konnten leicht abgeerntet werden. Die Dichte der Endothelzellen lag demzufolge zwischen 1,03 und 1,07 g/ml, was Literaturwerten entspricht [Bowman et al., 1979; Mischeck et al., 1989; Kummer-Fremgen, 1993; Thöle, 2000]. Die von Percoll gereinigten Zellen wurden auf ihre Viabilität untersucht und ausgezählt.

Trypanblau-Ausschlusstest

Mit dem Trypanblau-Ausschlusstest können Viabilität und Ausbeute isolierter Gehirnkapillarendothelzellen schnell und zuverlässig bestimmt werden [Bowman et al., 1981; Tennant, 1964]. Dem Test liegt die Tatsache zugrunde, dass Trypanblau nur von Zellen mit geschädigter Zellmembran aufgenommen wird. Ungeschädigte Zellen dagegen schließen den Farbstoff aus [Lindl und Bauer, 1994].

Abbildung 3.3 zeigt eine lichtmikroskopische Aufnahme von Gehirnkapillarendothelzellen nach der Isolierung.

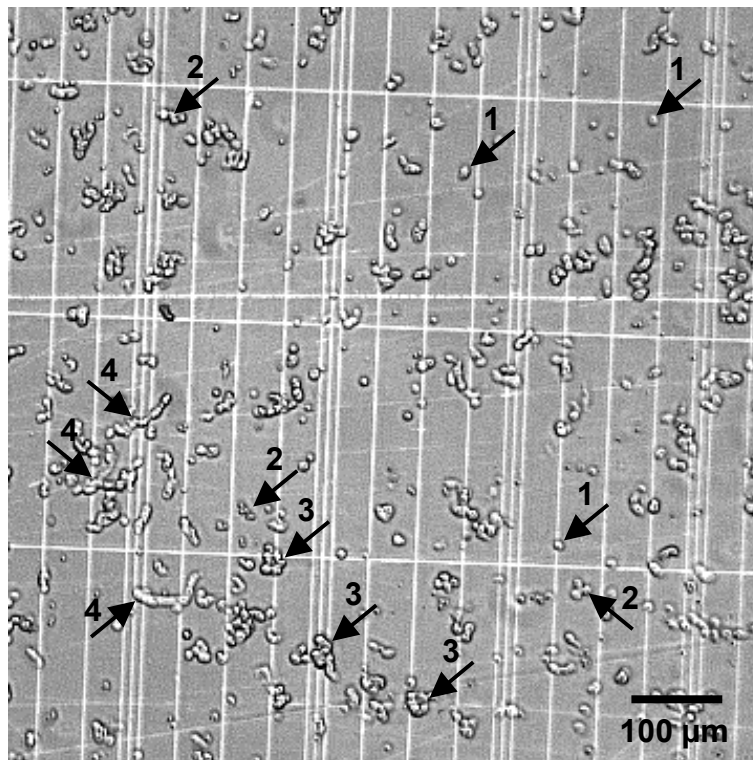


Abbildung 3.3

Gehirnkapillarendothelzellen nach der Isolierung

Pfeile 1: einzelne Kapillarendothelzellen

Pfeile 2: kleinere Zusammenlagerungen von 2-5 Kapillarendothelzellen

Pfeile 3: größere Zusammenlagerungen von 5-15 Kapillarendothelzellen

Pfeile 4: Kapillarfragmente

Vergrößerung 100fach

Bei der mikroskopischen Kontrolle nach der Isolierung war es möglich, erste Abschätzungen über Verunreinigungen durch Fremdzellen wie Erythrocyten, Fibroblasten, glatte Muskelzellen, Pericyten und Astrocyten sowie Kapillarfragmente und Zelltrümmer zu machen. Im Lichtmikroskop waren weder Erythrocyten mit ihrer charakteristisch bikonkaven Diskusscheiben-Form noch Fibroblasten oder glatte Muskelzellen zu sehen. Auch Pericyten oder Astrocyten mit der für sie typischen sternchenförmigen Morphologie konnten nicht beobachtet werden.

In Abbildung 3.3 sind sowohl einzelne Kapillarendothelzellen (Pfeile 1), kleinere und größere Zusammenlagerungen von Kapillarendothelzellen (Pfeile 2 und 3) als auch Kapillarfragmente (Pfeile 4) zu erkennen. Die Größe einzelner Kapillarendothelzellen lag bei einem Durchmesser von etwa 7-10 µm und somit vergleichbar früheren An-

gaben [Kummer-Fremgen, 1993]. Endothelzellen waren meist zu Gruppen aggregiert. Kleinere dieser Zusammenlagerungen zählten 2-5 Zellen, größere Zusammenlagerungen zählten bis zu 15 Zellen. Die Endothelzellen waren nach der Isolierung morphologisch gut erhalten. Die Zellmembranen waren an keiner Stelle eingestülpt oder anderweitig beschädigt.

Der Trypanblau-Ausschlusstest ergab immer eine Viabilität der Zellen von über 95%. Zelltrümmer machten einen Anteil von 1-5% aus. Lichtmikroskopisch konnte leicht zwischen ungefärbten lebenden Zellen und gefärbten toten Zellen unterschieden werden. Da die Serumkonzentration durch die 1:2 Verdünnung der Zellsuspension mit Trypanblaulösung auf unter 7% verringert wurde, waren die Ergebnisse durch den Serumanteil nicht verfälscht [Morgan und Darling, 1994].

Die Ausbeuten lagen bei 20-50 Mio. Kapillarendothelzellen/Schweinehirn. Diese Werte stimmen mit Literaturangaben überein [van Bree et al., 1992b; Teifel und Friedl, 1996; Gumbleton und Audus, 2001].

3.1.2 Kultivierung von PBCEC

Für die erfolgreiche Kultivierung cerebraler Kapillarendothelzellen spielen verschiedene Gesichtspunkte eine Rolle. Hierzu zählen die Beschichtung von Kulturflächen, das Passagieren und die Kultivierung von PBCEC, die verwendeten Kulturmedien und Medienzusätze sowie die Vermeidung von Kontaminationen durch Mikroorganismen.

3.1.2.1 Beschichtung von Kulturflächen

Viele Zellen – darunter auch cerebrale Kapillarendothelzellen – können ohne Vorbehandlung von Zellkulturgefäßen nicht an der Kulturfläche anhaften. Eine Zellkultur ist somit nicht möglich. Obwohl einige Zellarten, v.a. aber Zelllinien direkt an Plastik oder Glas adhärieren können, wird solch eine Bindung als unphysiologisch betrachtet [Yamada, 1983]. Die Extrazellulär-Matrix *in vivo* übernimmt wichtige Funktionen bei der Zelldifferenzierung, der Expression intrazellulärer Proteine, der Ausbildung der Zellpolarität und ist ausschlaggebend für die Zellgestalt [Kramer, 1985]. Zell-Matrix-Interaktionen sind auch für die *in vitro* Zellkultur von entscheidender Bedeutung [Strom und Michalopoulos, 1982]. Die Beschichtung von Kulturflächen als Simulation der Extrazellulär-Matrix stellt daher einen wichtigen Bestandteil in der Zellkultur dar.

Wichtig hierbei sind einerseits das Beschichtungsmaterial, andererseits aber auch das zu beschichtende Material der Zellkulturgefäße.

Die zur Kultivierung von PBCEC verwendeten Zellkulturgefäße waren aus Polycarbonat (Membranfiltereinsätze der Transwell®-12-Well-Platten), Polyester (Membranfiltereinsätze der Transwell Clear®-12-Well-Platten), Polystyrol (96-Well-Zellkulturplatten, Zellkulturflaschen 75 cm²) und Permanox®-Kunststoff (8-Well-Objektträgerkammern). Um Gehirnkapillarendothelzellen auf diesen Kunststoffen kultivieren zu können, wurde zunächst Collagen S in Kombination mit Fibronectin zur Beschichtung der Kulturfleichen eingesetzt. Aufgrund des zeitlichen Aufwandes dieses sog. Doppel-Coatings wurde in allen nachfolgenden Versuchen Rattenschwanz-Collagen verwendet.

Abbildung 3.4 zeigt cerebrale Kapillarendothelzellen vom Schwein nach 7 Tagen in Kultur. Die Kulturfleiche der Objektträgerkammern wurden mit Rattenschwanz-Collagen bzw. Collagen S/Fibronectin beschichtet.

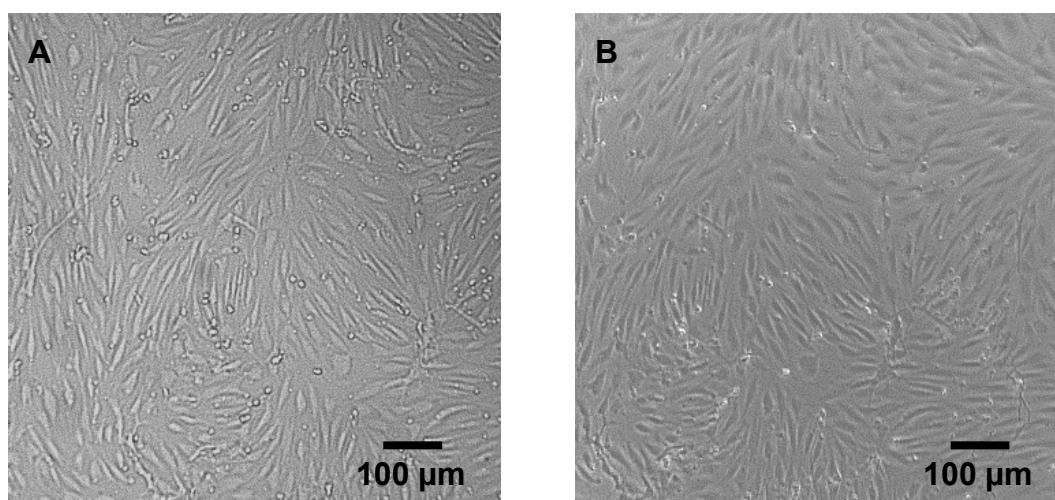


Abbildung 3.4

Cerebrale Kapillarendothelzellen vom Schwein auf unterschiedlich beschichteten Kulturfleichen nach 7 Tagen in Kultur

A: Rattenschwanz-Collagen-Beschichtung (Durchlicht)

B: Collagen S/Fibronectin-Beschichtung (Phasenkontrast)

Vergrößerung 100fach

Im Lichtmikroskop waren keine Unterschiede bezüglich des Wachstumsverhaltens zwischen Kapillarendothelzellen, die auf Rattenschwanz-Collagen oder Collagen S/Fibronectin kultiviert wurden, auszumachen (Abbildung 3.4). In beiden Fällen waren konfluente Monolayer sowie die typischen spindelförmigen Endothelzellstrukturen

zu beobachten. Das Ergebnis deutet darauf hin, dass sowohl die Kombination aus Collagen S und Fibronectin, als auch Rattenschwanz-Collagen als Beschichtungsmaterial eingesetzt werden kann.

3.1.2.2 Passagieren von PBCEC

Nach der Isolierung von PBCEC erfolgte entweder direkt die Aussaat oder die Kryokonservierung der Zellen. Direkt ausgesäte Zellen wurden durchgehend kultiviert (Primärkultur) oder einmal passagiert (Primärzelllinie). Kryokonservierte Zellen wurden nach der Aussaat ebenfalls entweder durchgehend kultiviert oder passagiert. Zur Durchführung von Permeationsuntersuchungen ist es erforderlich, mit homogenen Monolayern cerebraler Kapillarendothelzellen zu arbeiten, da Verunreinigungen die Dichtigkeit beeinflussen [Hoheisel et al., 1998]. Das Passagieren von PBCEC diente dem Entfernen von Verunreinigungen durch Zellagglomerate, Kapillarfragmente und Fremdzellen, v.a. Pericyten und Astrocyten [Tilling et al., 1998]. Bei der während des Passagierens stattfindenden Trypsinisierung lösten sich nur Endothelzellen von der Kulturfläche. Fremdzellen, Zellagglomerate und Kapillarfragmente wurden nicht abgelöst und blieben in der Zellkulturflasche zurück. Nach der Passage war die Zellkultur weitestgehend frei von Verunreinigungen. Abbildung 3.5 zeigt vergleichend passagierte und nicht passagierte Kapillarendothelzellen nach 5 Tagen in Kultur.

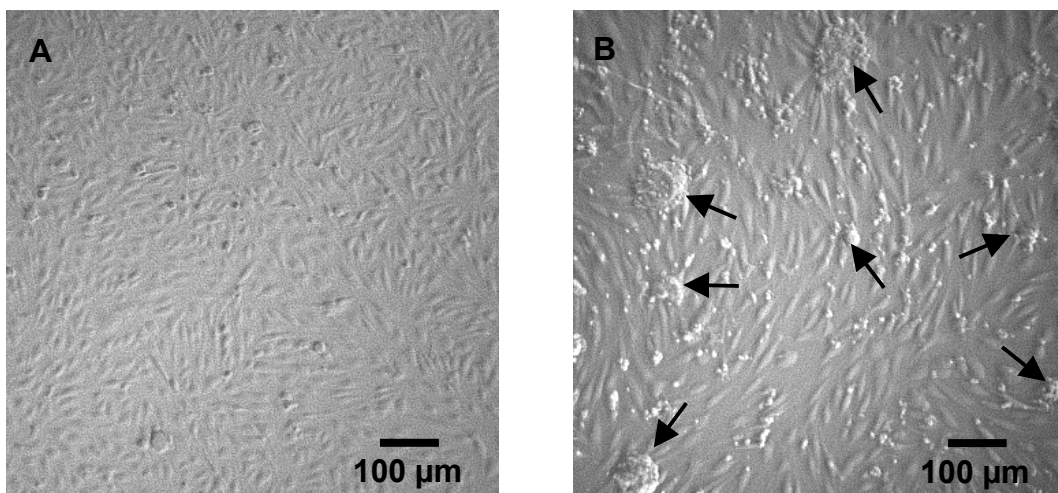


Abbildung 3.5

Passagierte und nicht passagierte Kapillarendothelzellen nach 5 Tagen in Kultur

A: passagierte Kapillarendothelzellen (Phasenkontrast)

B: nicht passagierte Kapillarendothelzellen (Phasenkontrast)

Die Pfeile weisen auf Verunreinigungen

Vergrößerung 100fach

Durch das Passagieren von PBCEC konnten Verunreinigungen durch Fremdzellen, Zelltrümmer und Zellagglomerate sowie Kapillarfragmente effektiv aus der Zellkultur entfernt werden (Abbildung 3.5, Bild A). Es sind keine Unebenheiten im Monolayer durch Zellagglomerate zu erkennen wie in Bild B (Pfeile). Passagierte Zellen wiesen eine Morphologie wie nicht passagierte Zellen auf und resultierten nach nur milder Trypsinisierung in reinen und homogenen Kapillarendothelzell-Monolayern, die zur Durchführung von Permeationsversuchen geeignet waren [Abbott et al., 1992; Tewes et al., 1997].

Auffällig war die im Lichtmikroskop erkennbar höhere Zelldichte von Monolayern passagierter Zellen im Vergleich zur Zelldichte nicht passagierter Zellen (Abbildungen 3.5 und 3.6). Abbildung 3.6 (Bild A und B) zeigt Zellen nach 4 Tagen in Kultur. Die Zellaussaat erfolgte direkt nach der Isolierung mit einer Aussaatdichte von 250.000 Zellen/cm². Die Endothelzellen in Bild A wurden an Tag 3 passagiert und erneut unter gleichen Bedingungen ausgesät. Bild B zeigt Zellen, die ohne Passage durchgehend kultiviert wurden.

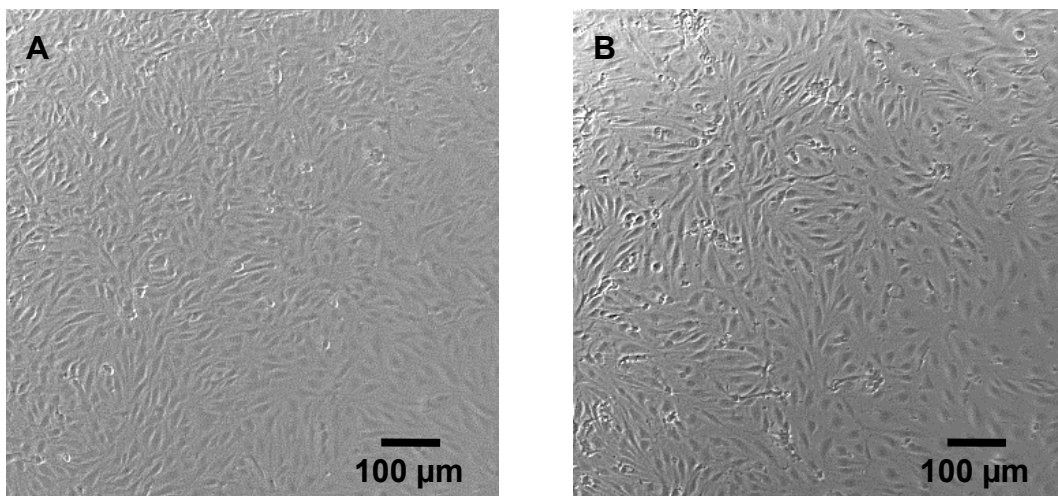


Abbildung 3.6

Passagierte und nicht passagierte Kapillarendothelzellen nach 4 Tagen in Kultur

A: passagierte Kapillarendothelzellen (Phasenkontrast)

B: nicht passagierte Kapillarendothelzellen (Phasenkontrast)

Passagierte Zellen (Bild A) weisen höhere Zelldichten auf als nicht passagierte Zellen (Bild B)
Vergrößerung 100fach

Passagierte Endothelzellen konnten bei gleicher Aussaatdichte besser an der Kulturfläche anhaften als nicht passagierte Endothelzellen (Abbildungen 3.5 und 3.6). 24 h nach der Aussaat waren fast alle passagierten Zellen adheriert im Gegensatz zu

nicht passagierten Zellen. Es befanden sich deutlich weniger passagierte Zellen im Überstand als nicht passagierte Zellen. Der Unterschied in der Zelldichte passagierter und nicht passagierter Endothelzell-Monolayer blieb über die gesamte Kultivierungsdauer von 7 Tagen bestehen. Diese Beobachtungen bestätigen Angaben von Dehouck et al. [Dehouck et al., 1990].

Die Passage und erneute Aussaat von PBCEC erfolgte mit Zellen an Tag 3 in Kultur. Diese passagierten Zellen waren somit bereits in einem fortgeschrittenen Differenzierungsstadium im Vergleich zu nicht passagierten Zellen, die direkt nach der Isolierung ausgesät wurden. Die Beobachtung unterschiedlicher Zelldichten bedingt durch unterschiedliches Adhäsionsvermögen an der Kulturfläche ist also möglicherweise auf den Differenzierungsgrad der Zellen zum Zeitpunkt der Aussaat zurückzuführen.

3.1.2.3 Kultivierung von PBCEC

Grundbedingung für Wachstum und Differenzierung von Zellen in Kultur ist eine stete Versorgung mit frischem Nährmedium. Hierdurch werden einerseits frische Nährstoffe bereitgestellt, andererseits werden in das Medium abgegebene z.T. toxische Stoffwechselprodukte entfernt. Zu häufiger Mediumwechsel allerdings kann eine mechanische Belastung für die empfindlichen Kapillarendothelzellen darstellen. Ein ausgewogenes Fütterungsschema ist daher erforderlich.

Tabelle 3.1 zeigt, nach welchem Schema bei den Nährmediumwechseln vorgegangen wurde.

Tabelle 3.1: Fütterungsschema von PBCEC

Tage in Kultur		0	1	2	3	4	5	6	7
Zellen in Primärkultur	Mediumwechsel Medium	A	+		+		+	+	V
			K+		K+		K+	K-	
Zellen mit Passage	Mediumwechsel Medium	A	+		P	+		+	V
			K+			K+		K-	

A Aussaat P Passage V Versuch + Mediumwechsel
K+ Kulturmedium, serumhaltig K- Kulturmedium, serumfrei

In der Primärkultur von Endothelzellen (keine Passage) fand der erste Mediumwechsel 24 Stunden nach der Aussaat statt. Dann wurde jeden zweiten Tag, nach 3 und 5 Tagen in Kultur, das Nährmedium gewechselt (*Tabelle 3.1: Fütterungsschema von PBCEC*, oben).

Auch bei Zellen, die einer Passage unterzogen wurden (Primärzelllinie), erfolgte der erste Mediumwechsel 24 h nach der Aussaat (*Tabelle 3.1: Fütterungsschema von PBCEC*, unten). Bei Erreichen von 75-80%iger Konfluenz nach 2-3 Tagen konnte das Passagieren durchgeführt werden. 24 h später fand der nächste Mediumwechsel der Primärzelllinie statt (4 Tage in Kultur).

Sowohl bei der Primärkultur als auch bei der Primärzelllinie wurde 24 Stunden vor Versuchsbeginn (6 Tage in Kultur) das serumhaltige Kulturmedium (K+) gegen serumfreies Kulturmedium (K-) ausgetauscht. Versuche wurden standardmäßig nach 7 Tagen Kultivierung durchgeführt.

Der Mediumwechsel musste sehr behutsam und für die Endothelzellen möglichst schonend erfolgen. Besondere Aufmerksamkeit war beim Absaugen des alten Nährmediums geboten, damit die bereits adhärenierten Zellen nicht beschädigt wurden. Bei der Zugabe des frischen Nährmediums wurde darauf geachtet, nicht direkt auf die Zellen zu pipettieren. Deshalb wurde frisches Nährmedium durch Schräghalten der Pipette langsam am Rand der Zellkulturflasche oder des Wells zugegeben.

3.1.2.4 Kulturmedien und Medienzusätze

Eine Voraussetzung für die erfolgreiche Zellkultur ist die Aufrechterhaltung differenzierter Zellen über den Zeitraum der Zellkultivierung [Kramer, 1985]. Die Zelldifferenzierung ist ein komplexer Prozess, der von vielen Faktoren beeinflusst wird. Darunter auch Kulturmedien und Medienzusätze.

Kulturmedien

Bereits 1887 unternahm Arnold erste Versuche, Zellen außerhalb des Organismus mit Körperflüssigkeiten zu kultivieren [Arnold, 1887]. Doch erst seit Harrison [Harrison, 1907], der als Begründer der modernen Gewebe- und Zellkultur gilt, wurden Zellen in verschiedensten Nährmedien gezüchtet. In aller Regel enthielten diese komplexe organische Zusätze, die chemisch nicht definiert und standardisiert waren. Das erste chemisch definierte Medium setzte Eagle 1955 ein, dessen Rezeptur jene niedermolekularen Substanzen beinhaltete, die das Wachstum mehrerer bekannter Zelllinien ermöglichten [Eagle, 1955]. Seither wurden Medien für die verschiedensten Zellarten entwickelt.

Zur Kultivierung von PBCEC wurden die Fertigmedien Medium 199 und DMEM/Ham's F-12 verwendet. Beide Medien sind standardisierte Flüssigmedien hoher Qualität, deren Zusammensetzung den erstmals eingesetzten Originalformulierungen entsprechen [Morgan et al., 1950; Dulbecco, 1959; Ham, 1965]. Sie basieren auf den Komponenten-Gruppen Aminosäuren, Kohlenhydrate, anorganische Salze und Vitamine. Die Fertigmedien wurden vom Hersteller unter EG-GMP-Bedingungen sterilfiltriert und abgefüllt. Für die Herstellung wurde Aqua ad Inyectabilia nach Ph. Eur. 2000 verwendet [Produktinformation Biochrom, 2000].

Medium 199, mit Earle's Salzen ergänzt, bietet in Kombination mit weiteren Zusätzen breite Einsatzmöglichkeiten für Zellen vieler Tierspezies. Bei der Kultivierung von Gehirnkapillarendothelzellen hat es sich bewährt [Bowman et al., 1981; Mischeck et al., 1989; Beuckmann et al., 1995; Fischer et al., 1996; Defazio et al., 1997; Franke et al., 2000; Fischer und Kissel, 2001]. Medium 199 wurde als Grundmedium zur Herstellung von Einfriermedium, Präparationsmedium, Präparationsmedium serumhaltig und Kulturmedium eingesetzt (s. 4.1.2 *Pufferlösungen, Kulturmedien und sonstige Lösungen*).

DMEM/Ham's F-12 (1:1) Flüssigmedium ist eine Kombination aus Dulbecco's MEM mit Ham's F-12 Medium zu je gleichen Teilen, die von Barnes und Sato 1980 eingeführt wurde [Barnes und Sato, 1980a]. Das Medium ist neben den üblichen Komponentengruppen besonders reich an Aminosäuren, Vitaminen und Spurenelementen und verfügt somit über einen erhöhten Nährstoffgehalt. Deshalb wurde DMEM/Ham's F-12 (1:1) als Grundmedium bei der serumfreien als auch bei der serum- und glucosfreien Kultivierung von PBCEC eingesetzt [Hoheisel, 1998].

Als Mediumzusätze wurden Pferdeserum (hitzeinaktiviert), L-Glutamin, HEPES sowie PenStrep, Gentamycin und Amphotericin B beigefügt.

Pferdeserum (hitzeinaktiviert)

Serum ist derjenige Anteil des Blutes, der nach Gerinnung des Blutes und nach Abzentrifugation des Blutkuchens übrig bleibt. Es enthält eine komplexe Mischung von Serumproteinen, Wachstumsfaktoren, Hormonen und z.T. unbekanntem Substanzen. Die Zusammensetzung variiert je nach Herkunft, Ernährungssituation und Entnahmebedingungen. Deshalb ist der Zusatz von Serum zu Kulturmedien ein viel diskutiertes Thema [Barnes und Sato, 1980a]. Vielfach wird gefordert, ganz auf Serum zu verzichten [Barnes und Sato, 1980b; Clark, 1983; Hoheisel et al., 1998] und Medien

definierter Zusammensetzung zu verwenden [Ham, 1983]. Dies ist aber nur möglich, wenn sowohl alle Serumbestandteile, als auch deren Funktion und Wirkung auf Zellen bekannt sind und vollständig ersetzt werden können [Sato, 1983]. Daher werden Seren unterschiedlichster Herkunft immer noch als universell einsetzbares Supplement in der Zellkultur verwendet, denn der Zusatz von Serum ist für die meisten Routinezüchtungen auch heute noch der einfachste, effektivste und meist auch wirtschaftlichste Weg, eine gut wachsende Zellkultur zu erhalten [Lindl und Bauer, 1994]. Die Auswahl des geeigneten Serums ist ein wichtiger Aspekt bei der Zellkultivierung, da die im Serum enthaltenen Substanzen u.a. fördernd auf Mitose und Zelldifferenzierung wirken. So regt das am häufigsten in der Zellkultur eingesetzte fötale Kälberserum (FCS) neben dem Endothelzellwachstum auch das Wachstum unerwünschter Fremdzellen an, was zu einem Überwachsen der Endothelzellkultur durch Pericyten, Astrocyten, Fibroblasten oder glatte Muskelzellen führen kann [Kummer-Fremgen, 1993; Lindl und Bauer, 1994]. Außerdem ist FCS arm an dem für Endothelzellen wichtigen Wachstumsfaktor ECGF (*endothelial cell growth factor*) [Maciag und Weinstein, 1983]. Nicht zuletzt wegen der BSE-Problematik wurde Serum vom Pferd als Mediumzusatz verwendet.

Das im Pferdeserum enthaltene ECGF fördert sowohl die Mitogenität, die Erhaltung endothelzellspezifischer Eigenschaften, als auch die Wachstumshemmung kontaminierender Zellen [Maciag et al., 1979]. Das Serum wurde vom Hersteller durch Membranfiltration sterilisiert und in Standardverfahren auf Mycoplasmenkontamination und bakterielle L-Formen untersucht. Die Hitzeinaktivierung erfolgte bei 56°C für 30 min und diente der Eliminierung wachstumshemmender Substanzen, wie z.B. Komplementfaktoren [Morgan und Darling, 1994] sowie kreuzreagierende Antikörper der Gammaglobulinfraktion [Produktinformation Biochrom, 2000]. Es wurde ausschließlich Pferdeserum einer Charge verwendet, um bereits erwähnte Schwankungen in der Zusammensetzung zu umgehen.

L-Glutamin

L-Glutamin ist in vielen Fällen die wachstumsbegrenzende Aminosäure und außerdem instabil bei 37°C [Lindl und Bauer, 1994]. L-Glutamin wird nicht nur für den Stoffwechsel verbraucht, sondern es wird sowohl nichtenzymatisch als auch enzymatisch durch Glutaminasen, die von den Zellen in das Medium abgegeben werden, zu Glutaminsäure und cytotoxischem Ammoniak abgebaut [Griffiths und Pirt, 1967].

Den Nährmedien Präparationsmedium, Präparationsmedium serumhaltig und Kulturmedium serumhaltig (K+) wurden zusätzlich 0,8 mM L-Glutamin zugefügt (insgesamt 1,5 mM L-Glutamin). Serumfreies Kulturmedium (K-) sowie glucose- und serumfreies Kulturmedium (K--) wurden mit 2 mM L-Glutamin zu insgesamt 4,5 mM L-Glutamin supplementiert.

HEPES

Die von Good et al. [Good et al., 1966] als Puffer eingeführte 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure (HEPES) wurde den Nährmedien in einer Konzentration von 10 mM zugesetzt. Für die Pufferung wird im Gegensatz zu NaHCO_3 kein CO_2 benötigt. Der pK_a -Wert von HEPES liegt mit 7,31 sehr nahe dem physiologischen pH-Wert und sorgt daher speziell in diesem Bereich für eine verbesserte Pufferung und pH-Stabilität der Zellkulturmedien.

3.1.2.5 Vermeidung von Kontaminationen durch Mikroorganismen

Die Vermeidung von Kontaminationen durch Bakterien, Pilze, Hefen, Mycoplasmen und Viren ist für jede Zellkultur von größter Bedeutung [Morgan und Darling, 1994]. Allerdings liefern gerade Nährmedien und Brutschränke ideale Wachstumsbedingungen für Mikroorganismen, bei denen sie sich innerhalb kürzester Zeit außerordentlich stark vermehren können. Wenngleich auch versucht wird, Zellkulturen antibiotikafrei zu kultivieren [Lindl und Bauer, 1994], so sind keimfreie Kulturen doch nur durch den Einsatz von Antibiotika und Antimykotika sowie eine konsequente Steriltechnik zu erreichen. Antibiotika und Antimykotika dienen hier als Ersatz für das Immunsystem des Organismus. Als Zusätze zu Nährmedien wurden die Antibiotika Pen/Strep (Penicillin/Streptomycin) und Gentamicin, sowie das Antimykotikum Amphotericin B verwendet. Die Kombination Penicillin/Streptomycin zählt zu den Standard-Antibiotika in der Zellkultur. Penicillin hemmt die Zellwandbiosynthese grampositiver Keime. Das Aminoglykosid Streptomycin erfasst grampositive wie auch gramnegative Keime. Das Spektrum des Aminoglykosids Gentamicin ist noch um Mycoplasmen erweitert. Beide Aminoglykoside wirken bakterizid durch Hemmung der Proteinbiosynthese. Amphotericin B ist ein Polyen-Antimykotikum, das Pilze, Hefen und Mycoplasmen durch Störung der Zellmembranpermeabilität abtötet. Viren stellen eine eher geringere Gefahrenquelle dar, weil sie im Gegensatz zu Bakterien und Pilzen empfindlicher

gegenüber Temperaturen und Temperaturschwankungen sind [Lindl und Bauer, 1994].

Künstliche Cerebrospinalflüssigkeit wurde mit 100 IE/ml bzw. 100 µg/ml PenStrep, 100 µg/ml Gentamicin und 2,5 µg/ml Amphotericin B versetzt. Dem für die Isolierung verwendeten Präparationsmedium und serumhaltigem Präparationsmedium wurden 100 IE/ml bzw. 100 µg/ml PenStrep und 100 µg/ml Gentamicin zugegeben. Außerdem wurden Kulturmedium (K+), Kulturmedium serumfrei (K-) sowie glucose- und serumfreiem Kulturmedium (K--) für die Kultivierung von PBCEC 100 IE/ml bzw. 100 µg/ml PenStrep zugesetzt.

Für die Herstellung sämtlicher Kulturmedien wurden ausschließlich sterile Fertigmedien und sterile Zusätze verwendet. Sämtliche Pufferlösungen und sonstigen Lösungen für die Zellkultur wurden mit bidestilliertem Wasser hergestellt und durch Filtration (Porendurchmesser 0,22 µm) sterilisiert. Glasgeräte, nicht sterile Verbrauchsmaterialien und sonstige für die Zellkultur benötigten nicht sterilen Materialien wurden im Autoklaven (30 min, 121°C, 2 bar) sterilisiert. Alle Arbeitsschritte, für die aseptisches Arbeiten erforderlich war, wurden in einer Laminar-Flow-Werkbank nach Desinfektion der Arbeitsplatte mit 70%igem Isopropanol durchgeführt [Lindl und Bauer, 1994]. Die Brutschrankinnenräume wurden alle 2 Monate mit der automatischen Desinfektions-Routine der Brutschränke bei 180°C für 3 h heißluftsterilisiert.

Durch konsequente Steriltechnik bei den Vorarbeiten zur Zellkultur, aseptisches Arbeiten sowie den Einsatz von Antibiotika konnten in der Zellkultur Kontaminationen durch Mikroorganismen erfolgreich vermieden werden.

3.1.3 Charakterisierung kultivierter PBCEC

Die Charakterisierung kultivierter Zellen ist die notwendige Voraussetzung für eine spätere Verwendung der Zellen als Zellkulturmodell. Demzufolge muss eine Charakterisierung zellspezifischer Merkmale auf jeden Fall durchgeführt werden, auch wenn dabei bereits bekannte Ergebnisse wiederholt werden [Borchardt et al., 1996; de Boer et al., 1999]. Die Charakterisierung kultivierter Zellen umfasst verschiedene Punkte, darunter Untersuchungen Zellart-spezifischer Eigenschaften zwecks Identitätsbestimmung der Zellen sowie Untersuchungen zum äußeren Erscheinungsbild und Wachstumsverhalten der Zellen in Kultur. Weiterhin können die Reinheit der Kulturen hinsichtlich Kontaminationen durch Fremdzellen sowie der Differenzie-

rungszustand untersucht werden. Als wichtiger Bestandteil der Charakterisierung kultivierter Zellen zählt der Nachweis von Enzymen sowie deren Aktivität und von anderen Markerproteinen, die im gesunden Gewebe *in vivo* exprimiert werden.

Zur Charakterisierung kultivierter cerebraler Kapillarendothelzellen vom Schwein wurden in den letzten Jahren bereits zahlreiche Untersuchungen durchgeführt. Nachgewiesen wurden die Enzyme γ -Glutamyltranspeptidase γ -GT [Mischeck et al., 1989; Meyer et al., 1990; Tontsch und Bauer, 1991; Rauh et al., 1992; Kummer-Fremgen, 1993; Fischer et al., 1996; Tewes et al., 1997; Thöle, 2000], alkalische Phosphatase ALP [Mischeck et al., 1989; Meyer et al., 1990; Rauh et al., 1992; Kummer-Fremgen, 1993; Walker et al., 1994; Beuckmann et al., 1995; Fischer et al., 1996; Tewes et al., 1997; Huwyler et al., 1998; Török et al., 1998], *angiotensin-converting-enzyme* ACE [Meyer et al., 1990; Rauh et al., 1992; Kummer-Fremgen, 1993; Huwyler et al., 1996a; Tewes et al., 1997; Török, 1999;], Lactat-Dehydrogenase LDH [Fischer et al., 1996], Na^+ - K^+ -ATPase [Tontsch und Bauer, 1991], das Phase-I-Enzym Monoaminoxidase MAO [Kummer-Fremgen, 1993], Phase-I-Monooxygenasen aus der Cytochrom P-450-Gruppe [Kummer-Fremgen, 1993] sowie das Phase-II-Enzym Glutathion-S-Transferase GT [Kummer-Fremgen, 1993].

Das Vorkommen des L-System-Carrier-Proteins für große neutrale L-Aminosäuren wurde funktionell durch Aufnahmeversuche belegt [Török, 1999]. Durch die Aufnahme von **acetyliertem *low density lipoprotein* Ac-LDL** konnte indirekt der Nachweis von LDL-Rezeptoren in der Membran kultivierter PBCEC erbracht werden [Rauh et al., 1992; Kummer-Fremgen, 1993; Fischer et al., 1996; Tewes et al., 1997]. Weitere Proteine wurden durch Western Blotting und/oder Immunfärbemethoden in kultivierten PBCEC nachgewiesen: das Zelloberflächenprotein Fibronectin [Fischer und Kissel, 2001], das Cytoskelettprotein Vimentin [Kummer-Fremgen, 1993; Huwyler et al., 1996a; Thöle, 2000; Fischer und Kissel, 2001], das *tight junction*-Protein ZO1 [Krause et al., 1991; Huwyler et al., 1998; Török et al., 1998] sowie das damit verwandte β -Catenin [Török, 1999], der Glucose-Transporter GLUT [Weiler-Güttler et al., 1989] und der *glial cell line-derived neurotrophic factor*-Rezeptor GFR α 1 [Igarashi et al., 1999]. Auch der ABC-Transporter *multidrug resistance associated protein* Mrp1 wurde in kultivierten PBCEC nachgewiesen [Gutmann et al., 1999a]. Die Expression des Sister-P-Glycoproteins sP-gp konnte zwar mittels RT-PCR im Gehirngewebe gezeigt werden, in kultivierten PBCEC dagegen war das Protein nicht nachweisbar [Török et al., 1999].

Auf Wiederholungen der bereits aufgeführten Untersuchungen wurde verzichtet. Die Charakterisierung kultivierter PBCEC wurde auf die Nachweise der wichtigsten Merkmale beschränkt. Hierzu zählen die Untersuchung von Zellwachstum und Erscheinungsbild kultivierter PBCEC, die Prüfung auf Kontamination durch Fremdzellen, Aktinfärbungen kultivierter PBCEC und Immunfärbungen des Markerproteins von-Willebrand-Faktor sowie der ABC-Transporter Mrp2 und P-glycoprotein.

3.1.3.1 Zellwachstum und Erscheinungsbild kultivierter PBCEC

Zellwachstum und Erscheinungsbild kultivierter PBCEC sind ein wichtiges Kriterium zur Beurteilung des Wachstumsverhaltens und der Entwicklung der Zellen, sowie deren Identifizierung als cerebrale Kapillarendothelzellen [Abbott et al., 1992].

Abbildung 3.7 zeigt cerebrale Kapillarendothelzellen vom Schwein in unterschiedlichen Entwicklungsstadien. Die Zellen wurden direkt nach der Isolierung mit einer Aussaatdichte von 250.000 Zellen/cm² auf die beschichtete Kulturfläche von Objektträgerkammern ausgesät. Nach 1, 3, 5, 7 und 9 Tagen in Kultur wurden Zellwachstum und Erscheinungsbild der Zellen dokumentiert.

24 Stunden nach der direkten Aussaat frisch isolierter PBCEC erfolgte der erste Mediumwechsel. Nur wenige nicht adherierte Zellen wurden dadurch entfernt, der Großteil der Zellen haftete bereits an der Kulturfläche. In Abbildung 3.7, Bild A sind deutlich „Zell-Inseln“ auf der teilweise noch unbewachsenen Kulturfläche zu erkennen. Zellwachstum ging hauptsächlich von diesen als Zellcluster bezeichneten Zellverbänden aus und verlief nach einem radial angeordneten Muster. An Tag 1 in Kultur war die für cerebrale Kapillarendothelzellen typisch längliche Spindelform nur ansatzweise erkennbar, nach 3 Tagen in Kultur jedoch bei allen Zellen deutlich ausgeprägt (Abbildung 3.7, Bild B). Anordnung und Ausrichtung der Zellen, sowie Abgrenzungen zu Nachbarzellen wurden sichtbar. Nach 5 Tagen in Kultur zeigte sich ein lückenloser, konfluenter Zellrasen mit dicht aneinander gewachsenen Zellen (Abbildung 3.7, Bild C). Die Form von PBCEC war schmal und langgezogen, von der durch den Zellkern hervorgerufenen bauchigen Mitte nach beiden Enden spitz zulaufend. PBCEC in Kultur waren 50-120 µm lang und 5-20 µm breit (Abbildung 3.7, Bild D), was früheren Angaben entspricht [Abbott et al., 1992]. Weiteres Größenwachstum erfolgte nicht. Die Differenzierung war mit Erreichen eines konfluenten Monolayers nach einer Kultivierungsdauer von 5-7 Tagen abgeschlossen (Abbildung 3.7, Bild D).

Bei weiterer Kultivierung der PBCEC bildeten sich stellenweise Löcher in den Endothelzell-Monolayern. Dies war im Lichtmikroskop nach 9 Tagen in Kultur, wie in Abbildung 3.7, Bild E (Pfeile), zu beobachten.

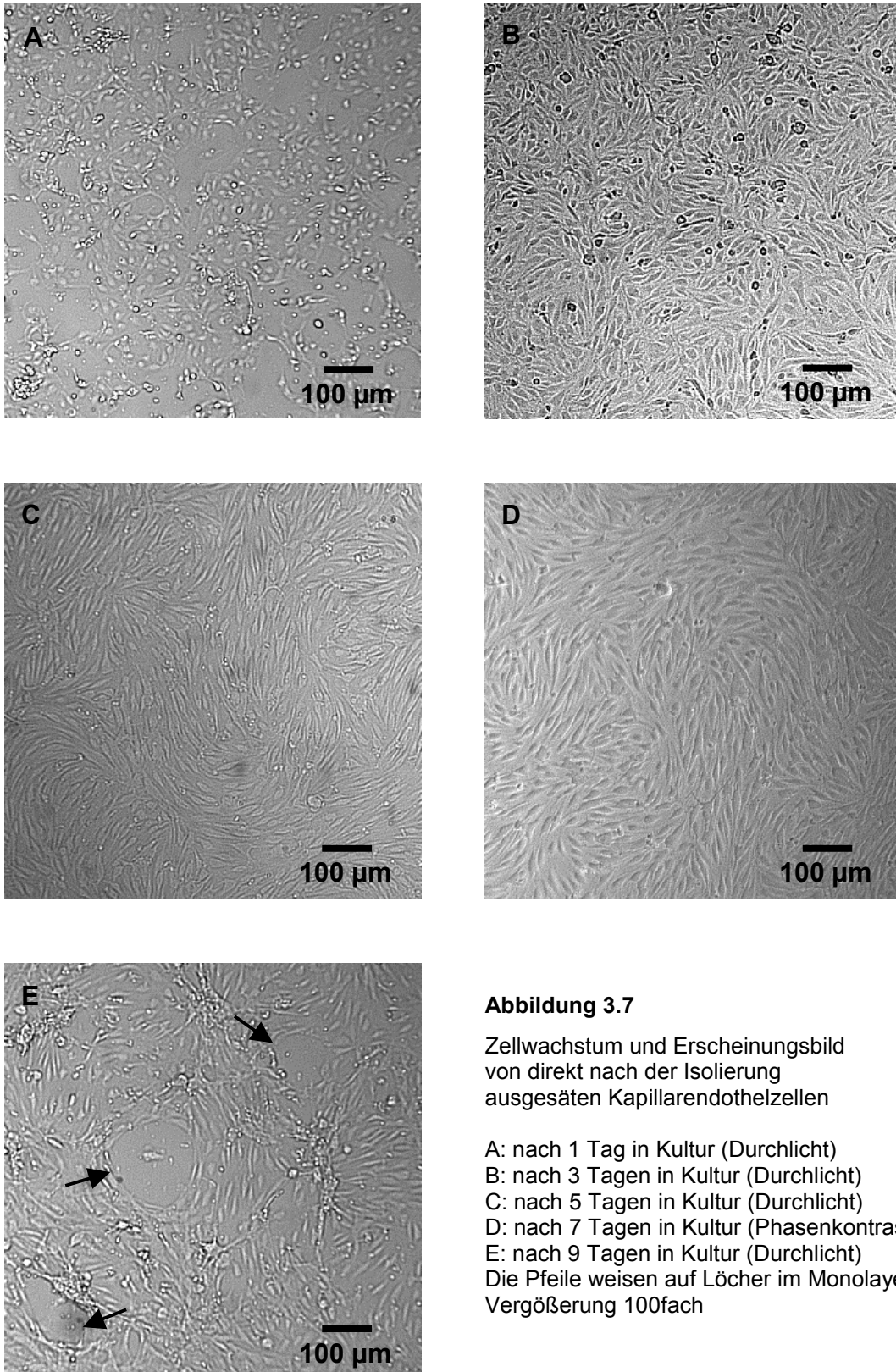


Abbildung 3.7

Zellwachstum und Erscheinungsbild von direkt nach der Isolierung ausgesäten Kapillarendothelzellen

A: nach 1 Tag in Kultur (Durchlicht)
 B: nach 3 Tagen in Kultur (Durchlicht)
 C: nach 5 Tagen in Kultur (Durchlicht)
 D: nach 7 Tagen in Kultur (Phasenkontrast)
 E: nach 9 Tagen in Kultur (Durchlicht)
 Die Pfeile weisen auf Löcher im Monolayer
 Vergrößerung 100fach

Bei der täglichen Routine-Kontrolle der PBCEC-Kulturen per Lichtmikroskop konnte ein besseres Wachstumsverhalten direkt nach der Isolierung ausgesäter Zellen im Vergleich zu zwischendurch kryokonservierten Zellen festgestellt werden. Zellen, die nach einer Kryokonservierungsphase ausgesät wurden, wiesen gegenüber direkt ausgesäten Zellen eine verzögerte Entwicklung auf. Die für Endothelzellen typische Spindelform konnte im Ansatz erst am zweiten Tag nach der Aussaat beobachtet werden und war erst nach 4-5 Tagen in Kultur deutlich ausgeprägt. Erst nach 5-7 Tagen war vollständige Konfluenz des PBCEC-Monolayers erreicht.

Die durch die Kryokonservierung bedingte Entwicklungsverzögerung hatte zur Folge, dass eine Passage der Zellen erst nach 3 Tagen in Kultur möglich war. Dagegen konnten direkt nach der Isolierung ausgesäte Zellen bereits nach 2 Tagen passagiert werden. Nach dem Passagieren waren keine Unterschiede mehr zwischen direkt ausgesäten Zellen und zwischendurch eingefrorenen Zellen zu erkennen.

Durch die Untersuchung von Zellwachstum und Erscheinungsbild kultivierter PBCEC konnte ein gutes Wachstumsverhalten cerebraler Kapillarendothelzellen in Kultur gezeigt werden. Bis zum Erreichen eines konfluenten Monolayers fanden Wachstum und Bewegung der Zellen statt, danach gelangte der Differenzierungsprozess durch Kontakthemmung zum Stillstand [Holley, 1975; Gitlin und D'Amore, 1983; Wieser et al., 1990; Aoki et al., 1991; Reiners et al., 1992]. Auch das Auftreten von Löchern im Zell-Monolayer durch sich ablösende Endothelzellen kann durch Stagnation der Differenzierung begründet werden und wurde bereits vorher beschrieben [Rim et al., 1986; Krause et al., 1991; Abbott et al., 1992; Raub et al., 1992; Audus et al., 1996; Tewes et al., 1997]. Deshalb wurden Experimente mit PBCEC-Monolayern nach 7 Tagen in Kultur durchgeführt. Das beobachtete Zellwachstum und Erscheinungsbild kultivierter PBCEC entspricht dem wie bereits vorher beschrieben [Mischeck et al., 1989; Pardridge et al., 1990; Meyer et al., 1991; Abbott et al., 1992; Kummer-Fremgen, 1993; Tewes et al., 1997; Török et al., 1998; Thöle, 2000; Fischer und Kissel, 2001].

3.1.3.2 Untersuchung von PBCEC auf Kontamination durch Fremdzellen

Bei einer Primärkultur handelt es sich um die Kultivierung direkt aus Geweben oder Organen entnommener Zellen [Lindl und Bauer, 1994; Morgan und Darling, 1994]. Aufgrunddessen kommen Kontaminationen durch Fremdzellen in der Primärkultur wesentlich häufiger vor als bei Kulturen von Zelllinien [Lindl und Bauer, 1994; Morgan und Darling, 1994]. Deswegen ist die Untersuchung kultivierter PBCEC auf Kontamination durch Fremdzellen ein wichtiger Bestandteil bei der Charakterisierung von PBCEC-Kulturen. Konkurrierende Fremdzellen in einer Zellkultur cerebraler Kapillarendothelzellen können Fibroblasten, glatte Muskelzellen sowie Pericyten und Astrocyten sein [Bowman et al., 1981; Abbott et al., 1992; Eddy et al., 1997; Cecchelli et al., 1999; Lund, 1999]. Abbildung 3.8 zeigt Kontaminationen durch Fremdzellen in Primärkulturen von PBCEC.

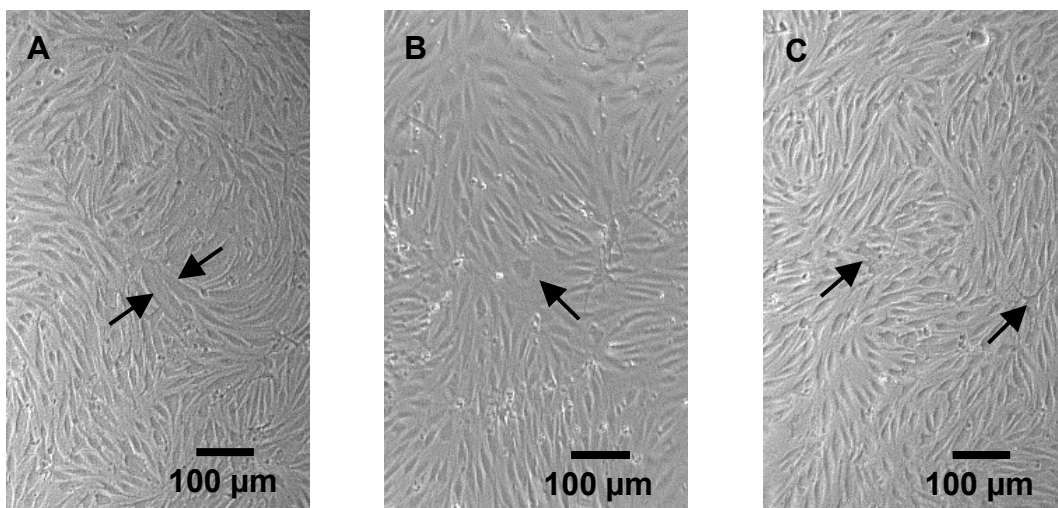


Abbildung 3.8

Kontaminationen von primärkultivierten PBCEC-Monolayern durch Fremdzellen (Pfeile)
 A: PBCEC nach 5 Tagen in Kultur, Pfeile weisen auf Fibroblasten (Phasenkontrast)
 B: PBCEC nach 5 Tagen in Kultur, Pfeil weist auf eine einzelne glatte Muskelzelle (Phasenkontrast)
 C: PBCEC nach 9 Tagen in Kultur, Pfeile weisen auf Pericyten (Phasenkontrast)
 Vergrößerung 100fach

Untersuchung kultivierter PBCEC auf Kontamination durch Fibroblasten

Fibroblasten sind junge, noch nicht ausgereifte, abgeflachte Zellen unregelmäßiger Struktur mit Zellfortsätzen, die neben Fibrocyten zu den fixen (ortständigen) Bindegewebszellen gehören und Extrazellulärsubstanz (Fasern und amorphe Grundsubstanz des Bindegewebes) bilden können. Sie sind an der Regeneration vieler Gewebe beteiligt und kommen ubiquitär vor [Thews et al., 1999]. Deswegen stellen Fibro-

blasten für Primärkulturen eine der häufigsten Kontaminationsquellen durch Fremdzellen dar [Lund, 1999]. Wegen ihrer nur geringen Anforderungen an Kulturbedingungen sowie ihrer kurzen Verdoppelungszeit wirken sich Fibroblasten besonders störend aus, da es zur Überwucherung der Zellkultur kommen kann [Morgan und Darling, 1994]. Aufgrund ihrer Morphologie können Fibroblasten allerdings deutlich von Endothelzellen unterschieden und somit in einer Kultur ausgemacht werden [Abbott et al., 1992]. Abbildung 3.8, Bild A zeigt Endothelzellen nach 5 Tagen in Kultur. Die Pfeile weisen auf Kontaminationen durch Fremdzellen. Es handelt sich aufgrund der Größe und der Zellmorphologie wahrscheinlich um Fibroblasten. Über eine mikroskopische Kontrolle hinaus wurden keine weiteren Untersuchungen gemacht, da es sich hierbei nur um Einzelfälle handelte.

Untersuchung kultivierter PBCEC auf Kontamination durch glatte Muskelzellen

Kontaminationen von PBCEC-Kulturen durch glatte Muskelzellen haben ihren Ursprung durch die Anwesenheit peripherer Blutgefäße der Hirnhäute, weil diese mit glatten Muskelzellen zur Regulation ihres Gefäßdurchmessers umgeben sind [Schor und Schor, 1986; Thews et al., 1999]. Vereinzelt konnten glatte Muskelzellen beobachtet werden (Abbildung 3.8, Bild B, Pfeil), die sich durch ihre polygonale „Pflasterstein-Form“ morphologisch deutlich von Endothelzellen unterscheiden [Mazurkowitz et al., 1980; Thyberg, 1996]. Da periphere Blutgefäße während der Isolierung weitestgehend zerstört und entfernt wurden [Lund, 1999], kamen glatte Muskelzellen nur selten in PBCEC-Kulturen vor. Weitergehende Untersuchungen wie der Nachweis des muskulären α -Aktins [Herman und D'Amore, 1985; Fischer et al., 1996] wurden nicht durchgeführt.

Untersuchung kultivierter PBCEC auf Kontamination durch Pericyten

Pericyten sind *in vivo* cerebralen Kapillarendothelzellen direkt aufgelagert und mit ihnen über die Basalmembran verwachsen [Goldstein und Betz, 1986; Schor und Schor, 1986; Schlosshauer, 1993]. Deshalb sind Pericyten nur schwer bei der Isolierung von PBCEC zu entfernen und stellen die Hauptursache für Kontaminationen kultivierter PBCEC durch Fremdzellen dar [Carson und Haudenschild, 1986; Rupnick et al., 1988; Méresse et al., 1989; Risau et al., 1990].

Török stellte fest, dass es bei niedrigen Aussaatdichten von Gehirnkapillarendothelzellen (50.000-100.000 Zellen/cm²) zu einem Überwachsen der Endothelzellkultur mit

Pericyten kommen kann, was jedoch durch hohe Aussaatdichten (125.000-400.000 Zellen/cm²) verhindert wird [Török, 1996]. Außerdem führt die Anwesenheit von Pferdeserum im Kulturmedium zu einer Wachstumsverzögerung von Pericyten gegenüber Endothelzellen, so dass Pericyten-Kontaminationen erst nach 9-10 Tagen in Kultur zu erkennen sind [Krause et al., 1991; Török, 1996].

Bei der lichtmikroskopischen Kontrolle nach der Isolierung von PBCEC konnten keine Pericyten beobachtet werden. Abbildung 3.8, Bild C (Pfeile) zeigt vermutlich Pericyten in einer PBCEC-Kultur nach 9 Tagen in Kultur. Sowohl Größe als auch die unregelmäßige Morphologie mit den spitzen Zellfortsätzen deuten auf Pericyten hin [Schor und Schor, 1986; Abbott et al., 1992]. Da die Aussaatdichte von PBCEC standardmäßig bei 250.000 Zellen/cm² lag, Versuche bereits nach 7 Tagen durchgeführt wurden und das verwendete Kulturmedium Pferdeserum enthielt, waren Pericyten nur selten in der Kultur zu finden. Dies zeigt auch, dass die angewandte Methode zur Isolierung von PBCEC geeignet ist, um eine Pericyten-freie Kapillarendothelzellkultur zu erhalten. Vor allem die Collagenase-Dispase-Inkubation, bei der die Basalmembran aufgelöst wurde und den Endothelzellen aufgelagerte Pericyten beseitigt wurden, spielt hierbei eine entscheidende Rolle [Bowman et al., 1981; Miller et al., 1992; Audus et al., 1996; Garberg, 1998; Tilling et al., 1998]. Da es sich um Einzelfälle handelte wurde auf weitere Untersuchungen wie Immunfärbungen des für Pericyten spezifischen nicht-muskulären Myosins [Joyce et al., 1985] oder des muskulären α -Aktins [Herman und D'Amore, 1985; Fischer et al., 1996] verzichtet.

Untersuchung kultivierter PBCEC auf Kontamination durch Astrocyten

Cerebrale Kapillaren sind *in vivo* fast vollständig von Astrocytenendfüßchen bedeckt (s. Abbildung Einleitung) [Goldstein und Betz, 1986; Schlosshauer, 1993; Golden und Pardridge, 1999]. Aufgrund dieser räumlichen Nähe sind Astrocyten, ähnlich wie Pericyten, nur schwer bei der Isolierung von PBCEC zu entfernen und stellen eine weitere Kontaminationsquelle kultivierter PBCEC durch Fremdzellen dar. Kontaminationen durch Astrocyten sind immunhistochemisch mit Antikörpern gegen das Astrocyten-spezifische Protein GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) nachweisbar [Bignami et al., 1972; Uyeda et al., 1972; White et al., 1981].

Für die Immunfärbung von GFAP erfolgte die Aussaat von PBCEC mit 250.000 Zellen/cm² auf die beschichtete Kulturfläche von Objektträgerkammern. Nach Fixierung und Permeabilisierung der Zellen sowie dem Blocken unspezifischer Adsorptions-

stellen wurde zunächst mit Primär-Antikörper und Propidiumiodid, dann mit FITC-markiertem Sekundär-Antikörper inkubiert. Die Negativ-Kontrollen wurden nur mit Propidiumiodid und Sekundär-Antikörper behandelt. Die Untersuchung der Zellen erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie. Abbildung 3.9 zeigt Positiv- und Negativ-Kontrolle nach indirekter Immunfärbung von GFAP bei 7 Tage alten PBCEC-Kulturen. Zellkerne wurden mit Propidiumiodid rot angefärbt.

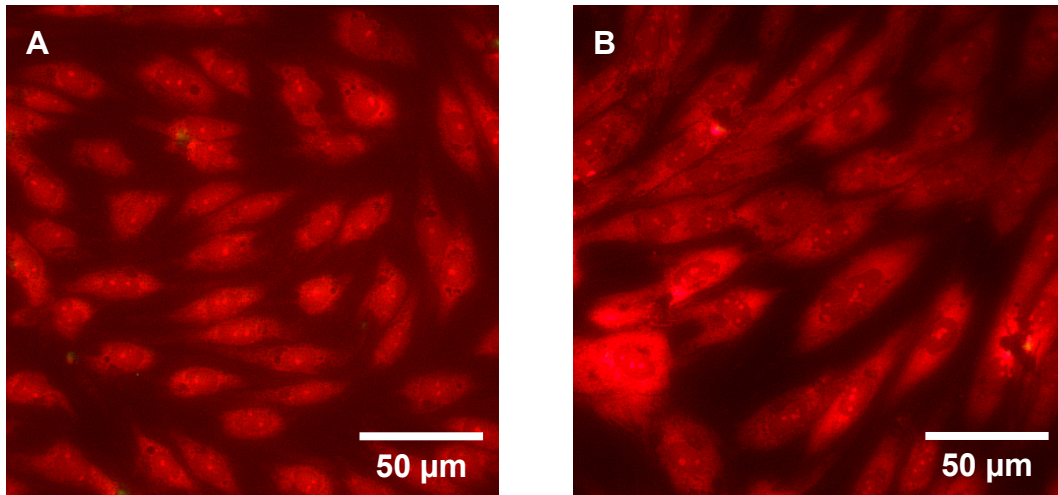


Abbildung 3.9

Immunfärbung von GFAP bei PBCEC-Monolayern nach 7 Tagen in Kultur

A: Positiv-Kontrolle

B: Negativ-Kontrolle

Zellkerne wurden mit Propidiumiodid rot gefärbt

Vergrößerung 400fach

Nach 7 Tagen in Kultur war keine grüne Immunfluoreszenz in PBCEC-Kulturen zu beobachten (Abbildung 3.9, Bild A). Es waren nur die mit Propidiumiodid rot angefärbten Zellkerne der Endothelzellen zu sehen. Aus dem Vergleich von Positiv- und Negativ-Kontrolle (Abbildung 3.9, Bilder A und B) muss die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die Immunfärbung des Astrocyten-spezifischen GFAP negativ war. Dieses Ergebnis belegt die Reinheit der Kapillarendothelzellkulturen, die nicht mit Astrocyten verunreinigt sind. Das Ergebnis wird durch Angaben bestätigt, wonach Kontaminationen von PBCEC-Primärkulturen durch Astrocyten weniger als 1% ausmachen und daher vernachlässigbar sind [Kummer-Fremgen, 1993; Fischer et al., 1996; Fischer und Kissel, 2001].

Die nur sehr selten und vereinzelt gefundenen Fremdzellen in PBCEC-Primärkulturen deuten auf minimale Kontamination durch Fibroblasten, glatte Mus-

kelzellen sowie Pericyten und Astrocyten hin. Dies hängt von unterschiedlichen Faktoren ab.

Zum einen belegen die Ergebnisse eine sorgfältige Arbeitsweise bei der Präparation der Hirne zur Isolierung von PBCEC. Durch das gründliche Entfernen der Hirnhäute sowie der peripheren Blutgefäße wurden assoziierte Fibroblasten und glatte Muskelzellen effektiv beseitigt. Die Reinheit einer PBCEC-Primärkultur hängt zum anderen entscheidend von der Isolierungsmethode ab [Garberg, 1998]. Um Verunreinigungen durch konkurrierende Fremdzellen von vorneherein auf ein Minimum zu beschränken, ist die richtige Methode zur Isolierung von PBCEC zu wählen [Abbott et al., 1992]. Aufgrund der nur selten und vereinzelt auftretenden Kontaminationen durch Astrocyten und Pericyten hat sich die rein enzymatische Isolierungsmethode als geeignet erwiesen, da durch die Collagenase-Dispase-Inkubation die Basalmembranen cerebraler Kapillaren aufgelöst wurden, und Astrocyten sowie Pericyten von den Endothelzellen getrennt wurden. Weiterhin haben das mit Pferdeserum supplementierte Kulturmedium durch verzögertes Pericytenwachstum [Török, 1996] sowie das Passagieren von PBCEC zu einer verbesserten Reinheit der Endothelzell-Monolayer geführt [Abbott et al., 1992; Tewes et al., 1997; Hoheisel et al., 1998; Tilling et al., 1998; Gumbleton and Audus, 2001].

3.1.3.3 Aktinfärbung kultivierter PBCEC

In vielen Eukaryontenzellen ist Aktin das häufigste Protein. Es ist auf das ganze Cytoplasma verteilt und liegt monomer als G-Aktin vor (globuläres Aktin), das zu F-Aktin (filamentöses Aktin) polymerisiert. Durch assoziierte Proteine werden Aktin-Filamente zu einem dreidimensionalen Gerüst geflochten, das die ganze Zelle durchzieht und der inneren Stabilisierung durch Ausbildung des Cytoskeletts dient [Pollard und Cooper, 1986]. Das Cytoskelett ist direkt verantwortlich für Bewegungsabläufe und Formänderungen während der Entwicklung von Zellen sowie für intrazelluläres Trafficking. Diese verschiedenartigen Aktivitäten des Cytoskeletts hängen zu einem großen Teil von den Aktin-Filamenten ab [Alberts et al., 1995]. So werden die Bildung und Regulation von tight junctions über die Aktin-Filamente des Cytoskeletts gesteuert, was direkte Auswirkungen auf die parazelluläre Dichtigkeit kultivierter PBCEC hat [Staddon und Rubin, 1996; Staddon und Rubin, 1999; Török, 1999]. Während Zellwachstum und Erscheinungsbild von Zellen lediglich Aussagen

über Wachstumsverhalten und äußere Strukturmerkmale erlauben, können mit Aktinfärbungen auch Aussagen über die innere Struktur und somit über den Differenzierungszustand von Zellen gemacht werden [Rubin et al., 1991; Biegel et al., 1995; Audus et al., 1996; Cecchelli et al., 1999; de Boer et al., 1999].

Für Aktinfärbungen erfolgte die Aussaat von PBCEC direkt nach der Isolierung mit 250.000 Zellen/cm² auf die beschichtete Kulturfläche von Objektträgerkammern. Nach 1, 3, 5, 7 und 9 Tagen in Kultur erfolgten Fixierung und Permeabilisierung der Zellen, anschließend wurde mit Phalloidin-FITC und Propidiumiodid inkubiert. Mittels Fluoreszenzmikroskopie konnten Aktingerüst und Zellkerne sichtbar gemacht werden. Im Fluoreszenzmikroskop erschienen Phalloidin-FITC-markierte Aktin-Filamente grün, mit Propidiumiodid markierte Zellkerne waren orange-rot (Abbildung 3.10).

Bild A in Abbildung 3.10 zeigt einen Zellcluster 24 h nach der Aussaat von PBCEC. Die Kulturfläche war zu diesem Zeitpunkt teilweise noch unbewachsen. Ansatzweise war bereits die für Endothelzellen typische Spindelform erkennbar. Mit Propidiumiodid-markierte Zellkerne traten deutlich hervor, filamentöse Aktin-Strukturen waren nicht zu erkennen, dagegen aber punktförmige Grünfärbung, was auf die globuläre Aktin-Form hindeutet. Zellabgrenzungen waren nur leicht ausgebildet. Nach 3 Tagen in Kultur (Abbildung 3.10, Bild B) war der PBCEC-Monolayer fast vollständig ausgebildet, es konnten nur noch wenige Lücken im Zellrasen gefunden werden. Die Zellmorphologie war nun deutlich spindelförmig.

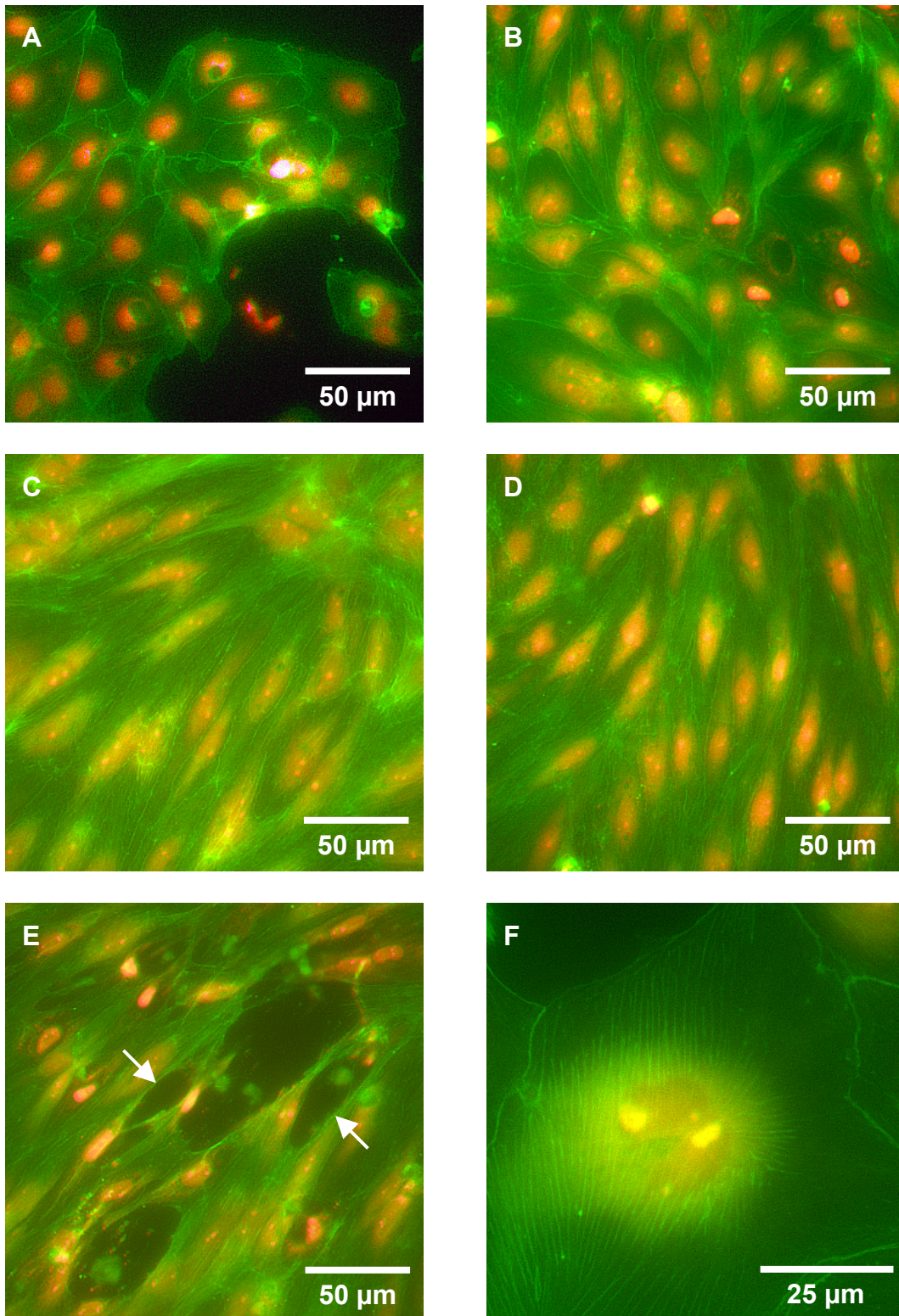


Abbildung 3.10

Aktinfärbung von PBCEC

A: nach 1 Tag in Kultur

B: nach 3 Tagen in Kultur

C: nach 5 Tagen in Kultur

D: nach 7 Tagen in Kultur

E: nach 9 Tagen in Kultur (Pfeile weisen auf Löcher)

F: Zellteilung nach 3 Tagen in Kultur (Vergrößerung 1000fach)

Vergrößerung 400fach

Die stärkere Grünfluoreszenz, hervorgerufen durch mehr gebundenes Phalloidin-FITC, weist auf die Bildung von F-Aktin hin, was durch die ersten sichtbaren Aktin-Filamente deutlich wird. Nach 5 Tagen in Kultur war ein konfluenten Monolayer ausgebildet (Abbildung 3.10, Bild C). Auffällig ist die stärker intensive Grünfärbung durch das Phalloidin-FITC-markierte F-Aktin. Klar zu erkennen sind die Endothelzell-spezifische Spindelform sowie Aktin-Filamente, die die Zellen durchziehen und das Cytoskelett bilden. Mit Erreichen eines konfluenten PBCEC-Monolayers nach 5-7 Tagen in Kultur hörten Wachstum und Bewegung der Zellen auf, die Differenzierung war abgeschlossen. Die Endothelzellen waren zu diesem Zeitpunkt 5-20 µm breit und 50-120 µm lang. Wie schon bei der Untersuchung von Zellwachstum und Erscheinungsbild kultivierter PBCEC sind auch bei den Aktinfärbungen nach 9 Tagen in Kultur Löcher im Zellrasen zu beobachten. Teilweise sind einzelne Zellen aus dem Monolayer herausgelöst (Abbildung 3.10, Bild E, Pfeile). Bild F in Abbildung 3.10 zeigt eine sich teilende Zellen nach 3 Tagen in Kultur, was gute Kulturbedingungen bestätigt und Zellproliferation beweist. Zellteilungen waren bis zum Erreichen eines konfluenten Monolayers an Tag 5 in Kultur zu beobachten, was zu einem späteren Zeitpunkt in Kultur aufgrund Kontakthemmung nicht mehr der Fall war.

Deutlich ist die Korrelation zwischen der Untersuchung von Zellwachstum und Erscheinungsbild kultivierter PBCEC (3.1.3.1 *Zellwachstum und Erscheinungsbild kultivierter PBCEC*) und den Experimenten zur Aktinfärbung kultivierter PBCEC zu erkennen. Durch die Aktinfärbung kultivierter PBCEC konnte zusätzlich gezeigt werden, dass das aufgrund der Isolierung von PBCEC zerstörte Cytoskelett nach der Aussaat der Zellen wieder aufgebaut wird. Hierzu bedarf es einer Kultivierungsdauer von etwa 5 Tagen, bis aus G-Aktin (Abbildung 3.10, Bild A) vollständig ausgebildete Aktin-Filamente vorliegen (Abbildung 3.10, Bilder C und D) und eine Neubildung sowie Neuorientierung des Cytoskeletts stattgefunden hat. Des Weiteren wurde bestätigt, dass nach Erreichen eines konfluenten Monolayers Wachstum und Bewegung der Zellen durch Kontakthemmung aufhören und der Differenzierungsprozess zum Stillstand kommt, was die Aktinfärbung kultivierter PBCEC nach 5 und 7 Tagen in Kultur beweisen. Damit lässt sich auch der bei weiterer Kultivierung von PBCEC eintretende Verlust der Dichtigkeit erklären, der durch sich ablösende Endothelzellen zustande kommt. Es konnte bestätigt werden, dass Permeationsversuche mit PBCEC-Monolayern nach 7 Tagen in Kultur durchgeführt werden müssen.

3.1.3.4 Immunfärbung des von-Willebrand-Faktors

Der von-Willebrand-Faktor (vWF, Faktor VIII der Blutgerinnungskaskade) ist ein Glycoprotein, das nur in Endothelzellen gebildet [Jaffe et al., 1974] und dort in speziellen Organellen, den Weibel-Palade-Körpern gespeichert und konzentriert wird [Wagner et al., 1982]. Da der von-Willebrand-Faktor als der Marker mit der höchsten Spezifität für Endothelzellen gilt [Bowman et al., 1983], dient er zu deren Identifizierung [Jaffe et al., 1973b] sowie zum Nachweis endothelzell-spezifischer Eigenschaften cerebraler Kapillarendothelzellen *in vitro* [Bowman et al., 1981].

Für die Immunfärbung des von-Willebrand-Faktors wurden Kapillarendothelzellen mit einer Dichte von 250.000 Zellen/cm² auf die beschichtete Kulturfläche von Objektträgerkammern ausgesät. PBCEC wurden zunächst fixiert und permeabilisiert, nach dem Blocken dann mit Primär-Antikörper und Propidiumiodid, anschließend mit FITC-markiertem Sekundär-Antikörper inkubiert. Die Negativ-Kontrollen wurden nur mit Propidiumiodid und Sekundär-Antikörper behandelt. Die Untersuchung der Zellen erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie. Abbildung 3.11 zeigt Positiv-Kontrollen (Bilder A, C und E) und Negativ-Kontrollen (Bilder B, D und F) von PBCEC an Tag 3, 5 und 7 in Kultur nach indirekter Immunfärbung des von-Willebrand-Faktors, der grün erscheint. Zellkerne sind mit Propidiumiodid orange-rot gefärbt.

Abbildung 3.11 zeigt die Bilder der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung von PBCEC nach indirekter Immunfärbung des von-Willebrand-Faktors. Die Negativ-Kontrollen (Abbildung 3.11, Bilder B, D und F) dienen zum Vergleich. Bereits nach 3 Tagen in Kultur war eine deutliche Grünfluoreszenz des noch sub-konfluenten PBCEC-Monolayers, hervorgerufen durch die Immunfärbung des von-Willebrand-Faktors mit FITC-markiertem Sekundär-Antikörper, zu beobachten (Abbildung 3.11, Bild A). Ab Tag 5 in Kultur wurde die für Endothelzellen charakteristische, granulär um die Zellkerne verteilte Immunfluoreszenz sichtbar (Abbildung 3.11, Bild C) [Jaffe et al., 1973b]. Noch deutlicher ist die Verteilung der punktförmigen Grünfluoreszenz um die Zellkerne von PBCEC nach 7 Tagen in Kultur bei 1000facher Vergrößerung in Abbildung 3.11, Bild E zu sehen. Bei den Granula handelt es sich wahrscheinlich um Endothelzell-spezifische Weibel-Palade-Körper [Weibel und Palade, 1964], die den in Endothelzellen synthetisierten vWF speichern [Wagner et al. 1982].

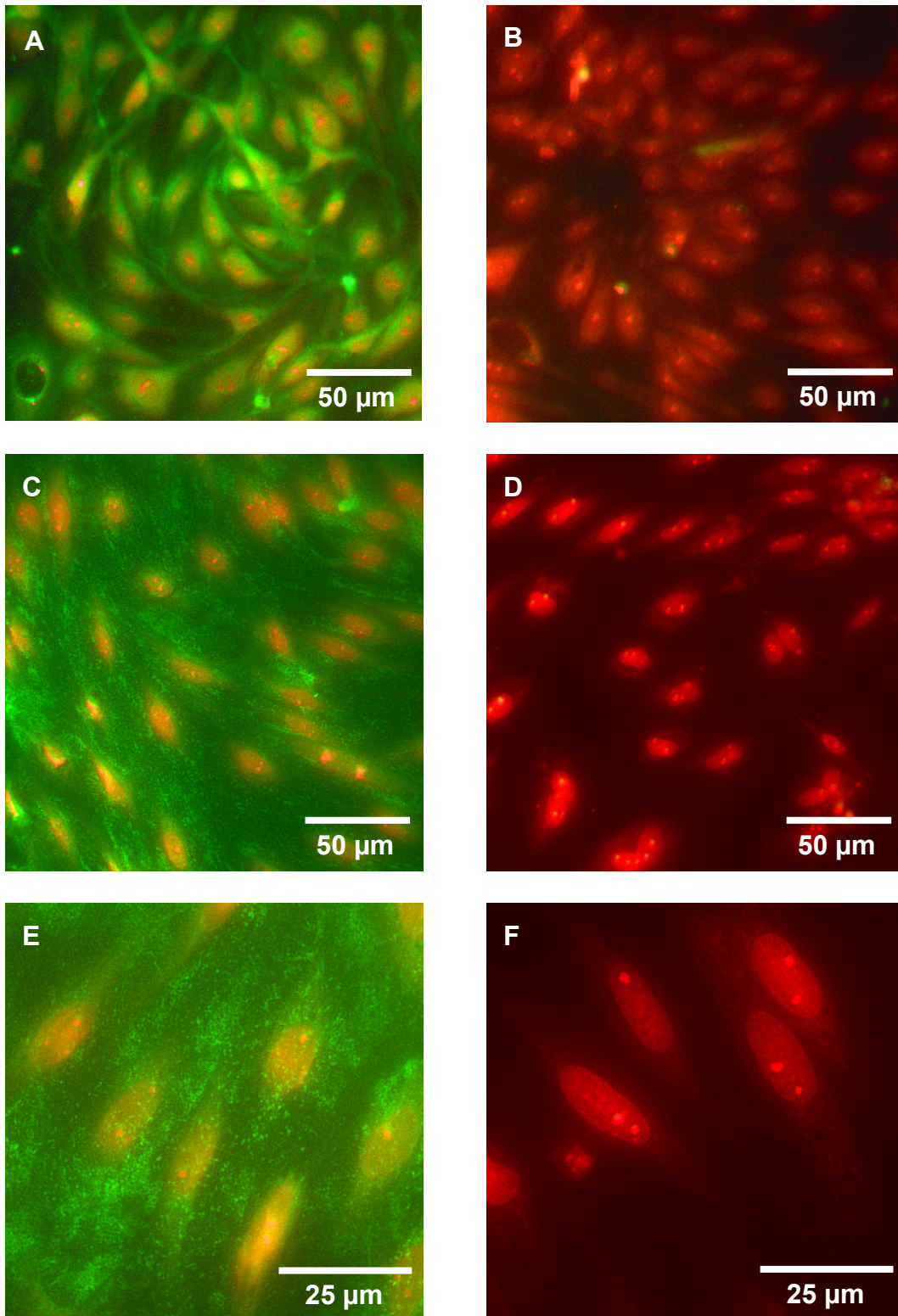


Abbildung 3.11

Immunfärbung des von-Willebrand-Faktors in kultivierten PBCEC

A, B: nach 3 Tagen in Kultur

C, D: nach 5 Tagen in Kultur

E, F: nach 7 Tagen in Kultur (Vergrößerung 1000fach)

Positiv-Kontrollen: A, C, E

Negativ-Kontrollen: B, D, F

Vergrößerung 400fach

Der von-Willebrand-Faktor war im Zeitraum von Tag 3 bis Tag 7 der PBCEC-Kultur durch Immunfärbung und Fluoreszenzmikroskopie nachweisbar (Abbildung 3.11, Bilder A, C und E). Die positive Immunfärbung des endothelzell-spezifischen von-Willebrand-Faktors belegt, dass PBCEC ihre endothelialen Eigenschaften in Kultur beibehalten, wenngleich dies nicht für alle Endothelzell-Marker gilt [Mischeck et al., 1989; Tontsch und Bauer, 1989; Meyer et al., 1990; Beuckmann et al., 1995]. Die leichte Zunahme der Fluoreszenz deutet auf weitere Expression des vWF in den Endothelzellen über die Kulturdauer von 7 Tagen hin. Des Weiteren schließt die Immunfärbung des vWF als Marker mit der höchsten Spezifität für Endothelzellen [Bowman et al., 1983] Kontaminationen durch nicht-endotheliale Fremdzellen wie Fibroblasten, glatte Muskelzellen, Pericyten und Astrocyten eindeutig aus, da diese keine Weibel-Palade-Körper enthalten und somit negative Immunfärbungen auf vWF ergeben würden [Jaffe et al., 1973a; Folkman et al., 1979; Buzney et al., 1983; Gitlin und D'Amore, 1983]. Die Ergebnisse stimmen mit denen anderer überein [Mischeck et al., 1989; Rauh et al., 1992; Kummer-Fremgen, 1993; Walker et al., 1994; Beuckmann et al., 1995; Huwyler et al., 1996a; Thöle, 2000; Fischer und Kissel, 2001]. Allerdings gibt es Hinweise, wonach der von-Willebrand-Faktor zur Charakterisierung kultivierter PBCEC nicht geeignet sei, da die Fähigkeit cerebraler Kapillarendothelzellen zur Synthese des vWF in Kultur verloren gehen soll [Tontsch und Bauer, 1989].

3.1.3.5 Immunfärbung des ABC-Transporters Mrp2

Im Hinblick auf die Bioverfügbarkeit ZNS-wirksamer Arzneistoffe im Gehirn ist die Anwesenheit von Arzneistoff-Transportern in der Blut-Hirn-Schranke von großer Bedeutung, weil diese als limitierender Faktor für den Arzneistoff-Übergang vom Blut in das Hirngewebe verantwortlich sein können [de Boer et al., 1998; Sugiyama et al., 1999; Terasaki und Hosoya, 1999]. Deshalb konzentriert sich das Forschungsinteresse auch auf die verschiedenen Transportproteine der Mrp-Gruppe (*multidrug resistance associated protein*) [Borst et al., 1997; Sarkadi und Müller, 1997; Cole und Deeley, 1998]. Der Fokus hierbei ist auf die Transporter Mrp1 und Mrp2 sowie deren Rolle in der Blut-Hirn-Schranke gerichtet [Kusuhara et al., 1998b; Seetharaman et al., 1998a; Zhang et al., 2000]. Da Mrp1 in Zelllinien bereits hinlänglich erforscht [Hipfner et al., 1999; Sugiyama et al., 1999] und in Zusammenarbeit mit anderen Gruppen in kultivierten PBCEC bereits nachgewiesen wurde [Gutmann et al., 1999a], galt das Augenmerk dem in der Blut-Hirn-Schranke noch weitestgehend unerforschten Mrp2.

Für Mrp2-Immunfärbungen wurden Kapillarendothelzellen mit einer Dichte von 250.000 Zellen/cm² auf die beschichtete Kulturfläche von Objektträgerkammern ausgesät. An Tag 1, 3, 5 und 7 in Kultur erfolgten zunächst Fixierung und Permeabilisierung der Zellen sowie das Blocken unspezifischer Adsorptionsstellen. Im Anschluss wurde mit Primär-Antikörper und Propidiumiodid, danach mit FITC-markiertem Sekundär-Antikörper inkubiert. Die Negativ-Kontrollen wurden nur mit Propidiumiodid und Sekundär-Antikörper behandelt. Abbildung 3.12, zeigt die Positiv-Kontrollen (Bilder A, C, E und G) und Negativ-Kontrollen (Bilder B, D, F und H) der Immunfärbungen von Mrp2 in kultivierten PBCEC an Tag 1, 3, 5 und 7 in Kultur.

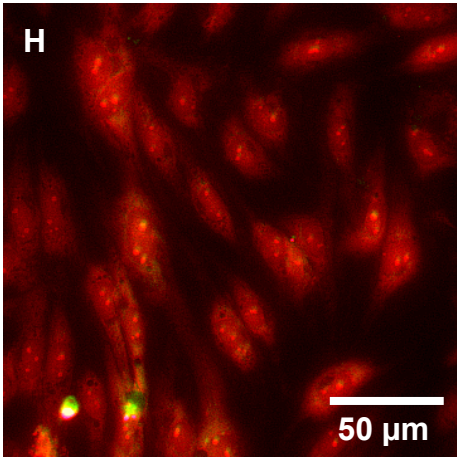
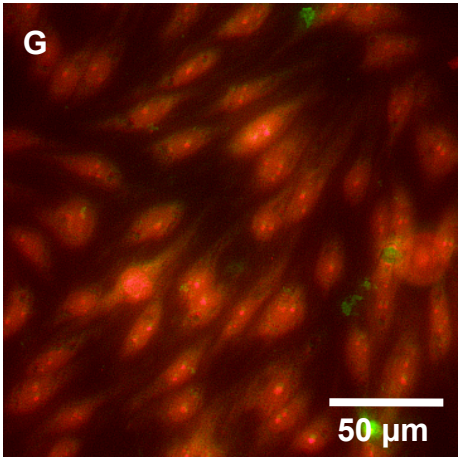
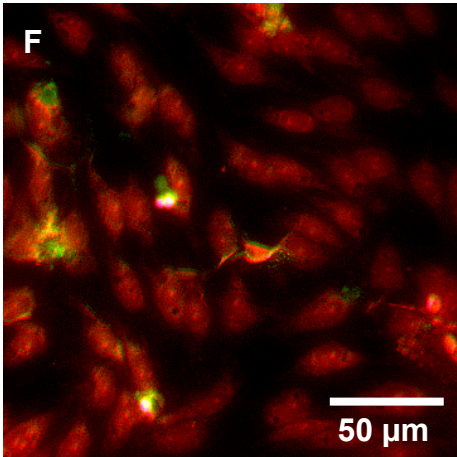
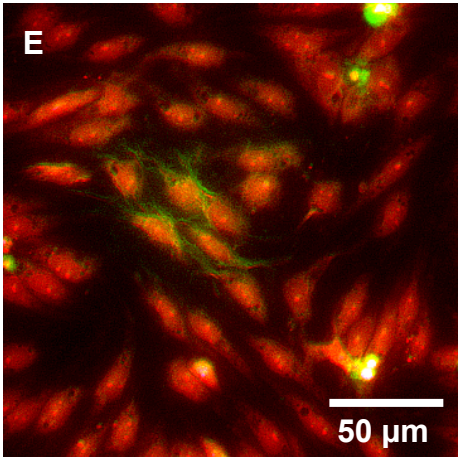
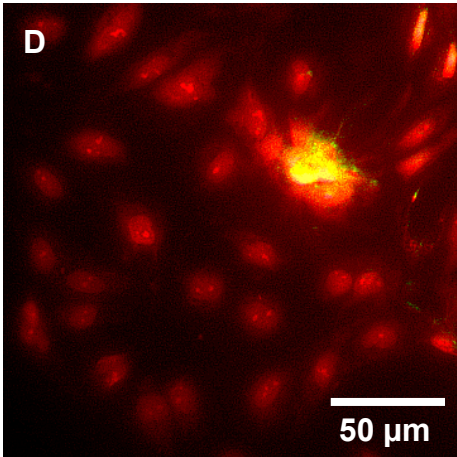
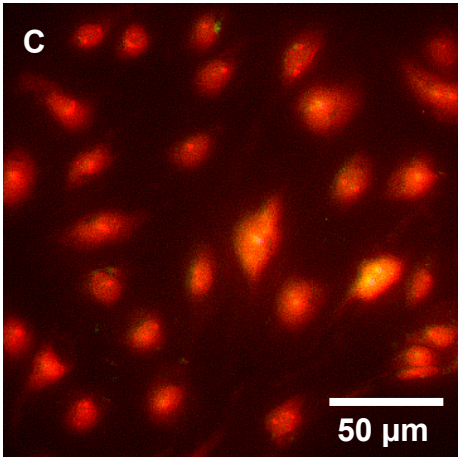
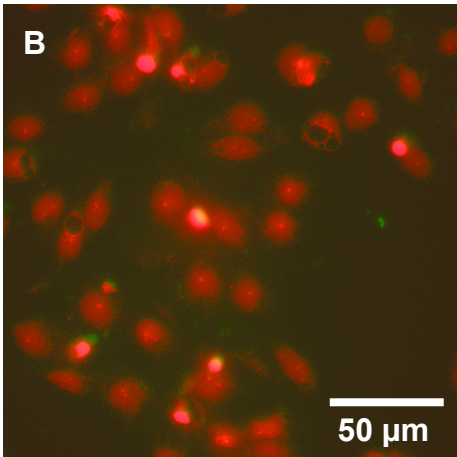
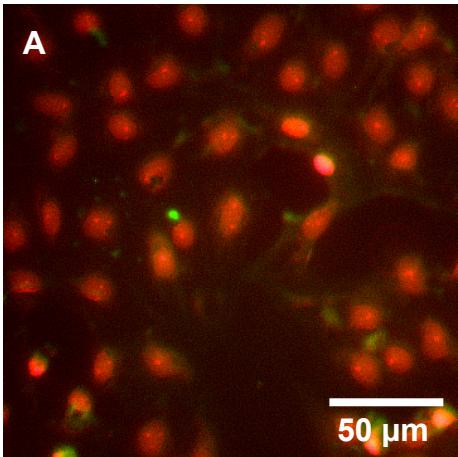


Abbildung 3.12 zeigt die Bilder der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung von PBCEC nach indirekter Immunfärbung des Transportproteins Mrp2. Die Bilder A, C, E und G zeigen die Positiv-Kontrollen, die Bilder B, D, F und H zeigen die Negativ-Kontrollen.

Zu keinem der untersuchten Zeitpunkte nach 1,3, 5 und 7 Tagen in Kultur ergaben PBCEC eine positive Immunfärbung von Mrp2, was der Vergleich von Positiv-Kontrollen und Negativ-Kontrollen in Abbildung 3.12 beweist. Das Ergebnis muss demzufolge eindeutig als Fehlen von Mrp2 in kultivierten PBCEC interpretiert werden. Eine Schlussfolgerung über Mrp2 in der Blut-Hirn-Schranke *in vivo* lässt sich daraus allerdings nicht ableiten. Zwar wurde der Nachweis von Mrp2 in Zellkulturen cerebraler Kapillarendothelzellen bisher nicht erbracht [Kusuhara et al., 1998b; Zhang et al., 2000], Versuche mit frisch isolierten Kapillaren jedoch konnten Mrp2 in der Blut-Hirn-Schranke *ex vivo* nachweisen [Miller et al., 2000; Bauer et al., 2001a; Bauer et al., 2002]. Außerdem ergaben Immunfärbungen von Mrp2 mit frisch isolierten Gehirnkapillaren Mrp2-defizienter TR⁻-Ratten ein negatives Ergebnis, wohingegen die mit Gehirnkapillaren normaler Ratten durchgeführten Immunfärbungen positiv ausfielen [Fricker, 2001, persönliche Mitteilung]. Die physiologische Bedeutung von Zellkultur-Experimenten zum Nachweis von Mrp2 in der Blut-Hirn-Schranke muss somit in Frage gestellt werden [Miller et al., 2000].

Abbildung 3.12

Immunfärbung von Mrp2 in kultivierten PBCEC

A, B: nach 1 Tag in Kultur

C, D: nach 3 Tagen in Kultur

E, F: nach 5 Tagen in Kultur

G, H: nach 7 Tagen in Kultur

Positiv-Kontrollen: A, C, E, G

Negativ-Kontrollen: B, D, F, H

Vergrößerung 400fach

3.1.3.6 Immunfärbung des ABC-Transporters P-Glycoprotein

Als Bestandteil der Blut-Hirn-Schranke übernimmt P-Glycoprotein eine wichtige Barrierefunktion, indem Xenobiotika, darunter zahlreiche Arzneistoffe, vom Übergang aus dem Blut in das Gehirn abgehalten werden [Schinkel et al., 1996; Tsuji und Tamai, 1997; Fromm, 2000]. Seit der Identifizierung von P-gp in der Blut-Hirn-Schranke, wird das Protein als Marker cerebraler Kapillarendothelzellen herangezogen [Cordon-Cardo et al., 1989; Thiebaut et al., 1989; Tatsuta et al., 1992; Tsuji et al., 1992; Lechardeur et al., 1996].

Zur Charakterisierung kultivierter PBCEC, aber auch im Hinblick auf die Entwicklung eines Modells zur Bestimmung von Arzneistoff-Interaktionen mit P-Glycoprotein an der Blut-Hirn-Schranke wurden Immunfärbungen zum Nachweis der P-gp-Expression in kultivierten Kapillarendothelzellen durchgeführt.

Für die Immunfärbung von P-Glycoprotein wurden PBCEC mit einer Aussaatdichte von 250.000 Zellen/cm² auf die beschichtete Kulturfläche von Objektträgerkammern ausgesät. Nach 1, 3, 5 und 7 Tagen in Kultur wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert, nach dem Blocken dann mit Primär-Antikörper und Propidiumiodid, anschließend mit FITC-markiertem Sekundär-Antikörper inkubiert. Die Negativ-Kontrollen wurden nur mit Propidiumiodid und Sekundär-Antikörper behandelt. Die Untersuchung der Zellen erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie. Abbildung 3.13 zeigt Positiv-Kontrollen (Bilder A, C, E und G) und Negativ-Kontrollen (Bilder B, D, F und H) nach indirekter Immunfärbung des Arzneistoff-Transporters P-Glycoprotein, der grün erscheint. Zellkerne sind mit Propidiumiodid orange-rot gefärbt.

Abbildung 3.13

Immunfärbung von P-Glycoprotein in kultivierten PBCEC
A, B: nach 1 Tag in Kultur
C, D: nach 3 Tagen in Kultur
E, F: nach 5 Tagen in Kultur
G, H: nach 7 Tagen in Kultur (Vergrößerung 1000fach)
Positiv-Kontrollen: A, C, E, G
Negativ-Kontrollen: B, D, F, H
Vergrößerung 400fach

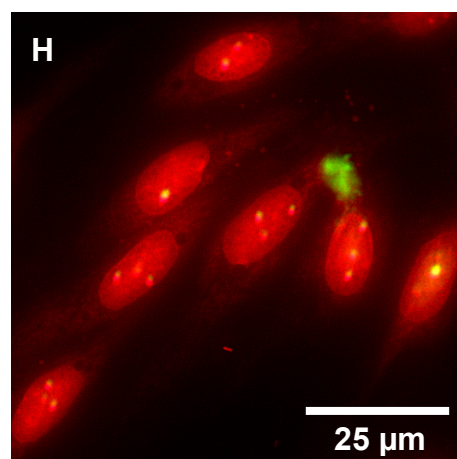
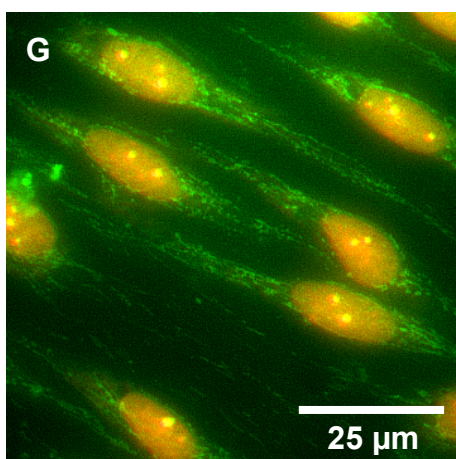
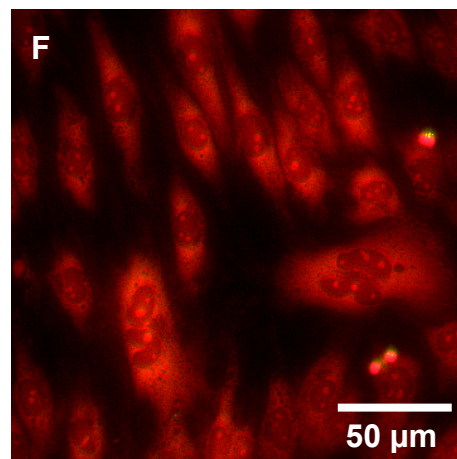
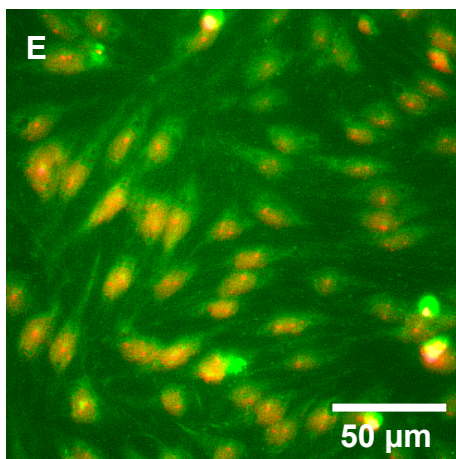
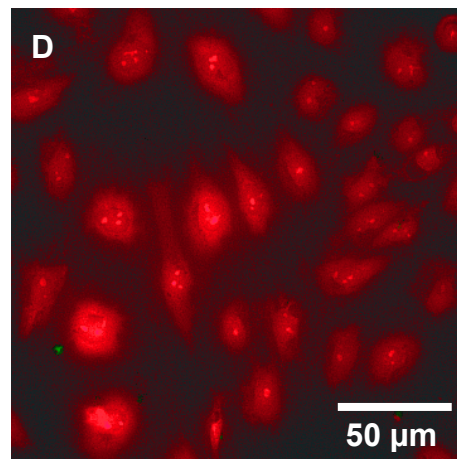
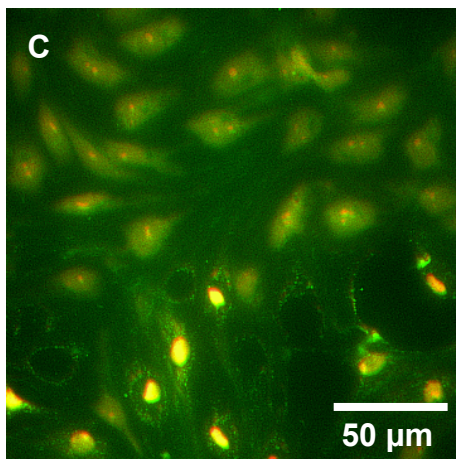
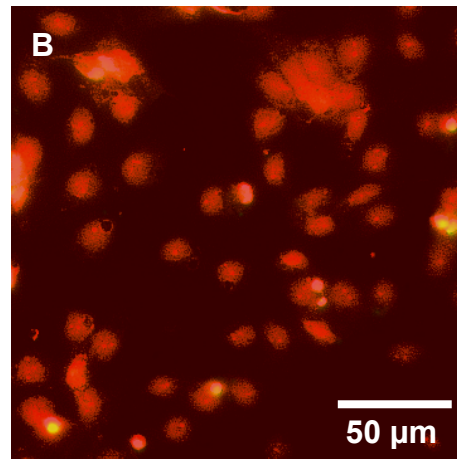
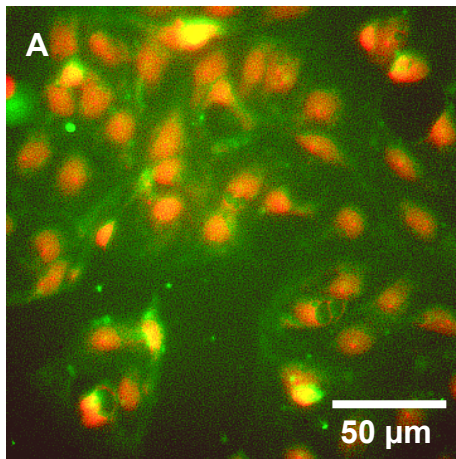


Abbildung 3.13 zeigt die Bilder der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung kultivierter PBCEC nach indirekter Immunfärbung von P-Glycoprotein. Die Bilder A, C, E und G zeigen die Positiv-Kontrollen, die Bilder B, D, F und H zeigen die Negativ-Kontrollen immungefärbter PBCEC nach 1, 3, 5 und 7 Tagen in Kultur.

Der Vergleich zwischen Positiv- und Negativ-Kontrollen in Abbildung 3.13 beweist positive Immunfärbungen von P-Glycoprotein in kultivierten PBCEC nach 1, 3, 5 und 7 Tagen in Kultur. Bei näherer Betrachtung war eine leichte Zunahme der Immunfluoreszenz über die gesamte Kulturdauer von Tag 1 bis Tag 7 festzustellen. Während die grüne Immunfluoreszenz nach Tag 1 in Kultur noch diffus verteilt war (Bild A), wurde eine Orientierung mit zunehmender Kulturdauer nach 3 und 5 Tagen deutlich (Bilder C und E), die mit dem Neuaufbau und der Neuorientierung des Cytoskeletts korrelierte (3.1.3.3 *Aktinfärbung kultivierter PBCEC*). An Tag 7 in Kultur war bei 1000facher Vergrößerung deutlich eine über die ganze Zelle spindelförmig verteilte granuläre Immunfluoreszenz zu erkennen, die um den Zellkern konzentrierter erschien (Bild G).

Aus den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen muss die Schlussfolgerung gezogen werden, dass P-Glycoprotein in kultivierten PBCEC exprimiert wird. Eine leichte Zunahme der P-Glycoprotein-Expression über die Kultivierungsdauer von 7 Tagen scheint wahrscheinlich. Die granuläre Immunfluoreszenz ist über die ganze Zelle spindelförmig verteilt und entspricht exakt den von Török gemachten Beobachtungen [Török, 1999]. Wenngleich auch frisch isolierte Kapillaren aus Schweinehirn stärkere Immunfärbungen von P-gp aufweisen als kultivierte PBCEC [Török, 1999], so bestätigt der hier erbrachte immunhistochemische Nachweis von P-Glycoprotein in kultivierten PBCEC doch frühere Untersuchungen zur konstanten P-gp-Expression in cerebralen Kapillarendothelzellen vom Schwein [Hegmann et al., 1992; Huwyler et al., 1996a; Török, 1999]. Die Expression von P-Glycoprotein unterscheidet sich damit deutlich von der Mrp2-Expression, was insbesondere im Hinblick auf die Entwicklung funktioneller *in vitro* Screening-Systeme für beide Proteine von größter Wichtigkeit ist.

3.1.4 Zusammenfassung der Isolierung, Kultivierung und Charakterisierung von PBCEC

Cerebrale Kapillarendothelzellen vom Schwein (PBCEC) wurden nach einer rein enzymatischen Methode isoliert. Die Ausbeuten lagen bei 20-50 Mio. Kapillarendothelzellen/Schweinehirn, die nach der Isolierung mittels Trypanblau-Ausschlusstest ermittelte Vialbilität lag bei über 95%. Die Zellen konnten zur Langzeitlagerung in flüssigem Stickstoff kryokonserviert werden. PBCEC wurden in unterschiedliche Zellkulturgefäße auf beschichtete Kulturoberflächen ausgesät und als Primärkultur unpassagiert, oder als passagierte Primärzelllinie kultiviert. PBCEC wiesen ein gutes Zellwachstum auf und waren nach 5-7 Tagen in Kultur zu konfluenten Monolayern zusammengewachsen. Direkt nach der Isolierung ausgesäte PBCEC zeigten dabei ein besseres Wachstumsverhalten als vor der Aussaat kryokonservierte PBCEC. Passagierte PBCEC (Primärzelllinie) bildeten dichtere Monolayer als nicht passagierte PBCEC (Primärkultur) und wurden deshalb zur Durchführung von Permeationsversuchen verwendet. Kontaminationen primärkultivierter PBCEC durch Fibroblasten, glatte Muskelzellen, Pericyten oder Astrocyten wurden nur selten und vereinzelt beobachtet. Bei PBCEC-Primärzelllinien wurden nie Kontaminationen durch Fremdzellen beobachtet. Aktinfärbungen kultivierter PBCEC bestätigten das gute Wachstumsverhalten in Kultur. Mit Erreichen eines konfluenten Monolayers waren Aktin-Filamente und Cytoskelett ausgebildet. Der Differenzierungsprozess kam damit zum Stillstand. Immunfärbungen des von-Willebrand-Faktors bestätigten den endothelialen Charakter kultivierter PBCEC. Indirekt wurde damit zusätzlich die Reinheit von PBCEC-Primärkulturen bestätigt. An PBCEC-Monolayern durchgeführte Immunfärbungen des ABC-Transporters Mrp2 waren negativ. Dagegen konnte durch immunhistochemischen Nachweis die Expression von P-Glycoprotein in kultivierten PBCEC gezeigt werden.

3.2 ***In vitro* Permeationsmodell der Blut-Hirn-Schranke: Charakterisierung durch Permeationsversuche mit Parazellulär-Markern und Modell-Substanzen**

Zellkulturmodelle werden in der pharmazeutischen Industrie zunehmend als Screening-Systeme bei der Entwicklung von Arzneistoffen eingesetzt [Borchardt et al., 1996; Garberg, 1998; Otis et al., 2001]. Dabei kommen Zellkulturmodelle der Blut-Hirn-Schranke im *compound profiling* als Permeations-Screening-Systeme zur Untersuchung der Hirngängigkeit ZNS-wirksamer Arzneistoffe zum Einsatz, die ebenso im Hinblick auf ZNS-toxische Nebenwirkungen auch für andere Arzneistoffe verwendet werden [Garberg, 1998; Franke et al., 1999; Galla, 2000]. Die industrielle Anwendung von Zellkulturmodellen erfordert jedoch deren Validierung und setzt hierfür Charakterisierung und Standardisierung der Modelle voraus [Bauer und Fricker, 2000].

Durch die Standardisierung werden Arbeitsanweisungen und Versuchsprotokolle vereinheitlicht und genormt, mit dem Ziel der Reproduzierbarkeit, Vergleichbarkeit und Übertragbarkeit von Ergebnissen aus Zellkulturexperimenten [de Boer et al., 1999]. Die Charakterisierung eines Zellkulturmodells umfasst außer der detaillierten Beschreibung zellspezifischer Eigenschaften auch die sorgfältige Untersuchung material- und methodenspezifischer Einflussfaktoren [Audus et al., 1990; Bauer und Fricker, 2000]. Bei der Etablierung eines Zellkulturmodells ist dessen Charakterisierung unumgänglich, auch wenn dabei bereits bekannte Ergebnisse wiederholt werden [Borchardt et al., 1996; de Boer et al., 1999]. Die sorgfältige Charakterisierung eines *in vitro* Permeationsmodells der Blut-Hirn-Schranke ist die Voraussetzung für

- die Beurteilung, ob das Modell für eine bestimmte Fragestellung geeignet ist,
- die Anwendung des Modells zur Durchführung von Experimenten und
- die richtige Interpretation von Ergebnissen aus Experimenten mit diesem Modell [Audus et al., 1990; Borchardt et al., 1996; Gumbleton und Audus, 2001].

Deshalb wurden zur Charakterisierung des *in vitro* Permeationsmodells der Blut-Hirn-Schranke neben der Charakterisierung der für das Modell eingesetzten Zellen auch material- und methodenspezifische Einflussfaktoren durch Permeationsversuche mit Parazellulär-Markern und Modell-Substanzen untersucht.

3.2.1 Permeationsversuche mit Parazellulär-Markern

Das herausragende Merkmal der Blut-Hirn-Schranke ist ihre Undurchlässigkeit für einer Vielzahl von Substanzen. Diese Eigenschaft wird von *tight junctions* hervorgerufen, die die cerebralen Kapillarendothelzellen eng miteinander verbinden und somit parazelluläre Permeation *in vivo* verhindern [Reese und Karnovsky, 1967; Brightman und Reese, 1969; Bradbury, 1993]. In Kultur jedoch verlieren cerebrale Kapillarendothelzellen aufgrund einer verminderten Expression von *tight junctions* teilweise ihre Barrierefunktion [Tao-Cheng et al., 1987; Wolburg et al., 1994]. Deshalb weisen *in vitro* Permeationsmodelle der Blut-Hirn-Schranke gegenüber der *in vivo* Situation eine etwa um den Faktor 150 höhere parazelluläre Durchlässigkeit auf, was zu einer Überbewertung der Arzneistoff-Permeation führt [Pardridge et al., 1990]. Dieser Nachteil wird bei der Verwendung sog. Parazellulär-Marker berücksichtigt. Parazellulär-Marker sind kleine, hydrophile Moleküle wie z.B. Sucrose und Carboxyfluorescein, die die Blut-Hirn-Schranke *in vivo* nicht passieren können [Bowman et al., 1983; Rubin et al., 1991; Franke et al., 1999]. Mit diesen Marker-Molekülen wird die erhöhte parazelluläre Durchlässigkeit von *in vitro* Permeationsmodellen der Blut-Hirn-Schranke bestimmt, so dass Aussagen über Dichtigkeit und Unversehrtheit des Kapillarendothelzell-Monolayers möglich sind [Rim et al., 1986; Audus und Borchardt, 1987]. Permeationsdaten von Testsubstanzen können zu denen des Parazellulär-Markers in Bezug gesetzt und somit relativiert werden [Audus et al., 1990; Borchardt et al., 1996; Gumbleton und Audus, 2001]. Außer den für das Permeationsmodell eingesetzten Zellen sowie physikalisch-chemischen Eigenschaften einer Testsubstanz haben auch material- und methodenspezifische Faktoren Einfluss auf die Permeation dieser Testsubstanz und müssen bei der Charakterisierung eines *in vitro* Permeationsmodells in Betracht gezogen werden [Shah et al., 1989; Yu und Sinko, 1997; Garberg, 1998; Cecchelli et al., 1999; Mathieu et al., 1999]. Ziel der Charakterisierung des *in vitro* Permeationsmodells der Blut-Hirn-Schranke durch Permeationsversuche mit Parazellulär-Markern war es, Einflussfaktoren hinsichtlich ihrer Auswirkung auf die Permeation zu beschreiben. Untersucht wurden die Einflussfaktoren Beschichtung von Kulturflächen, Aussaatdichte, Kulturdauer, Kulturmedium, Versuchsdesign, Passagieren von PBCEC und Membranfilter. Die genauen Versuchsbedingungen zur Untersuchung der Einflussfaktoren durch Permeationsversuche mit Parazellulär-Markern sind in Tabelle 6.1 im Anhang aufgeführt.

3.2.1.1 Einflussfaktor Beschichtung von Kulturflächen

Kulturflächen von Zellkulturgefäßen werden in der Zellkultur adhärenter Zellen zur Simulation der Extrazellulär-Matrix beschichtet. Sowohl das Beschichtungsmaterial als auch die Beschichtungsmenge haben dabei weitreichende Konsequenzen: Adhäsion, Wachstum, Differenzierung, Polarität, Morphologie und Struktur der Zellen sowie die Expression vieler Proteine und die intrazelluläre Regulation werden beeinflusst [Strom und Michalopoulos, 1982; Yamada, 1983; Kramer, 1985; Tewes et al., 1995; Yu und Sinko, 1997; Tilling et al., 1998]. Hiervon ist auch die Ausbildung der komplexen *tight junctions* betroffen, die für die Barrierefunktion der Blut-Hirn-Schranke verantwortlich sind [Wolburg et al., 1994]. Die Auswirkung des Einflussfaktors Beschichtung von Kulturflächen auf die Barrierefunktion kultivierter PBCEC wurde mit verschiedenen Beschichtungsmaterialien und unterschiedlichen Beschichtungsmengen in Permeationsversuchen mit Sucrose als Parazellulär-Marker untersucht.

3.2.1.1.1 Beschichtungsmaterial

Die Untersuchung des Einflussfaktors Beschichtung von Kulturflächen erfolgte mit den Beschichtungsmaterialien Rattenschwanz-Collagen und der Kombination Collagen S/Fibronectin als sog. Doppel-Coating. Rattenschwanz-Collagen und Collagen S zählen zu den Typ-I-Collagenen, die die meistverwendeten Adhäsionssubstrate in der Zellkultur sind [Strom und Michalopoulos, 1982]. Fibronectin wird von Endothelzellen synthetisiert und hat als Zelloberflächenprotein neben der Primärfunktion der Zelladhäsion auch eine Schlüsselrolle bei der Zellausbreitung und der Zellmorphologie und wird deshalb seit langem zur Beschichtung von Kulturfächen eingesetzt [Yamada, 1983; Lou und Hu, 1987]. Zur Untersuchung des Einflusses dieser Beschichtungsmaterialien auf die Dichtigkeit von PBCEC-Monolayern wurden Polyester-Membranfilter von Transwell Clear[®]-12-Well-Zellkulturplatten vor der Aussaat von PBCEC mit 20 µg/cm² Rattenschwanz-Collagen bzw. einer Kombination aus 20 µg/cm² Collagen S und 4 µg/cm² Fibronectin beschichtet. Abbildung 3.14 gibt die Permeationsrate des Parazellulär-Markers Sucrose über die Versuchsdauer von 60 min wieder.

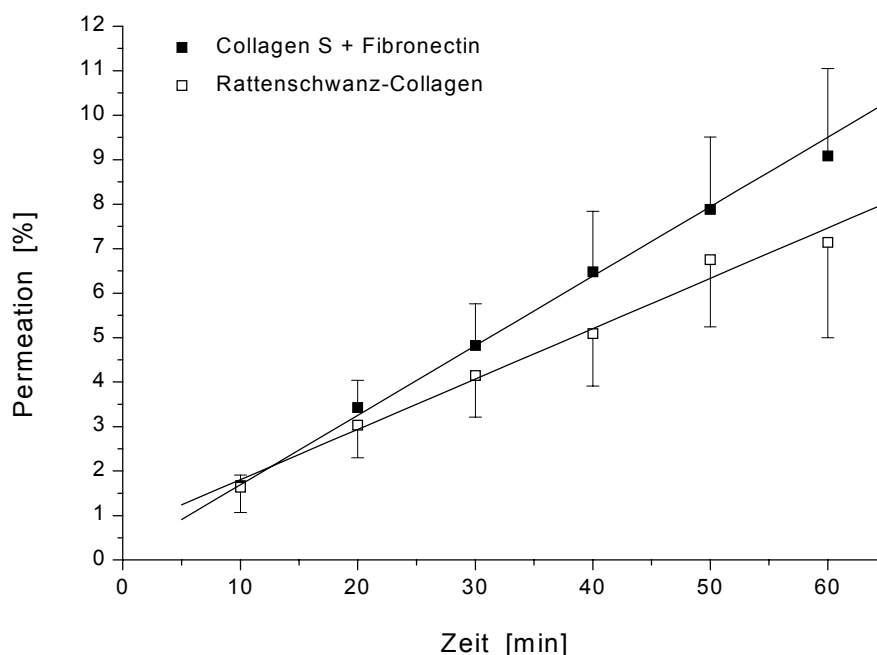


Abbildung 3.14

Einflussfaktor Beschichtung von Kulturflächen (Beschichtungsmaterial)
(genaue Versuchsbedingungen in Tabelle 6.1 im Anhang)

Permeation von Sucrose durch PBCEC-Monolayer

Beschichtungsmaterial Rattenschwanz-Collagen bzw. Collagen S/Fibronectin

Ausgleichsgeraden:

$y = 0,156x + 0,1305$ (Collagen S/Fibronectin)

$y = 0,113x + 0,67$ (Rattenschwanz-Collagen)

(Mittelwerte \pm S.D., $n = 6$)

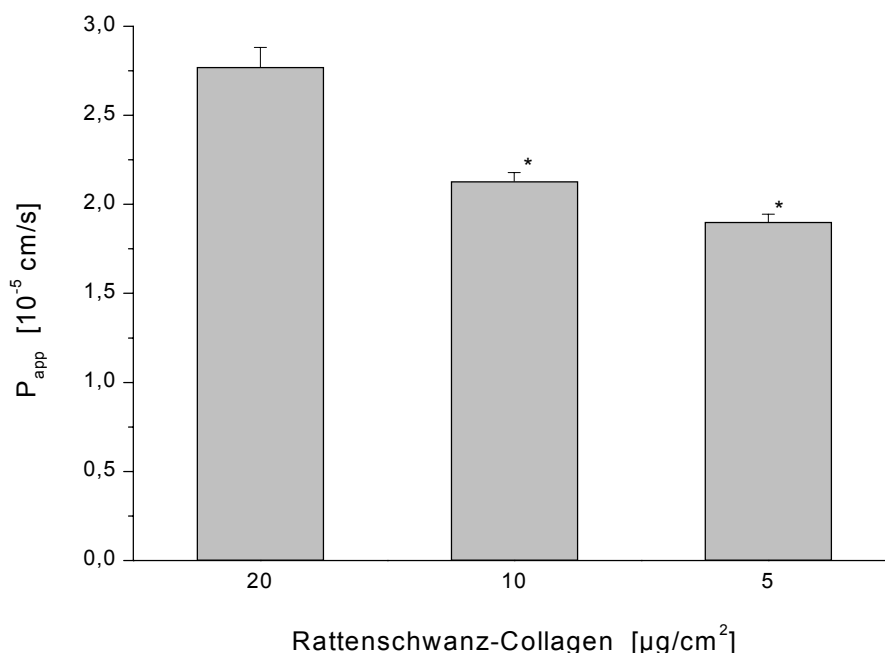
Abbildung 3.14 zeigt die zeitabhängige Permeation von Sucrose durch PBCEC-Monolayer, die auf Collagen S/Fibronectin- bzw. Rattenschwanz-Collagen-Beschichtung kultiviert wurden. Beide Kurvenverläufe sind linear ($r = 0,998$ bzw. $r = 0,993$). Aus den Steigungen der Ausgleichsgeraden ergeben sich bei einer Fläche der Membranfiltereinsätze von $1,13 \text{ cm}^2$ Sucrose-Permeationsraten von $0,138 \text{ \%/min/cm}^2$ bzw. $0,1 \text{ \%/min/cm}^2$ durch PBCEC-Monolayer, die auf Collagen S/Fibronectin bzw. Rattenschwanz-Collagen kultiviert wurden. Bei einer Collagen S/Fibronectin-Beschichtung resultiert nach 60-minütiger Permeation eine Sucrose-Permeationsrate von $9,1\%$ gegenüber $7,1\%$ bei einer Rattenschwanz-Collagen-Beschichtung.

Wenngleich auch der Unterschied statistisch nicht signifikant ist, so deutet die geringere Permeation des Parazellulär-Markers Sucrose doch auf besseres Zellwachstum und somit eine höhere Dichtigkeit von PBCEC-Monolayern hin, die auf Rattenschwanz-Collagen kultiviert wurden gegenüber PBCEC-Monolayern, die auf Colla-

gen S/Fibronectin kultiviert wurden. Bessere Adhäsion und besseres Wachstum cerebraler Kapillarendothelzellen auf Rattenschwanz-Collagen-beschichteten Kulturflächen wurden auch von Abbott et al. beobachtet, die ebenfalls keinen Effekt durch zusätzliches Coating mit Fibronectin feststellen konnten [Abbott et al., 1992]. Für alle weiteren Permeationsversuche wurde auf das zeitaufwendige Doppelcoating mit Collagen S/Fibronectin verzichtet. Stattdessen wurden Kulturflächen von Zellkulturgefäßen, wie bereits vielfach beschrieben, nur noch mit Rattenschwanz-Collagen beschichtet [Walker et al., 1994; Tewes et al., 1997; Tilling et al., 1998; Franke et al., 1999; Fischer und Kissel, 2001].

3.2.1.1.2 Beschichtungsmenge

Bei der Kultivierung von Zellen hat auch die Menge des Beschichtungsmaterials, mit der Kulturflächen beschichtet werden, einen Einfluss auf die Ausbildung zellulärer Eigenschaften, wovon auch die Barrierefunktion der *tight junctions* betroffen ist [Yamada, 1983; Abbott et al., 1992]. Zur weiteren Untersuchung des Einflussfaktors Beschichtung von Kulturflächen wurden deshalb Polyester-Membranfilter von Transwell Clear[®]-12-Well-Zellkulturplatten mit unterschiedlichen Beschichtungsmengen an Rattenschwanz-Collagen vorbehandelt. Die Kulturflächen wurden vor der Aussaat von PBCEC mit 5, 10 bzw. 20 µg/cm² Rattenschwanz-Collagen beschichtet. Abbildung 3.15 zeigt die apparenten Permeationskoeffizienten des Parazellulär-Markers Sucrose aus Permeationsversuchen mit PBCEC-Monolayern in Abhängigkeit der Beschichtungsmenge.

**Abbildung 3.15**

Einflussfaktor Beschichtung von Kulturflächen (Beschichtungsmenge)
(genaue Versuchsbedingungen in Tabelle 6.1 im Anhang)
Permeation von Sucrose durch PBCEC-Monolayer
Beschichtungsmenge 5, 10, 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Rattenschwanz-Collagen
(Mittelwerte \pm S.D., $n = 4$, $*p < 0,001$)

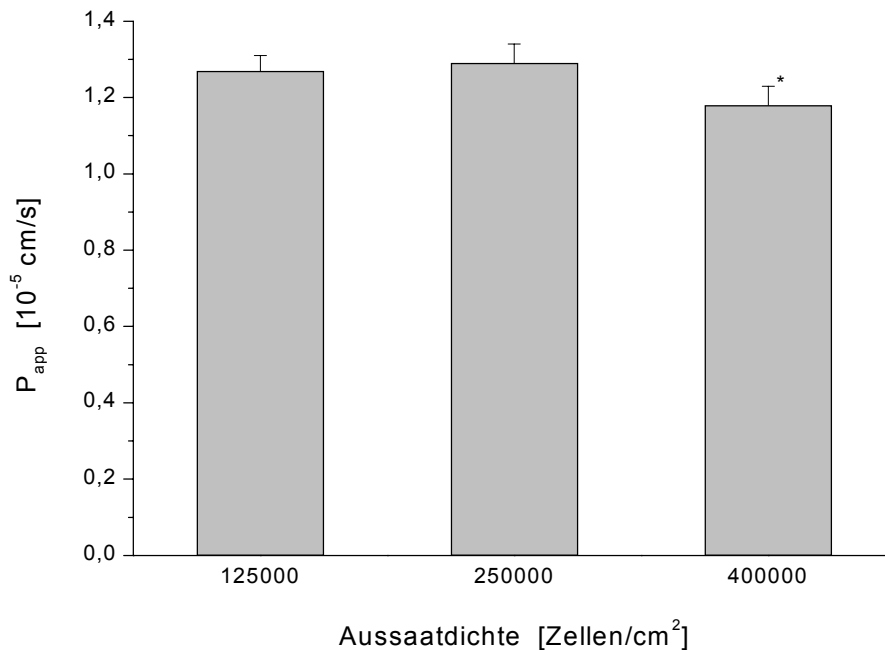
Mit Verringerung der Rattenschwanz-Collagen-Beschichtungsmenge konnte eine Abnahme des apparenten Permeationskoeffizienten für den Parazellulär-Marker Sucrose festgestellt werden (Abbildung 3.15). Aus Permeationsversuchen mit PBCEC-Monolayern, die auf einer Rattenschwanz-Collagen-Beschichtung von 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ kultiviert wurden, ergab sich ein P_{app} von $2,77 \times 10^{-5} \text{ cm/s}$. Hierzu hoch signifikant unterschiedlich ($p < 0,001$) die geringere Permeationsgeschwindigkeit bei 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Beschichtungsmenge mit einem P_{app} von $2,13 \times 10^{-5} \text{ cm/s}$. Der niedrigste P_{app} resultierte aus Permeationsversuchen mit PBCEC-Monolayern, die auf 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Rattenschwanz-Collagen kultiviert wurden: mit $1,90 \times 10^{-5} \text{ cm/s}$ war der P_{app} hoch signifikant unterschiedlich ($p < 0,001$) zu den Koeffizienten, die aus den Permeationsversuchen mit 10 bzw. 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Rattenschwanz-Collagen-Beschichtung ermittelt wurden.

Das Wachstumsverhalten von PBCEC ist demnach bei geringerer Rattenschwanz-Collagen-Beschichtung besser, was zu dichteren PBCEC-Monolayern und somit zu niedrigerer parazellulärer Permeation von Sucrose in Permeationsversuchen führt.

Dieses Ergebnis war nicht zu erwarten, da die meisten Zellarten bei höheren Beschichtungsmengen besser wachsen [Yamada, 1983]. Das Ergebnis wurde allerdings durch Versuche in Zusammenarbeit mit anderen Gruppen bestätigt [Delzer, 2000, persönliche Mitteilung]. Diesen Angaben zufolge führt eine Verringerung der Rattenschwanz-Collagen-Beschichtungsmenge unter $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ sogar noch zu einer weiteren Verbesserung von Wachstumsverhalten und Dichtigkeit von PBCEC und somit zu noch geringerer parazellulärer Permeation von Sucrose. Für weitere Permeationsversuche wurden Kulturflächen von Zellkulturgefäßen zur Kultivierung von PBCEC standardmäßig mit $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ Rattenschwanz-Collagen beschichtet.

3.2.1.2 Einflussfaktor Aussaatdichte

Die Aussaatdichten cerebraler Kapillarendothelzellen sind nach Literaturangaben sehr verschieden und liegen zwischen 50.000-600.000 Zellen/ cm^2 [van Bree et al., 1988a; Krause et al., 1991; Saheki et al., 1994; Fischer et al., 1996; Johnson und Anderson, 1999; Gumbleton und Audus, 2001]. Vielfach werden nur unzureichende oder gar keine Angaben über die Aussaatdichten von Gehirnkapillarendothelzellen gemacht [Raub et al., 1992; Ohnishi et al., 1995; Tewes et al., 1997; Hoheisel et al., 1998; Franke et al., 1999]. Demzufolge gibt es bis heute in der Literatur auch noch keine Angaben über den Einfluss der Aussaatdichte cerebraler Kapillarendothelzellen auf deren Eigenschaften in Kultur. Dieser Einflussfaktor wirkt sich jedoch auf das Wachstumsverhalten von Kapillarendothelzellen sowie auf die Dichtigkeit von Kapillarendothelzell-Monolayern und somit auch auf die Permeation von Substanzen in einem *in vitro* Permeationsmodell der Blut-Hirn-Schranke aus [Audus et al., 1990]. Um den apparenten Permeationskoeffizienten von Sucrose in Abhängigkeit des Einflussfaktors Aussaatdichte zu untersuchen, wurden PBCEC mit 125.000, 250.000 und 400.000 Zellen/ cm^2 auf Polyester-Membranfilter von Transwell Clear[®]-12-Well-Zellkulturplatten ausgesät, die vorher mit $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ Rattenschwanz-Collagen beschichtet wurden. Nach 7 Tagen in Kultur wurden die PBCEC-Monolayer für Permeationsversuche verwendet. Abbildung 3.16 zeigt die Ergebnisse der Untersuchung des Einflussfaktors Aussaatdichte.

**Abbildung 3.16**

Einflussfaktor Aussaatdichte

(genaue Versuchsbedingungen in Tabelle 6.1 im Anhang)

Permeation von Sucrose durch PBCEC-Monolayer

Aussaatdichte von PBCEC 125.000, 250.000, 400.000 Zellen/cm²

(Mittelwerte ± S.D., n = 4, *p < 0,05)

Nach Permeationsversuchen mit dem Parazellulär-Marker Sucrose konnten nur geringfügige Änderungen der ermittelten apparenten Permeationskoeffizienten in Abhängigkeit der Aussaatdichte beobachtet werden (Abbildung 3.16). Der P_{app} aus Permeationsversuchen mit PBCEC-Monolayern, die bei einer Aussaatdichte von 125.000 Zellen/cm² gewachsen sind, lag bei $1,27 \times 10^{-5}$ cm/s. Die Verdoppelung der Aussaatdichte auf 250.000 Zellen/cm² konnte keine Verbesserung der Dichtigkeit des PBCEC-Monolayers bewirken, was der annähernd gleiche P_{app} von $1,29 \times 10^{-5}$ cm/s belegt. Erst eine weitere Erhöhung der Aussaatdichte auf 400.000 Zellen/cm² führte zu PBCEC-Monolayern, die die Sucrose-Permeationsgeschwindigkeit auf einen P_{app} von $1,18 \times 10^{-5}$ cm/s reduzierten. Dieser unterscheidet sich schwach signifikant ($p < 0,05$) von den P_{app} -Werten bei den Aussaatdichten von 125.000 und 250.000 Zellen/cm². Eine Verbesserung der Dichtigkeit von PBCEC-Monolayern bei einer Aussaatdichte von 400.000 Zellen/cm² kann damit im Vergleich zu den Aussaatdichten von 125.000 und 250.000 Zellen/cm² als wahrscheinlich angesehen werden.

Der Einflussfaktor Aussaatdichte hatte bei den untersuchten Aussaatdichten von 125.000, 250.000 und 400.000 Zellen/cm² keine großen Auswirkungen auf das Wachstumsverhalten und die Dichtigkeit von PBCEC-Monolayern, was die ähnlichen apparenten Permeationskoeffizienten von $1,27 \times 10^{-5}$ cm/s, $1,29 \times 10^{-5}$ cm/s und $1,18 \times 10^{-5}$ cm/s für Sucrose bestätigen. Die Aussaatdichte von 400.000 Zellen/cm² war zu hoch gewählt, da im Gegensatz zu den niedrigeren Aussaatdichten nicht alle Zellen an der Kulturfläche adhären und anwachsen konnten, was per Lichtmikroskop festgestellt wurde. Bei zu niedrigen Aussaatdichten wie z.B. 125.000 Zellen/cm² kann es zu einem Überwachsen der Endothelzellkultur durch Pericyten kommen, was durch höhere Aussaatdichten von 250.000 Zellen/cm² verhindert wird [Török, 1996]. Deshalb wurden PBCEC zur weiteren Charakterisierung des *in vitro* Permeationsmodells durch Permeationsversuche mit Parazellulär-Markern mit einer Aussaatdichte von 250.000 Zellen/cm², wie bereits berichtet, ausgesät [Gumbleton und Audus, 2001]. Raub et al. konnten bei dieser Aussaatdichte sogar die Ausbildung der dichtesten Kapillarendothelzell-Monolayer beobachten [Raub et al., 1992].

3.2.1.3 Einflussfaktor Kulturdauer

Der Einsatz von *in vitro* Permeationsmodellen der Blut-Hirn-Schranke für das Screening von Arzneistoffen erfordert dichte Kapillarendothelzell-Monolayer, die der *in vivo* Situation möglichst nahe kommen sollen [Audus et al., 1990, Borchardt et al., 1996; Gumbleton und Audus, 2001]. Die Dichtigkeit der Monolayer ist dabei entscheidend von der Kulturdauer der Zellen abhängig. Literaturangaben zufolge ist die Kulturdauer cerebraler Kapillarendothelzellen jedoch sehr unterschiedlich und liegt bei 6-20 Tagen [Audus und Borchardt, 1986b; Rim et al., 1986; Tao-Cheng et al., 1987; Fischer et al., 1996; Franke et al., 2000]. Die Entscheidung, ob kultivierte Kapillarendothelzell-Monolayer für Permeationsversuche verwendet werden können, wird dabei oft durch lichtmikroskopische Kontrolle nach optischen Kriterien [Shah et al., 1989; Johnson und Anderson, 1999; Otis et al., 2001] oder aufgrund von Messungen des transendothelialen elektrischen Widerstandes (TEER) getroffen [Raub et al., 1992; Tewes et al., 1997; Franke et al., 1999]. Allerdings können optische Kontrollen und TEER-Messungen nur beschränkt Auskunft über die Dichtigkeit von Kapillarendothelzell-Monolayern geben, so dass diesen Methoden Permeationsversuche mit Parazellulär-Markern vorzuziehen sind [Miller et al., 1992; Borchardt et al., 1996;

Gumbleton und Audus, 2001]. Der Einflussfaktor Kulturdauer wurde deshalb durch Permeationsversuche mit dem Parazellulär-Marker Carboxyfluorescein untersucht, um den Zeitpunkt zu bestimmen, zu dem PBCEC-Monolayer ihre maximale Dichtigkeit aufweisen. Hierzu wurden PBCEC mit einer Aussaatdichte von 250.000 Zellen/cm² auf Polyester-Membranfilter von Transwell Clear®-12-Well-Zellkulturplatten ausgesät, die vorher mit 5 µg/cm² Rattenschwanz-Collagen beschichtet wurden. Permeationsversuche wurden nach 4, 5, 6, 7, 8, 9 und 10 Tagen in Kultur durchgeführt. Abbildung 3.17 zeigt die relative Permeationsgeschwindigkeit (Tag 7 = 1) von Carboxyfluorescein durch PBCEC-Monolayer in Abhängigkeit der Kulturdauer.

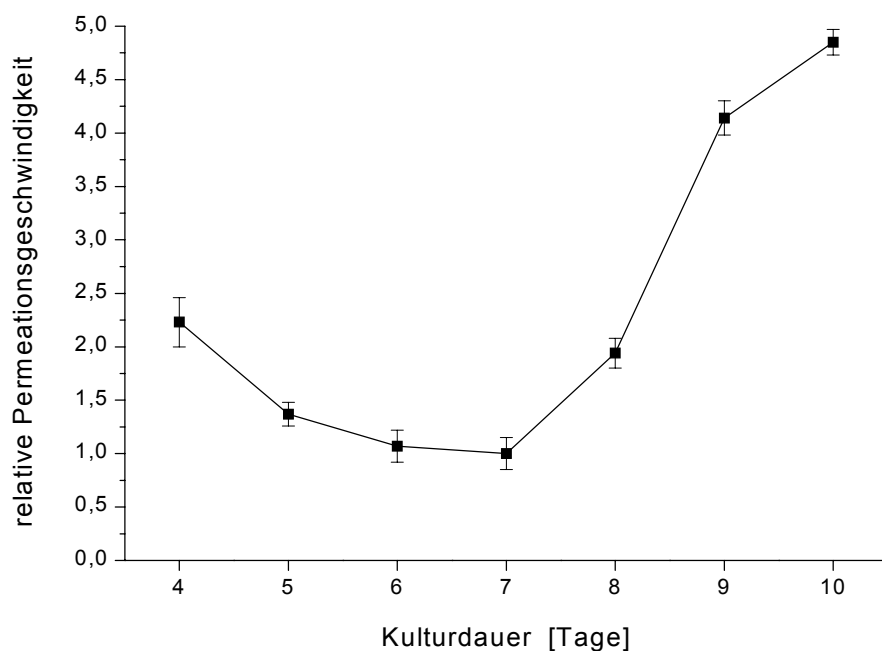


Abbildung 3.17

Einflussfaktor Kulturdauer
(genaue Versuchsbedingungen in Tabelle 6.1 im Anhang)
relative Permeationsgeschwindigkeit von Carboxyfluorescein durch
PBCEC-Monolayer (Tag 7 = 1)
Kulturdauer 4, 5, 6, 7, 8, 9 und 10 Tage
(Mittelwerte ± S.D., n = 4)

Abbildung 3.17 zeigt einen deutlich von der Kulturdauer abhängigen Kurvenverlauf für die relative Permeationsgeschwindigkeit des Parazellulär-Markers Carboxyfluorescein. Permeationsversuche mit PBCEC nach 4 Tagen in Kultur ergaben eine relative Permeationsgeschwindigkeit von 2,23 bezogen auf Tag 7. Der Wert fiel an Tag 5 auf 1,37 und an Tag 6 auf 1,07. Das Kurven-Minimum mit der relativen Carboxyfluor-

rescein-Permeations-geschwindigkeit von 1 war nach 7 Tagen in Kultur erreicht. Mit zunehmender Kulturdauer folgte dann ein schneller Anstieg des Kurvenverlaufs: an Tag 8 in Kultur kam es annähernd zu einer Verdoppelung der relativen Permeations-geschwindigkeit auf einen Wert von 1,94 und an Tag 9 zu einer Vervierfachung auf 4,14. Nach 10 Tagen stieg die relative Carboxyfluorescein-Permeationsgeschwindigkeit mit einem Wert von 4,85 fast auf das 5-fache bezogen auf Tag 7.

Der in Abbildung 3.17 dargestellte Kurvenverlauf korreliert mit den Ergebnissen der Untersuchungen zu 3.1.3.1 *Zellwachstum und Erscheinungsbild kultivierter PBCEC* und 3.1.3.3 *Aktinfärbungen kultivierter PBCEC*. Die Permeationsgeschwindigkeit des Parazellulär-Markers nimmt mit zunehmender Konfluenz des PBCEC-Monolayers ab. Zwar war im Mikroskop nach 5 Tagen in Kultur ein lückenloser, konfluenter Zellrasen mit dicht aneinander gewachsenen Zellen zu beobachten, die Untersuchung des Einflussfaktors Kulturdauer konnte allerdings zeigen, dass maximale Dichtigkeit erst 2 Tage später, nach 7 Tagen in Kultur erreicht war. Diese Verzögerung wurde bereits an Kapillarendothelzellen vom Rind gezeigt [Audus und Borchardt, 1986b; Audus et al., 1996; Eddy et al., 1997] und kann damit erklärt werden, dass die für die Ausbildung eines dichten, für Permeationsversuche geeigneten PBCEC-Monolayers verantwortlichen *tight junctions* erst nach Erreichen von Konfluenz in vollständig ausdifferenzierten Zellen gebildet werden [Krause et al., 1991; Raub et al., 1992; Török, 1999]. Das Ergebnis stimmt überein mit 3.1.3.3 *Aktinfärbungen kultivierter PBCEC* und lässt vermuten, dass die Bildung und Regulation von *tight junctions* über die Aktin-Filamente des Cytoskeletts gesteuert werden, was direkte Auswirkungen auf die parazelluläre Dichtigkeit kultivierter PBCEC hat [Staddon und Rubin, 1996; Staddon und Rubin, 1999; Török, 1999]. Der nach Tag 7 in Kultur beobachtete schnelle Anstieg der relativen Carboxyfluorescein-Permeationsgeschwindigkeit ist mit den mikroskopischen Bildaufnahmen, die Löcher im PBCEC-Monolayer zeigen, plausibel zu begründen. Maximale Dichtigkeit von PBCEC-Monolayern war nach einer Kulturdauer von 7 Tagen erreicht, was der Kurvenverlauf in Abbildung 3.17 beweist. Diese Beobachtung wird von anderen bestätigt [Walker et al., 1994; Fischer et al., 1996; Tewes et al., 1997; Franke et al., 2000] und konnte durch TEER-Messungen belegt werden [Hoheisel et al., 1998]. Für weitere Permeationsversuche wurden PBCEC über eine Kulturdauer von 7 Tagen kultiviert.

3.2.1.4 Einflussfaktor Kulturmedium

Die Zusammensetzung von Kulturmedien als Einflussfaktor bei der Ausbildung dichter Kapillarendothelzell-Monolayer ist ein viel diskutiertes Thema [Audus et al., 1990; Garberg, 1998]. Um die Expression von *tight junctions* zu fördern, wurden bereits die verschiedensten Medienzusätze untersucht. Darunter Insulin [Abbott et al., 1992], Hydrocortison [Hegmann et al., 1992; Hoheisel et al., 1998; Thöle, 2000], cAMP-Analoga [Rubin et al., 1991; Beuckmann et al., 1995; Deli et al., 1995; Igarashi et al., 1999; Török, 1999; Thöle, 2000], Phosphodiesterase-Inhibitoren [Rubin et al., 1991; Deli et al., 1995; Török, 1999; Thöle, 2000], der glial cell line derived neurotrophic factor GDNF [Igarashi et al., 1999] sowie Kombinationen der Substanzen oder sonstige andere Substanzen [Abbott et al., 1992; Wolburg et al., 1994; Hurst und Clark, 1999; Török, 1999]. Auch Astrocyten-konditioniertes Medium sowie der Einfluss von Astrocyten in Co-Kultur mit Kapillarendothelzellen wurden untersucht [Tao-Cheng et al., 1987; Dehouck et al., 1990; Rubin et al., 1991; Rauh et al., 1992; Raub et al., 1992; Wolburg et al., 1994; Deli et al., 1995; Stanness et al., 1996; Cecchelli et al., 1999; Török, 1999; Thöle, 2000]. Insbesondere aber die Verwendung von Serum als Mediumzusatz bei der Kultivierung cerebraler Kapillarendothelzellen ist umstritten [Hoheisel et al., 1998; Thöle, 2000]. Es enthält einerseits Zellwachstums-fördernde Faktoren, andererseits noch unbekannte Substanzen. Außerdem unterliegt die Zusammensetzung von Serum natürlichen Schwankungen, was eine Standardisierung und somit auch die Reproduzierbarkeit erschwert [Barnes und Sato, 1980a; Barnes und Sato, 1980b; Clark, 1983; Sato, 1983; Hoheisel et al., 1998]. Zur Charakterisierung des *in vitro* Permeationsmodells der Blut-Hirn-Schranke bezüglich der Auswirkung von Pferdeserum auf die Ausbildung von dichten PBCEC-Monolayern wurde deshalb der Einflussfaktor Kulturmedium untersucht. PBCEC wurden mit 250.000 Zellen/cm² auf Rattenschwanz-Collagen-beschichtete Polyester-Membranfilter von Transwell Clear[®]-12-Well-Zellkulturplatten ausgesät. Ab Tag 5 in Kultur wurde die Testgruppe mit serumfreiem Kulturmedium behandelt, die Kontrollgruppe wurde weiterhin mit serumhaltigem Nährmedium kultiviert. Vor der Durchführung von Permeationsversuchen mit 5, 6, 7 und 8 Tage lang kultivierten Zellen wurde der TEER der PBCEC-Monolayer gemessen. In Abbildung 3.18 sind die TEER-Werte (A) sowie die relative Permeationsgeschwindigkeit (Tag 7 = 1) des Parazellulär-Markers Sucrose (B) von Kontroll- und Test-Gruppe in Abhängigkeit der Kulturdauer dargestellt.

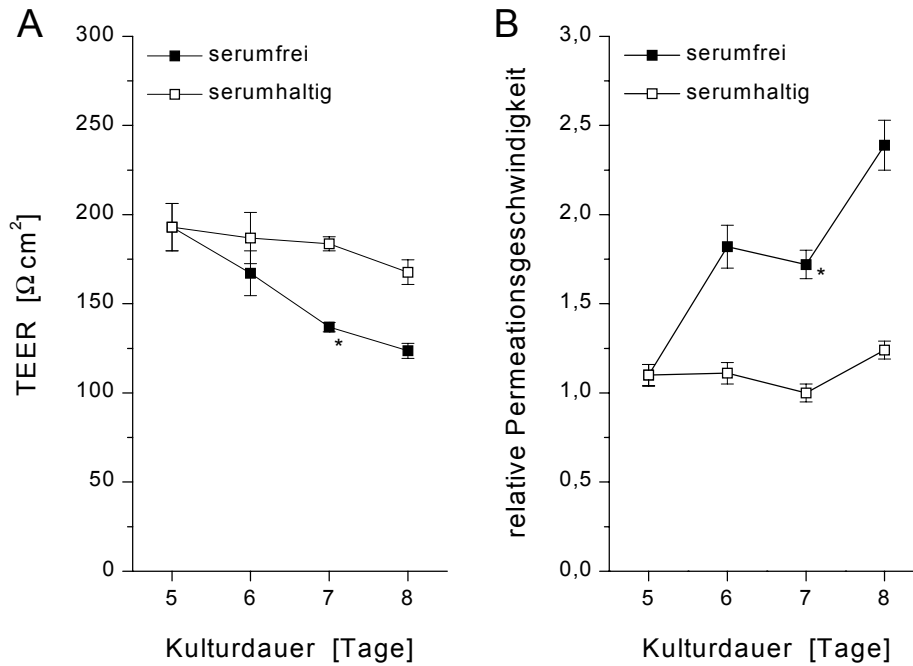


Abbildung 3.18

Einflussfaktor Kulturmedium

(genaue Versuchsbedingungen in Tabelle 6.1 im Anhang)

A: TEER von PBCEC-Monolayern

B: relative Permeationsgeschwindigkeit von Sucrose durch PBCEC-Monolayer
(Tag 7 = 1)

Kulturmedium serumfrei (Testgruppe) und serumhaltig (Kontrollgruppe)
(Mittelwerte \pm S.D., n = 6, *p < 0,001)

Abbildung 3.18 zeigt in Abhängigkeit der Kulturdauer deutliche Unterschiede bei den TEER-Werten (Bild A) und den relativen Sucrose-Permeationsgeschwindigkeiten (Bild B) zwischen der mit serumhaltigem Nährmedium kultivierten Kontrollgruppe und der mit serumfreiem Nährmedium kultivierten Testgruppe. Der TEER von PBCEC-Monolayern aus der Testgruppe nahm kontinuierlich ab: von $193,0 \Omega \text{cm}^2$ an Tag 5 auf $167,1 \Omega \text{cm}^2$ an Tag 6 und $136,9 \Omega \text{cm}^2$ an Tag 7 bis auf $123,6 \Omega \text{cm}^2$ an Tag 8 in Kultur. Demgegenüber blieb der TEER von PBCEC-Monolayern der Kontrollgruppe bis Tag 7 mit etwa $185 \Omega \text{cm}^2$ annähernd konstant (Tag 6: $186,9 \Omega \text{cm}^2$, Tag 7: $183,6 \Omega \text{cm}^2$) und fiel erst an Tag 8 auf einen Wert von $167,7 \Omega \text{cm}^2$.

Die relativen Permeationsgeschwindigkeiten für den Parazellulär-Marker Sucrose verhielten sich analog dem TEER. Permeationsversuche mit PBCEC-Monolayern nach 5 Tagen in Kultur ergaben eine relative Permeationsgeschwindigkeit von 1,10 bezogen auf Tag 7. Nach dem Mediumwechsel von serumhaltigem zu serumfreiem Nährmedium folgte bei der Testgruppe ein schneller Anstieg auf 1,82 an Tag 6, der

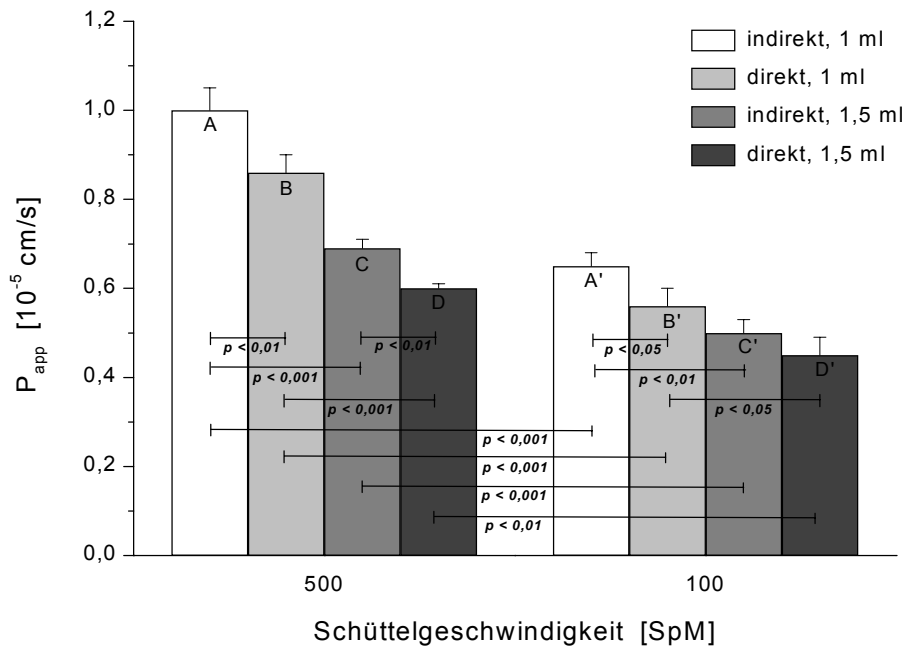
an Tag 7 auf 1,72 leicht fiel aber bis Tag 8 in Kultur auf 2,39 weiter anstieg. Permeationsversuche mit PBCEC-Monolayern der Kontrollgruppe, die mit serumhaltigem Nährmedium kultiviert wurden ergaben relative Permeationsgeschwindigkeiten für Sucrose, die gegen die Kulturdauer aufgetragen einen ähnlichen Kurvenverlauf wie bereits in Abbildung 3.17 gezeigt aufweisen. Die relative Permeationsgeschwindigkeit an Tag 5 mit 1,10 blieb an Tag 6 mit 1,11 konstant. Das Kurven-Minimum war nach 7 Tagen in Kultur erreicht. An Tag 8 stieg der Wert auf 1,24.

Ein Vergleich der TEER-Werte an Tag 7 zwischen der mit serumhaltigem Nährmedium kultivierten Kontrollgruppe und der mit serumfreiem Nährmedium kultivierten Testgruppe weist einen hochsignifikanten Unterschied auf ($p < 0,001$). Zu dem gleichen Ergebnis führt der Vergleich der relativen Sucrose-Permeationsgeschwindigkeiten an Tag 7. Auch hier ist ein hochsignifikanter Unterschied zwischen Kontroll- und Testgruppe festzustellen ($p < 0,001$). Daraus muss der Schluss gezogen werden, dass der Entzug von Serum aus dem Kulturmedium – und somit der Entzug von wichtigen Wachstumsfaktoren – zu einem schnelleren Verlust der Dichtigkeit von PBCEC-Monolayern führt im Vergleich zu Zellen, die mit serumhaltigem Kulturmedium behandelt wurden. Die Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den Arbeiten von Hoheisel et al. und Franke et al., wonach serumfreies Kulturmedium zu einer verbesserten Dichtigkeit von PBCEC-Monolayern führt, was aber durch die Verwendung eines anderen Serums und die zusätzlich Supplementierung des Kulturmediums mit Hydrocortison erklärt werden kann [Hennig et al., 1989; Hoheisel et al., 1998; Franke et al., 2000]. Übereinstimmung findet sich mit den Ergebnissen von Robinson et al. und Thöle, die ebenfalls einen Verlust der Barrierefunktion kultivierter Kapillarendothelzellen nach Serumentzug feststellen konnten [Robinson et al., 1986; Thöle, 2000]. Aus den Ergebnissen leitet sich ab, dass der Einflussfaktor Kulturmedium bezüglich der Supplementierung des Nährmediums mit Pferde-Serum deutliche Auswirkungen auf die Ausbildung von PBCEC-Monolayer hat und sich somit auf das *in vitro* Permeationsmodell der Blut-Hirn-Schranke niederschlägt.

3.2.1.5 Einflussfaktor Versuchsdesign

Die richtige Anwendung eines *in vitro* Permeationsmodells erfordert außer der Charakterisierung zellspezifischer Eigenschaften auch Kenntnisse über material- und methodenspezifische Eigenschaften [Shah et al., 1989; Audus et al., 1990; Yu und Sinko, 1997; Garberg, 1998; Cecchelli et al., 1999; Bauer und Fricker, 2000]. Insbesondere methodenspezifische Parameter im Versuchsdesign können sich auf den Permeationskoeffizienten von Testsubstanzen auswirken und zu Fehlinterpretationen von Ergebnissen aus Permeationsversuchen führen. Um dies zu vermeiden, müssen methodenspezifische Parameter im Versuchsdesign einerseits sorgfältig charakterisiert werden, andererseits aber auch optimiert werden, um die Blut-Hirn-Schranke *in vivo* möglichst realitätsgetreu zu simulieren [Audus et al., 1990; Bauer und Fricker, 2000]. Zur Charakterisierung des Einflussfaktors Versuchsdesign wurde die Auswirkung der Versuchsparameter Probenapplikation, Akzeptorvolumen und Schüttelgeschwindigkeit auf den apparenten Permeationskoeffizienten des Parazellulär-Markers Sucrose untersucht. Hierzu erfolgte die Aussaat von PBCEC mit einer Aussaatdichte von 250.000 Zellen/cm² auf Rattenschwanz-Collagen-beschichtete Polyester-Membranfilter von Transwell Clear[®]-12-Well-Zellkulturplatten. Nach 7 Tagen in Kultur wurden Permeationsversuche unter variierenden Versuchsparametern durchgeführt.

Bei dem *Versuchsparameter Probenapplikation* wurde zwischen *direkter und indirekter Applikation* des radioaktivmarkierten *Tracers* unterschieden. Dieser wurde entweder zu der bereits auf den Zellen befindlichen Sucroselösung im Donorkompartiment pipettiert (direkte Probenapplikation) oder aber zunächst zu der noch nicht auf den Zellen befindlichen Sucrose-Lösung. Diese radioaktive Lösung wurde durch Schütteln gemischt und anschließend auf die Zellen in das Donorkompartiment gegeben. Bei dem *Versuchsparameter Akzeptorvolumen* wurden Permeationsversuche mit 1 ml bzw. 1,5 ml als Akzeptorvolumen durchgeführt. Bei dem *Versuchsparameter Schüttelgeschwindigkeit* wurde die Transwell Clear[®]-12-Well-Zellkulturplatte bei 100 SpM bzw. 500 SpM geschüttelt. In Abbildung 3.19 sind die apparenten Permeationskoeffizienten für Sucrose in Abhängigkeit der Versuchsparameter Probenapplikation, Akzeptorvolumen und Schüttelgeschwindigkeit dargestellt.

**Abbildung 3.19**

Einflussfaktor Versuchsdesign
 (genaue Versuchsbedingungen in Tabelle 6.1 im Anhang)
 Permeation von Sucrose durch PBCEC-Monolayer
 Versuchsparameter Probenapplikation: direkt und indirekt
 Versuchsparameter Akzeptorvolumen: 1 und 1,5 ml
 Versuchsparameter Schüttelgeschwindigkeit: 100 und 500 SpM
 (Mittelwerte \pm S.D., $n = 3$)

Abbildung 3.19 zeigt deutliche Effekte auf den apparenten Permeationskoeffizienten des Parazellulär-Markers Sucrose bei der Durchführung von Permeationsversuchen in Abhängigkeit der Versuchsparameter Probenapplikation, Akzeptorvolumen und Schüttelgeschwindigkeit.

Versuchsparameter Probenapplikation

Durch die Änderung von indirekter zu direkter Probenaufgabe bei einem Akzeptorvolumen von 1 ml und einer Schüttelgeschwindigkeit von 500 SpM wurde der P_{app} von $1,00 \times 10^{-5}$ cm/s (A) auf $0,86 \times 10^{-5}$ cm/s (B) signifikant reduziert ($p < 0,01$). Bei gleicher Schüttelgeschwindigkeit und einem Akzeptorvolumen von 1,5 ml fiel der P_{app} von $0,69 \times 10^{-5}$ cm/s (C) bei indirekter Probenapplikation auf $0,60 \times 10^{-5}$ cm/s (D) bei direkter Probenapplikation ($p < 0,01$). Auch bei einer Schüttelgeschwindigkeit von 100 SpM machte sich die Änderung von indirekter zu direkter Probenapplikation im Sucrose- P_{app} bemerkbar: es wurde eine Erniedrigung von $0,65 \times 10^{-5}$ cm/s (A') auf $0,56 \times 10^{-5}$ cm/s (B', $p < 0,05$) bei einem Akzeptorvolumen von 1 ml bzw. von $0,50 \times$

10^{-5} cm/s (C') auf $0,45 \times 10^{-5}$ cm/s (D') bei einem Akzeptorvolumen von 1,5 ml ermittelt.

Bei der höheren Schüttelgeschwindigkeit von 500 SpM ruft die Änderung von indirekter zu direkter Probenapplikation signifikante Unterschiede der apparenten Permeationskoeffizienten für Sucrose ($p < 0,01$) hervor. Demgegenüber wurde bei der niedrigen Schüttelgeschwindigkeit von 100 SpM und einem Akzeptorvolumen von 1 ml ein nur schwach signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) bzw. bei 100 SpM und 1,5 ml Akzeptorvolumen kein signifikanter Unterschied der apparenten Permeationskoeffizienten ermittelt. Daraus kann der Schluss gezogen werden, dass der Versuchsparameter Probenapplikation bei hohen Schüttelgeschwindigkeiten deutliche Auswirkungen auf den apparenten Permeationskoeffizienten von Sucrose bei der Durchführung von Permeationsversuchen mit dem *in vitro* Permeationsmodell der Blut-Hirn-Schranke hat. Ein Einfluss bei niedrigen Schüttelgeschwindigkeiten kann als statistisch wahrscheinlich angenommen werden.

Die Unterschiede in den apparenten Permeationskoeffizienten des Parazellulär-Markers Sucrose bei der Durchführung von Permeationsversuchen mit dem *in vitro* Permeationsmodell der Blut-Hirn-Schranke in Abhängigkeit der Probenapplikation können so erklärt werden, dass sich der radioaktive Sucrose-Tracer bei direkter Applikation in das Donorkompartiment zunächst noch in der Donor-Lösung verteilen muss, bevor eine parazelluläre Diffusion in das Akzeptorkompartiment stattfinden kann. Im Gegensatz hierzu ist bei indirekter Probenapplikation durch vorheriges Mischen der Lösung eine Verteilung im Donorkompartiment nicht mehr notwendig, der Tracer kann ohne zeitliche Verzögerung parazellulär in das Akzeptorkompartiment diffundieren. Deshalb erfolgte bei weiteren Permeationsversuchen eine indirekte Probenapplikation.

Versuchsparameter Akzeptorvolumen

Bei einer Schüttelgeschwindigkeit von 500 SpM bewirkte die Änderung des Akzeptorvolumens von 1 ml auf 1,5 ml eine Erniedrigung des P_{app} von $1,00 \times 10^{-5}$ cm/s (A) auf $0,69 \times 10^{-5}$ cm/s (C, indirekte Probenapplikation, $p < 0,001$) bzw. von $0,86 \times 10^{-5}$ cm/s (B) auf $0,60 \times 10^{-5}$ cm/s (D, direkte Probenapplikation, $p < 0,001$). Bei einer Schüttelgeschwindigkeit von 100 SpM fiel der P_{app} durch die Erhöhung des Akzeptorvolumens bei indirekter Probenapplikation von $0,65 \times 10^{-5}$ cm/s (A') auf $0,50 \times 10^{-5}$

cm/s (C', $p < 0,01$) bzw. bei direkter Probenapplikation von $0,56 \times 10^{-5}$ cm/s (B') auf $0,45 \times 10^{-5}$ cm/s (D', $p < 0,05$).

Statistisch hoch signifikante Unterschiede ($p < 0,001$) der apparenten Permeationskoeffizienten für Sucrose durch eine Änderung des Akzeptorvolumens ergaben sich bei einer Schüttelgeschwindigkeit von 500 SpM. Bei 100 SpM und indirekter Probenapplikation waren die Unterschiede signifikant ($p < 0,01$) bzw. schwach signifikant ($p < 0,05$) bei 100 SpM und direkter Probenapplikation. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass der Einfluss des Versuchsparameters Akzeptorvolumen auf den apparenten Permeationskoeffizienten bei höheren Schüttelgeschwindigkeiten größer ist als bei niedrigen Schüttelgeschwindigkeiten.

Die Auswirkungen auf den apparenten Permeationskoeffizienten von Sucrose durch Änderungen des Versuchsparameters Akzeptorvolumen können durch einen veränderten hydrostatischen Gesamtdruck bei unterschiedlichen Akzeptorvolumina in dem vertikal angeordneten Donor-Akzeptor-System von Transwell Clear[®]-12-Well-Platten erklärt werden. Bei einem Donor-Akzeptor-Verhältnis der Volumina von 0,5 ml : 1,5 ml wird davon ausgegangen, dass der hydrostatische Druck des Donorvolumens gleich dem Auftrieb des unter dem Donor befindlichen Akzeptorvolumens entspricht und der hydrostatische Gesamtdruck somit gleich null ist [Produktinformation Transwell[®], Costar, 2000]. Der hydrostatische Gesamtdruck ändert sich daher bei einem konstanten Donorvolumen von 0,5 ml nur durch Variation des Akzeptorvolumens. Bei ein Akzeptorvolumen von 1 ml baut sich demzufolge ein hydrostatischer Gesamtdruck auf, der solange einen gerichteten Flüssigkeitsstrom von Donor zu Akzeptor bewirkt, bis der hydrostatische Gesamtdruck ausgeglichen ist. Dies hat eine stärkere Permeation des Parazellulär-Markers aus dem Donorkompartiment in das Akzeptorkompartiment zur Folge, so dass aus Permeationsversuchen mit einem Akzeptorvolumen von 1 ml fälschlicherweise höhere apparente Permeationskoeffizienten resultieren als bei einem Akzeptorvolumen von 1,5 ml. Deshalb wurde für weitere Permeationsversuche ein Akzeptorvolumen von 1,5 ml gewählt.

Versuchsparameter Schüttelgeschwindigkeit

Durch die Änderung der Schüttelgeschwindigkeit bei der Durchführung von Permeationsversuchen von 500 SpM auf 100 SpM ergaben sich folgende apparente Permeationskoeffizienten für den Parazellulär-Marker Sucrose: bei indirekter Probenapplikation und einem Akzeptorvolumen von 1 ml fiel der P_{app} von $1,00 \times 10^{-5}$ cm/s

(A) um 35% auf $0,65 \times 10^{-5}$ cm/s (A', $p < 0,001$). Bei direkter Probenapplikation und einem Akzeptorvolumen von 1 ml wurde ebenfalls eine Reduktion des P_{app} um 35% von $0,86 \times 10^{-5}$ cm/s (B) auf $0,56 \times 10^{-5}$ cm/s (B', $p < 0,001$) ermittelt. Bei einem höheren Akzeptorvolumen von 1,5 ml und indirekter Probenapplikation fiel der P_{app} von $0,69 \times 10^{-5}$ cm/s (C) auf $0,50 \times 10^{-5}$ cm/s (C', $p < 0,001$), was einer Reduktion von 27,5% entspricht. Bei 1,5 ml Akzeptorvolumen und direkter Probenapplikation ergab sich ein Rückgang des Sucrose- P_{app} um 25% von $0,60 \times 10^{-5}$ cm/s (D) auf $0,45 \times 10^{-5}$ cm/s (D', $p < 0,01$).

Der Versuchsparameter Schüttelgeschwindigkeit hat einen großen Einfluss auf den apparenten Permeationskoeffizienten von Sucrose bei der Durchführung von Permeationsversuchen mit dem *in vitro* Permeationsmodell der Blut-Hirn-Schranke. Dies wird durch statistisch hoch signifikante Unterschiede ($p < 0,001$) belegt.

Die Auswirkungen des Versuchsparameters Schüttelgeschwindigkeit auf den apparenten Permeationskoeffizienten können durch Beobachtungen mit Farbstofflösungen erklärt werden: bei hohen Schüttelgeschwindigkeiten wird die Testsubstanz vollständig im Akzeptorkompartiment verteilt. Der Donor-Akzeptor-Konzentrationsgradient bleibt über die ganze Versuchsdauer erhalten, die Testsubstanz kann durch die Permeationsbarriere permeieren. Bei sehr niedrigen Schüttelgeschwindigkeiten hingegen kommt es zu einer nur ungenügenden Durchmischung des Akzeptorkompartiments. Dies führt innerhalb des Akzeptors zur Ausbildung eines Konzentrationsgradienten, wobei sich die Testsubstanz direkt hinter der Permeationsbarriere (PBCEC-Monolayer auf beschichtetem Membranfilter) konzentriert. Diese Konzentrierung an der Permeationsbarriere bewirkt eine Verringerung des Donor-Akzeptor-Konzentrationsgefälles, was geringere Permeation und somit einen niedrigeren Permeationskoeffizienten der Testsubstanz zur Folge hat. Die Schüttelgeschwindigkeit in Permeationsversuchen muss also einerseits über dem kritischen Wert liegen, bei dem es zu einer nur ungenügenden Durchmischung des Akzeptors kommt. Andererseits darf es durch eine zu hohe Schüttelgeschwindigkeit nicht zur Schädigung des PBCEC-Monolayers kommen. Deshalb wurde bei weiteren Permeationsversuchen eine Schüttelgeschwindigkeit von 100 SpM eingestellt.

3.2.1.6 Einflussfaktor Passagieren von PBCEC

Die Eigenschaften kultivierter Zellen können auch maßgeblich von dem Zellpopulationstyp einer Zellkultur abhängen [Audus et al., 1990]. Dabei handelt es sich um die Kultivierung von Zellen als Primärkultur, als Primärzelllinie oder als etablierte Zelllinie. Primärkulturen cerebraler Kapillarendothelzellen werden häufig einer Passage unterzogen und dann *per definitionem* als Primärzelllinie weiter kultiviert [Rubin et al., 1991; Dehouck et al., 1992; Hegmann et al., 1992; Joly et al., 1995; Schulze et al., 1997; Igarashi et al., 1999; Gaillard et al., 2000]. Der Sinn und Zweck dieses zusätzlichen Arbeitsschrittes liegt zum einen darin, Primärkulturen von Fremdzellkontaminationen zu befreien, so dass reine Kapillarendothelzell-Monolayer erhalten werden [Tewes et al., 1997; Tilling et al., 1998; Franke et al., 2000]. Zum anderen können durch das Passagieren einer Primärkultur bis zu 50 Subkulturen herangezogen werden, was der Vermehrung von Zellmasse dient und somit zeit- und kostenintensive Zellisolierungen einspart [Dehouck et al., 1990; Abbott et al., 1992; van Bree et al., 1992b; Cecchelli et al., 1999]. Das Passagieren cerebraler Kapillarendothelzellen kann sich jedoch auf die Eigenschaften der Zellen auswirken, indem es zu einem Verlust endothelzellspezifischer Merkmale kommt [Audus et al., 1990; Shi und Audus, 1994; de Boer et al., 1999; Garberg, 1998]. Um die Auswirkungen des Einflussfaktors Passagieren von PBCEC für das *in vitro* Permeationsmodell der Blut-Hirn-Schranke zu untersuchen, wurden Endothelzellen zunächst in Zellkulturflaschen mit einer Dichte von 250.000 Zellen/cm² ausgesät. Bei Erreichen von 75-80%iger Konfluenz nach 2-3 Tagen in Kultur erfolgte die Passage mittels Trypsinisierung. Anschließend wurden die PBCEC erneut mit einer Aussaatdichte von 250.000 Zellen/cm² auf 5 µg/cm² Rattenschwanz-Collagen-beschichtete Transwell Clear[®]-12-Well-Zellkulturplatten ausgesät und bis zu Tag 7 in Kultur gehalten. Permeationsversuche wurden bei einer Schüttelgeschwindigkeit von 100 SpM durchgeführt, die Versuchsparameter Probenapplikation und Akzeptorvolumen wurden variiert. Als Vergleich dienten unpassagierte Zellen. Abbildung 3.20 zeigt den apparenten Permeationskoeffizienten des Parazellulär-Markers Sucrose aus Permeationsversuchen mit unpassagierten und passagierten PBCEC.

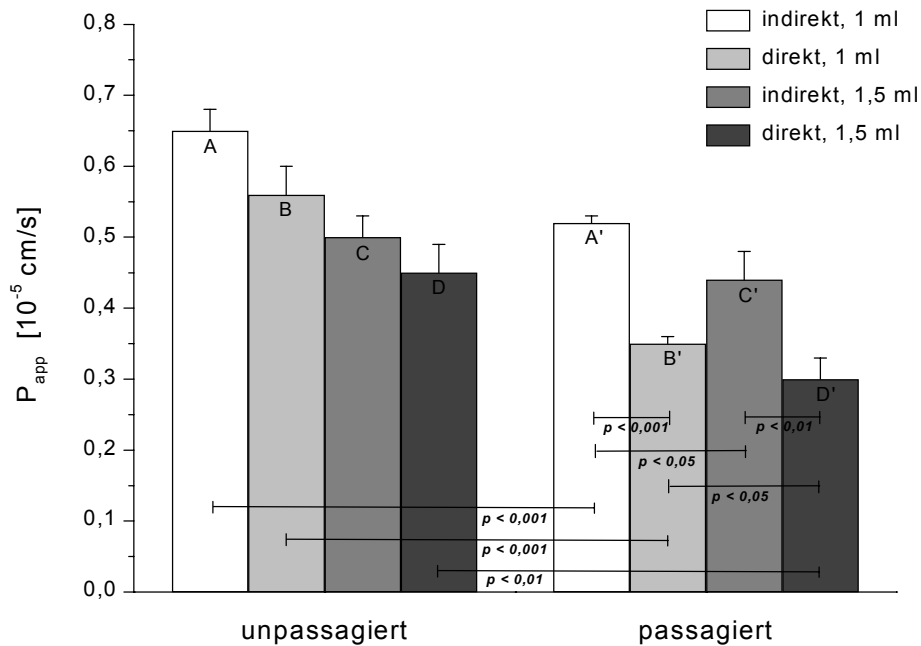


Abbildung 3.20

Einflussfaktor Passagieren von PBCEC
 (genaue Versuchsbedingungen in Tabelle 6.1 im Anhang)
 Permeation von Sucrose durch PBCEC-Monolayer
 PBCEC-Monolayer unpassagiert und passagiert
 Versuchsparameter Probenapplikation: direkt und indirekt
 Versuchsparameter Akzeptorvolumen: 1 und 1,5 ml
 Versuchsparameter Schüttelgeschwindigkeit: 100 SpM
 (Mittelwerte \pm S.D., $n = 3$)

Abbildung 3.20 stellt die apparenten Permeationskoeffizienten von Sucrose nach Permeationsversuchen mit unpassagierten und passagierten PBCEC zusammen. Die als Vergleich herangezogenen Werte der unpassagierten Zellen sind die bereits in Abbildung 3.19 gezeigten Permeationsdaten.

Die Versuchsparameter Probenapplikation und Akzeptorvolumen hatten auch bei der Durchführung von Permeationsversuchen mit passagierten PBCEC-Monolayern deutliche Auswirkungen auf den apparenten Sucrose-Permeationskoeffizienten. Bei konstanter Schüttelgeschwindigkeit von 100 SpM äußerte sich die Änderung von indirekter zu direkter Probenapplikation durch die Reduktion des P_{app} von $0,52 \times 10^{-5}$ cm/s (A') auf $0,35 \times 10^{-5}$ cm/s (B', $p < 0,001$) bei einem Akzeptorvolumen von 1 ml bzw. von $0,44 \times 10^{-5}$ cm/s (C') auf $0,30 \times 10^{-5}$ cm/s (D', $p < 0,01$) bei einem Akzeptorvolumen von 1,5 ml. Die Änderung des Akzeptorvolumens von 1 ml auf 1,5 ml bei indirekter Probenapplikation führte zur Reduktion des P_{app} von $0,52 \times 10^{-5}$ cm/s (A')

auf $0,44 \times 10^{-5}$ cm/s (C', $p < 0,05$) und bei direkter Probenapplikation von $0,35 \times 10^{-5}$ cm/s (B') auf $0,30 \times 10^{-5}$ cm/s (D', $p < 0,05$).

Der Vergleich der apparenten Sucrose-Permeationskoeffizienten nach Permeationsversuchen mit unpassagierten und passagierten PBCEC-Monolayern zeigt die Auswirkungen des Einflussfaktors Passagieren von PBCEC. Bei indirekter Probenapplikation, einem Akzeptorvolumen von 1 ml und einer Schüttelgeschwindigkeit von 100 SpM wurde für unpassagierete PBCEC ein P_{app} von $0,65 \times 10^{-5}$ cm/s (A) gegenüber $0,52 \times 10^{-5}$ cm/s (A') für passagierete PBCEC ermittelt ($p < 0,001$). Bei gleicher Schüttelgeschwindigkeit und gleichem Akzeptorvolumen aber direkter Probenapplikation ergab sich ein P_{app} von $0,56 \times 10^{-5}$ cm/s (B) bei unpassagierten PBCEC, der P_{app} passagierter PBCEC lag bei $0,35 \times 10^{-5}$ cm/s (B', $p < 0,001$). Bei der Durchführung von Permeationsversuchen mit indirekter Probenapplikation, einem Akzeptorvolumen von 1,5 ml und 100 SpM fiel der Sucrose- P_{app} statistisch nicht signifikant von $0,50 \times 10^{-5}$ cm/s (C, unpassagiert) auf $0,44 \times 10^{-5}$ cm/s (C', passagiert). Bei dem Versuchsdesign direkte Probenapplikation, 1,5 ml Akzeptorvolumen, 100 SpM Schüttelgeschwindigkeit wurde für unpassagierete PBCEC-Monolayer ein P_{app} von $0,45 \times 10^{-5}$ cm/s (D) errechnet, für passagierete PBCEC-Monolayer wurden $0,30 \times 10^{-5}$ cm/s ermittelt (D', $p < 0,01$).

Die Ergebnisse beweisen, dass auch Monolayer der PBCEC-Primärzelllinie (passagierete Zellen) dem Einflussfaktor Versuchsdesign unterliegen, die Effekte waren statistisch signifikant. Permeationsversuche zur Untersuchung des Einflussfaktors Passagieren von PBCEC mit unpassagierten und passagierten Kapillarendothelzellen ergaben statistisch signifikante Unterschiede der ermittelten Permeationskoeffizienten für Sucrose. Daraus muss der Schluss gezogen werden, dass passagierete PBCEC-Monolayer dichter sind als unpassagierete PBCEC-Monolayer. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu denen von Thöle [Thöle, 2000], bestätigen aber die Angaben anderer [Dehouck et al., 1990; Shi und Audus, 1994; Hoheisel et al., 1998]. Die erhöhte Dichtigkeit passagierter PBCEC-Monolayer gegenüber unpassagierten PBCEC-Monolayern kann damit erklärt werden, dass aufgrund des unterschiedlichen Differenzierungsgrades der Zellen zum Zeitpunkt der Aussaat (unpassagierete Zellen Tag 0, passagierete Zellen Tag 3) das Adhäsionsvermögen der Zellen an der Kulturfläche unterschiedlich ist. Demzufolge können passagierete Endothelzellen besser an der Kulturfläche anhaften als unpassagierete Endothelzellen, was zu einer höheren

Zelldichte des Monolayers und infolgedessen zu einer höheren Dichtigkeit gegenüber Parazellulär-Markern wie Sucrose führt (s. auch 3.1.2.2 *Passagieren von PBCEC*).

3.2.1.7 Einflussfaktor Membranfilter

Die Entwicklung eines Zellkulturmodells zur Durchführung von Permeationsversuchen erfordert ein geeignetes Trägersystem, auf dem Zellen kultiviert werden können [Audus et al., 1990]. Hierzu werden Zellkulturplatten mit mikroporösen Membranfiltern verwendet, an die unterschiedliche Anforderungen gestellt werden: 1) die Kulturfläche der Membranfilter muss Adhäsion und Wachstum von Zellen sowie die Ausbildung konfluenter Monolayer ermöglichen, 2) die Membranfilter sollten bzgl. ihrer optischen Eigenschaften klar und lichtdurchlässig sein, so dass Zellwachstum und Erscheinungsbild kultivierter Zellen lichtmikroskopisch verfolgt werden können und 3) die Membranfilter sollten sowohl für hydrophile und lipophile als auch für nieder- und hochmolekulare Substanzen gut permeabel sein [Shah et al., 1989; Audus et al., 1990; Cecchelli et al., 1999]. Kommerziell werden bereits verschiedenste Zellkulturplatten von zahlreichen Herstellern angeboten, deren Membranfilter sich in Material, Kulturfläche, Porengröße, Porendichte, Membranfilterdicke u.v.m. unterscheiden [Garberg, 1998]. Bei der Auswahl von Zellkulturplatten ist hierauf zu achten, da die Eigenschaften eines Membranfilters die Permeation von Testsubstanzen und somit deren Permeationskoeffizienten beeinflussen, was zu Artefakten und Fehlinterpretationen von Ergebnissen aus Permeationsversuchen führen kann [Audus et al., 1990; Yu und Sinko, 1997]. Beispielsweise sollen Membranfilter mit Porengrößen über 0,4 μm nicht für die Kultivierung cerebraler Kapillarendothelzellen verwendet werden, da die Zellen durch die Poren hindurchwachsen und sich ein zweiter Monolayer auf der Unterseite des Filters bildet [Biegel und Pachter, 1994; Audus et al., 1996; Garberg, 1998; Cecchelli et al., 1999]. Des Weiteren muss der Membranfilter frei permeabel für die Testsubstanz sein, damit nicht dieser die Permeationsbarriere darstellt, sondern der Zell-Monolayer. Zur Durchführung von Permeationsversuchen mit cerebralen Kapillarendothelzellen wurden in den letzten Jahren hauptsächlich Membranfilter aus Polycarbonat verwendet [Audus und Borchardt, 1987; Pardridge et al., 1990; Raub et al., 1992; Saheki et al., 1994; Fischer et al., 1996; Schulze et al., 1997; Tewes et al., 1997]. Polycarbonat besitzt jedoch den Nachteil, dass darauf kultivierte Zellen aufgrund der optischen Eigenschaften des Materials nicht per Lichtmikroskop betrachtet

werden können. Deshalb wurden Zellkulturplatten mit Membranfiltern aus Polyester entwickelt, die bei der Kultivierung von Kapillarendothelzellen zunehmend eingesetzt werden [Franke et al., 1999; Bauer und Fricker, 2000; Franke et al., 2000]. Beide Materialien sind sehr gut permeabel für den Parazellulär-Marker Sucrose und wurden deshalb zur Untersuchung des Einflussfaktors Membranfilter eingesetzt [Cecchelli et al., 1999]. Tabelle 3.2 stellt die eingesetzten Zellkulturplatten mit den Eigenschaften der jeweiligen Membranfilter gegenüber. Für die Durchführung von Permeationsversuchen wurden passagierte PBCEC verwendet. Hierzu wurden die Zellen zunächst in Zellkulturflaschen mit einer Dichte von 250.000 Zellen/cm² ausgesät. Bei Erreichen von 75-80%iger Konfluenz nach 2-3 Tagen in Kultur erfolgte die Passage mittels Trypsinisierung. Die PBCEC wurden erneut mit einer Aussaatdichte von 250.000 Zellen/cm² auf 5 µg/cm² Rattenschwanz-Collagen-beschichtete Membranfilter von Transwell Clear[®]- und Transwell[®]-12-Well-Zellkulturplatten ausgesät und bis zu Tag 7 in Kultur gehalten. Permeationsversuche wurden nach indirekter Probenapplikation bei einem Akzeptorvolumen von 1,5 ml und einer Schüttelgeschwindigkeit von 100 SpM durchgeführt. Abbildung 3.21 stellt den Vergleich der apparenten Permeationskoeffizienten von Sucrose in Abhängigkeit unterschiedlicher Membranfilter dar.

Tabelle 3.2 Eigenschaften von Transwell Clear[®]- und Transwell[®]-12-Well-Zellkulturplatten

Eigenschaft	Transwell Clear[®]	Transwell[®]
Membranmaterial	Polyester	Polycarbonat
optische Eigenschaft	klar, lichtdurchlässig	opak
Zellen mikroskopierbar	ja	nein
Dicke des Filters [µm]	10	10
Porendurchmesser [µm]	0,4	0,4
Porendichte [1/cm ²]	4 × 10 ⁶	10 ⁸

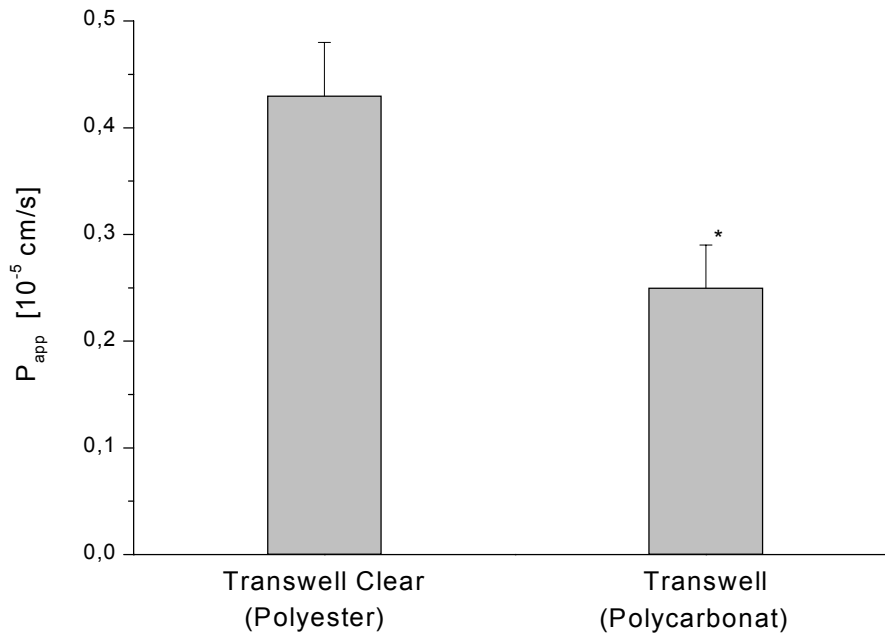


Abbildung 3.21

Einflussfaktor Membranfilter

(genaue Versuchsbedingungen in Tabelle 6.1 im Anhang)

Permeation von Sucrose durch passagierte PBCEC-Monolayer

Transwell Clear[®]-12-Well-Zellkulturplatte (Polyester-Membranfilter)

Transwell[®]-12-Well-Zellkulturplatte (Polycarbonat Membranfilter)

Versuchsparameter Probenapplikation: indirekt

Versuchsparameter Akzeptorvolumen: 1,5 ml

Versuchsparameter Schüttelgeschwindigkeit: 100 SpM

(Mittelwerte \pm S.D., n = 3, *p < 0,01)

Der Vergleich der apparenten Sucrose Permeationskoeffizienten nach Permeationsversuchen zur Untersuchung des Einflussfaktors Membranfilter in Abbildung 3.21 zeigt, dass Versuche mit PBCEC-Monolayern, die auf Polyester-Membranfiltern der Transwell Clear[®]-12-Well-Zellkulturplatten kultiviert wurden einen P_{app} von $0,43 \times 10^{-5}$ cm/s ergaben. Hierzu signifikant reduziert der P_{app} von $0,25 \times 10^{-5}$ cm/s nach Permeationsversuchen mit PBCEC-Monolayern, die auf Polycarbonat-Membranfiltern von Transwell[®]-12-Well-Zellkulturplatten kultiviert wurden.

Aus diesem Ergebnis könnte der Schluss gezogen werden, dass PBCEC auf Polycarbonat-Membranfiltern besser wachsen und somit dichtere Monolayer ergeben als auf Polyester-Membranfiltern. Dieser Schluss würde allerdings Angaben widersprechen, wonach Zellen auf Polyester-Membranfiltern besser wachsen als auf Polycarbonat-Membranfiltern und die Barrierefunktion des Zellmonolayers gegenüber parazellulärer Permeation dadurch deutlich verbessert ist [Yu und Sinko, 1997]. Außer-

dem wäre für diese Schlussfolgerung ein Vergleich der effektiven Sucrose-Permeationskoeffizienten notwendig, die den Widerstand der beschichteten Membranfilter für den Parazellulär-Marker berücksichtigen. Deshalb kann auch die Schlussfolgerung, dass der Widerstand des Polycarbonat-Membranfilters für die Sucrose-Permeation größer ist als der des Polyester-Membranfilters und sich auf die apparenten Sucrose-Permeationskoeffizienten niederschlägt, nicht belegt werden. Zudem haben Yu und Sinko bei reinen Polyester-Membranfiltern einen höheren Widerstand gegenüber Parazellulär-Markern gemessen als dies bei Polycarbonat-Membranfiltern der Fall ist, was auch aufgrund der geringeren Porendichte von Polyester-Membranfiltern logisch erscheint (Tabelle 3.2). Eine klare Schlussfolgerung ist aus diesen Ergebnissen nicht möglich. Für weitere Permeationsversuche wurden Transwell Clear[®]-12-Well-Zellkulturplatten mit Polyester-Membranfiltern verwendet, da Zellwachstum und Erscheinungsbild kultivierter PBCEC per Lichtmikroskop verfolgt werden können.

3.2.2 Permeationsversuche mit Modell-Substanzen

Die Anwendung eines *in vitro* Permeationsmodells der Blut-Hirn-Schranke als industrietaugliches Permeations-Screening-System für Arzneistoffe erfordert dessen Charakterisierung, Standardisierung und Validierung. Hierbei ist neben der Untersuchung endothelzellspezifischer Merkmale sowie material- und methodenspezifischer Einflussfaktoren auch die Beurteilung der Trennleistung des Modells hinsichtlich der Unterscheidung zwischen gut und schlecht permeierenden Substanzen notwendig [Bauer und Fricker, 2000]. Richtigkeit und Präzision der Trennleistung sind wichtige Kriterien für die Validierung eines *in vitro* Permeationsmodells, die durch den Bezug der Permeationsdaten von Testsubstanzen auf Referenzdaten erheblich verbessert werden können [Gumbleton und Audus, 2001]. Um ein breites Spektrum an Referenzdaten zu erhalten, dienen bekannte Modell-Substanzen mit unterschiedlichem Permeationsvermögen als interne Kontrollen. Zur Charakterisierung des *in vitro* Permeationsmodells der Blut-Hirn-Schranke durch Permeationsversuche mit Modell-Substanzen wurden die Arzneistoffe Cyclosporin A, Diazepam, Morphin und Propranolol sowie die Aminosäure L-Leucin eingesetzt. Sucrose wurde als Parazellulär-Marker verwendet. Durch Variation der Versuchsbedingungen bei der Durchführung der Permeationsversuche wurden verschiedene Permeationsmodelle simuliert, um

die Vergleichbarkeit und Übertragbarkeit von Ergebnissen verschiedener Modelle zu beurteilen. Die ermittelten apparenten Permeationskoeffizienten P_{app} der Modell-Substanzen wurden für jede der Simulationen gegen die logarithmierten Oktanol-Puffer-Verteilungskoeffizienten $\log P_{Oktanol/Puffer}$ der Substanzen aufgetragen und korreliert. Die genauen Versuchsbedingungen zur Untersuchung der Einflussfaktoren durch Permeationsversuche mit Modell-Substanzen sind in Tabelle 6.2 im Anhang aufgeführt.

Oktanol-Puffer-Verteilungskoeffizienten $P_{Oktanol/Puffer}$ der Modell-Substanzen

Der Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient $P_{Oktanol/Puffer}$ ist ein Maß für die Lipophilie einer Substanz und stellt einen der gebräuchlichsten physikalisch-chemischen Parameter zur Vorhersage der Hirngängigkeit vieler Arzneistoffe dar [Oldendorf, 1974b; Bradbury, 1985; Audus et al., 1992; Robinson und Rapoport, 1992; van Bree et al., 1993; Buchwald und Bodor, 1998]. Neben anderen physikalisch-chemischen Parametern wird der Verteilungskoeffizient auch für Rechen-Modelle zur Vorhersage des *brain uptake* von Arzneistoffen herangezogen [Young et al., 1988; Buchwald und Bodor, 1998; Norinder et al., 1998]. Grundlage hierfür bildet die direkte Abhängigkeit der passiven Permeation einer Substanz über biologische Barrieren von der Lipophilie dieser Substanz, was streng genommen aber nur für ein Molekulargewicht < 400 g/mol gilt [Krogh, 1946; Becker und Quadbeck, 1952; Levin, 1980]. Für viele Arzneistoffe konnte bereits eine gute Korrelation zwischen dem Verteilungskoeffizienten und der Permeation durch die Blut-Hirn-Schranke *in vitro* [Leo et al., 1971, Rim et al., 1986; Shah et al., 1989; Pardridge et al., 1990; Eddy et al., 1997; Glynn und Yazdani, 1998; Johnson und Anderson, 1999] und *in vivo* [Levin, 1980; Leo et al., 1971; Rapoport et al., 1979; Pardridge et al., 1990; Buchwald und Bodor, 1998] gezeigt werden. Deshalb wurde der Oktanol-Puffer-Verteilungskoeffizient $P_{Oktanol/Puffer}$ der Modell-Substanzen bestimmt und als logarithmierter Oktanol-Puffer-Verteilungskoeffizient $\log P_{Oktanol/Puffer}$ mit den aus Permeationsversuchen ermittelten apparenten Permeationskoeffizienten P_{app} der Substanzen korreliert. Tabelle 3.3 gibt die ermittelten Verteilungskoeffizienten der Modell-Substanzen wieder.

Tabelle 3.3: Oktanol-Puffer-Verteilungskoeffizienten von Modell-Substanzen (Mittelwert \pm S.D.)

Modell-Substanz	$P_{\text{Oktanol/Puffer}}$	$\log P_{\text{Oktanol/Puffer}}$
Sucrose	0,00124 \pm 0,00003	-2,91 \pm 0,08
L-Leucin	0,0559 \pm 0,0017	-1,25 \pm 0,06
Morphin	0,284 \pm 0,005	-0,55 \pm 0,01
Propranolol	7,698 \pm 0,085	0,89 \pm 0,01
Diazepam	464,0 \pm 9,3	2,67 \pm 0,05
Cyclosporin A	548,7 \pm 21,9	2,74 \pm 0,11

Die in Tabelle 3.3 aufgeführten Modell-Substanzen ergaben nach steigender Lipophilie die Reihenfolge Sucrose < L-Leucin < Morphin < Propranolol < Diazepam < Cyclosporin A. Der Parazellulär-Marker Sucrose mit dem kleinsten $\log P_{\text{Oktanol/Puffer}}$ von $-2,91$ war am wenigsten lipophil, Cyclosporin A mit dem größten $\log P_{\text{Oktanol/Puffer}}$ von $2,74$ war am stärksten lipophil. Den ermittelten Oktanol-Puffer-Verteilungskoeffizienten zufolge waren Sucrose, L-Leucin und Morphin etwa 800-, 18- bzw. 3,5-fach stärker in der Pufferphase als in der Oktanolphase angereichert. Die Verteilung von Propranolol, Diazepam und Cyclosporin hingegen ergab eine etwa 8-, 464- bzw. 550-fach stärkere Anreicherung der Substanzen in Oktanol als in Puffer. Die ermittelten Oktanol-Puffer-Verteilungskoeffizienten der Modell-Substanzen stimmen gut mit Literaturangaben überein [Oldendorf, 1974a; Rapoport et al., 1979; Cefalu und Pardridge, 1985; Tsuji et al., 1993; Huwyler et al., 1997; Glynn und Yazdanian, 1998].

3.2.2.1 *In vitro* Permeationsmodell der Blut-Hirn-Schranke, Simulation 1

Für die erste Simulation eines *in vitro* Permeationsmodells der Blut-Hirn-Schranke wurden cerebrale Kapillarendothelzellen vom Schwein mit einer Dichte von 150.000 Zellen/cm² auf 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Rattenschwanz-Collagen-beschichtete Transwell Clear[®]-12-Well-Zellkulturplatten ausgesät und bis zu Tag 7 in Kultur gehalten. Permeationsversuche wurden mit den Modell-Substanzen Cyclosporin A, Diazepam, Morphin und Propranolol sowie dem Parazellulär-Marker Sucrose nach indirekter Probenapplikation bei einem Akzeptorvolumen von 1 ml und einer Schüttelgeschwindigkeit von 500 SpM über 60 min durchgeführt. Abbildung 3.22 zeigt die Korrelation der apparenten Permeationskoeffizienten mit den logarithmierten Oktanol-Puffer-Verteilungskoeffizienten der Substanzen.

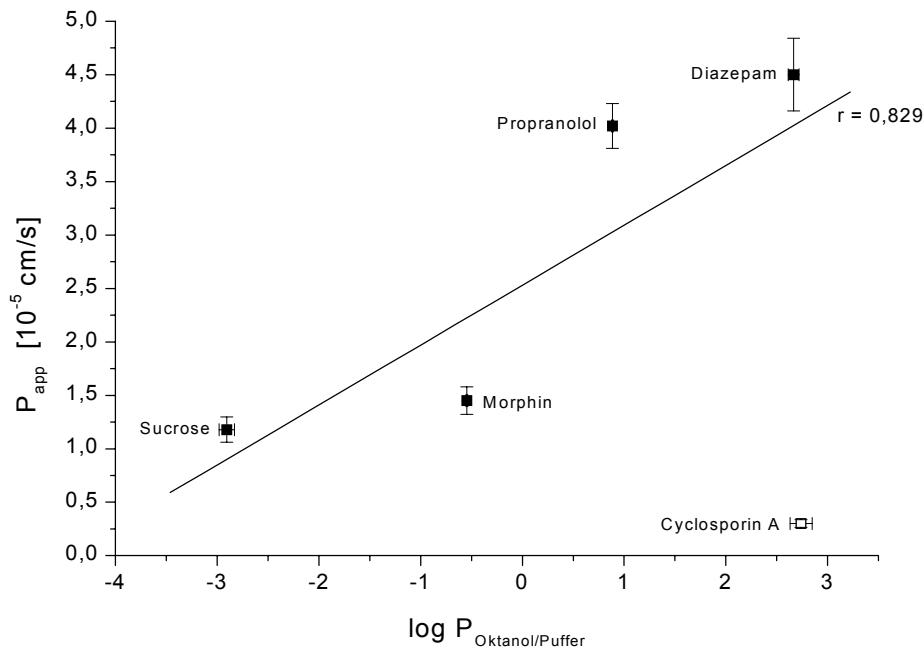


Abbildung 3.22

In vitro Permeationsmodell der Blut-Hirn-Schranke, Simulation 1
 (genaue Versuchsbedingungen in Tabelle 6.2 im Anhang)
 Permeation von Modell-Substanzen durch unpassagierte PBCEC-Monolayer
 Beschichtung: 20 µg/cm² Rattenschwanz-Collagen
 Aussaatdichte: 150.000 Zellen/cm²
 Kultivierung: 7 Tage, serumhaltiges Kulturmedium K+
 Versuchsdesign: indirekte Probenapplikation, 1 ml Akzeptorvolumen, 500 SpM
 (Mittelwerte ± S.D., P_{app}: n = 4, log P_{Oktanol/Puffer}: n = 27, r = 0,829)

Abbildung 3.22 zeigt eine gute Korrelation ($r = 0,829$) des ermittelten P_{app} für die Modell-Substanzen Diazepam, Morphin, Propranolol und Sucrose mit dem $\log P_{Oktanol/Puffer}$ der Substanzen. Cyclosporin A wurde nicht in die Korrelation mit einberechnet. Der P_{app} für Sucrose lag mit $1,18 \times 10^{-5}$ cm/s knapp unter dem von Morphin mit $1,45 \times 10^{-5}$ cm/s. Der P_{app} der lipophileren Arzneistoffe Propranolol ($\log P_{Oktanol/Puffer} = 0,89$) und Diazepam ($\log P_{Oktanol/Puffer} = 2,67$) war mit $4,02 \times 10^{-5}$ cm/s bzw. $4,50 \times 10^{-5}$ cm/s wesentlich höher. Für Cyclosporin A wurde trotz der größten Lipophilie ($\log P_{Oktanol/Puffer} = 2,74$) nur ein P_{app} von $0,30 \times 10^{-5}$ cm/s ermittelt.

Wie bereits für viele Arzneistoffe *in vitro* gezeigt, korrelieren die apparenten Permeationskoeffizienten der Modell-Substanzen Diazepam, Morphin und Propranolol sowie des Parazellulär-Markers Sucrose gut mit ihren Oktanol-Puffer-Verteilungskoeffizienten [Leo et al., 1971, Rim et al., 1986; Pardridge et al., 1990; Glynn und Yazdanian, 1998; Johnson und Anderson, 1999]. Cyclosporin A weist trotz der größten Lipophilie aller Modell-Substanzen die geringste Permeationsgeschwindigkeit

keit auf, was sich in einer deutlich negativen Abweichung des P_{app} von der Korrelationsgeraden äußert. Diese Beobachtung entspricht der anderer [Cefalu und Pardridge, 1985; Begley et al., 1990].

Aus Simulation 1 ergibt sich aufgrund der apparenten Permeationskoeffizienten folgendes Ranking (nach steigendem P_{app}): Sucrose < Morphin < Propranolol < Diazepam. Cyclosporin A wurde nicht in das Ranking mit einbezogen.

3.2.2.2 *In vitro* Permeationsmodell der Blut-Hirn-Schranke, Simulation 2

PBCEC wurden mit einer Aussaatdichte von 150.000 Zellen/cm² auf die mit 20 µg/cm² Rattenschwanz-Collagen beschichteten Membranfilter von Transwell Clear®-12-Well-Zellkulturplatten ausgesät. Um einen Einfluss von Serum auf die Permeation von Cyclosporin A in Simulation 1 zu untersuchen, wurden die Zellen für die zweite Simulation eines *in vitro* Permeationsmodells der Blut-Hirn-Schranke ab Tag 4 in Kultur auf serumfreies Kulturmedium umgestellt. An Tag 7 in Kultur wurden die PBCEC-Monolayer für Permeationsversuche über eine Versuchsdauer von 60 min eingesetzt. Nach indirekter Probenapplikation der Arzneistoffe Cyclosporin A, Diazepam, Morphin und Propranolol sowie des Parazellulär-Markers Sucrose wurden die Permeationsversuche bei 1 ml Akzeptorvolumen und 500 SpM Schüttelgeschwindigkeit durchgeführt. In Abbildung 3.23 ist die Korrelation des apparenten Permeationskoeffizienten der Modell-Substanzen mit dem logarithmierten Oktanol-Puffer-Verteilungskoeffizienten dargestellt.

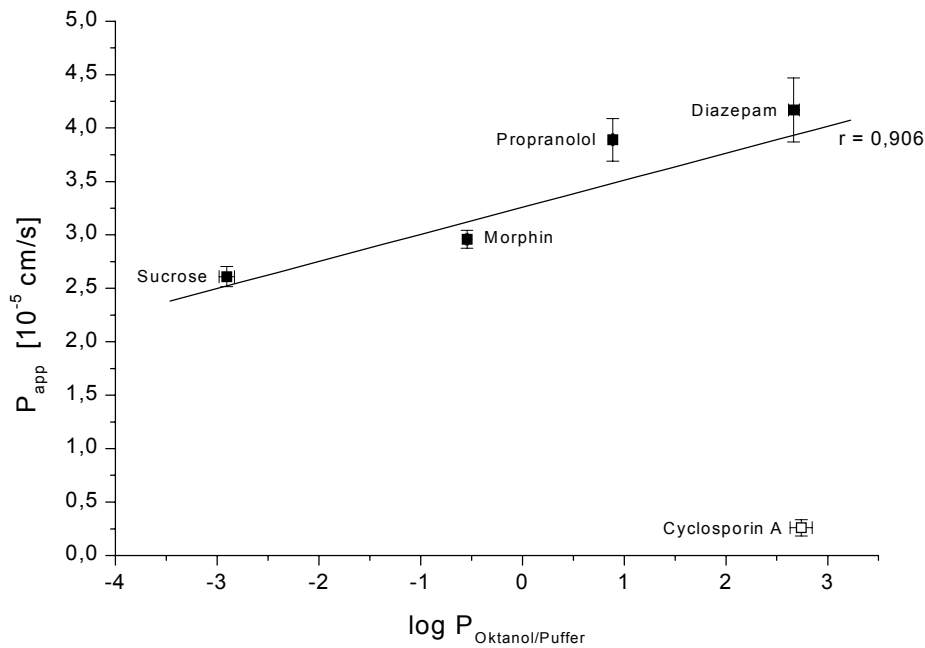


Abbildung 3.23

In vitro Permeationsmodell der Blut-Hirn-Schranke, Simulation 2
 (genaue Versuchsbedingungen in Tabelle 6.2 im Anhang)
 Permeation von Modell-Substanzen durch unpassagierte PBCEC-Monolayer
 Beschichtung: 20 µg/cm² Rattenschwanz-Collagen
 Aussaatdichte: 150.000 Zellen/cm²
 Kultivierung: 7 Tage, serumfreies Kulturmedium K-
 Versuchsdesign: indirekte Probenapplikation, 1 ml Akzeptorvolumen, 500 SpM
 (Mittelwerte ± S.D., P_{app}: n = 4, log P_{Oktanol/Puffer}: n = 27, r = 0,906)

Abbildung 3.23 zeigt die Korrelation des nach Permeationsversuchen ermittelten P_{app} von Diazepam, Morphin, Propranolol und Sucrose mit dem log P_{Oktanol/Puffer} der Substanzen. Cyclosporin wurde nicht in die Korrelation mit einberechnet. Deutlich ist der Effekt des Serumentzugs auf die Trennleistung des Permeations-Screening-Systems an dem P_{app} der weniger lipophilen Substanzen Sucrose und Morphin zu erkennen: mit $2,61 \times 10^{-5}$ cm/s für Sucrose bzw. $2,96 \times 10^{-5}$ cm/s für Morphin lagen die P_{app}-Werte erheblich über denen in Simulation 1. Demgegenüber war der P_{app} von Propranolol bzw. Diazepam mit $3,89 \times 10^{-5}$ cm/s bzw. $4,17 \times 10^{-5}$ cm/s nur geringfügig reduziert. Der P_{app} von $0,26 \times 10^{-5}$ cm/s für Cyclosporin A war auch in Simulation 2 der niedrigste der ermittelten apparenten Permeationskoeffizienten.

Eine gute Korrelation zwischen Permeationsgeschwindigkeit und Lipophilie von Sucrose, Morphin, Propranolol und Diazepam konnte erneut bestätigt werden (r = 0,906). Cyclosporin A wurde nicht in die Korrelation mit einberechnet. In Simulation 2 hat der Entzug von Serum aus dem Kulturmedium bei der Kultivierung von PBCEC

im Vergleich zu Simulation 1 zur Ausbildung weniger dichter Zell-Monolayer geführt, was sich in einem starken Anstieg der Permeationsgeschwindigkeit des hydrophilen Parazellulär-Markers Sucrose und von Morphin geäußert hat. Diese Beobachtungen bestätigen die Ergebnisse aus 3.2.1.4 *Einflussfaktor Kulturmedium*. Für die sehr gut permeierenden lipophilen Transzellulär-Marker Diazepam und Propranolol stellt auch ein dichter Monolayer keine Permeationsbarriere dar, so dass keine großen Unterschiede in den P_{app} -Werten aus Simulation 1 bei dichteren PBCEC-Monolayern verglichen mit weniger dichten PBCEC-Monolayern aus Simulation 2 zu beobachten waren. Der P_{app} von Cyclosporin A war trotz des Serumentzugs aus dem Nährmedium erneut sehr niedrig und wies eine deutlich negative Abweichung von der Korrelationsgeraden auf. Demzufolge hat Serum keinen Einfluss auf die Permeation von Cyclosporin A in einem *in vitro* Permeationsmodell der Blut-Hirn-Schranke. Daraus muss der Schluss gezogen werden, dass entweder Adsorption an das Material der Zellkulturplatte stattgefunden hat, oder aber andere Mechanismen eine Permeation von Cyclosporin A verhindert haben. Der erste Fall kann ausgeschlossen werden, da Adsorptionsstellen durch unmarkiertes Cyclosporin A abgesättigt wurden. Als wahrscheinlicher kann ein Einfluss des ABC-Transporters P-Glycoprotein angenommen werden, der in den Kapillarendothelzellen nachgewiesen wurde (3.1.3.6 *Immunfärbung des ABC-Transporter P-Glycoprotein*). Da Cyclosporin A ein gutes Substrat von P-gp ist, liegt die Vermutung nahe, dass das Immunsuppressivum durch P-gp an der Permeation durch den Monolayer gehindert wurde, was zu der negativen Abweichung des P_{app} von der Korrelationsgeraden geführt hat [Cefalu und Pardridge, 1985; Begley et al., 1990; Twentyman, 1992; Saeki et al., 1993; Tsuji et al., 1993; Sakata et al., 1994; Theis et al., 1997; Kochi et al., 1999].

Aus Simulation 2 ergibt sich anhand der apparenten Permeationskoeffizienten das gleiche Ranking wie in Simulation 1, allerdings wurde durch den Serum-Entzug bei der Kultivierung der Zellen die Trennleistung durch weniger dichte PBCEC-Monolayer verringert. Das Ranking nach steigendem P_{app} : Sucrose < Morphin < Propranolol < Diazepam. Cyclosporin A wurde nicht mit einbezogen.

3.2.2.3 *In vitro* Permeationsmodell der Blut-Hirn-Schranke, Simulation 3

Für die dritte Simulation eines *in vitro* Permeationsmodells der Blut-Hirn-Schranke wurden PBCEC mit 250.000 Zellen/cm² auf Transwell Clear®-12-Well-Zellkulturplatten ausgesät, deren Kulturfläche zuvor mit 5 µg/cm² Rattenschwanz-Collagen beschichtet wurde. Permeationsversuche erfolgten nach einer Kulturdauer von 7 Tagen mit unpassagierten PBCEC-Monolayern nach indirekter Probenapplikation der Substanzen, bei 1 ml Akzeptorvolumen und einer Schüttelgeschwindigkeit von 500 SpM. Abbildung 3.24 zeigt die Korrelation der apparenten Permeationskoeffizienten mit den logarithmierten Oktanol-Puffer-Verteilungskoeffizienten.

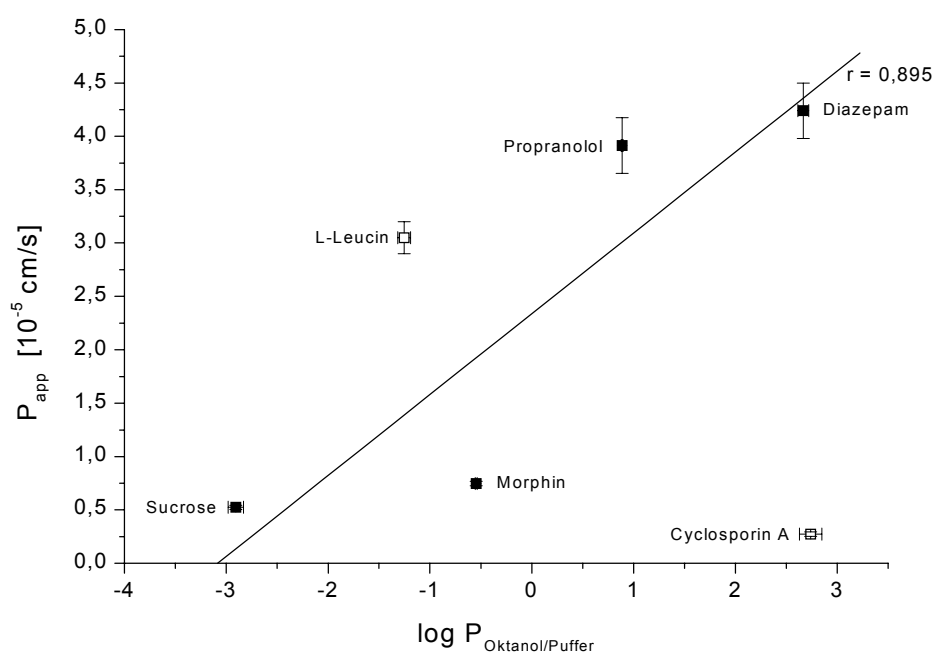


Abbildung 3.24

In vitro Permeationsmodell der Blut-Hirn-Schranke, Simulation 3
 (genaue Versuchsbedingungen in Tabelle 6.2 im Anhang)
 Permeation von Modell-Substanzen durch unpassagirierte PBCEC-Monolayer
 Beschichtung: 5 µg/cm² Rattenschwanz-Collagen
 Aussaatdichte: 250.000 Zellen/cm²
 Kultivierung: 7 Tage, serumhaltiges Kulturmedium K+
 Versuchsdesign: indirekte Probenapplikation, 1 ml Akzeptorvolumen, 500 SpM
 (Mittelwerte ± S.D., P_{app}: n = 4, log P_{Oktanol/Puffer}: n = 27, r = 0,895)

Abbildung 3.24 zeigt, dass die dritte Simulation eines *in vitro* Permeationsmodells der Blut-Hirn-Schranke über eine bessere Trennleistung verfügte als die Simulationen 1 und 2. Der P_{app} von Sucrose bzw. Morphin lag bei $0,52 \times 10^{-5}$ cm/s bzw. $0,75 \times 10^{-5}$ cm/s und somit deutlich unter denen aus Simulation 1 und Simulation 2. Die für Propranolol und Diazepam ermittelten P_{app}-Werte waren mit $3,91 \times 10^{-5}$ cm/s bzw. $4,24 \times$

10^{-5} cm/s ähnlich denen der vorherigen Simulationen. Unverändert zu Simulation 1 und 2 der P_{app} für Cyclosporin A von $0,27 \times 10^{-5}$ cm/s. Für die Aminosäure L-Leucin wurde ein P_{app} von $3,05 \times 10^{-5}$ cm/s ermittelt.

Die bessere Trennleistung in Simulation 3 verglichen mit Simulation 1 und 2 kann auf die von $20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ auf $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ reduzierte Beschichtungsmenge von Rattenschwanz-Collagen sowie auf die Erhöhung der Aussaatdichte von PBCEC auf $250.000 \text{ Zellen}/\text{cm}^2$ zurückgeführt werden, was bei der Kultivierung von PBCEC die Ausbildung dichter Zell-Monolayer zur Folge hatte. Nach Permeationsversuchen ergaben sich infolgedessen niedrigere apparente Permeationskoeffizienten für die hydrophilen Substanzen Sucrose und Morphin (s. auch *3.2.1.1 Einflussfaktor Beschichtung von Kulturflächen* und *3.2.1.2 Einflussfaktor Aussaatdichte*). Die Permeation der lipophilen Transzellulär-Marker Propranolol und Diazepam sowie des P-gp-Substrates Cyclosporin A blieb von der verbesserten Dichtigkeit der PBCEC-Monolayer unbeeinflusst. Auffallend ist die für seine Lipophilie überhöhte Permeationsgeschwindigkeit von L-Leucin. Diese positive Abweichung des P_{app} der Aminosäure L-Leucin von der Korrelationsgeraden deutet auf das Vorhandensein des L-Aminosäure-Carriers in den PBCEC-Monolayern hin, der für die Versorgung des Gehirns mit L-Aminosäuren verantwortlich ist [Betz und Goldstein, 1978; Goldstein et al., 1983; van Bree et al., 1988b; Audus et al., 1992; Laterra und Goldstein, 1992; Drewes, 1999]. Dieses Aminosäure-Carrier-Protein befindet sich auf der apikalen und basolateralen Seite von Gehirnkapillarendothelzellen und transportiert L-Aminosäuren vom Blut in das Gehirn. Sein Vorkommen in kultivierten Gehirnkapillarendothelzellen wurde bereits mehrfach funktionell nachgewiesen, was auch die positive Abweichung des P_{app} für L-Leucin von der Korrelationsgeraden erklärt [Betz und Goldstein, 1978; Cancilla und DeBault, 1983; Audus und Borchardt, 1986b; Török, 1999].

Das nach steigendem P_{app} aufgestellte Ranking blieb unverändert: Sucrose < Morphin < Propranolol < Diazepam. Cyclosporin A und L-Leucin wurden nicht in das Ranking mit einbezogen.

3.2.2.4 *In vitro* Permeationsmodell der Blut-Hirn-Schranke, Simulation 4

Die vierte Simulation eines *in vitro* Permeationsmodells der Blut-Hirn-Schranke wurde durchgeführt, um den Einfluss passagierter PBCEC sowie eines veränderten Versuchsdesigns auf die apparenten Permeationskoeffizienten und das Ranking der Modell-Substanzen zu untersuchen. Hierzu wurden Endothelzellen zunächst in Zellkulturflaschen mit einer Dichte von 250.000 Zellen/cm² ausgesät. Bei Erreichen von 75-80%iger Konfluenz nach 2-3 Tagen in Kultur erfolgte die Passage mittels Trypsinisierung. Anschließend wurden die PBCEC erneut mit einer Aussaatdichte von 250.000 Zellen/cm² auf 5 µg/cm² Rattenschwanz-Collagen-beschichtete Membranfilter von Transwell Clear[®]-12-Well-Zellkulturplatten ausgesät und bis zu Tag 7 in Kultur gehalten. Permeationsversuche erfolgten nach indirekter Probenapplikation bei einem Akzeptorvolumen von 1,5 ml und einer Schüttelgeschwindigkeit von 100 SpM. Abbildung 3.25 gibt die Korrelation der apparenten Permeationskoeffizienten mit den logarithmierten Oktanol-Puffer-Verteilungskoeffizienten der Substanzen wieder.

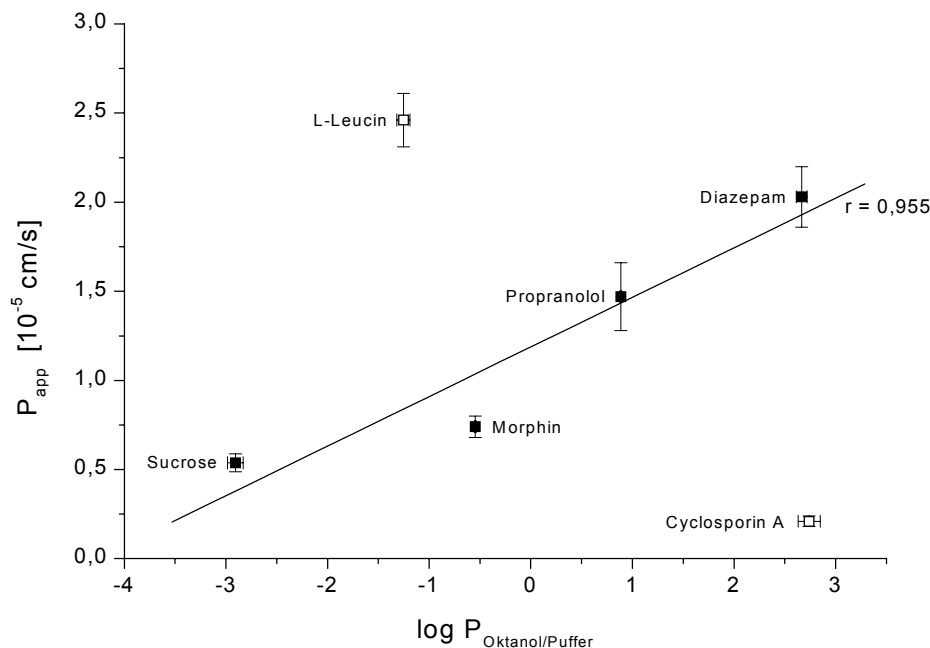


Abbildung 3.25

In vitro Permeationsmodell der Blut-Hirn-Schranke, Simulation 4
 (genaue Versuchsbedingungen in Tabelle 6.2 im Anhang)
 Permeation von Modell-Substanzen durch passagierete PBCEC-Monolayer
 Beschichtung: 5 µg/cm² Rattenschwanz-Collagen
 Aussaatdichte: 250.000 Zellen/cm²
 Kultivierung: 7 Tage, serumhaltiges Kulturmedium K+
 Versuchsdesign: indirekte Probenapplikation, 1,5 ml Akzeptorvolumen, 100 SpM
 (Mittelwerte ± S.D., P_{app}: n = 3, log P_{Oktanol/Puffer}: n = 27, r = 0,955)

Abbildung 3.25 zeigt eine gute Korrelation ($r = 0,955$) des ermittelten P_{app} für Sucrose, Morphin, Propranolol und Diazepam mit dem $\log P_{Oktanol/Puffer}$ der Substanzen. Cyclosporin und L-Leucin wurden nicht in die Korrelation mit einberechnet. Wie in Simulation 3, ergaben eine Beschichtungsmenge von $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ Rattenschwanz-Collagen und eine Aussaatdichte von $250.000 \text{ Zellen}/\text{cm}^2$ auch bei Simulation 4 dichte PBCEC-Monolayer, was der P_{app} von Sucrose mit $0,54 \times 10^{-5} \text{ cm/s}$ und der von Morphin mit $0,74 \times 10^{-5} \text{ cm/s}$ belegen. Durch Änderungen des Versuchsdesigns (Akzeptorvolumens $1,5 \text{ ml}$; Schüttelgeschwindigkeit 100 SpM) und durch die Verwendung passagierter PBCEC-Monolayer in Simulation 4 gegenüber Simulation 3 wurde der P_{app} der Transzellulär-Marker Propranolol und Diazepam auf $1,47 \times 10^{-5} \text{ cm/s}$ bzw. $2,03 \times 10^{-5} \text{ cm/s}$ reduziert. Der P_{app} für Cyclosporin A fiel geringfügig auf $0,21 \times 10^{-5} \text{ cm/s}$, der für L-Leucin fiel auf $2,46 \times 10^{-5} \text{ cm/s}$.

Die Ergebnisse für Sucrose und Morphin bestätigen die aus Simulation 3 ermittelten apparenten Permeationskoeffizienten (s. auch 3.2.1.1 *Einflussfaktor Beschichtung von Kulturflächen* und 3.2.1.2 *Einflussfaktor Aussaatdichte*). Die Reduktion der P_{app} -Werte für Propranolol und Diazepam dürften aufgrund der hohen Lipophilie der Moleküle eher auf das verringerte Akzeptorvolumen und die verringerte Schüttelgeschwindigkeit als auf die Verwendung passagierter PBCEC-Monolayer zurückzuführen sein (s. auch 3.2.1.5 *Einflussfaktor Versuchsdesign*). Das Ranking nach steigendem P_{app} blieb unverändert: Sucrose < Morphin < Propranolol < Diazepam. Cyclosporin A und L-Leucin wurden nicht mit einbezogen.

3.2.2.5 *In vitro* Permeationsmodell der Blut-Hirn-Schranke, Simulation 5

Die fünfte Simulation eines *in vitro* Permeationsmodells der Blut-Hirn-Schranke diente der Untersuchung des Einflusses des Serumproteins BSA auf die Permeation der Modell-Substanzen *in vitro*. Mit einem 4%-igen BSA-Zusatz zur KRB-Pufferlösung sollte die *in vivo* Situation realitätsgetreuer simuliert werden. Die Aussaat von PBCEC erfolgte mit $150.000 \text{ Zellen}/\text{cm}^2$ auf Transwell Clear[®]-12-Well-Zellkulturplatten, deren Kulturfläche mit $20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ Rattenschwanz-Collagen beschichtet wurde. Permeationsversuche wurden nach 7 Tagen in Kultur mit unpassagierten PBCEC-Monolayern nach indirekter Probenapplikation der Substanzen, bei 1 ml Akzeptorvolumen und einer Schüttelgeschwindigkeit von 500 SpM durchgeführt. Es wurde KRB-Pufferlösung mit 4% BSA verwendet. In Abbildung 3.26 sind die ap-

parenten Permeationskoeffizienten der Modell-Substanzen gegen die logarithmierten Oktanol-Puffer-Verteilungskoeffizienten aufgetragen.

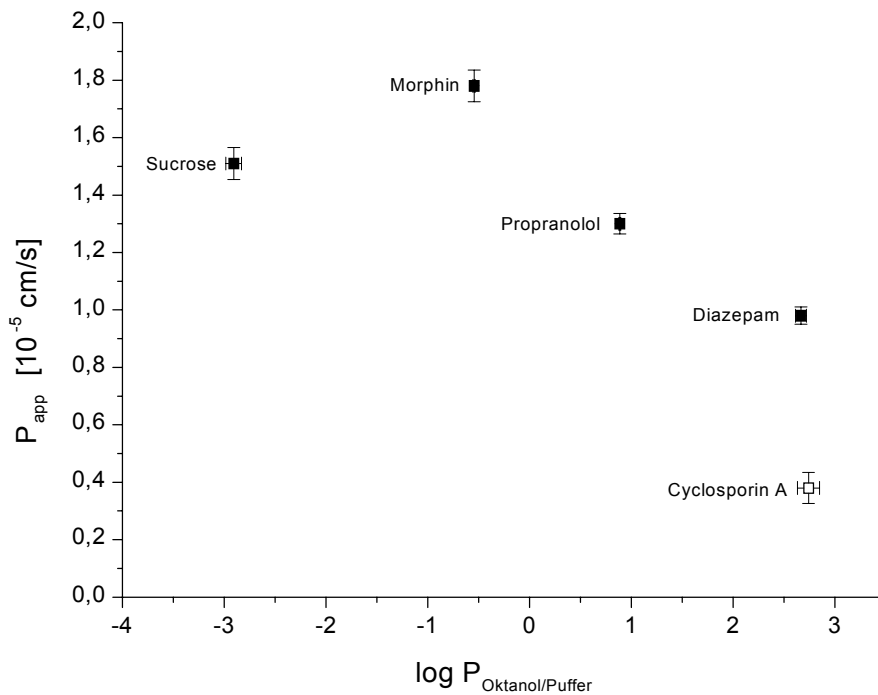


Abbildung 3.26

In vitro Permeationsmodell der Blut-Hirn-Schranke, Simulation 5
(genaue Versuchsbedingungen in Tabelle 6.2 im Anhang)
Permeation von Modell-Substanzen durch unpassagierete PBCEC-Monolayer
KRB-Pufferlösung mit 4% BSA
Beschichtung: $20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ Rattenschwanz-Collagen
Aussaatdichte: $150.000 \text{ Zellen}/\text{cm}^2$
Kultivierung: 7 Tage, serumhaltiges Kulturmedium K+
Versuchsdesign: indirekte Probenapplikation, 1 ml Akzeptorvolumen, 500 SpM
(Mittelwerte \pm S.D., P_{app} : $n = 4$, $\log P_{\text{Oktanol/Puffer}}$: $n = 27$)

Abbildung 3.26 zeigt, dass nach Zugabe von 4% BSA zu der KRB-Pufferlösung, die zur Durchführung von Permeationsversuchen verwendet wurde, keine Korrelation des P_{app} mit dem $\log P_{\text{Oktanol/Puffer}}$ möglich war. Der Zusatz von BSA zur KRB-Pufferlösung bewirkte eine drastische Reduktion des P_{app} der lipophilen Transzellulär-Marker Propranolol und Diazepam auf $1,30 \times 10^{-5} \text{ cm/s}$ bzw. $0,98 \times 10^{-5} \text{ cm/s}$. Die Permeation der hydrophilen Substanzen Sucrose und Morphin hingegen wurde kaum beeinflusst. Der P_{app} lag mit $1,51 \times 10^{-5} \text{ cm/s}$ für Sucrose bzw. $1,78 \times 10^{-5} \text{ cm/s}$ für Morphin im Bereich der Werte, die aus den Simulationen 1 und 2 ermittelt wurden. Mit einem P_{app} von $0,38 \times 10^{-5} \text{ cm/s}$ war die Permeationsgeschwindigkeit von Cyclosporin A im Vergleich zu vorherigen Simulationen fast verdoppelt, aber dennoch sehr niedrig.

Die deutlich verringerte Permeationsgeschwindigkeit der lipophilen Arzneistoffe Propranolol und Diazepam kommt durch Proteinbindung an BSA zustande [Eddy et al., 1997]. Bei den hydrophilen Substanzen Sucrose und Morphin war das nicht der Fall, die apparenten Permeationskoeffizienten lagen im üblichen Bereich. Auch die niedrige Permeationsgeschwindigkeit von Cyclosporin A wurde durch den Zusatz von BSA kaum beeinflusst.

Die Supplementierung der KRB-Pufferlösung mit 4% BSA änderte das Ranking wie folgt (nach steigendem P_{app}): Diazepam < Propranolol < Sucrose < Morphin. Cyclosporin A wurde nicht in das Ranking mit einbezogen.

Zur Charakterisierung des *in vitro* Permeationsmodells der Blut-Hirn-Schranke durch Permeationsversuche wurde der apparente Permeationskoeffizient P_{app} bestimmt. Der P_{app} gibt die Permeationsgeschwindigkeit an, mit der eine Substanz durch die Permeationsbarriere aus Zell-Monolayer und beschichtetem Membranfilter permeiert. Da jedoch der Zell-Monolayer und nicht der beschichtete Membranfilter die geschwindigkeitsbestimmende Permeationsbarriere darstellen soll, muss durch Kontrollversuche ohne Zellen gezeigt werden, dass der beschichtete Membranfilter frei permeabel für die zu untersuchende Substanz ist [Cecchelli et al., 1999]. Aus den Kontrollversuchen kann der Filter-Permeationskoeffizient P_{Fil} ermittelt werden, der die Permeationsgeschwindigkeit der Substanz angibt, mit der diese durch den beschichteten Membranfilter permeiert. Aus dem apparenten Permeationskoeffizienten P_{app} und dem Filter-Permeationskoeffizienten P_{Fil} kann dann der effektive Permeationskoeffizient P_{eff} errechnet werden, der die Permeationsgeschwindigkeit angibt, mit der die Substanz nur durch den Zell-Monolayer permeiert (s. Gleichung unter 1.1.4.2.3 *Experimenttypen, Permeationsversuche*).

Die für den Parazellulär-Marker Sucrose aus Kontrollversuchen ermittelten Werte für P_{Fil} lagen bei $0,7-1,4 \times 10^{-4}$ cm/s. Bei einem P_{app} von $1,0 \times 10^{-5}$ cm/s resultieren somit für den P_{eff} Werte von $1,08-1,17 \times 10^{-5}$ cm/s. Für gut permeierende Substanzen wie die Transzellulär-Marker Diazepam und Propranolol sind P_{app} und P_{eff} sogar gleich, weil nicht der Zell-Monolayer, sondern der beschichtete Membranfilter die geschwindigkeitsbestimmende Permeationsbarriere darstellt [Yu und Sinko, 1997]. Aufgrund des nur geringen bzw. nicht vorhandenen Unterschiedes zwischen P_{app} und P_{eff} wurde der beschichtete Membranfilter als Permeationsbarriere vernachlässigt, so dass

nur der apparente Permeationskoeffizient P_{app} einer Substanz angegeben wurde. Dadurch konnte im Sinne eines industrietauglichen Permeations-Screening-Systems auf weitere zeit- und kostenintensive Kontrollversuche zur Bestimmung des P_{Fil} verzichtet werden.

Die gute Korrelation der zur Charakterisierung des *in vitro* Permeationsmodells der Blut-Hirn-Schranke durch Permeationsversuche mit Modell-Substanzen ermittelten apparenten Permeationskoeffizienten P_{app} mit den logarithmierten Oktanol-Puffer-Verteilungskoeffizienten $\log P_{Oktanol/Puffer}$ entspricht bisherigen Beobachtungen [Leo et al., 1971, Rim et al., 1986; Pardridge et al., 1990; Glynn und Yazdanian, 1998; Johnson und Anderson, 1999]. In der Literatur wird teilweise jedoch nicht von einem linearen Verhältnis zwischen Permeation und Lipophilie ausgegangen, sondern von einem sigmoidalen Verhältnis, was auf einen Grenzwert der Lipophilie schließen lässt oberhalb dessen Substanzen die Blut-Hirn-Schranke permeieren können [Oldendorf, 1974a; Goldstein und Betz, 1986; van Bree et al., 1988a; Audus et al., 1992; van Bree et al., 1993]. Ein sigmoidales Verhältnis zwischen dem P_{app} und dem $\log P_{Oktanol/Puffer}$ kann aufgrund der Korrelationen in Simulation 1 und Simulation 3 zwar vermutet werden, für einen Nachweis bedarf es aber der Untersuchung von weitaus mehr Substanzen als der hier getesteten.

Das Ranking der Testsubstanzen nach steigendem P_{app} war bei vier simulierten *in vitro* Permeationsmodellen der Blut-Hirn-Schranke gleich: Sucrose < Morphin < Propranolol < Diazepam. Ein 4%-iger BSA-Zusatz zur Pufferlösung in Simulation 5 verursachte ein komplett anderes Ranking, was auf Proteinbindung der lipophilen Arzneistoffe Propranolol und Diazepam zurückzuführen ist. Da Permeationsversuche üblicherweise ohne den Zusatz von BSA oder anderen Serumproteinen durchgeführt werden, spielt dieser Einflussfaktor für ein *in vitro* Permeationsmodell der Blut-Hirn-Schranke in der Praxis jedoch keine Rolle.

Die positive Abweichung des P_{app} für L-Leucin von der Korrelationsgeraden lässt sich durch carrier-vermittelten Transport erklären, da L-Leucin ein Substrat des L-Aminosäure-Carriers ist und legt zugleich die Vermutung nahe, dass dieses Protein in kultivierten PBCEC funktionell aktiv ist, was bereits früher gezeigt wurde [Török, 1999]. Für den Arzneistoff Cyclosporin A wurde ein großer $\log P_{Oktanol/Puffer}$ bestimmt, die apparenten Permeationskoeffizienten waren dafür wider Erwarten niedrig. Cyclosporin A wurde demzufolge nicht in die Korrelationen mit einberechnet, da offensichtlich kein lineares Verhältnis zwischen dem P_{app} und dem $\log P_{Oktanol/Puffer}$ der

Substanz besteht. Die geringe Permeationsgeschwindigkeit von Cyclosporin A durch PBCEC-Monolayer kann mit großer Wahrscheinlichkeit auf die Anwesenheit des ABC-Transporters P-Glycoprotein in den Endothelzellen zurückgeführt werden. Zwar ist mit dem *in vitro* Permeationsmodell der Blut-Hirn-Schranke aufgrund der durchgeführten Permeationsversuche (Permeationsrichtung apikal nach basolateral) eine deutlich negative Abweichung des P_{app} für Cyclosporin A von der Korrelationsgeraden festzustellen, allerdings kann daraus nicht zweifelsfrei der Einfluss von P-Glycoprotein nachgewiesen werden. Es hätte weiterer Permeationsversuche mit Permeationsrichtung von basolateral nach apikal bedurft, um aus der Netto-Permeation beider Experimente Aussagen über P-gp-Interaktionen mit Cyclosporin A treffen zu können. Weitere Permeationsversuche wurden allerdings nicht durchgeführt, da diese Methode zur Bestimmung von Arzneistoff-P-gp-Interaktionen ungeeignet erscheint: es sind zeit- und kostenintensive Permeationsversuche in beiden Permeationsrichtungen notwendig, außerdem zeigen die Ergebnisse, dass das *in vitro* Permeationsmodell der Blut-Hirn-Schranke anfällig gegenüber vielen Einflussfaktoren ist, was zu fehlerhaften Schlussfolgerungen hinsichtlich der Arzneistoff-P-gp-Interaktion führt [Döppenschmitt et al., 1999a; Lentz et al., 2000]. Die positive Abweichung der P_{app} -Werte für L-Leucin und die negative Abweichung der P_{app} -Werte für Cyclosporin A von der Korrelationsgeraden sind in der Literatur dokumentiert und zeigen, dass mit dem *in vitro* Permeationsmodell der Blut-Hirn-Schranke deutlich differenziert werden kann zwischen passiver parazellulärer und transzellulärer Permeation (z.B. Sucrose, Diazepam) und Transportmechanismen wie dem L-Aminosäure-Carrier (L-Leucin) bzw. dem ABC-Transporter P-Glycoprotein (Cyclosporin A) [Oldendorf, 1974a; Pardridge et al., 1990; Buchwald und Bodor, 1998].

Die Ergebnisse zeigen, dass eine Vergleichbarkeit von Permeationsdaten unterschiedlicher *in vitro* Permeationsmodelle der Blut-Hirn-Schranke zwar qualitativ über das Ranking von Testsubstanzen nach dem P_{app} möglich ist, quantitative Vergleiche der absoluten P_{app} -Werte dagegen sind aufgrund zu großer Schwankungen nur schwer, wenn überhaupt möglich. Somit ist die Übertragbarkeit von Permeationsdaten von einem *in vitro* Permeationsmodell auf das andere in Frage gestellt [de Boer et al., 1999]. Daraus kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass als einzige Referenz für Permeationsdaten nur das eigene *in vitro* Permeationsmodell der Blut-Hirn-Schranke gültig ist, welches hierfür ausreichend charakterisiert und standardisiert sein muss [de Boer et al., 1999].

3.2.3 Zusammenfassung der Charakterisierung des *in vitro* Permeationsmodells der Blut-Hirn-Schranke

Zur Charakterisierung des *in vitro* Permeationsmodells der Blut-Hirn-Schranke wurden zunächst Permeationsversuche mit Parazellulär-Markern durchgeführt, um neben zellspezifischen Einflussfaktoren auch material- und methodenspezifische Einflussfaktoren hinsichtlich ihrer Auswirkungen auf die Permeation von Testsubstanzen zu untersuchen. Die Untersuchungen umfassten folgende Einflussfaktoren: Beschichtung von Kulturflächen, Aussaatdichte, Kulturdauer, Kulturmedium, Versuchsdesign, Passagieren von PBCEC und Membranfilter.

Bei Verwendung von Rattenschwanz-Collagen als Beschichtungsmaterial resultierten niedrigere Permeationsraten des Parazellulär-Markers Sucrose als bei der Kombination Collagen S/Fibronectin. Durch Verringerung der Rattenschwanz-Collagen-Beschichtungsmenge von 20 auf 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ nahm der P_{app} für Sucrose ab. Für die Untersuchung des Einflussfaktors Aussaatdichte wurden PBCEC mit 125.000, 250.000 und 400.000 Zellen/ cm^2 ausgesät. Die P_{app} -Werte von Sucrose waren annähernd gleich. Maximale Dichtigkeit von PBCEC-Monolayern war nach einer Kulturdauer von 7 Tagen erreicht, zur Kultivierung der Zellen wurde dabei serumhaltiges Nährmedium eingesetzt. Der Austausch gegen serumfreies Nährmedium bei der Kultivierung von PBCEC führte zur Ausbildung weniger dichter Monolayer. Große Auswirkungen auf den apparenten Permeationskoeffizienten von Sucrose hatte der Einflussfaktor Versuchsdesign. Der P_{app} wurde deutlich reduziert durch die Änderung von indirekter zu direkter Probenapplikation, durch die Erhöhung des Akzeptorvolumens von 1 ml auf 1,5 ml sowie durch die Verminderung der Schüttelgeschwindigkeit von 500 SpM auf 100 SpM. Das Passagieren von PBCEC bewirkte eine bessere Adhäsion der Zellen an der Kulturfläche. Dadurch waren PBCEC-Monolayer passagierter Zellen dichter als die unpassagierter Zellen, was einen niedrigeren Sucrose- P_{app} zur Folge hatte. Bei der Untersuchung des Einflussfaktors Membranfilter stellten PBCEC-Monolayer auf Polycarbonat-Membranfiltern einen höheren Widerstand für die Sucrose-Permeation dar als PBCEC-Monolayer auf Polyester-Membranfiltern.

Zur Beurteilung der Trennleistung des Permeationsmodells hinsichtlich der Unterscheidung zwischen gut und schlecht permeierenden Substanzen wurden Permeationsversuche mit Modell-Substanzen durchgeführt. Um die Vergleichbarkeit und Übertragbarkeit von Ergebnissen unterschiedlicher Permeationsmodelle zu beurtei-

len, wurden durch Variation der Versuchsbedingungen bei der Durchführung von Permeationsversuchen verschiedene Modelle simuliert. Die ermittelten apparenten Permeationskoeffizienten der Modell-Substanzen wurden bei jeder der Simulationen gegen die logarithmierten Oktanol-Puffer-Verteilungskoeffizienten der Substanzen aufgetragen und korreliert.

Der P_{app} der Modell-Substanzen Diazepam, Morphin, Propranolol und Sucrose korrelierte gut mit dem $\log P_{Oktanol/Puffer}$ der Substanzen. Dies war nicht der Fall bei einem 4%igen BSA-Zusatz zur KRB-Pufferlösung. Das Ranking nach steigendem P_{app} war bei allen Simulationen Sucrose < Morphin < Propranolol < Diazepam, außer bei der Simulation mit BSA-Zusatz. Die positive Abweichung der P_{app} -Werte für L-Leucin und die negative Abweichung der P_{app} -Werte für Cyclosporin A von der Korrelationsgeraden zeigen, dass mit dem *in vitro* Permeationsmodell der Blut-Hirn-Schranke deutlich differenziert werden kann zwischen passiver parazellulärer und transzellulärer Permeation (z.B. Sucrose, Diazepam) und Transportmechanismen wie dem L-Aminosäure-Carrier (L-Leucin) bzw. dem ABC-Transporter P-Glycoprotein (Cyclosporin A). Dennoch gibt es Einschränkungen bezüglich der Vergleichbarkeit und Übertragbarkeit von Permeationsdaten verschiedener *in vitro* Permeationsmodelle der Blut-Hirn-Schranke. Qualitative Vergleiche über das Ranking von Testsubstanzen nach dem P_{app} sind zwar möglich, quantitative Vergleiche der absoluten P_{app} -Werte sind dagegen nur schwer, wenn überhaupt möglich. Die Übertragbarkeit von Permeationsdaten auf andere Modelle ist somit nicht gegeben. Als einzige Referenz für Permeationsdaten kann deshalb nur das eigene, ausreichend charakterisierte und standardisierte *in vitro* Permeationsmodell der Blut-Hirn-Schranke verwendet werden.

3.3 Untersuchung von Arzneistoffen auf Interaktionen mit P-Glycoprotein im Calcein-AM-Assay

Der ABC-Transporter P-Glycoprotein hat vielfältige Auswirkungen auf das pharmakokinetische Verhalten zahlreicher Arzneistoffe *in vivo*, wie die Verringerung der intestinalen Absorption, die Einschränkung der Hirngängigkeit vieler ZNS-Therapeutika und die Erhöhung der renalen und biliären Elimination [Schinkel et al., 1995b; Kushihara et al., 1998a; Chiou et al., 2000; Fromm, 2000; Tanigawara, 2000; Huisman et al., 2001]. Zudem ruft die bei vielen Krebserkrankungen auftretende P-gp-Überexpression das als *multidrug resistance* bekannte Phänomen von Cytostatika-Kreuzresistenzen hervor, was eine wirksame Chemotherapie verhindert [Ling, 1987; Gottesman und Pastan, 1993; Sikic, 1993; di Pietro et al., 1996; Ford, 1996]. Angesichts dieser Tatsachen besteht in der medizinisch-pharmazeutischen Forschung ein zunehmendes Interesse an der Untersuchung von Arzneistoffen auf Interaktionen mit P-Glycoprotein. Von entsprechenden Screening-Modellen erhofft man sich dabei nicht nur einen großen Nutzen für das *compound profiling* von Forschungssubstanzen in der präklinischen Phase der Arzneimittelentwicklung, sondern auch Erfolge auf der Suche nach effektiven P-gp-Inhibitoren zur MDR-Bekämpfung bei Krebserkrankungen [Sarkadi und Müller, 1997; Döppenschmitt et al., 1999b; Polli et al., 2001; Wang et al., 2001b]. Die bisher verwendeten *in vitro* Modelle zur Untersuchung von Arzneistoff-P-gp-Interaktionen weisen jedoch einige Nachteile auf. Die Methoden sind in der Durchführung zu aufwendig, sind auf die Untersuchung von Cytostatika beschränkt, erfordern zur Detektion die Anwendung radioaktiver Substanzen oder sind leicht anfällig gegenüber äußeren Einflussfaktoren [Jetté et al., 1998; Döppenschmitt et al., 1999b; Eneroth et al., 2001; Polli et al., 2001; Yamazaki et al., 2001]. Außerdem muss bei diesen Modellen die Verwendung P-gp-überexprimierender Zelllinien oder daraus gewonnener Membranvesikel prinzipiell in Frage gestellt werden, weil die Überexpression von P-Glycoprotein in den Zellen auf krankhafte Veränderungen oder auf Transfektion zurückzuführen ist und somit nicht mit physiologischen Bedingungen verglichen werden kann. Um die Nachteile der bisherigen Modelle zu umgehen, wurden primärkultivierte PBCEC als Modellzellen mit dem Calcein-AM/Calcein-System als Indikator zur Untersuchung von Arzneistoff-Interaktionen mit P-Glycoprotein kombiniert [Bauer et al., 2001b].

Primärkultivierte PBCEC als Modellzellen des Calcein-AM-Assays

Im Hinblick auf die Entwicklung eines *in vitro* Zellkulturmodells zur Untersuchung von Arzneistoff-P-gp-Interaktionen ist der Nachweis von P-gp in den Modellzellen von größter Bedeutung. Durch immunhistochemische Versuche wurde die physiologische Expression von P-Glycoprotein in primärkultivierten PBCEC belegt (3.1.3.6 *Immunfärbung des ABC-Transporters P-Glycoprotein*), außerdem bestätigen frühere Untersuchungen eine konstante P-gp-Expression in cerebralen Kapillarendothelzellen vom Schwein [Hegmann et al., 1992; Huwyler et al., 1996a; Török, 1999]. Diese Ergebnisse zeigen, dass primärkultivierte PBCEC als Modellzellen für den Calcein-AM-Assay prinzipiell geeignet sind.

Das Calcein-AM/Calcein-System als Indikator des Calcein-AM-Assays

Die Untersuchung von Arzneistoff-Interaktionen mit P-Glycoprotein erfordert ein geeignetes Indikatorsystem, das die Wechselwirkungen zwischen Testsubstanz und P-gp detektierbar macht. Für die bisher existierenden Modelle werden hierzu meistens autofluoreszierende, Fluoreszenz- oder radioaktiv-markierte P-gp-Substrate eingesetzt [Fontaine et al., 1996; Fenart et al., 1998; Miller et al., 2000; Bogman et al., 2001; Polli et al., 2001; Wang et al., 2001b]. In einer weiteren Methode wird die P-gp-Aktivität nach Aktivierung des Proteins durch Testsubstanzen indirekt über die ATP-Hydrolyse bestimmt [Scarborough, 1995; Litman et al., 1997a; Litman et al., 1997b; Litman et al., 1997c; Garrigues et al., 2000; Garrigues et al., 2001]. Diese Indikatorsysteme wurden allerdings als ungeeignet für einen gut funktionierenden, wenig zeit- und kostenintensiven Arzneistoff-P-gp-Interaktions-Assay bewertet, weil die verwendeten Substanzen entweder cytotoxisch oder radioaktiv sind, an Zellbestandteile binden, in Zellkompartimenten angereichert werden, für die Anwendung im HTS-Maßstab zu teuer sind oder das Indikatorsystem an sich für ein HTS-Modell zu aufwendig ist. Deshalb wurde das Calcein-AM/Calcein-System als Indikator für Untersuchungen zur P-Glycoprotein-Interaktion mit Arzneistoffen eingesetzt.

Calcein-Acetoxy-methylester (Calcein-AM) ist ein nicht fluoreszierender, lipophiler Ester mit einem Molekulargewicht von 994,9 g/mol. Calcein-AM ist P-gp- und Mrp1-Substrat [Feller et al., 1995b; Holló et al., 1996; Tiberghien und Loor, 1996; Twyman und Versantvoort, 1996; Holló et al., 1998; Ueda et al., 1999]. Untersuchungen an P-gp- und Mrp1-überexprimierenden Zellen ergaben Michaelis-Konstanten für Calcein-AM von $K_M = 0,12 \mu\text{M}$ bzw. $K_M = 0,05 \mu\text{M}$ [Essodaïgui et al., 1998]. Das Pro-

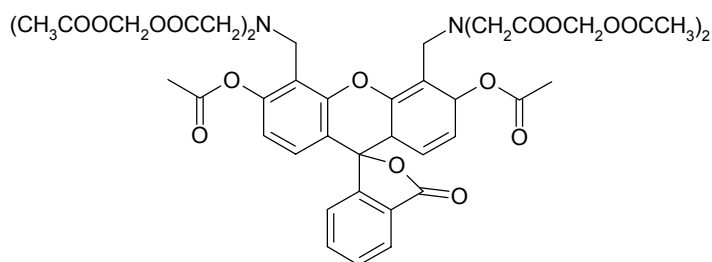
drug Calcein-AM gelangt schnell durch Diffusion in die Zelle, wo es sofort von unspezifischen Esterasen zu Calcein gespalten wird [www.probes.com/handbook/, Kapitel 15.5].

Calcein ist ein stark fluoreszierendes, hydrophiles Molekül, das intrazellulär aus Calcein-AM durch Hydrolyse der Esterbindungen entsteht und dann als dissoziierte Säure vorliegt. Das Molekulargewicht beträgt 622,5 g/mol. An Mrp1-überexprimierenden Zellen wurde eine Michaelis-Konstante von $K_M = 268 \mu\text{M}$ festgestellt. Calcein ist somit ein schwaches Mrp1-Substrat, jedoch kein P-gp-Substrat [Feller et al., 1995a; Fujita et al., 1997; Essodaïgui et al., 1998]. Außerdem soll Calcein auch Substrat von Mrp2 sein [Evers et al., 2000]. Die Excitationswellenlänge der Calcein-Fluoreszenz liegt bei $\lambda_{\text{Ex}} = 494 \text{ nm}$, die Emissionswellenlänge bei $\lambda_{\text{Em}} = 517 \text{ nm}$. Die Calcein-Fluoreszenz ist unabhängig vom pH-Wert sowie von der Ca^{2+} - und der Mg^{2+} -Konzentration und weist keinen Quenching-Effekt auf. Erfordert jedoch das Versuchsdesign ein Quenching von z.B. extrazellulärem Calcein zur besseren Detektion der intrazellulären Calcein-Fluoreszenz, kann dies bewußt durch Zugabe von Co^{2+} -Ionen herbeigeführt werden. Calcein bindet nicht an intrazelluläre Zellbestandteile und wird nicht in Zellkompartimenten angereichert [www.probes.com/handbook/, Kapitel 15.5].

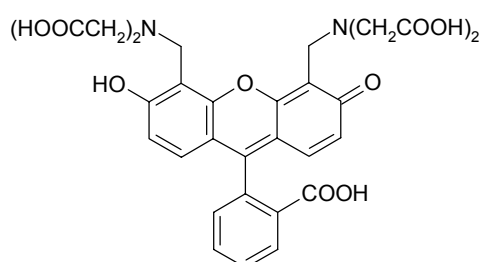
Aufgrund dieser Eigenschaften ist das Calcein-AM/Calcein-Indikatorsystem sehr gut zur Untersuchung von Arzneistoff-P-gp-Interaktionen geeignet und besser als andere Acetoxymethylester wie BCECF-AM, Fluo-3-AM, Fura-2-AM oder Indo-1-AM, aber auch besser als Indikatoren wie Rhodamin 123 und Hoechst 33342 [Homolya et al., 1996; Tiberghien und Loor, 1996; Sarkadi und Müller, 1997; Wang et al., 2001b]. Außerdem hat sich das Calcein-AM/Calcein-Indikatorsystem in vielen Untersuchungen an P-gp-überexprimierenden Zelllinien bewährt [Homolya et al., 1993; Holló et al., 1994; Liminga et al., 1994; Sarkadi et al., 1994; Goodfellow et al., 1996; Wigler, 1999; Marbeuf-Gueye et al., 2000] und wurde bereits erfolgreich in der Klinik zur Vorhersage von Therapie-Respondern und der Überlebensrate bei der Behandlung von akuter myeloischer Leukämie eingesetzt [Broxterman et al., 1996; Legrand et al., 1998; Karászi et al., 2001].

Abbildung 3.27 zeigt die Strukturformeln von Calcein-AM (A) und Calcein (B), die Eigenschaften der Substanzen sind in Tabelle 3.4 zusammengefasst.

(A) Calcein-Acetoxy-methylester



(B) Calcein

**Abbildung 3.27**

Strukturformeln von Calcein-AM (A) und Calcein (B)

Tabelle 3.4: Eigenschaften von Calcein-AM und Calcein [www.probes.com/handbook/ Kapitel 15.5]

Eigenschaft	Calcein-AM	Calcein
Molekulargewicht [g/mol]	994,9	622,5
Lipophilie/Hydrophilie	lipophil	hydrophil
Fluoreszenzeigenschaft	nicht fluoreszierend	stark fluoreszierend <ul style="list-style-type: none"> • $\lambda_{\text{Ex}} = 494 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em}} = 517 \text{ nm}$ • pH-unabhängig • Ca^{2+}- und Mg^{2+}-unabhängig • kein Quenching • keine Bindung • keine Kompartimentierung
P-gp-Substrat	+ ($K_M = 0,12 \mu\text{M}$)*	-
Mrp1-Substrat	+ ($K_M = 0,05 \mu\text{M}$)**	+ ($K_M = 268 \mu\text{M}$)**

* in P-gp-überexprimierender Zelllinie K562/ADR bestimmt [Essodaïgui et al., 1998]

** in Mrp1-überexprimierender Zelllinie GLC4/ADR bestimmt [Essodaïgui et al., 1998]

Das Prinzip des Calcein-AM-Assays

Abbildung 3.28 zeigt das Prinzip des Calcein-AM-Assays. Calcein-AM permeiert sehr leicht durch die Zellmembran und gelangt so rasch in die Zelle (Abbildung 3.28, 1). Die schnelle Verteilung über die Lipid-Doppelschicht führt dabei zu einem Gleichgewicht zwischen extra- und intrazellulärer Calcein-AM-Konzentration. Intrazelluläres Calcein-AM wird sofort durch unspezifische Esterasen ATP-unabhängig mit einem hohen *turnover* von etwa $3 \times 10^6/\text{min}$ irreversibel zu dem stark fluoreszierenden Calcein hydrolysiert (Abbildung 3.28, 2). Deswegen ist Calcein-AM in der Zelle praktisch nicht existent, sondern liegt ausschließlich in Form der dissoziierten Säure Calcein vor. Hydrophiles Calcein dagegen kann nicht durch die Zellmembran permeieren und wird deshalb in der Zelle zurückgehalten (bei 37°C liegt die Halbwertszeit der Calcein-Diffusion aus der Zelle bei > 3 h). Calcein-AM wird allerdings als sehr gutes Substrat von P-Glycoprotein aktiv aus der Lipid-Doppelschicht der Zellmembran transportiert und so an der Permeation in die Zelle gehindert (Abbildung 3.28, 3). Interagiert eine Testsubstanz mit P-Glycoprotein, entweder kompetitiv als Substrat oder non-kompetitiv als Inhibitor, gelangt mehr Calcein-AM in die Zelle, was einen Anstieg der intrazellulären Calcein-Fluoreszenz zur Folge hat (Abbildung 3.28, 4). Dabei ist die intrazelluläre Calcein-Fluoreszenz proportional zur Intensität der Interaktion zwischen Testsubstanz und P-gp, so dass eine schwache Interaktion zu einem schwachen Anstieg der intrazellulären Calcein-Fluoreszenz führt, und eine starke Interaktion einen starken Anstieg der intrazellulären Calcein-Fluoreszenz bewirkt. Die Fluoreszenz-Messung erfolgt nach Lyse der Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen als Referenz. Die Interaktion zwischen Testsubstanz und P-gp kann als prozentualer Effekt der Testsubstanz bezogen auf die Kontrolle angegeben werden. Neben P-Glycoprotein verhindert auch der ABC-Transporter Mrp1 die Permeation von Calcein-AM in die Zelle und transportiert außerdem, wie auch Mrp2, im Cytoplasma befindliches Calcein aktiv aus der Zelle heraus (Abbildung 3.28, 5) [Homolya et al., 1993; Karlson et al., 1994; Feller et al., 1995a; Tiberghien und Loor, 1996; Sharom, 1997; Ueda et al., 1997; Essodaïgui et al., 1998; Ueda et al., 1999; Evers et al., 2000; Wang et al., 2001b; www.probes.com/handbook/, Kapitel 15.5].

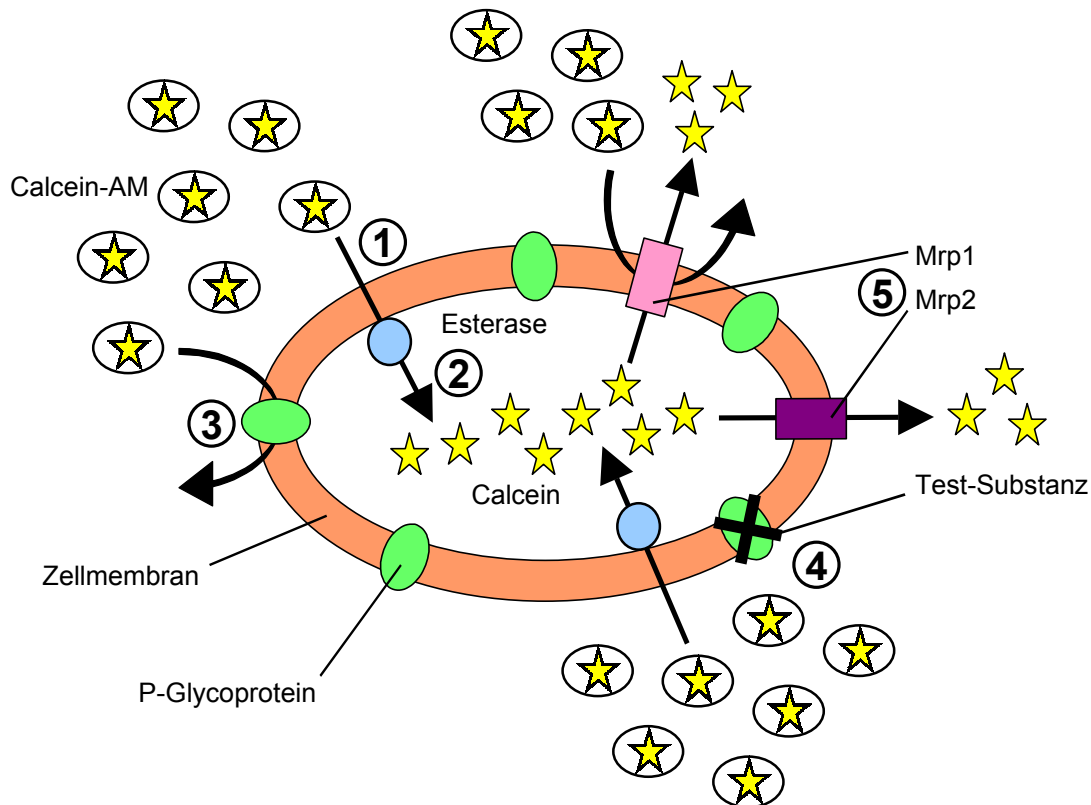


Abbildung 3.28

Prinzip des Calcein-AM-Assays

- 1) Calcein-AM permeiert durch die Zellmembran in die Zelle
- 2) Calcein-AM wird von Esterasen zu Calcein hydrolysiert, das in der Zelle akkumuliert
- 3) P-Glycoprotein verhindert durch aktiven Transport die Permeation von Calcein-AM in die Zelle
- 4) Testsubstanzen, die mit P-gp interagieren erhöhen die intrazelluläre Calcein-Fluoreszenz
- 5) Mrp1 verhindert durch aktiven Transport die Permeation von Calcein-AM in die Zelle
Mrp1 und Mrp2 transportieren Calcein aktiv aus der Zelle heraus

Zur Untersuchung von Arzneistoff-Interaktionen mit P-Glycoprotein nach dem Prinzip des Calcein-AM-Assays wurden zwei sich ergänzende Modelle entwickelt. Der *Calcein-AM-MDR-Assay* diente der Bestimmung von konzentrationsabhängigen Arzneistoff-Effekten auf P-gp durch die schnelle Untersuchung einer großen Anzahl von Testsubstanzen im Sinne eines industrietauglichen, wenig zeit- und kostenintensiven Screening-Modells. Der daraus weiterentwickelte *Calcein-AM-Kinetik-Assay* wurde eingesetzt, um die Art der Interaktion von Testsubstanzen mit P-gp zu bestimmen.

3.3.1 Untersuchungen mit dem Calcein-AM-MDR-Assay

Mit dem Calcein-AM-MDR-Assay (*Calcein-AM-multidrug resistance-Assay*) wurden Arzneistoff-Interaktionen mit P-Glycoprotein an kultivierten PBCEC in Abhängigkeit der Arzneistoffkonzentration untersucht. Um dieses Screening-Modell zu validieren und auf seine Richtigkeit und Empfindlichkeit zu prüfen, wurden Versuche mit Validierungssubstanzen durchgeführt, die bezüglich ihrer Interaktionen mit P-gp aus der Literatur bereits bekannt sind. Als Validierungssubstanzen wurden Arzneistoffe gewählt, die entsprechend einer Klassifizierung nach Seelig in Substrate (Substrate, Borderline-Substrate, MDR-Inducer) und Non-Substrate von P-gp eingeteilt sind [Seelig, 1998]. Weiterhin wurden strukturelle Unterschiede von Calciumkanalblockern des Phenylalkylamin-Typs, Steroidhormone auf P-gp-Interaktionen in Abhängigkeit ihrer Lipophilie, der Einfluss der ABC-Transporter Mrp1 und Mrp2 auf den Calcein-AM-MDR-Assay, die ATP-Abhängigkeit von P-gp, das Flavonoid Quercetin auf P-gp-aktivierende Eigenschaften sowie der Einfluss der Membranfluidität auf die Funktion von P-gp untersucht. Weil mit dem Calcein-AM-Assay aufgrund des Versuchsdesigns nicht zwischen P-gp-Substraten und -Inhibitoren unterschieden werden kann, wird im Folgenden der Begriff „*Substrat*“ durch die allgemeine Bezeichnung „*Modulator*“ ersetzt [Tiberghien und Loor, 1996; Polli et al., 2001]. Modulatoren können dabei sowohl transportierte Substrate als auch echte Inhibitoren von P-Glycoprotein sein.

3.3.1.1 Validierung des Calcein-AM-MDR-Assays

3.3.1.1.1 P-gp-Modulatoren

Die als Validierungssubstanzen untersuchten P-gp-Modulatoren waren Chinidin, Codein, Cyclosporin A, Digoxin, Ivermectin, Loperamid, Morphin, Nicardipin, Noscapin, Papaverin, PRI-053, PSC-833, RAD, Ritonavir, Saquinavir, Taxol, Verapamil und Yohimbin [Seelig, 1998]. Die Ergebnisse der Untersuchungen dieser Arzneistoffe auf Interaktionen mit P-Glycoprotein im Calcein-AM-MDR-Assay sind in Abbildung 3.29 dargestellt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind keine Fehlerbalken eingetragen. Die Einzelwerte mit Standardabweichungen sowie die E_{max} -Kurven der Substanzen sind unter *6.1 Starke P-gp-Modulatoren*, *6.2 Mäßige P-gp-Modulatoren* und *6.3 Schwache P-gp-Modulatoren* im Anhang zu finden.

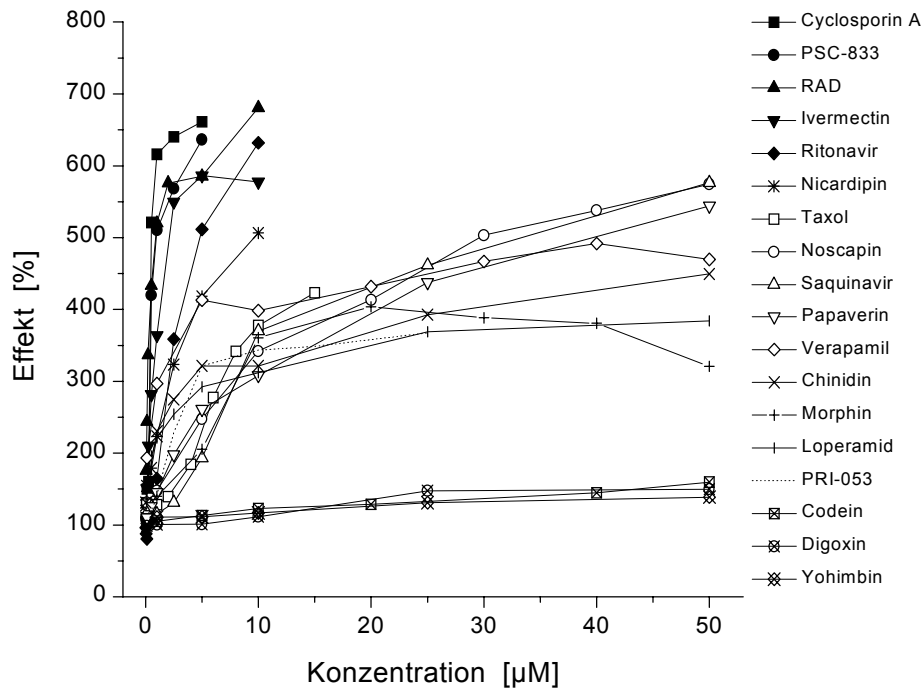


Abbildung 3.29

Calcein-AM-MDR-Assay, Modulatoren

(Einzelwerte mit Standardabweichungen und E_{max} -Kurven unter 6.1, 6.2 und 6.3 im Anhang)
Effekte in Abhängigkeit der Konzentration (Kontrolle = 100%)

starke Substrate: geschlossene Symbole —■—

mäßige Substrate: offene Symbole —□—

schwache Substrate: offene Symbole mit Kreuz —⊠—

(Mittelwert, n = 6)

Abbildung 3.29 zeigt eine konzentrationsabhängige Zunahme des, auf die Kontrolle bezogenen, prozentualen Effekts der mit dem Calcein-AM-MDR-Assay untersuchten Validierungssubstanzen aus der Klasse der P-gp-Modulatoren. Aufgrund der deutlichen Unterschiede in den Effekt-Konzentrationsprofilen wurde eine weitere Unterteilung der Substanzen nach den in Tabelle 3.5 aufgeführten Kriterien vorgenommen. Demzufolge wurden Substanzen als starke P-gp-Modulatoren definiert, deren Effekt bis zu einer Konzentration von 10 μM größer als 500% war. Substanzen mit einem Effekt von 250 bis 500% im Konzentrationsbereich von 10 bis 50 μM wurden als mäßige P-gp-Modulatoren klassifiziert. Substanzen, deren Effekt im Konzentrationsbereich von 10 bis 50 μM zwischen 125 und 250% lag, wurden als schwache P-gp-Modulatoren eingestuft. Als Non-Modulatoren wurden Substanzen mit einem Effekt kleiner 125% bei Konzentrationen bis 250 μM definiert.

Tabelle 3.5: Kriterien zur Klassifizierung von P-gp-Modulatoren und Non-Modulatoren

Klasse	Konzentration [μM]	Effekt [%]
starker P-gp-Modulator	bis 10	> 500
mäßiger P-gp-Modulator	10-50	250-500
schwacher P-gp-Modulator	10-50	125-250
Non-Modulator	bis 250	< 125

Aufgrund dieser Kriterien wurden die Validierungssubstanzen Cyclosporin A, PSC-833, RAD, Ivermectin, Ritonavir und Nicardipin als starke P-gp-Modulatoren (Abbildung 3.29, geschlossene Symbole \blacksquare) klassifiziert. Die Effekte für Cyclosporin A, PSC-833, RAD und Ivermectin lagen bereits ab einer Konzentration von 2,5 μM weit über 500%. Bei einer Konzentration von 5 μM wurde für Cyclosporin A, PSC-833 und Ivermectin ein Effekt von 661,1%, 636,6% bzw. 586,2% ermittelt. RAD und Ritonavir zeigten bei 10 μM mit 680,7% bzw. 632,1% einen Effekt deutlich über 500%. Nicardipin hingegen lag bei gleicher Konzentration mit 506,5% nur knapp über der 500%-Grenze. Als mäßige P-gp-Modulatoren (Abbildung 3.29, offene Symbole \square) wurden folgende Validierungssubstanzen klassifiziert: Taxol (423,4%, 15 μM), Noscapin (574,4%, 50 μM), Saquinavir (576,5%, 50 μM), Papaverin (544,0%, 50 μM), Verapamil (491,8%, 40 μM), Chinidin (449,4%, 50 μM), Morphin (403,7%, 20 μM), Loperamid (384,1%, 50 μM) und PRI-053 (367,4%, 25 μM). Die bei einer Konzentration von 50 μM ermittelten Effekte für Codein mit 159,8%, Digoxin mit 149,9% und Yohimbin mit 138,9% lagen im Konzentrationsbereich von 10 bis 50 μM deutlich unter 250% und überschritten 125% erst bei einer Konzentration über 10 μM . Demzufolge wurden die Substanzen als schwache P-gp-Modulatoren eingestuft (Abbildung 3.29, offene Symbole mit Kreuz \boxtimes).

Der steile Kurvenanstieg für die starken P-gp-Modulatoren Cyclosporin A, PSC-833, RAD, Ivermectin, Ritonavir und Nicardipin auf Effekte über 500% bei Konzentrationen bis 10 μM deutet auf starke Interaktionen mit P-Glycoprotein hin, was den Ergebnissen bisheriger Untersuchungen dieser Substanzen entspricht [Shirai et al., 1994; Lemaire et al., 1996; Miller et al., 1997; Rose et al., 1998; Gutmann et al., 1999b]. Versuche mit Konzentrationen über 5 μM bzw. 10 μM waren wegen der ge-

ringen Wasserlöslichkeit dieser lipophilen Substanzen nicht möglich. Die Effekte von PSC-833 und Cyclosporin A waren annähernd gleich, obwohl PSC-833 *in vivo* eine etwa 5- bis 10-mal stärkere Wirkung auf P-gp hat als Cyclosporin A [Lemaire et al., 1996]. Dieser Unterschied in der Wirkung auf P-gp liegt an der geringeren Proteinbindung von PSC-833 *in vivo* mit 50%, wohingegen die Proteinbindung von Cyclosporin A 97% beträgt. Damit ist der für die Wirkung verantwortliche freie Cyclosporin A-Anteil im Blut wesentlich kleiner als der von PSC-833 [Lemaire und Tillement, 1982]. Die Untersuchungen mit dem Calcein-AM-MDR-Assay wurden jedoch unter anderen Bedingungen, z.B. ohne Serumzusatz durchgeführt, wodurch die annähernd gleichen Effekte von PSC-833 und Cyclosporin A *in vitro* erklärt werden können. Deutlich flacher als die Effekt-Konzentrationsprofile der starken P-gp-Modulatoren verliefen die der mäßigen P-gp-Modulatoren, was auf weniger starke Interaktionen zwischen Substanzen dieser Klasse und P-Glycoprotein schließen lässt. Hierzu gehören die seit langem bekannten *MDR-reversal*-Substanzen der ersten Generation Taxol, Verapamil und Chinidin, wie auch die Protease-Inhibitoren Saquinavir und PRI-053 sowie die Opiate Morphin, Noscapin, Papaverin und das synthetische Derivat Loperamid, was Literaturangaben zu *in vitro*- und *in vivo*-Daten der Substanzen bestätigen [Gottesman und Pastan, 1993; Jetté et al., 1995; Kusuhara et al., 1997; Kim et al., 1998b; Bauer et al., 2001c]. Für Codein, Digoxin und Yohimbin wurden im Bereich von 10 bis 50 μM Effekte von nur knapp über 125% ermittelt, dennoch wurden die Substanzen nach Vergleich der Effekt-Konzentrationsprofile mit denen von Non-Modulatoren (3.3.1.1.4 *Non-Modulatoren*) als schwache P-gp-Modulatoren klassifiziert.

Alle untersuchten Validierungssubstanzen aus der Klasse der P-gp-Modulatoren zeigten einen konzentrationsabhängigen Anstieg der intrazellulären Calcein-Fluoreszenz, was auf Interaktionen mit P-gp hindeutet. Diese Ergebnisse stimmen mit bisherigen Erkenntnissen über die untersuchten Validierungssubstanzen überein und belegen somit, dass P-gp-Modulatoren mit dem Calcein-AM-MDR-Assay zuverlässig als solche identifiziert wurden und keine der Substanzen falsch-negativ bewertet wurde. Weiterhin zeugen die Ergebnisse von der hohen Empfindlichkeit des Modells, mit dem unterschiedlich starke Interaktionen von Untersuchungssubstanzen mit P-Glycoprotein sehr gut differenziert wurden, so dass eine Klassifizierung in starke, mäßige und schwache P-gp-Modulatoren möglich war [Ford und Hait, 1990; Gottesman und Pastan, 1993; Ford, 1996; Ambudkar et al., 1999].

3.3.1.1.2 Borderline-Modulatoren

Borderline-Modulatoren sind P-gp-Modulatoren mit nur geringer P-gp-Interaktionsaktivität [Seelig, 1998]. Aus dieser Klasse wurden Promazin, Chlorpromazin und Clozapin als Validierungssubstanzen auf Interaktionen mit P-Glycoprotein im Calcein-AM-MDR-Assay untersucht. Abbildung 3.30 gibt die konzentrationsabhängigen Effekte der Borderline-Modulatoren wieder. Die Einzelwerte mit Standardabweichungen sowie die E_{max} -Kurven der Substanzen sind unter 6.4 *Borderline-Modulatoren* im Anhang zu finden.

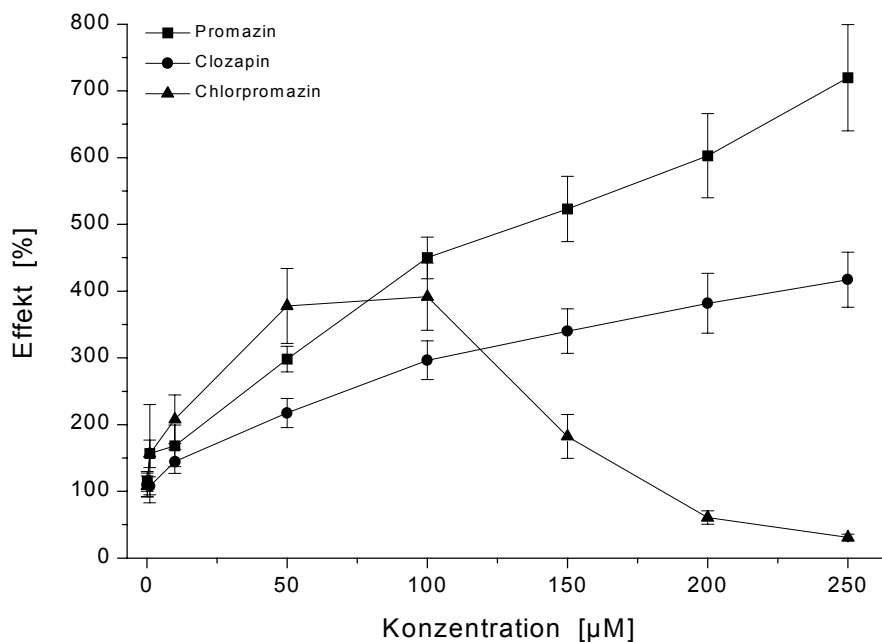


Abbildung 3.30

Calcein-AM-MDR-Assay, Borderline-Modulatoren
(Einzelwerte mit Standardabweichungen und E_{max} -Kurven unter 6.4 im Anhang)
Effekte in Abhängigkeit der Konzentration (Kontrolle = 100%)
(Mittelwert \pm S.D., n = 6)

In Abbildung 3.30 sind die Effekt-Konzentrationsprofile von Promazin, Chlorpromazin und Clozapin nach Untersuchung auf Interaktionen mit P-gp im Calcein-AM-MDR-Assay dargestellt. Für Promazin und Clozapin wurden kontinuierlich ansteigende Effekte bis zu einer Konzentration von 250 μM mit 719,6% bzw. 417,2% festgestellt. Die Kurve von Chlorpromazin stieg zunächst bis 100 μM auf 391,6% und fiel dann mit zunehmender Konzentration bis 250 μM auf 31,0%. Die starke Abnahme des prozentualen Effekts lässt sich nur durch cytotoxische Eigenschaften der Substanz

erklären. Aufgrund der starken Lipophilie von Chlorpromazin mit einem $\log P_{\text{Oktanol/Wasser}} > 5$ lagert sich die Substanz in die Lipid-Doppelschicht der Zellmembran ein, wodurch die Membranfluidität verändert wird [Leo et al., 1971; Ford und Hait, 1990]. Bei hoher Chlorpromazin-Konzentration kommt es dann zur Lyse der Zellen. Diese cytotoxische Wirkung von Chlorpromazin wurde lichtmikroskopisch beobachtet. Aus den Ergebnissen kann der Schluss gezogen werden, dass eine gesonderte Klassifizierung von Substanzen als Borderline-Modulatoren für den Calcein-AM-MDR-Assay nicht notwendig ist, weil eine Einteilung anhand der Kurvenverläufe nach den Kriterien in Tabelle 3.5 unter 3.3.1.1.1 *P-gp-Modulatoren* möglich ist. Demnach wurden Chlorpromazin und Promazin als schwache bis mäßige P-gp-Modulatoren eingestuft (im Konzentrationsbereich von 10 bis 50 μM lagen die Effekte zwischen 150 und 350%), Clozapin wurde als schwacher P-gp-Modulator klassifiziert (Effekte zwischen 150 bis 250% bei 10 bis 50 μM). Die Ergebnisse sind übereinstimmend mit Literaturangaben [Ford et al., 1988; Ford und Hait, 1990; Tsuji et al., 1992; Schinkel et al., 1996; Bergmann et al., 1998].

3.3.1.1.3 MDR-Inducer

MDR-Inducer werden nach Seelig als P-gp-Modulatoren definiert, die eine Überexpression von P-Glycoprotein hervorrufen können [Seelig, 1998]. Aus der Klasse der MDR-Inducer wurden Clotrimazol, Colchicin, Doxorubicin, Erythromycin, Rifampicin und Vinblastin als Validierungssubstanzen auf Interaktionen mit P-Glycoprotein untersucht. Die konzentrationsabhängigen Effekte der Substanzen sind in Abbildung 3.31 dargestellt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind nicht alle Fehlerbalken in der Abbildung eingetragen. Die Einzelwerte mit Standardabweichungen sowie die E_{max} -Kurven der Substanzen sind unter 6.5 *MDR-Inducer* im Anhang zu finden.

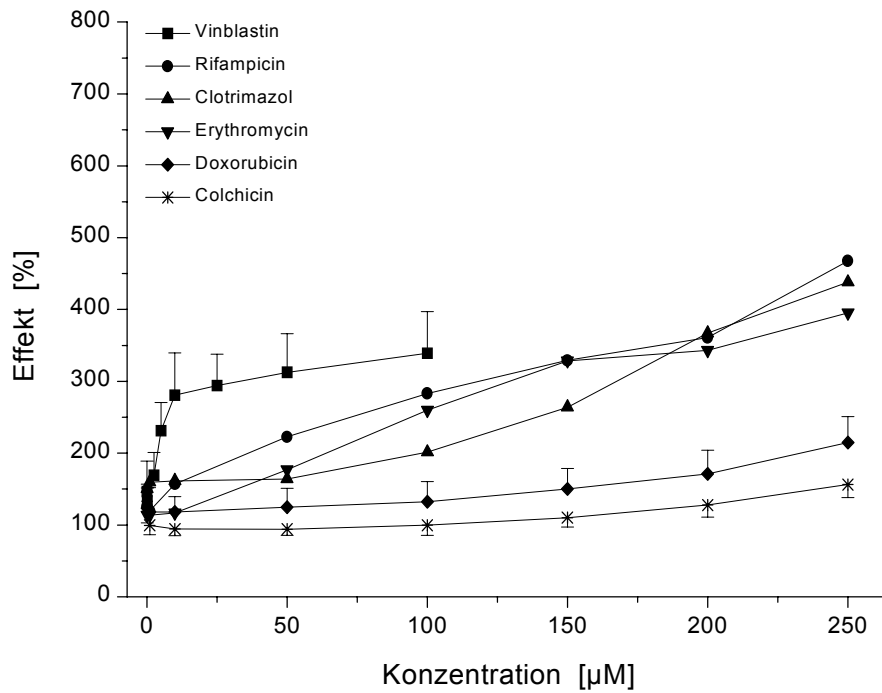


Abbildung 3.31

Calcein-AM-MDR-Assay, MDR-Inducer
 (Einzelwerte mit Standardabweichungen und E_{max} -Kurven unter 6.5 im Anhang)
 Effekte in Abhängigkeit der Konzentration (Kontrolle = 100%)
 (Mittelwert \pm S.D., n = 6)

Abbildung 3.31 zeigt die Ergebnisse der Untersuchung von MDR-Inducern auf Interaktionen mit P-gp im Calcein-AM-MDR-Assay. Das Effekt-Konzentrationsprofil von Vinblastin war das auffälligste der untersuchten MDR-Inducer: einem schnellen Anstieg des Effekts auf etwa 300% bei 10 μ M folgte ein Plateau bis zur Vinblastin-Konzentration von 100 μ M mit einem Effekt von 338,9%. Die Effekt-Konzentrationsprofile von Rifampicin, Clotrimazol und Erythromycin hingegen waren annähernd linear und einander sehr ähnlich. Die Effekte stiegen bis auf 467,5% für Rifampicin, 438,0% für Clotrimazol und 395,2% für Erythromycin bei einer Substanzkonzentration von 250 μ M. Demgegenüber wurden für Doxorubicin und Colchicin sehr flache, fast parallel zur 100%-Kontrolle verlaufende Kurven bestimmt. Die Substanzen zeigten maximale Effekte von nur 214,9% bzw. 156,4% bei 250 μ M.

Da der Calcein-AM-MDR-Assay nicht zum Nachweis von MDR-Induktion geeignet ist, kann bei einem Screening unbekannter Testsubstanzen lediglich eine Aussage über deren Interaktionen mit P-Glycoprotein, nicht aber über P-gp-induzierende Eigenschaften gemacht werden. Deshalb ist eine gesonderte Klassifizierung von Testsub-

stanzen als MDR-Inducer aufgrund von Untersuchungen mit dem Calcein-AM-MDR-Assay nicht möglich. Die Klassifizierung der Substanzen erfolgte nach den unter 3.3.1.1.1 *P-gp-Modulatoren* in Tabelle 3.5 aufgeführten Kriterien. Vinblastin wurde als mäßiger P-gp-Modulator mit Effekten zwischen 250 bis 500% bei 10 bis 50 µM eingeteilt. Die anderen MDR-Inducer (Clotrimazol, Colchicin, Doxorubicin, Erythromycin, Rifampicin) wurden der Klasse der schwachen P-gp-Modulatoren zugeordnet, wobei Colchicin und Doxorubicin als sehr schwacher P-gp-Modulatoren einzustufen sind [Ohnishi et al., 1995; Drion et al., 1996; Tiberghien und Loor, 1996; Litman et al., 1997b; Schwarz et al., 2000].

3.3.1.1.4 Non-Modulatoren

Mit der Untersuchung von Non-Modulatoren wurde überprüft, ob Substanzen ohne P-gp-Interaktionen mit dem Calcein-AM-MDR-Assay identifiziert werden, so dass falsch-positive Ergebnisse ausgeschlossen werden können. Außerdem wurde mit diesen Negativ-Kontrollen die Empfindlichkeit des Modells untersucht, um zwischen Non-Modulatoren und schwachen P-gp-Modulatoren zu differenzieren. Die Validierungssubstanzen waren Adrenalin, Ascorbinsäure, Benzylpenicillin, Clonidin, Coffein, Diazepam und Sucrose [Seelig, 1998]. Abbildung 3.32 fasst die Ergebnisse der Untersuchungen von Non-Modulatoren mit dem Calcein-AM-MDR-Assay zusammen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden keine Fehlerbalken in die Abbildung eingetragen. Die Einzelwerte mit Standardabweichungen sind unter 6.6 *Non-Modulatoren* im Anhang zu finden.

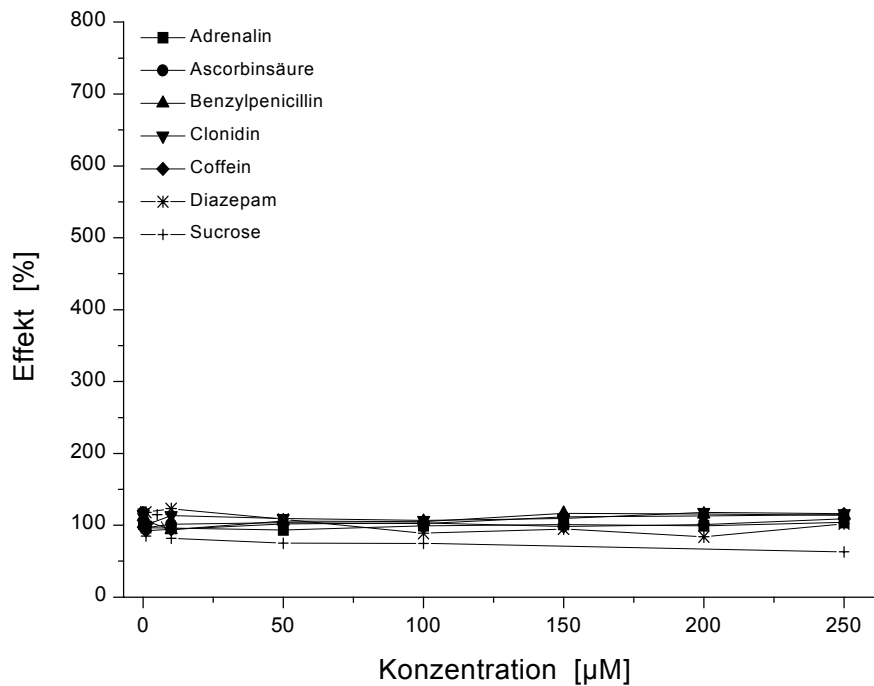


Abbildung 3.32

Calcein-AM-MDR-Assay, Non-Modulatoren
 (Einzelwerte mit Standardabweichungen unter 6.6 im Anhang)
 Effekte in Abhängigkeit der Konzentration (Kontrolle = 100%)
 (Mittelwert, n = 6)

Abbildung 3.32 zeigt, dass keine Effekte der als Negativ-Kontrollen für Interaktionen mit P-Glycoprotein bekannten Validierungssubstanzen im Calcein-AM-MDR-Assay detektiert wurden. Im Konzentrationsbereich von 0,1 bis 250 μM waren die ermittelten Effekte kleiner als 125% und lagen um den Kontrollwert von 100%. Die Ergebnisse belegen einerseits, dass Substanzen ohne P-gp-Interaktionen im Calcein-AM-MDR-Assay als Non-Modulatoren richtig erkannt wurden [Huwyler et al., 1997; Tunggal et al., 2000; Adachi et al., 2001; Yamazaki et al., 2001]. Andererseits wird die hohe Empfindlichkeit des Calcein-AM-MDR-Assays dadurch bestätigt, dass selbst zwischen Non-Modulatoren ohne Effekt auf P-gp und schwachen Modulatoren mit nur geringem Effekt auf P-gp differenziert werden konnte. Die Grenzen sind allerdings fließend, so dass die Klassifizierung einer Testsubstanz trotz der unter 3.3.1.1.1 *P-gp-Modulatoren* in Tabelle 3.5 aufgeführten Kriterien nicht immer einfach erscheint. Beispielsweise konnte Propranolol auch nach mehreren, voneinander unabhängigen Untersuchungen mit dem Calcein-AM-MDR-Assay nicht eindeutig als Non-Modulator oder schwacher P-gp-Modulator eingestuft werden, weil die ermittel-

ten Effekte zu heterogen waren (Daten nicht gezeigt). Diese Beobachtung stimmt jedoch mit Literaturangaben überein, wonach Propranolol noch nicht zweifelsfrei als P-gp-Modulator oder Non-Modulator identifiziert wurde [Litman et al., 1997b; Letrent et al., 1999; Shapiro et al., 1999; Neuhoff et al., 2000; Yang et al., 2000; Polli et al., 2001; Koggel et al., 2002].

3.3.1.1.5 P-gp-Interaktionen von Calciumkanalblockern des Phenylalkylamin-Typs

In weiteren Validierungsversuchen wurde mit dem Calcein-AM-MDR-Assay die Differenzierung strukturell verwandter Substanzen untersucht, was insbesondere für die Durchführung von QSAR-Studien (*quantitative structure-activity relationship*, quantitative Struktur-Wirkungsbeziehung) zur Aufklärung der Beziehung zwischen Molekülstruktur und P-gp-Interaktion sowie für die Entdeckung und Optimierung neuer Leitstrukturen beim *drug design* effektiver P-gp-Inhibitoren von großer Bedeutung ist [Seelig und Landwojtowicz, 2000]. Als Validierungssubstanzen wurden hierzu die Calciumkanalblocker vom Phenylalkylamin-Typ Devapamil, Dexverapamil, Gallopamil, Levemopamil und Verapamil eingesetzt. Abbildung 3.33 zeigt das chemische Grundgerüst der Substanzen. Die Ergebnisse der Untersuchung sind in Abbildung 3.34 dargestellt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden nicht alle Fehlerbalken in die Abbildung eingetragen. Die Einzelwerte mit Standardabweichungen sowie die E_{max} -Kurven sind unter 6.7 *Calciumkanalblocker vom Phenylalkylamintyp* im Anhang zu finden.

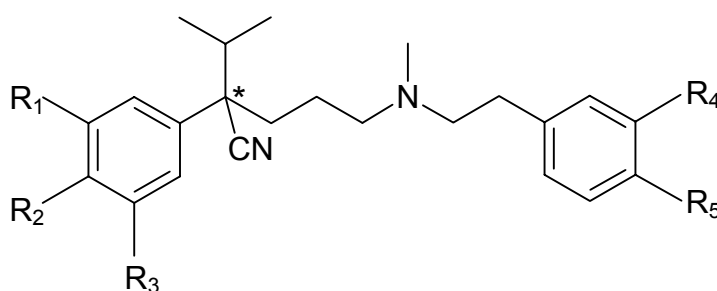


Abbildung 3.33

Grundgerüst von Calciumkanalblockern vom Phenylalkylamin-Typ

Levemopamil: $R_1 = H$, $R_2 = H$, $R_3 = H$, $R_4 = H$, $R_5 = H$, Racemat

Devapamil: $R_1 = H$, $R_2 = OCH_3$, $R_3 = OCH_3$, $R_4 = OCH_3$, $R_5 = H$, Racemat

Verapamil: $R_1 = H$, $R_2 = OCH_3$, $R_3 = OCH_3$, $R_4 = OCH_3$, $R_5 = OCH_3$, S-Enantiomer

Dexverapamil: $R_1 = H$, $R_2 = OCH_3$, $R_3 = OCH_3$, $R_4 = OCH_3$, $R_5 = OCH_3$, R-Enantiomer

Gallopamil: $R_1 = OCH_3$, $R_2 = OCH_3$, $R_3 = OCH_3$, $R_4 = OCH_3$, $R_5 = OCH_3$, Racemat

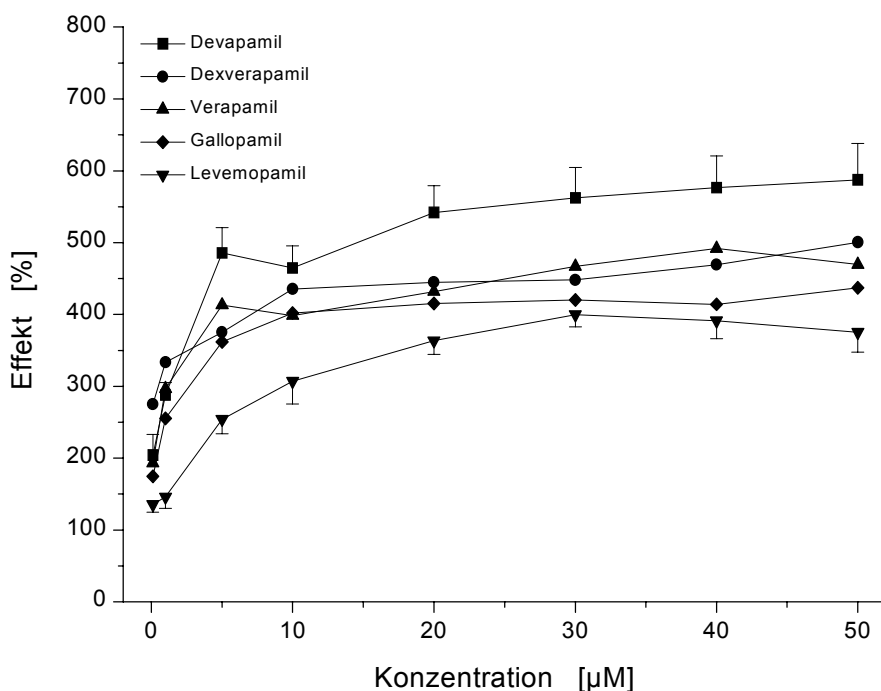


Abbildung 3.34

Calcein-AM-MDR-Assay, Calciumkanalblocker vom Phenylalkylamin-Typ
(Einzelwerte mit Standardabweichungen unter 6.7 im Anhang)
Effekte in Abhängigkeit der Konzentration (Kontrolle = 100%)
(Mittelwert \pm S.D., n = 6)

Abbildung 3.34 zeigt, dass trotz der strukturellen Verwandtschaft der untersuchten Calciumkanalblocker eine Differenzierung mit dem Calcein-AM-MDR-Assay möglich war. Auffallend sind die parallel verlaufenden Effekt-Konzentrationsprofile, was eine Struktur-Wirkungsbeziehung zwischen Calciumkanalblockern vom Phenylalkylamin-Typ und P-gp-Interaktion vermuten lässt. Die Kurvenverläufe zeigen zunächst einen Anstieg bis zu einer Konzentration von etwa 10 μM und gehen dann in ein Plateau über. Der stärkste Effekt wurde für Devapamil mit 587,5% bei einer Konzentration von 50 μM festgestellt, Levemopamil zeigte bei dieser Konzentration mit 375,1% den schwächsten Effekt. Die Effekt-Konzentrationsprofile von Dexverapamil (R-Enantiomer) und Verapamil (S-Enantiomer) waren ab einer Konzentration von 5 μM nahezu identisch (kein signifikanter Unterschied der Effekte bei den entsprechenden Konzentrationen). Auch die für Gallopamil ermittelten Effekte waren denen von Verapamil und Dexverapamil sehr ähnlich: lediglich bei 1, 5, 30 und 40 μM bzw. bei 0,1, 1 und 50 μM waren die Effekte statistisch schwach signifikant geringer ($p < 0,05$) als die von Verapamil bzw. von Dexverapamil.

Die Ergebnisse zeigen, dass mit dem Calcein-AM-MDR-Assay selbst geringe strukturelle Unterschiede aufgrund der Interaktionen mit P-Glycoprotein erkannt wurden. Eine Differenzierung zwischen Levemopamil ohne Methoxygruppe an den Phenylringen, Devapamil mit insgesamt 3 Methoxygruppen, Verapamil und Dexverapamil mit jeweils 4 Methoxygruppen und Gallopamil mit 5 Methoxygruppen an den Phenylringen war möglich. Die Differenzierung der Enantiomere Verapamil (S-Enantiomer) und Dexverapamil (R-Enantiomer) konnte allerdings, obwohl die P-gp-Bindungsaffinitäten verschieden sein sollen, nicht belegt werden [Neuhoff et al., 2000]. Aufgrund der beobachteten Effekte wurden die Substanzen nach Tabelle 3.5 unter 3.3.1.1.1 *P-gp-Modulatoren* als mäßige P-gp-Modulatoren klassifiziert.

3.3.1.1.6 P-gp-Interaktionen von Steroidhormonen in Abhängigkeit der Lipophilie

Neben einer Vielzahl strukturell verschiedener Xenobiotika interagiert P-Glycoprotein auch mit körpereigenen Substanzen wie z.B. Steroidhormonen, weshalb eine physiologische Funktion von P-gp u.a. bei der Steroidsekretion und beim Schutz von Zellmembranen steroid-sezernierender Zellen gegenüber hohen lokalen Steroidkonzentrationen vermutet wird [Gottesman und Pastan, 1993; Jetté et al., 1995; Schinkel, 1997; Baggetto, 1998]. Um zu überprüfen, ob diese physiologische Funktion von P-Glycoprotein mit dem Calcein-AM-MDR-Assay belegt werden kann, wurden das natürliche Sexualhormon Progesteron, die natürlichen Glucocorticoide Cortisol und Cortison sowie das synthetische Glucocorticoid Dexamethason auf P-gp-Interaktionen untersucht. Die bei 100 μM , 150 μM und 200 μM ermittelten Effekte der Substanzen wurden mit logarithmierten Oktanol-Puffer-Verteilungskoeffizienten aus der Literatur korreliert. Abbildung 3.35 fasst die Ergebnisse der Untersuchung mit dem Calcein-AM-MDR-Assay zusammen. Die Einzelwerte mit Standardabweichungen sowie die E_{max} -Kurven sind unter 6.8 *Steroidhormone* im Anhang zu finden. Abbildung 3.36 zeigt die Korrelation der im Calcein-AM-MDR-Assay beobachteten Effekte für die untersuchten Steroidhormone bei 100, 150 und 200 μM mit den logarithmierten Oktanol-Puffer-Verteilungskoeffizienten der Substanzen.

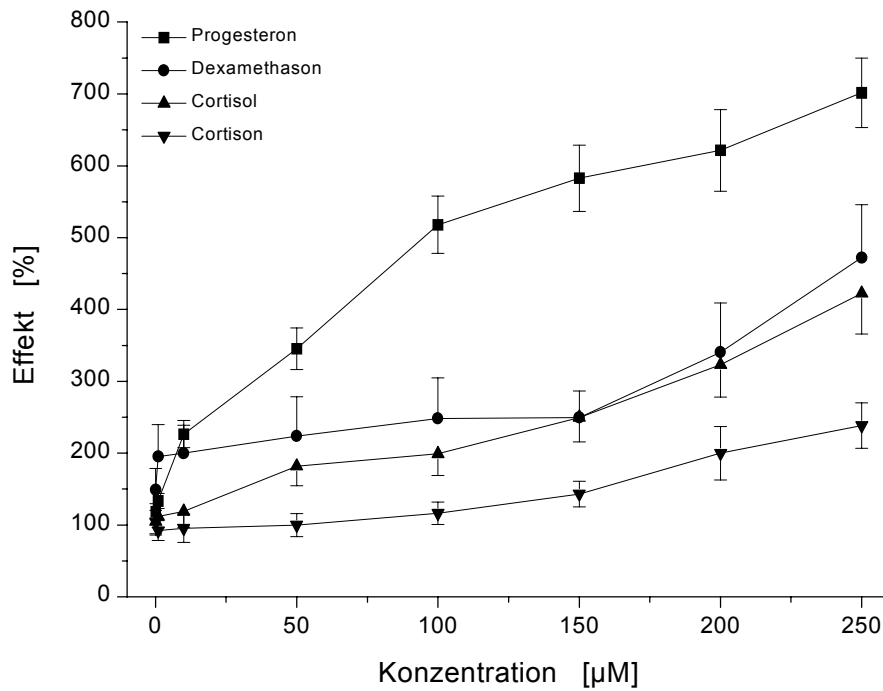


Abbildung 3.35

Calcein-AM-MDR-Assay, Steroidhormone
 (Einzelwerte mit Standardabweichungen unter 6.8 im Anhang)
 Effekte in Abhängigkeit der Konzentration (Kontrolle = 100%)
 (Mittelwert \pm S.D., n = 6)

Abbildung 3.35 stellt die Effekt-Konzentrationsprofile der mit dem Calcein-AM-MDR-Assay untersuchten Steroidhormone Cortisol, Cortison, Dexamethason und Progesteron dar. Als einzige der Substanzen zeigte Progesteron einen kontinuierlichen Anstieg des Kurvenverlaufs bis auf einen Effekt von 701,6% bei einer Konzentration von 250 μM . Die Effekt-Konzentrationsprofile der anderen Steroidhormone dagegen verliefen sehr flach, eine leichte Zunahme der Effekte wurde erst ab einer Konzentration von 100 μM festgestellt. Bei 250 μM wurden Effekte von 472,3% für Dexamethason, 422,5% für Cortisol und 238,3% für Cortison ermittelt. Ob es sich dabei allerdings noch um spezifische Effekte handelt ist fraglich. Die Substanzen wurden wie folgt klassifiziert: Progesteron als mäßiger P-gp-Modulator, Cortisol und Dexamethason als schwach bis mäßige P-gp-Modulatoren und Cortison als schwacher P-gp-Modulator.

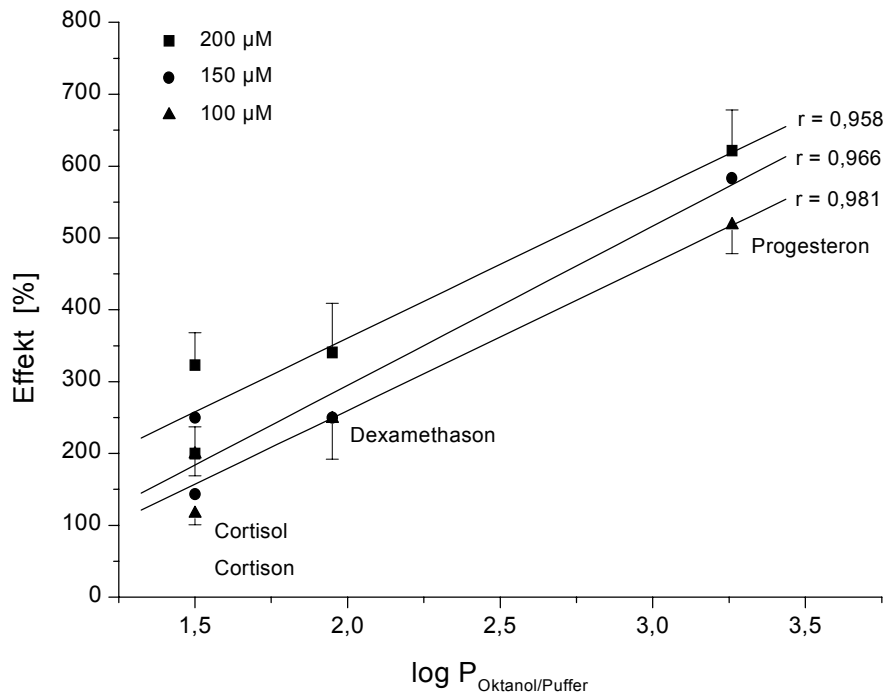


Abbildung 3.36

Korrelation der im Calcein-AM-MDR-Assay ermittelten Effekte von Steroidhormonen mit dem $\log P_{\text{Oktanoll/Puffer}}$ der Substanzen

$\log P_{\text{Oktanoll/Puffer}}$ (Cortisol) = 1,5*

$\log P_{\text{Oktanoll/Puffer}}$ (Cortison) = 1,5*

$\log P_{\text{Oktanoll/Puffer}}$ (Dexamethason) = 1,95*

$\log P_{\text{Oktanoll/Puffer}}$ (Progesteron) = 3,26*

* [aus Ponec et al., 1986]

(Mittelwert \pm S.D., n = 6)

Abbildung 3.36 zeigt ein lineares Verhältnis zwischen den im Calcein-AM-MDR-Assay ermittelten Effekten von Steroidhormonen mit dem $\log P_{\text{Oktanoll/Puffer}}$ der Substanzen. Die Korrelationskoeffizienten waren $r = 0,958$ für 200 μM , $r = 0,966$ für 150 μM und $r = 0,981$ für 100 μM (50 μM : $r = 0,933$, 250 μM : $r = 0,911$, Daten nicht gezeigt). Linearität war erst ab 50 μM gegeben, bei niedrigeren Konzentrationen waren die Abweichungen der Effekte von der Korrelationsgeraden zu groß.

Bei der Untersuchung von Steroiden wurde mit zunehmender Lipophilie der Substanzen ein stärkerer Effekt im Calcein-AM-MDR-Assay beobachtet. Progesteron, das nur an P-gp bindet, nicht aber transportiert wird, zeigt als Steroidhormon mit der größten Lipophilie die stärksten Effekte (Abbildung 3.35) [Seelig, 1998; Ueda et al., 1997]. Dabei korrelierten die mit dem Calcein-AM-MDR-Assay für die untersuchten Steroide ermittelten Effekte gut mit dem $\log P_{\text{Oktanoll/Puffer}}$ (Abbildung 3.36). Diese Ergebnisse stimmen mit Literaturangaben überein und liefern den funktionellen Beweis

dafür, dass P-gp in PBCEC mit Steroidhormonen interagiert [Scarborough, 1995; Ueda et al., 1997; Shapiro et al., 1999]. Auch bei dieser Untersuchung konnte die Empfindlichkeit des Calcein-AM-MDR-Assays hinsichtlich der Differenzierung strukturell ähnlicher Substanzen festgestellt werden. Cortison, mit einer Carbonylgruppe an Position 11 gegenüber einer Hydroxylgruppe bei Cortisol zeigte trotz gleichem $\log P_{\text{Oktanoll/Puffer}}$ von 1,5 ab einer Konzentration von 50 μM statistisch hochsignifikant geringere Effekte ($p < 0,001$) im Calcein-AM-MDR-Assay als Cortisol.

3.3.1.1.7 EC_{50} von Validierungssubstanzen im Calcein-AM-MDR-Assay

Die Berechnung der Konzentrationen für halbmaximalen Effekt EC_{50} aus den Effekt-Konzentrationsprofilen der im Calcein-AM-MDR-Assay untersuchten Validierungssubstanzen erfolgte nach dem E_{max} -Modell [Gabrielsson und Weiner, 1997]. Für Clotrimazol, Colchicin und Doxorubicin sowie die Steroidhormone Cortisol, Cortison und Dexamethason konnte aufgrund der Effekt-Konzentrationsprofile keine E_{max} -Kurve berechnet werden, deshalb liegen zu diesen Substanzen keine EC_{50} vor [Tibergien und Loor, 1996]. In Tabelle 3.6 sind die zur Validierung des Calcein-AM-MDR-Assays eingesetzten Substanzen nach steigender EC_{50} aufgeführt. Die berechneten E_{max} -Kurven der Substanzen sind unter 6.1 bis 6.8 im Anhang zu finden.

Tabelle 3.6 zeigt, dass sich die EC_{50} der im Calcein-AM-MDR-Assay untersuchten Validierungssubstanzen über einen großen Bereich, von 0,14 μM für Dexverapamil bis 343,1 μM für Erythromycin, erstrecken. Das Ranking nach den EC_{50} weist eine gute Übereinstimmung mit der Klassifizierung der Validierungssubstanzen nach den in Tabelle 3.5 (3.3.1.1.1 *P-gp-Modulatoren*) aufgestellten Kriterien auf. Dexverapamil, Verapamil, Nicardipin, Ritonavir, Yohimbin und Progesteron weichen davon ab.

Die für Dexverapamil und Verapamil ermittelten niedrigen EC_{50} -Werte resultieren aus der Berechnung der, durch einen starken Anstieg gekennzeichneten, Effekt-Konzentrationsprofile und führen somit zur Überbewertung der in der Literatur und im Calcein-AM-MDR-Assay mit Effekten von maximal 450% als mäßige P-gp-Modulatoren klassifizierten Substanzen [Tsuruo et al., 1981; Spoelstra et al., 1994; Chikhale et al., 1995; Neuhoff et al., 2000; Pauli-Magnus et al., 2000] (s. 3.3.1.1.5 *P-gp-Interaktionen von Calciumkanalblockern des Phenylalkylamin-Typs in Abhängigkeit der Struktur* und E_{max} -Kurven von Dexverapamil und Verapamil im Anhang).

Tabelle 3.6: EC₅₀ von P-gp-Modulatoren (Mittelwert ± S.D.)

Substanz	EC ₅₀ [µM]	Interaktion mit P-gp*
Dexverapamil	0,14 ± 0,08	mäßig
RAD	0,30 ± 0,04	stark
Cyclosporin A	0,56 ± 0,29	stark
Verapamil	0,75 ± 0,26	mäßig
PSC-833	0,81 ± 0,33	stark
Ivermectin	0,96 ± 0,18	stark
Gallopamil	1,00 ± 0,25	mäßig
Loperamid	1,22 ± 0,36	mäßig
Devapamil	1,45 ± 0,47	mäßig
Chinidin	2,04 ± 0,75	mäßig
Nicardipin	3,41 ± 0,44	stark
PRI-053	3,68 ± 1,03	mäßig
Vinblastin	4,49 ± 1,55	mäßig
Morphin	4,72 ± 2,94	mäßig
Levemopamil	5,48 ± 1,23	mäßig
Ritonavir	8,11 ± 3,22	stark
Papaverin	14,3 ± 2,1	mäßig
Noscapin	16,8 ± 2,6	mäßig
Yohimbin	16,9 ± 9,8	schwach
Chlorpromazin	18,6 ± 8,5	schwach-mäßig
Saquinavir	21,9 ± 6,8	mäßig
Taxol	29,8 ± 19,3	mäßig
Codein	44,3 ± 22,9	schwach
Digoxin	52,7 ± 8,3	schwach
Progesteron	99,2 ± 25,6	mäßig
Clozapin	167,8 ± 25,9	schwach
Promazin	263,4 ± 91,7	schwach
Rifampicin	320,4 ± 209,0	schwach
Erythromycin	343,1 ± 116,3	schwach

* nach Tabelle 3.5, 3.3.1.1.1 *P-gp-Modulatoren*

Auch Yohimbin als schwacher P-gp-Modulator mit einem im Calcein-AM-MDR-Assay ermittelten Effekt von lediglich 138,9% bei einer Konzentration von 50 µM ist durch das Ranking der EC₅₀ überbewertet. Nicardipin und Ritonavir dagegen sind nach den EC₅₀ wegen eines verhältnismäßig flachen Anstiegs der Effekt-Konzentrationsprofile im Vergleich zu dem anderer starker P-gp-Modulatoren unterbewertet. Dies entspricht jedoch nicht den im Calcein-AM-MDR-Assay ermittelten Effekten von über 500% bei einer Konzentration von 10 µM sowie den bisher bekannten starken Interaktionen von Nicardipin und Ritonavir mit P-Glycoprotein [Kim et al., 1998a; Drewe et

al., 1999; Gutmann et al., 1999b; Polli et al., 2001; Huisman et al., 2001] (s. 3.3.1.1.1 *P-gp-Modulatoren* und E_{\max} -Kurven von Nicardipin, Ritonavir und Yohimbin im Anhang). Außerdem ist auch der mäßige P-gp-Modulator Progesteron als Steroidhormon mit der stärksten P-gp-Interaktion und einem im Calcein-AM-MDR-Assay ermittelten Effekt von über 700% bei 250 μM durch die EC_{50} unterbewertet [Scarborough, 1995; Ueda et al., 1997; Shapiro et al., 1999] (s. 3.3.1.1.6 *P-gp-Interaktionen von Steroidhormonen in Abhängigkeit der Lipophilie* und E_{\max} -Kurve von Progesteron im Anhang).

Das Ranking der Validierungssubstanzen nach den EC_{50} stimmt gut mit Literaturangaben überein was belegt, dass der Calcein-AM-MDR-Assay eine geeignete Methode zur Untersuchung von Arzneistoffen auf Interaktionen mit P-Glycoprotein ist. Auffallend sind jedoch die, im Vergleich zu Literaturwerten, teilweise um den Faktor 50-80 niedrigeren EC_{50} [Tiberghien und Loor, 1996; Eneroth et al., 2001]. Dieser Unterschied ist auf die Verwendung primärkultivierter PBCEC gegenüber den in der Literatur verwendeten P-gp-überexprimierenden Zelllinien zurückzuführen. Weil die Empfindlichkeit dieser Zellen durch die P-gp-Überexpression reduziert ist, muss zum einen der P-gp-Marker Calcein-AM in höheren Konzentrationen eingesetzt werden, um eine detektierbare Kontroll-Fluoreszenz zu erhalten [Polli et al., 2001; Reichel, 2001]. Für einen Anstieg der intrazellulären Calcein-Fluoreszenz sind zum anderen aber auch höhere Konzentrationen der Testsubstanzen notwendig, was dann wiederum zu höheren EC_{50} führt [Tiberghien und Loor, 1996; Eneroth et al., 2001; Polli et al., 2001; Reichel, 2001]. Deshalb muss die Verwendung von P-gp-überexprimierenden Zelllinien für Untersuchungen von Arzneistoff-Interaktionen mit P-Glycoprotein sowie die physiologische Bedeutung von Ergebnissen aus Experimenten mit diesen Modellen prinzipiell in Frage gestellt werden.

Da eine niedrige EC_{50} , wie z.B. für Dexverapamil errechnet, nicht zwangsläufig auch einen maximalen Effekt bedeutet und umgekehrt, aufgrund eines hohen maximalen Effekts, wie bei Progesteron beobachtet, nicht automatisch ein niedriger EC_{50} -Wert angenommen werden kann, muss für eine aussagekräftige Beurteilung der P-Glycoprotein-Interaktion von Testsubstanzen sowohl die Klassifizierung nach den Effekt-Konzentrationsprofilen anhand Tabelle 3.5 (3.3.1.1.1 *P-gp-Modulatoren*) als auch die EC_{50} herangezogen werden.

3.3.1.2 Einfluss der ABC-Transporter Mrp1 und Mrp2 auf den Calcein-AM-MDR-Assay

Als möglicher Störfaktor des Calcein-AM-MDR-Assays wurde der Einfluss der ABC-Transporter Mrp1 und Mrp2 untersucht, da beide Proteine Auswirkungen auf das Calcein-AM/Calcein-Indikatorsystem haben könnten. Mrp1, das bereits in kultivierten PBCEC nachgewiesen wurde, verhindert die Permeation von Calcein-AM in die Zelle und transportiert intrazelluläres Calcein aktiv aus der Zelle heraus [Feller et al., 1995a; Holló et al., 1996; Twentyman und Versantvoort, 1996; Essodaïgui et al., 1998; Gutmann et al., 1999a; Marbeuf-Gueye et al., 2000]. Mrp2 dagegen konnte in kultivierten Gehirnkapillarendothelzellen bisher noch nicht nachgewiesen werden (s. auch 3.1.3.5 *Immunfärbung des ABC-Transporters Mrp2*) [Kusuhara et al., 1998b; Zhang et al., 2000]. Da Calcein jedoch ein Mrp2-Substrat ist, wurden auch hier Kontrollversuche durchgeführt, um einen aktiven Calcein-Transport aus den Zellen durch Mrp2 mit Sicherheit ausschließen zu können [Evers et al., 2000].

3.3.1.2.1 Mrp1-Kontrolle

Um einen Einfluss von Mrp1 auf den Calcein-AM-MDR-Assay zu untersuchen, wurden PSC-833, Cyclosporin A, Verapamil und Ivermectin in einer Konzentration von 5 μM , mit und ohne den LTD₄-Antagonisten MK571 als Mrp1-Inhibitor, für Kontrollversuche verwendet. MK571 wurde 2,5 μM eingesetzt [Loe et al., 1996; Keppler et al., 1997; Preiss, 1998; König et al., 1999; Borst et al., 2000]. Die Ergebnisse der Mrp1-Kontrollversuche sind in Abbildung 3.37 zusammengefasst.

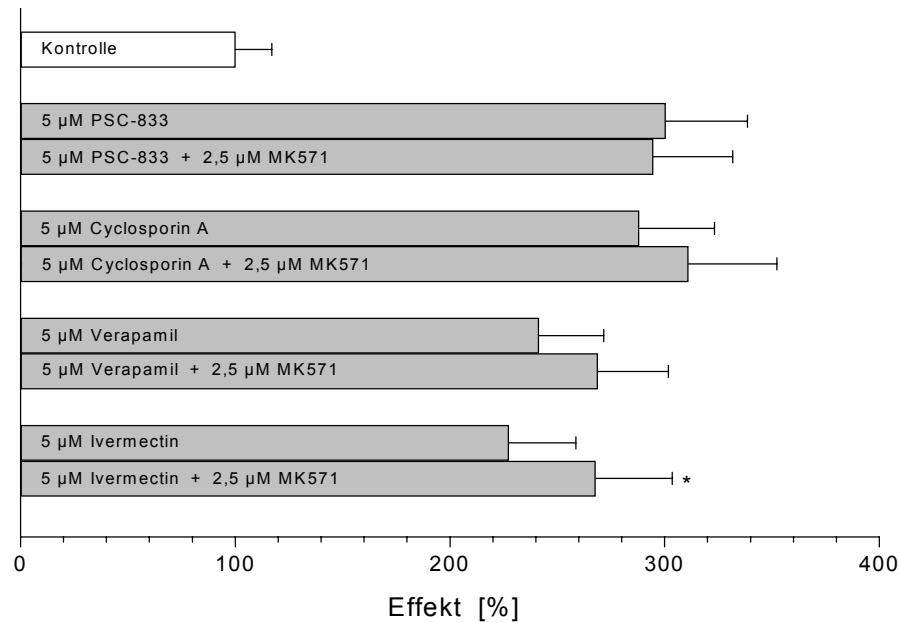


Abbildung 3.37

Calcein-AM-MDR-Assay, Mrp1-Kontrolle

Effekte von PSC-833, Cyclosporin A, Verapamil und Ivermectin mit und ohne MK571 (Kontrolle = 100%)

(Mittelwert \pm S.D., n = 6, *p < 0,05 bezogen auf 5 µM Ivermectin)

Abbildung 3.37 zeigt die Effekte der mit dem Calcein-AM-MDR-Assay untersuchten PSC-833, Cyclosporin A, Verapamil und Ivermectin mit und ohne den Mrp1-Inhibitor MK-571. Es wurden keine signifikanten Unterschiede der Effekte von PSC-833, Cyclosporin A und Verapamil zu den Effekten der Substanzen mit MK571 festgestellt. Die ermittelten Effekte lagen bei 300,5% für 5 µM PSC-833 und 294,7% für 5 µM PSC-833 mit 2,5 µM MK571, 288,1% für 5 µM Cyclosporin A und 311,0% für 5 µM Cyclosporin A mit 2,5 µM MK571 sowie 241,4% für 5 µM Verapamil und 268,9% für 5 µM Verapamil mit 2,5 µM MK571. Der Effekt von 267,9% für 5 µM Ivermectin mit 2,5 µM MK571 war jedoch gegenüber dem Effekt von 227,4% für 5 µM Ivermectin ohne den Mrp1-Inhibitor statistisch schwach signifikant erhöht (p < 0,05), was auf einen Einfluss von Mrp1 im Calcein-AM-MDR-Assay hindeuten könnte [Eneroth et al., 2001]. Im Gegensatz hierzu scheinen die Ergebnisse der anderen Substanzen mit und ohne MK571 einen Einfluss von Mrp1 auf den Calcein-AM-MDR-Assay auszuschließen. Diese Schlussfolgerung kann aber nicht mit letzter Sicherheit belegt werden, denn PSC-833, Cyclosporin A und Verapamil sollen neben P-gp auch mit Mrp1 interagieren, so dass die Wirkung von MK571 überlagert sein kann und die annähernd gleichen Effekte der Substanzen mit und ohne MK571 auch durch Mrp1-

Interaktionen erklärt werden können [Cole et al., 1994; Lautier et al., 1996; Loe et al., 1996; Preiss, 1998].

3.3.1.2.2 Mrp2-Kontrolle

Für die Kontrollexperimente zur Untersuchung möglicher Auswirkungen von Mrp2 auf den Calcein-AM-MDR-Assay wurden PSC-833, Cyclosporin A, Verapamil und Ivermectin verwendet sowie LTC₄ als kompetitiver Inhibitor für Mrp2. Die Substanzen wurden in einer Konzentration von 5 µM eingesetzt, LTC₄ wurde 0,5 µM eingesetzt [Keppler et al., 1997; Cole und Deeley, 1998; Kusuhara et al., 1998b; Gutmann et al., 1999b; Hipfner et al., 1999]. Die Ergebnisse der Mrp2-Kontrollversuche sind in Abbildung 3.38 dargestellt.

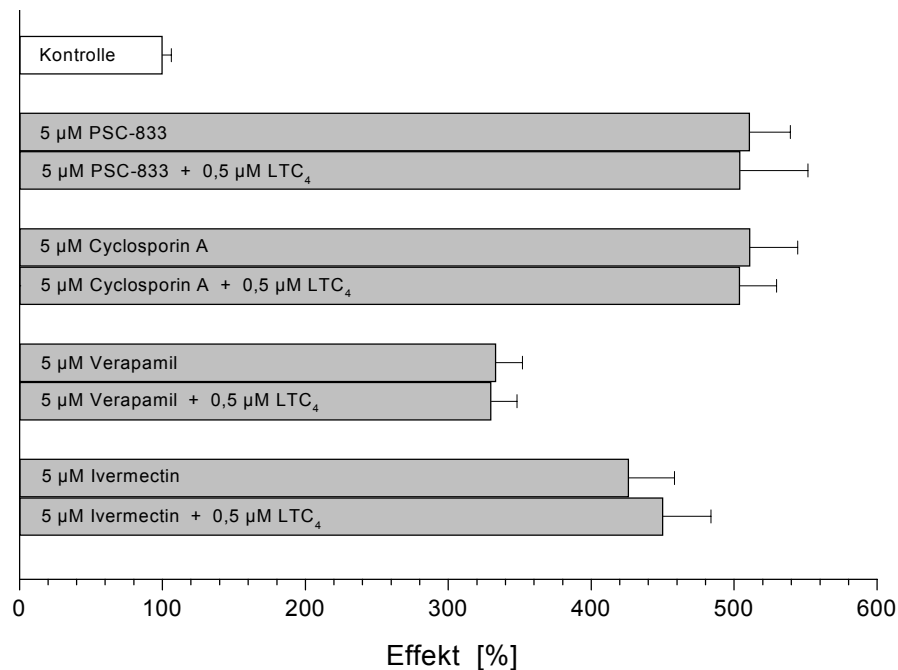


Abbildung 3.38

Calcein-AM-MDR-Assay, Mrp2-Kontrolle
 Effekte von PSC-833, Cyclosporin A, Verapamil und Ivermectin mit und ohne LTC₄
 (Kontrolle = 100%)
 (Mittelwert ± S.D., n = 6)

Abbildung 3.38 zeigt die Ergebnisse der Untersuchungen von PSC-833, Cyclosporin A, Verapamil und Ivermectin jeweils mit und ohne LTC₄. Es wurden folgende Effekte ermittelt: 5 µM PSC-833 511,0%, 5 µM PSC-833 mit 0,5 µM LTC₄ 504,3%, 5 µM Cyclosporin A 511,1%, 5 µM Cyclosporin A mit 0,5 µM LTC₄ 503,9%, 5 µM Verapamil

333,3%, 5 μM Verapamil mit 0,5 μM LTC₄ 330,1%, 5 μM Ivermectin 426,4%, 5 μM Ivermectin mit 0,5 μM LTC₄ 450,9%. Zwischen den Effekten der Testsubstanzen mit LTC₄ und den Effekten der Testsubstanzen ohne LTC₄ waren keine statistisch signifikanten Unterschiede festzustellen. Daraus kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass Mrp2 keinen Einfluss auf den Calcein-AM-MDR-Assay hat. Zugleich stellen diese Ergebnisse einen funktionellen Beweis für das Fehlen von Mrp2 in kultivierten PBCEC dar und bestätigen die Beobachtungen unter 3.1.3.5 *Immunfärbung des ABC-Transporters Mrp2* sowie die Angaben anderer Arbeitsgruppen [Kusuhara et al., 1998b; Zhang et al., 2000].

3.3.1.2.3 Mrp1/Mrp2-Kontrolle

In weiteren Kontrollversuchen zur Untersuchung des Einfluss von Mrp1 und Mrp2 auf den Calcein-AM-MDR-Assay wurden MK571 und LTC₄ einzeln, zusammen und mit PSC-833 kombiniert getestet. Die eingesetzten Konzentrationen waren 5 μM PSC-833, 2,5 μM MK571 und 0,5 μM LTC₄. Die Ergebnisse der Mrp1/Mrp2-Kontrollversuche sind in Abbildung 3.39 wiedergegeben.

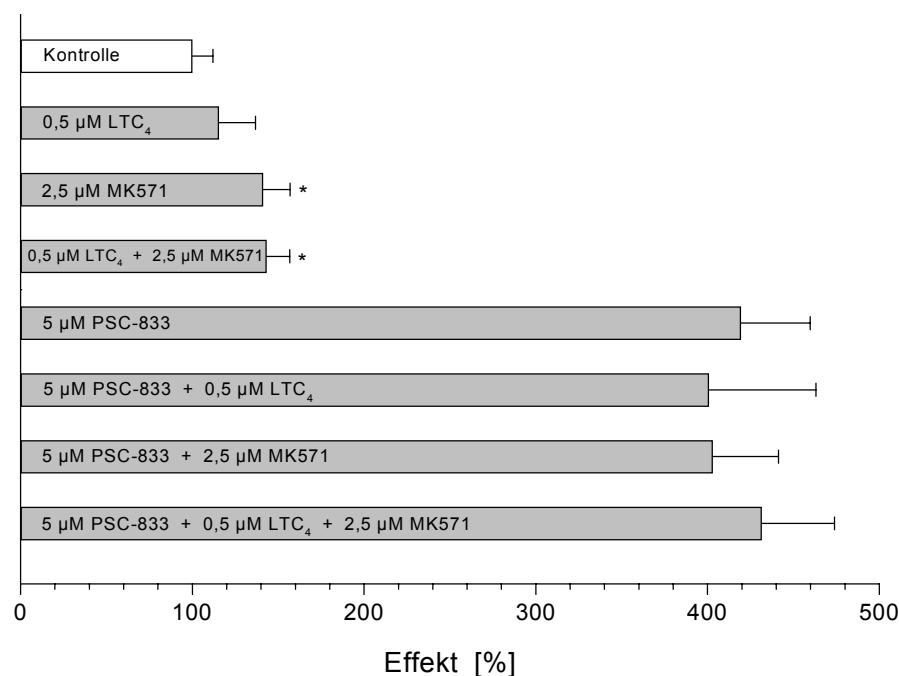


Abbildung 3.39

Calcein-AM-MDR-Assay, Mrp1/Mrp2-Kontrolle
 Effekte von LTC₄, MK571 und PSC-833 (Kontrolle = 100%)
 (Mittelwert \pm S.D., n = 6, * p < 0,001 bezogen auf Kontrolle)

Abbildung 3.39 zeigt die Effekte der Untersuchungen mit MK571 (Mrp1-Kontrolle), LTC₄ (Mrp2-Kontrolle) und PSC-833 zur Bestimmung des Einfluss von Mrp1 und Mrp2 auf den Calcein-AM-MDR-Assay. Die Mrp2-Kontrolle ergab mit 0,5 µM LTC₄ einen Effekt von 115,4%, der statistisch nicht signifikant erhöht war gegenüber der 100%-Kontrolle. Für die Mrp1-Kontrolle (2,5 µM MK571) wurde mit 141,1% eine statistisch hoch signifikante Zunahme ($p < 0,001$) des Effekts gegenüber der Kontrolle beobachtet, wie auch für die Mrp1/Mrp2-Kontrolle (0,5 µM LTC₄ und 2,5 µM MK571) mit 143,1%. In einer Konzentration von 5 µM zeigte PSC-833 einen Effekt von 419,4%. Dieser Effekt wurde durch einen Zusatz von 0,5 µM LTC₄ (400,7%), 2,5 µM MK571 (402,9%) oder 0,5 µM LTC₄ und 2,5 µM MK571 (431,5%) nur geringfügig verändert.

Die Ergebnisse lassen aufgrund der statistisch hoch signifikanten Zunahme des Effekts durch MK571 einen geringen Einfluss von Mrp1 auf den Calcein-AM-MDR-Assay vermuten [Eneroth et al., 2001]. Ein Effekt von Mrp2 konnte nicht beobachtet werden. Da die Kombination aus PSC-833 und MK571 keinen synergistischen Effekt zeigte, kann eine Interaktion von PSC-833 mit Mrp1 angenommen werden.

Aus 3.3.1.2.1 *Mrp1-Kontrolle*, 3.3.1.2.2 *Mrp2-Kontrolle* und 3.3.1.2.3 *Mrp1/Mrp2-Kontrolle* können folgende Schlussfolgerungen gezogen werden: ein geringer Einfluss von Mrp1 auf den Calcein-AM-MDR-Assay ist nicht vollständig auszuschließen. Hierbei wird wegen der deutlich stärkeren Affinität von Mrp1 zu Calcein-AM ($K_M = 0,05 \mu\text{M}$) gegenüber der von Calcein ($K_M = 268 \mu\text{M}$) vermutlich vorwiegend die Permeation von Calcein-AM in die Zelle verhindert und weniger das im Cytoplasma befindliche Calcein aktiv aus der Zelle heraustransportiert [Essodaïgui et al., 1998]. Mrp2 dagegen scheint in 7 Tage lang kultivierten PBCEC nicht exprimiert zu werden, worauf auch die Ergebnisse aus 2.1.3.5 *Immunfärbung des ABC-Transporters Mrp2* hindeuten. PSC-833, Cyclosporin A und Verapamil interagieren außer mit P-gp vermutlich auch mit Mrp1. Die Schlussfolgerungen stimmen mit Literaturangaben überein [Cole et al., 1994; Lautier et al., 1996; Loe et al., 1996; Twentyman und Versantvoort, 1996; Kusahara et al., 1998b; Preiss, 1998; Gutmann et al., 1999a; Zhang et al., 2000].

3.3.1.3 ATP-Abhängigkeit von Pgp

Zur funktionellen Untersuchung der ATP-Abhängigkeit von P-Glycoprotein im Calcein-AM-MDR-Assay wurden Versuche mit normal kultivierten PBCEC als Kontrollzellen im Vergleich zu Testzellen, deren ATP-Reserven mit glucosefreiem aber deoxyglucosehaltigem Nährmedium erschöpft wurden, durchgeführt [Danø, 1973]. Die verwendeten Testsubstanzen waren 5 μ M PSC-833 als Referenz, 10 mM D-Glucose als Energielieferant für die ATP-Synthese, 10 mM 2-Desoxy-D-glucose als metabolischer Inhibitor der Glykolyse sowie 2 mM 2,4-Dinitrophenol (2,4-DNP) als metabolischer Inhibitor der oxidativen Phosphorylierung. Die Ergebnisse der Versuche sind in Abbildung 3.40 dargestellt.

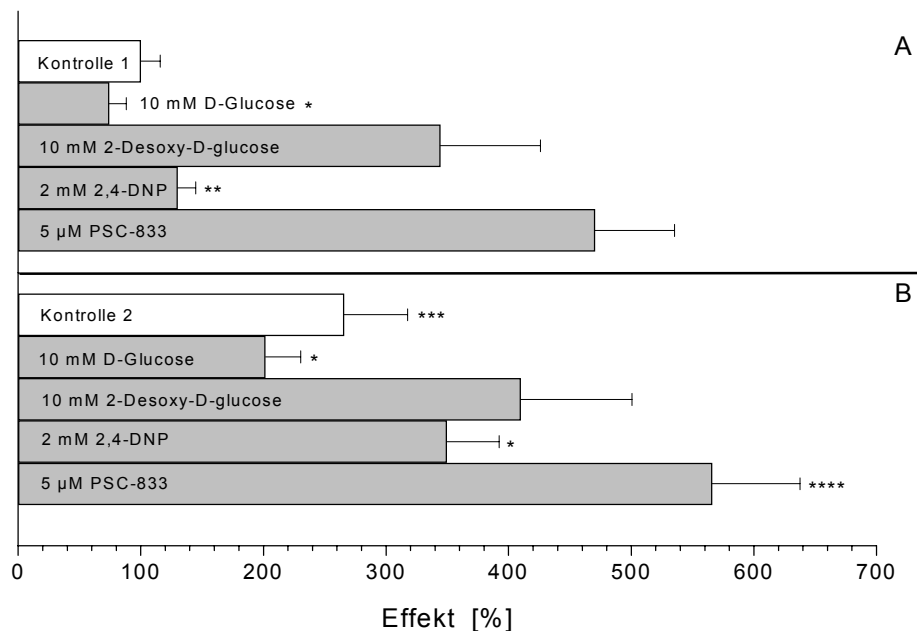


Abbildung 3.40

Calcein-AM-MDR-Assay, ATP-Abhängigkeit von P-gp

Effekte von D-Glucose, 2-Desoxy-D-glucose, 2,4-Dinitrophenol und PSC-833

A: PBCEC unter Standardbedingungen mit glucosehaltigem Nährmedium kultiviert (Kontrollzellen)

B: PBCEC ohne D-Glucose aber mit 2-Desoxy-D-glucose kultiviert (Testzellen)

alle Werte auf Kontrolle 1 (100%) bezogen

(Mittelwerte \pm S.D., n = 6, *p < 0,05 und **p < 0,01 zu Kontrolle 1 bzw. Kontrolle 2,

p < 0,001 zu Kontrolle 1, *p < 0,05 zu PSC-833 in A)

Abbildung 3.40 zeigt die Ergebnisse der unter Standardbedingungen mit glucosehaltigem Nährmedium kultivierten PBCEC (A) und der ohne D-Glucose aber mit 2-Desoxy-D-glucose kultivierten PBCEC (B). Alle Effekte wurden auf Kontrolle 1 bezogen. Für die Kontrollzellen (A) wurden Effekte festgestellt von 74,1% für 10 mM D-

Glucose, 344,2% für 10 mM 2-Desoxy-D-glucose, 130,0% für 2 mM 2,4-DNP und 470,4% für PSC-833. Gegenüber Kontrolle1 war der Effekt von D-Glucose schwach signifikant reduziert ($p < 0,05$), der von 2,4-DNP war signifikant erhöht ($p < 0,01$). Die Effekte bei den Testzellen (B) waren 265,7% für Kontrolle 2, 201,6% für D-Glucose, 409,7% für 2-Desoxy-D-glucose, 349,5% für 2,4-DNP und 565,8% für PSC-833. Die Effekte von D-Glucose und 2,4-DNP waren gegenüber Kontrolle 2 schwach signifikant reduziert bzw. erhöht ($p < 0,05$). Der Effekt von Kontrolle2 war hochsignifikant größer als der von Kontrolle1 ($p < 0,001$).

Durch die ATP-Erschöpfung war die P-gp-Funktion offensichtlich stark beeinträchtigt, was der Vergleich zwischen Kontrolle 2 und Kontrolle 1 belegt. Auch für alle weiteren untersuchten Substanzen waren die Effekte an den Testzellen größer als an den Kontrollzellen. Ein schwach signifikant verringerter Effekt ($p < 0,05$) durch 10 mM D-Glucose wurde sowohl bei den Kontrollzellen als auch bei den Testzellen gegenüber der entsprechenden Kontrolle festgestellt, was auf eine erhöhte P-gp-Aktivität in Folge von ATP-Synthese deutet. Die im Vergleich zu dem Effekt von PSC-833 deutlich geringeren Effekte der metabolischen Inhibitoren in (A) könnten an der kurzen Inkubationszeit liegen, wodurch die ATP-Erschöpfung noch nicht vollständig war. Das würde allerdings die auch in (B) geringeren Effekte von 2-Desoxy-D-glucose und 2,4-DNP gegenüber dem PSC-833-Effekt nicht erklären, da die Testzellen 3 Tage lang vor Versuchsbeginn ohne Glucose und mit 2-Desoxy-D-glucose kultiviert wurden. Der schwach signifikant stärkere Effekt ($p < 0,05$) von PSC-833 an den Testzellen gegenüber den Kontrollzellen könnte daraufhin deuten, dass P-Glycoprotein durch PSC-833 nicht vollständig inhibiert wird. Allerdings sind wahrscheinlich auch andere zelluläre Mechanismen durch die ATP-Erschöpfung zum Erliegen gekommen, was zusätzlich eine Erhöhung der intrazellulären Calcein-Fluoreszenz bewirkt haben könnte. In weiteren Versuchen wurde die ATP-Abhängigkeit von P-gp durch sogenanntes *vanadate trapping* untersucht. Hierbei wird die P-gp-ATPase mit dem ATPase-Inhibitor Na-Vanadat direkt gehemmt, so dass die ATP-Hydrolyse zum Erliegen kommt [Ambudkar et al., 1992; Germann, 1996; Senior und Gadsby, 1997; Sharom, 1997; Ambudkar et al., 1999; Sauna und Ambudkar, 2000; Kerr et al., 2001; Lu et al., 2001]. Abbildung 3.41 zeigt die Ergebnisse der Auswirkungen von Na-Vanadat im Calcein-AM-MDR-Assay.

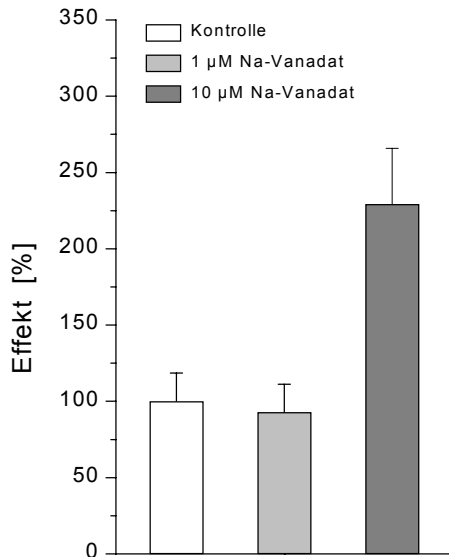


Abbildung 3.41

Calcein-AM-MDR-Assay, ATP-Abhängigkeit von P-gp
Vanadate trapping der P-gp-ATPase (Kontrolle = 100%)
 (Mittelwert \pm S.D., n = 6)

In Abbildung 3.41 sind die Ergebnisse des *vanadate trapping* dargestellt. Bei 1 μ M Na-Vanadat konnte mit 92,9% kein Anstieg des Effekts im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden. Mit 10 μ M Na-Vanadat jedoch war ein deutlicher Effekt von 229,6% festzustellen. Dieses Ergebnis stimmt genau mit Literaturwerten von Ambudkar et al. überein, die eine Inhibition der P-gp-ATPase mit 7-10 μ M Na-Vanadat angegeben haben [Ambudkar et al., 1992; Ambudkar et al., 1999].

Außerdem stellen die Ergebnisse der Untersuchungen mit dem Calcein-AM-MDR-Assay zugleich einen funktionellen Nachweis von P-gp in kultivierten PBCEC als auch einen Beleg für die ATP-Abhängigkeit von P-gp dar, was sich mit Beobachtungen anderer deckt [Ambudkar et al., 1992; Ohnishi et al., 1995; Germann, 1996; Senior und Gadsby, 1997; Sharom, 1997; Ambudkar et al., 1999; Sauna und Ambudkar, 2000; Kerr et al., 2001].

3.3.1.4 Einfluss der Membranfluidität auf die Funktion von P-gp

Das in vielen Zellen durch Überexpression von P-gp beobachtete MDR-Phänomen geht mit einer veränderten Membranzusammensetzung sowie den daraus folgenden Veränderungen biophysikalischer Eigenschaften der Zellmembran einher [Montoudan et al., 1986; Callaghan et al., 1993; Rothnie et al., 2001]. Auch die Membranfluidität, die hauptsächlich über den Cholesterinanteil in der Lipid-Doppelschicht reguliert wird, unterliegt diesen Veränderungen, was Auswirkungen auf die P-gp-Funktion haben soll [Sinicrope et al., 1992; Mazzoni und Trave, 1993; Pallarés-Trujillo et al., 1993; Ferté, 2000; Luker et al., 2000; Lu et al., 2001; Rothnie et al., 2001]. Zur Un-

tersuchung des Einfluss der Membranfluidität auf die Funktion von P-Glycoprotein im Calcein-AM-MDR-Assay, wurden Cholesterin und D- α -Tocopheryl-Polyethylenglykol-Succinat (TPGS) eingesetzt. Hierbei diente Cholesterin zur Erniedrigung der Membranfluidität und das Detergens TPGS als *fluidizer* zur Erhöhung der Membranfluidität. Abbildung 3.42 zeigt das Ergebnis der Untersuchung mit Cholesterin.

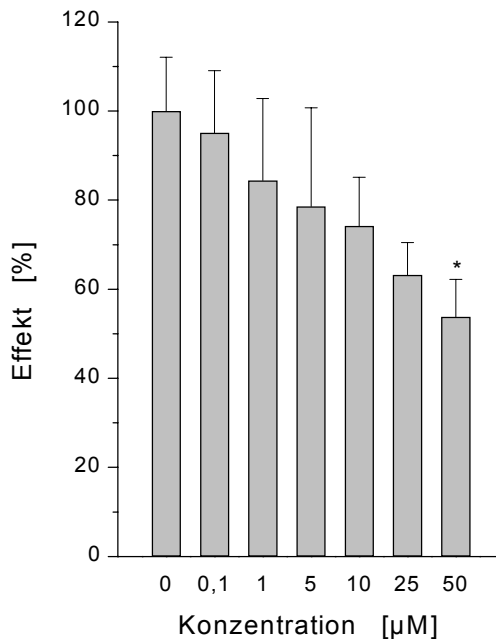


Abbildung 3.42

Calcein-AM-MDR-Assay
 Einfluss von Cholesterin auf die Funktion von P-gp
 Kontrolle = 100%
 (Mittelwert \pm S.D., n = 6, *p < 0,001 bezogen auf die Kontrolle)

Mit zunehmender Cholesterin-Konzentration wurde eine Abnahme der intrazellulären Calcein-Fluoreszenz beobachtet, was in Abbildung 3.42 als konzentrationsabhängige Abnahme des prozentualen Effekts dargestellt ist. Bei einer Cholesterin-Konzentration von 50 μ M war der Effekt mit 53,8% im Vergleich zur Kontrolle hoch signifikant erniedrigt (p < 0,001). Eine Erklärung für dieses Effekt-Konzentrationsprofil könnte eine geringere Permeation von Calcein-AM durch die Zellmembran in die Zelle aufgrund der veränderten Membranzusammensetzung durch Cholesterin sein, was allerdings angesichts der hohen Lipophilie von Calcein-AM und der daraus folgenden sehr guten Membrangängigkeit als unwahrscheinlich erscheint. Die Beobachtung stimmt jedoch mit der von Luker et al. und Rothnie et al. überein, die durch Erhöhung des Cholesterinanteils in der Membran von Testzellen bzw. Membranvesikeln eine verstärkte P-gp-Aktivität feststellen konnten, was mit der erniedrigten Membranfluidität korrelierte und deswegen auf einen höheren Ordnungszustand der Membran zurückgeführt wird [Luker et al., 2000; Rothnie et al., 2001]. Daraus folgt der Umkehrschluss, dass die Erhöhung der Membranfluidität durch Detergenzien wie

TPGS die P-gp-Aktivität herabsetzt [Drori et al., 1995]. In Abbildung 3.43 sind die Ergebnisse der Untersuchung von TPGS auf die Funktion von P-gp im Calcein-AM-MDR-Assay dargestellt.

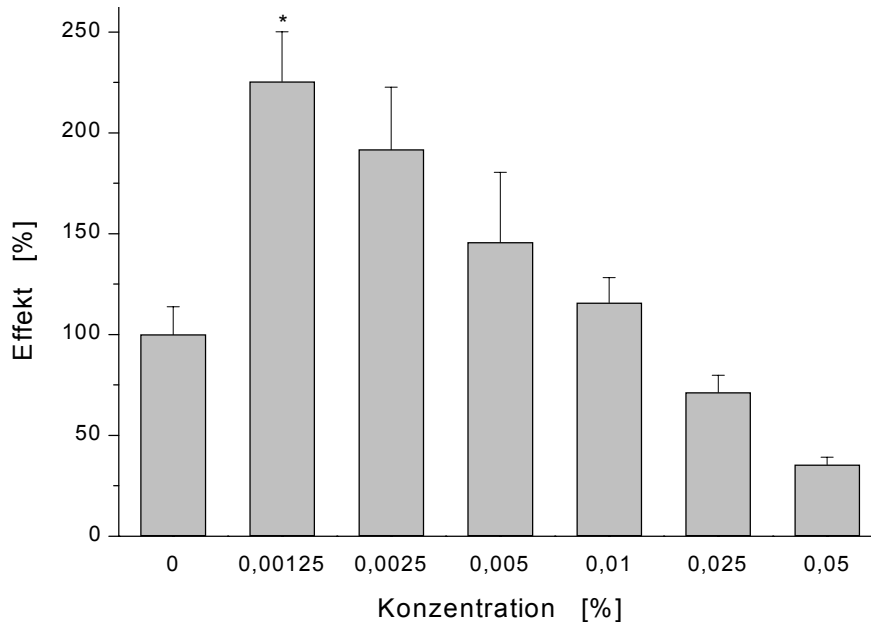


Abbildung 3.43

Calcein-AM-MDR-Assay

Einfluss von TPGS auf die Funktion von P-gp

Kontrolle = 100%

(Mittelwert \pm S.D., n = 6, *p < 0,001 bezogen auf die Kontrolle)

Abbildung 3.43 zeigt das Effekt-Konzentrationsprofil von TPGS. Bei der niedrigsten Konzentration von 0,00125% TPGS wurde ein Effekt von 225,5% ermittelt, der zur Kontrolle statistisch hoch signifikant erhöht war ($p < 0,001$). Die Abnahme des Effekts bei höheren TPGS-Konzentrationen ist auf die Lyse der Zellen aufgrund von Membrandisintegration zurückzuführen und konnte lichtmikroskopisch verfolgt werden.

Auch in diesem Fall könnten die beobachteten Effekte mit einem veränderten Membranzustand erklärt werden. Da für Calcein-AM jedoch nicht die Permeation durch die Membran geschwindigkeitsbestimmend ist, kann diese Erklärung ausgeschlossen werden [Essodaïgui et al., 1998]. Das Ergebnis bestätigt vielmehr die Hypothese, wonach die Erhöhung der Membranfluidität zu einer Verminderung der P-gp-Aktivität führt [Sinicrope et al., 1992; Drori et al., 1995] und stellt Berichte, denen zufolge Detergenzien P-gp-Inhibitoren seien in Frage [Zordan-Nudo et al., 1993; Batrakova et al., 1999; Dintaman und Silverman, 1999; Miller et al., 1999]. Da Detergenzi-

en amphiphile Moleküle sind, lagern sich diese in Zellmembranen ein, wodurch die Membranfluidität erhöht wird [Drori et al., 1995]. In hohen Konzentrationen jedoch rufen Detergenzien aufgrund von Membrandisintegration die Lyse von Zellen hervor, was Abbildung 3.43 belegt. Eine echte Inhibition von P-gp durch Detergenzien erscheint deswegen unwahrscheinlich, in Betracht kommt vielmehr eine unspezifische Erhöhung der Membranfluidität, was sich negativ auf die P-gp-Funktion auswirkt [Drori et al., 1995; Luker et al., 2000]. Eine direkte P-gp-Inhibition durch Detergenzien ist bislang in der Literatur nicht belegt.

Aus den Ergebnissen der Untersuchung des Einfluss der Membranfluidität auf die Funktion von P-gp mit dem Calcein-AM-MDR-Assay kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass Cholesterin die P-gp-Aktivität erhöht, TPGS dagegen verringert. In beiden Fällen handelt es sich vermutlich um eine indirekte Wirkung über die Veränderung der Membranfluidität. Die Ergebnisse dieser Untersuchung haben eine große Bedeutung für den Calcein-AM-MDR-Assay als Screening-Modell für Arzneistoff-Interaktionen mit P-gp. Da alle Arzneistoffe mit Zellmembranen interagieren – entweder über Rezeptoren auf der Zelloberfläche, durch Adsorption an die Membran, durch Einlagerung in die Membran oder durch Permeation der Membran – kann es sich bei den im Calcein-AM-MDR-Assay ermittelten Effekten der Testsubstanzen auch um Membraneffekte handeln, die sich indirekt über Änderungen der Membranfluidität auf P-gp auswirken und nicht wie bislang angenommen, um direkte Interaktionen mit P-gp. Hierfür sind weitergehende Untersuchungen notwendig.

3.3.1.5 P-gp-Aktivierung durch Quercetin ?

Außer der Hemmung von P-Glycoprotein soll mit bestimmten Substanzen auch eine Aktivierung des Transporters möglich sein. Hierzu gehört das Flavonol Quercetin aus der Gruppe der Flavonoide, das sowohl *in vitro* als auch *in vivo* bei niedrigen Konzentrationen bis zu 10 μM aktivierend, bei Konzentrationen über 10 μM inhibierend auf P-gp wirken soll [Mitsunaga et al., 2000]. Um diese Interaktion von Quercetin mit P-gp zu untersuchen, wurde die Substanz in Konzentrationen von 0,1 bis 50 μM im Calcein-AM-MDR-Assay getestet [Cornelius et al., 2001]. Das Ergebnis der Untersuchung auf P-gp-Aktivierung durch Quercetin ist in Abbildung 3.44 als Balkendiagramm dargestellt.

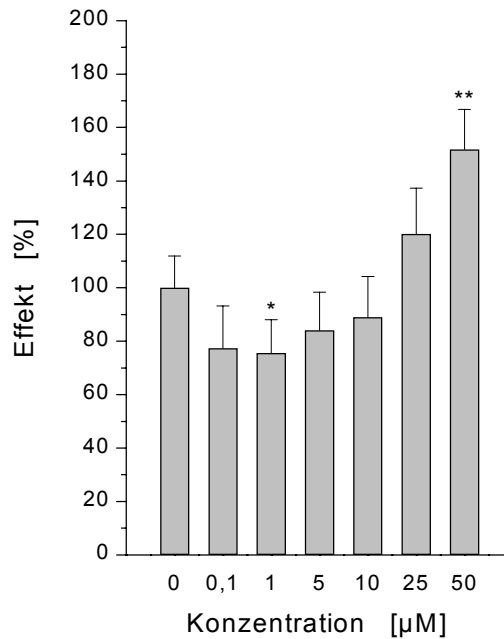


Abbildung 3.44

Calcein-AM-MDR-Assay
 P-gp-Aktivierung durch Quercetin ?
 Kontrolle = 100%
 (Mittelwert \pm S.D., n = 6, *p < 0,01, **p < 0,001
 bezogen auf die Kontrolle)

Abbildung 3.44 zeigt das Effekt-Konzentrationsprofil von Quercetin. Niedrige Konzentrationen bis 10 μM führten zu einem deutlich geringeren Effekt gegenüber der 100%-Kontrolle ohne Quercetin: bei 1 μM Quercetin war der Effekt mit 75,6% signifikant kleiner ($p < 0,01$) bezogen auf die Kontrolle. Konzentrationen über 10 μM bewirkten einen Anstieg des Effekts, der bei 50 μM mit 151,8% im Vergleich zur Kontrolle hoch signifikant größer war ($p < 0,001$). Die Ergebnisse stimmen mit denen von Mitsunaga et al. überein und lassen zunächst eine Aktivierung von P-gp durch niedrige Quercetin-Konzentrationen bis 10 μM und eine kompetitive oder non-kompetitive Hemmung bei Konzentrationen über 10 μM vermuten [Mitsunaga et al., 2000]. Die Aktivierung bei geringen Quercetin-Konzentrationen kann allerdings durch Brefeldin A, einen Inhibitor des intrazellulären *protein traffickings*, aufgehoben werden [Misumi et al., 1986; Reichel, 2001, persönliche Mitteilung]. Aufgrund dieser Tatsache scheint es wahrscheinlicher zu sein, dass durch Behandlung mit Quercetin zusätzlich intrazellulär in Vesikeln gespeichertes P-Glycoprotein in die Zellmembran eingebaut wird und so das Phänomen einer „scheinbaren Aktivierung“ hervorruft.

Die Ergebnisse der Validierung des Calcein-AM-MDR-Assays zeigen, dass es sich bei der Kombination aus primärkultivierten PBCEC als Modellzellen und dem Calcein-AM/Calcein-System als Indikator um ein empfindliches Screening-Modell zur Untersuchung von Arzneistoff-Interaktionen mit P-Glycoprotein handelt, mit dem zuverlässige und reproduzierbare Ergebnisse gewonnen wurden. Starke, mäßige und

schwache P-gp-Modulatoren wurden richtig identifiziert und von Non-Modulatoren differenziert. Weiterhin war eine Differenzierung strukturell ähnlicher Calciumkanalblocker vom Phenylalkylamin-Typ sowie der Steroidhormone Cortisol und Cortison möglich, so dass der Calcein-AM-MDR-Assay auch zur Aufklärung der Beziehung zwischen Molekülstruktur und P-gp-Interaktion eingesetzt werden kann. Mit der Untersuchung von Steroidhormonen konnte auch eine physiologische Funktion von P-gp als Steroid-Transporter belegt werden. Aus den Effekt-Konzentrationsprofilen der Validierungssubstanzen wurden mit einem E_{max} -Modell die EC_{50} ermittelt, deren Ranking gut mit Literaturangaben übereinstimmt. Auffallend sind jedoch die deutlich niedrigeren EC_{50} , die aus den Effekt-Konzentrationsprofilen der im Calcein-AM-MDR-Assay untersuchten Substanzen resultierten im Vergleich zu Literaturwerten, die aus den Ergebnissen von Versuchen mit P-gp-überexprimierenden Zelllinien errechnet wurden. Diese Tatsache unterstreicht die physiologische Bedeutung der Untersuchungen mit primärkultivierten PBCEC als Modellzellen des Calcein-AM-MDR-Assays gegenüber Zelllinien. Als mögliche Störfaktoren auf das Calcein-AM/Calcein-Indikatorsystem wurden die ABC-Transporter Mrp1 und Mrp2 untersucht, die jedoch nur geringfügige bzw. keine Auswirkungen hatten. Demgegenüber spielt der Energiezustand primärkultivierter PBCEC für Experimente mit dem Calcein-AM-MDR-Assay eine wichtige Rolle, was die Versuche zur Bestimmung der ATP-Abhängigkeit von P-gp gezeigt haben. Weiterhin wurde das Flavonoid Quercetin auf eine angeblich P-gp-aktivierende Eigenschaft untersucht, was allerdings mit dem Einbau von vesikulär gespeichertem P-Glycoprotein in die Zellmembran erklärt werden konnte. Von großer Bedeutung war die Untersuchung des Einfluss der Membranfluidität auf die Funktion von P-gp. Es wurde festgestellt, dass die P-gp-Aktivität indirekt durch unspezifische Membraneffekte mit Cholesterin und dem *fluidizer* TPGS deutlich beeinflusst wird, was weitreichende Konsequenzen für die Verwendung des Calcein-AM-MDR-Assays haben könnte, da auch Arzneistoffe Wechselwirkungen mit der Zellmembran eingehen. Zur Klärung dieses Sachverhaltes sind weitere Untersuchungen notwendig.

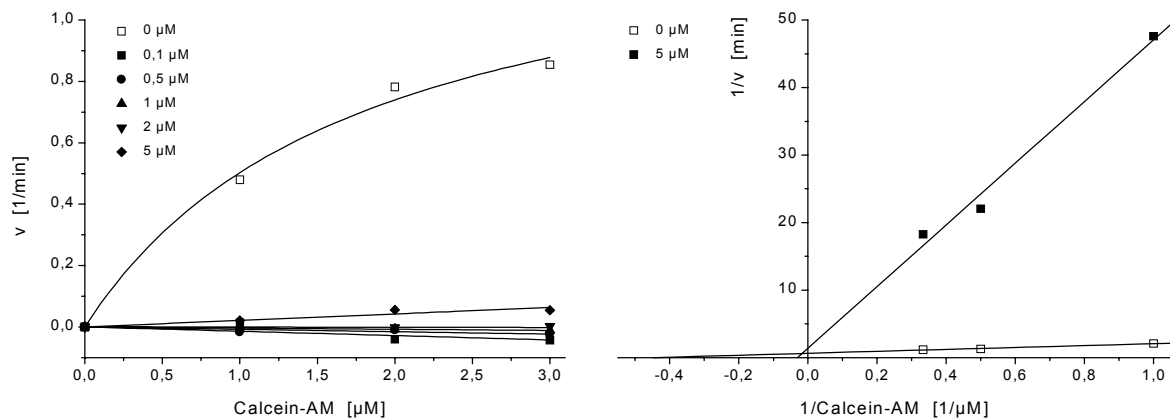
3.3.2 Untersuchungen mit dem Calcein-AM-Kinetik-Assay

Mit dem Calcein-AM-Kinetik-Assay wurde die Art der Interaktion von Arzneistoffen mit P-Glycoprotein untersucht. Die genaue Kenntnis darüber spielt vor allem im Hinblick auf eine spätere Anwendung von Entwicklungssubstanzen als Arzneimittel eine große Rolle. Substanzen, die als transportierte Substrate kompetitiv mit P-gp interagieren, können *in vivo* stark in ihrer Absorption, Verteilung und Elimination beeinflusst werden. Non-kompetitive Inhibitoren dagegen, die P-gp schon in geringer Konzentration spezifisch hemmen, könnten zur MDR-Bekämpfung bei Krebserkrankungen eingesetzt werden [Schinkel et al., 1995b; Germann, 1996; Sarkadi und Müller, 1997; van Asperen et al., 1997b; Kusuhara et al., 1998a; Ambudkar et al., 1999; Fromm, 2000; Tanigawara, 2000]. Bisher jedoch gibt es noch keine geeignete *in vitro* Methode, um schnell und einfach die Art der Wechselwirkung eines Arzneistoffs mit P-Glycoprotein zu untersuchen. Zum einen werden Arzneistoff-P-gp-Interaktionen, wie mit dem Calcein-AM-MDR-Assay, als Effekt in Abhängigkeit der Substanzkonzentration bestimmt, woraus sich aber keine Aussage über die Art der Interaktion ableiten lässt [Homolya et al., 1993; Fontaine et al., 1996; Tiberghien und Loor, 1996; Sharom et al., 1999; Pauli-Magnus et al., 2000; Eneroth et al., 2001]. Zum anderen wird versucht, über Permeationsversuche, P-gp-ATPase-Aktivitätsmessung, Photoaffinitätsmarkierung oder Radioligandenbindung Arzneistoffe als Substrate oder Inhibitoren von P-gp zu identifizieren. Diese Methoden sind jedoch in der Durchführung aufwendig, erfordern zur Detektion die Anwendung radioaktiver Substanzen und sind leicht anfällig gegenüber Störfaktoren [Shirai et al., 1994; Jetté et al., 1995; Litman et al., 1997a; Döppenschmitt et al., 1999b; Shapiro et al., 1999; Martin et al., 2000; Neuhoff et al., 2000; Garrigues et al., 2001; Polli et al., 2001].

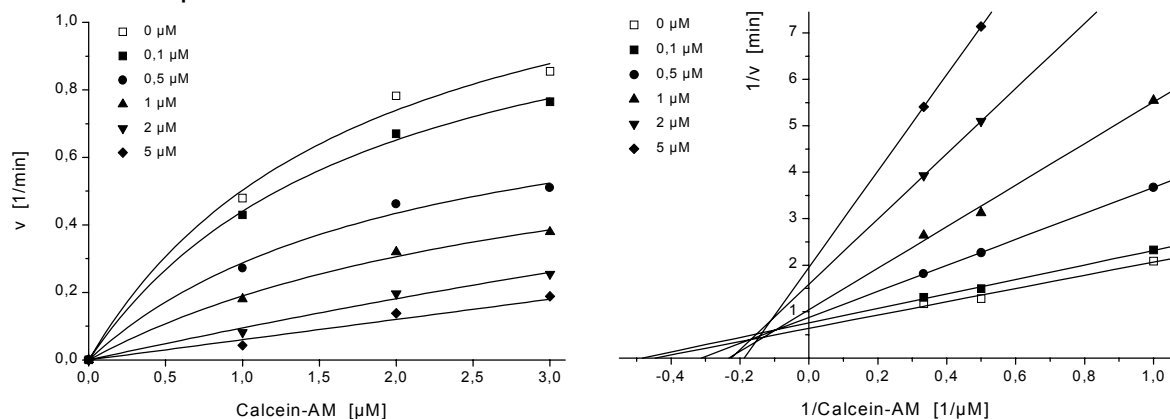
Deshalb wurde der Calcein-AM-MDR-Assay zum Calcein-AM-Kinetik-Assay weiterentwickelt, mit dem die Art der Interaktion von Nicardipin, Ritonavir, Taxol und Vinblastin mit P-Glycoprotein in Abhängigkeit der Arzneistoffkonzentration, der Calcein-AM-Konzentration und der Zeit untersucht wurde. PSC-833 wurde als Referenzsubstanz für maximale Hemmung eingesetzt. Für die Funktionsweise von P-gp wurde, wie bereits vielfach in der Literatur beschrieben, ein Enzym-ähnlicher Mechanismus angenommen, so dass die Berechnung der hyperbolischen Kinetiken nach der Michaelis-Menten-Gleichung erfolgte [Michelson und Slate, 1992; Sinicrope et al., 1992; Spoelstra et al., 1994; Essodaïgui et al., 1998, Döppenschmitt et al., 1999b;

Marbeuf-Gueye et al., 2000; Jang et al., 2001; Kerr et al., 2001; Taylor et al., 2001]. Um die Art der Interaktion einer Testsubstanz mit P-Glycoprotein zu bestimmen und um die Michaelis-Konstante K_M sowie die maximale Reaktionsgeschwindigkeit v_{max} zu ermitteln, erfolgte die Darstellung nach Lineweaver-Burk. Die Berechnung der Inhibitionskonstante K_i erfolgte für kompetitive Inhibition der Testsubstanz aus der Michaelis-Konstante K_M und für non-kompetitive Inhibition der Testsubstanz aus der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit v_{max} (s. 5.6.5 unter *Materialien und Methoden*). In Abbildung 3.45 sind die Michaelis-Menten-Kinetiken in der direkten Darstellung (links) sowie in der Lineweaver-Burk-Darstellung (rechts) von PSC-833 (A), Nicardipin (B), Ritonavir (C), Taxol (D) und Vinblastin (E) aufgeführt.

A PSC-833



B Nicardipin



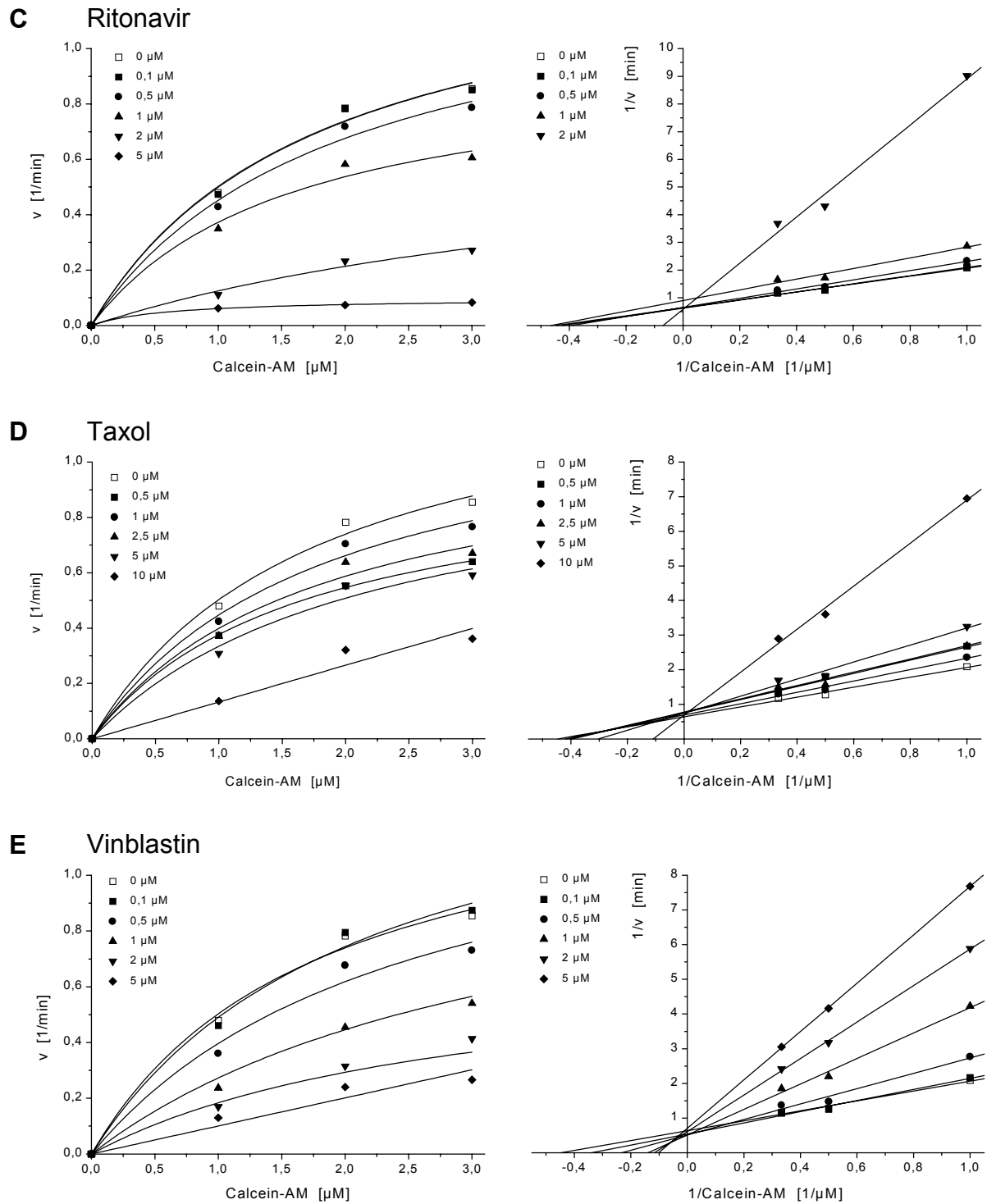


Abbildung 3.45

Calcein-AM-Kinetik-Assay

Michaelis-Menten-Kinetik in der direkten Darstellung (links) und in der Lineweaver-Burk-Darstellung (rechts)
 A: PSC-833 (Referenz für maximale Hemmung), B: Nicardipin, C: Ritonavir, D: Taxol, E: Vinblastin
 (Mittelwert, $n = 4$)

Abbildung 3.45 gibt die Michaelis-Menten-Kinetik in der direkten Darstellung (links) und in der Lineweaver-Burk-Darstellung (rechts) der im Calcein-AM-Kinetik-Assay untersuchten Testsubstanzen PSC-833 (A), Nicardipin (B), Ritonavir (C), Taxol (D) und Vinblastin (E) wieder.

PSC-833 diente als Referenz für maximale Hemmung. Die P-gp-Aktivität war bereits ab einer Konzentration von 0,1 μM vollständig inhibiert (Bild A, Abbildung 3.45). Deshalb wurde für PSC-833 eine Inhibitionskonstante $K_i \leq 0,1 \mu\text{M}$ angenommen. Aufgrund der nicht messbaren Reaktionsgeschwindigkeiten für 0,1/0,5/1 und 2 μM in der Michaelis-Menten-Kinetik war für diese Konzentrationen eine Darstellung nach Lineweaver-Burk nicht möglich. Lediglich für 5 μM PSC-833 konnte das Lineweaver-Burk-Diagramm erstellt werden. Die Art der Interaktion von PSC-833 mit P-gp wurde als non-kompetitive Inhibition eingestuft. Aufgrund der Lineweaver-Burk-Darstellung wurde auch für Nicardipin eine non-kompetitive Inhibition von P-gp angenommen, obwohl es sich hierbei auch um eine gemischte Inhibition handeln könnte (Bild B, Abbildung 3.45). Die Inhibitionskonstante K_i von Nicardipin wurde mit 1,37 μM berechnet. Für Ritonavir, Taxol und Vinblastin wurden Lineweaver-Burk-Diagramme erstellt, die auf eine kompetitive Inhibition von P-gp deuten (Bilder C, D und E, Abbildung 3.45). Die Berechnung der Inhibitionskonstante K_i ergab für Ritonavir 2,05 μM , für Taxol 10,61 μM und für Vinblastin 0,70 μM . Die Auto-Hydrolyse von extrazellulärem Calcein-AM lag während der einstündigen Inkubation bei $< 1\%$.

Tabelle 3.7 fasst die Inhibitionskonstanten K_i und den P-gp-Inhibitionstyp der mit dem Calcein-AM-Kinetik-Assay untersuchten Substanzen zusammen.

Tabelle 3.7: K_i und P-gp-Inhibitionstyp der im Calcein-AM-Kinetik-Assay untersuchten Substanzen

Substanz	K_i [μM]	P-gp-Inhibitionstyp
PSC-833*	$\leq 0,1^{**}$	non-kompetitiv
Nicardipin	$1,37 \pm 0,63$	non-kompetitiv
Ritonavir	$2,05 \pm 1,14$	kompetitiv
Taxol	$10,61 \pm 6,13$	kompetitiv
Vinblastin	$0,70 \pm 0,41$	kompetitiv

* als Referenz für maximale Hemmung

** angenommener Wert für K_i aufgrund der vollständigen Inhibition von P-gp ab 0,1 μM

Die Ergebnisse in Abbildung 3.45 und Tabelle 3.7 zeigen, dass die Art der P-Glycoprotein-Interaktion der untersuchten Testsubstanzen mit dem Calcein-AM-

Kinetik-Assay bestimmt werden kann. Die K_i korrelieren mit der Klassifizierung der Substanzen nach den im Calcein-AM-MDR-Assay beobachteten Effektkonzentrationsprofilen und den daraus ermittelten EC_{50} (3.3.1.1.7 EC_{50} von Validierungssubstanzen im Calcein-AM-MDR-Assay). Die Einteilung von PSC-833 und Nicardipin als non-kompetitive P-gp-Inhibitoren sowie die Klassifizierung von Ritonavir, Taxol und Vinblastin als kompetitive P-gp-Inhibitoren stimmen mit bisherigen Untersuchungen zu Interaktionen dieser Substanzen mit P-Glycoprotein überein [Ford und Hait, 1990; Ford, 1996; Litman et al., 1997a; Litman et al., 1997b; Litman et al., 1997c; Smith et al., 1998; Ferté, 2000; Katoh et al., 2000; Martin et al., 2000; Bauer et al., 2001d]. PSC-833 wurde aufgrund der Inhibitionskonstante $K_i \leq 0,1 \mu\text{M}$ als sehr starker non-kompetitiver P-gp-Inhibitor klassifiziert und deshalb als Referenz für maximale P-gp-Hemmung eingesetzt [Liminga et al., 1994; Tiberghien und Loor, 1996; Mayer et al., 1997; Seelig, 1998; Smith et al., 1998]. Ritonavir und Vinblastin wurden als kompetitive Inhibitoren mit deutlich höherer Affinität zu P-gp als Taxol eingestuft [Ford und Hait, 1990; Tiberghien und Loor, 1996; van Asperen et al., 1997b; Seelig, 1998; Döppenschmitt et al., 1999a; Gutmann et al., 1999b; Martin et al., 2000]. Das Lineweaver-Burk-Diagramm für Nicardipin deutet jedoch auf eine komplexere Funktionsweise von P-gp hin, als dies mit der einfachen hyperbolischen Enzym-Kinetik nach Michaelis-Menten angenommen wurde. Hierfür sprechen auch die für P-gp postulierten mehreren Bindungsstellen, die ihrer Funktion nach in transportierende und regulatorische Bindungsstellen unterteilt werden und über allosterische Interaktionen zwischen hoch- und niedrig-affinen Konformationen wechseln können, so dass außerdem eine negative und positive Kooperativität zwischen den Bindungsstellen angenommen werden muss [Sharom, 1997; Ueda et al., 1997; Shapiro et al., 1999; Martin et al., 2000]. Dies verdeutlicht die Notwendigkeit weiterer Versuche um die bisherigen Ergebnisse statistisch abzusichern und um den Calcein-AM-Kinetik-Assay als geeignetes Modell zur Bestimmung der Art von Arzneistoff-P-gp-Interaktionen zu validieren.

Die Untersuchungen mit dem Calcein-AM-MDR- und Calcein-AM-Kinetik-Assay haben gezeigt, dass es sich hierbei um industrietaugliche Screening-Modelle zur Bestimmung von Arzneistoff-P-gp-Interaktionen handelt, die sowohl für das *compound profiling* von Forschungssubstanzen in der präklinischen Phase der Arzneimittelentwicklung als auch bei der Suche nach effektiven P-gp-Inhibitoren zur MDR-Bekämpfung bei Krebserkrankungen eingesetzt werden können. Speziell bei der Erforschung neuer ZNS-Therapeutika stellen beide Modelle eine gute Ergänzung zu dem Permeationsmodell der Blut-Hirn-Schranke dar. Mit dem Calcein-AM-MDR-Assay wurden Arzneistoff-Effekte auf P-gp untersucht, der daraus weiterentwickelte Calcein-AM-Kinetik-Assay diente der Klassifizierung der Testsubstanzen als kompetitive Substrate oder non-kompetitive Inhibitoren von P-gp. Mit dem Calcein-AM-MDR- und Calcein-AM-Kinetik-Assay konnten viele Nachteile der bisherigen Modelle zur Untersuchung von Arzneistoff-P-gp-Interaktionen umgangen werden. Aufgrund der auf 96-Well-Zellkulturplatten-basierenden Assays und der einfachen fluorimetrischen Analytik ist eine Anwendung als *high throughput screening*-System denkbar, mit dem zeit- und kostengünstig eine große Anzahl von Testsubstanzen untersucht werden kann. Primärkultivierte PBCEC als Modellzellen spiegeln die physiologische Situation besser wider als die von anderen Arbeitsgruppen verwendeten Zelllinien [Tiberghien und Loor, 1996; Eneroth et al., 2001], was sich in einer verbesserten Empfindlichkeit gegenüber P-gp-überexprimierenden Zelllinien und einer sehr guten und reproduzierbaren Differenzierung der Testsubstanzen äußert. Ein weiterer Vorteil liegt in dem einfachen Prinzip des Calcein-AM-Assays, das im Hinblick auf die Entwicklung weiterer funktioneller *in vitro* Screening-Modelle mit entsprechenden Indikatorsystemen auch auf andere Transporter übertragbar ist. Außerdem kann das Prinzip des Calcein-AM-Assays auch für die Untersuchung der P-gp-Aktivität von Tumorproben in der Klinik ausgenutzt werden und somit von großer Bedeutung für die Vorhersage der Therapie-Response und der Überlebensrate bei der Behandlung von Krebserkrankungen sein [Liminga et al., 1994; Broxterman et al., 1996; Legrand et al., 1998; Karászi et al., 2001].

Zu den Nachteilen des Calcein-AM-MDR- und Calcein-AM-Kinetik-Assays zählt der für eine Primärkultur notwendige zeitliche Aufwand sowie die lediglich indirekte Bestimmung der P-gp-Aktivität über die intrazelluläre Calcein-Akkumulation. Auch der

Einfluss weiterer, möglicherweise noch unbekannter Transporter auf das Calcein-AM/Calcein-Indikatorsystem muss berücksichtigt werden. Aufgrund der komplexeren Funktionsweise von P-Glycoprotein als der bisher angenommenen, werden weitere Untersuchungen mit dem Calcein-AM-Kinetik-Assay zeigen, ob die Auswertung der Daten über die einfache hyperbolische Enzym-Kinetik nach Michaelis-Menten dem P-gp-Funktionsmechanismus gerecht wird, oder ob allosterische Interaktionen sowie negative und positive Kooperativität berücksichtigt werden müssen, was die Auswertung stark erschweren würde. Außerdem muss der Zusammenhang zwischen den im Calcein-AM-MDR- und Calcein-AM-Kinetik-Assay ermittelten Ergebnissen und der Membranfluidität geklärt werden, um sicherzustellen, dass die gemessenen intrazellulären Fluoreszenzen nicht auf unspezifische Membraneffekte, sondern auf direkte Interaktionen der Testsubstanzen mit P-Glycoprotein zurückzuführen sind. Tabelle 3.8 fasst die Vor- und Nachteile des Calcein-AM-MDR- und Calcein-AM-Kinetik-Assays zusammen.

Tabelle 3.8: Vor- und Nachteile des Calcein-AM-MDR- und Calcein-AM-Kinetik-Assays

Vorteile	Nachteile
<ul style="list-style-type: none"> • einfaches Prinzip • einfache Analytik • hohe Empfindlichkeit • gute Differenzierung • zuverlässig, reproduzierbar • physiologische Bedingungen • <i>high throughput screening</i> möglich • übertragbar auf andere Zellen • übertragbar auf andere Transporter • klinische Anwendung möglich 	<ul style="list-style-type: none"> • aufwendige Primärkultur • indirekte Bestimmung der P-gp-Aktivität • komplizierte Auswertung des Kinetik-Assays • Einfluss anderer Transporter ? • Membraneffekte ?

3.3.3 Zusammenfassung der Untersuchungen von Arzneistoff-Interaktionen mit P-Glycoprotein im Calcein-AM-Assay

Zur Untersuchung von Arzneistoff-Interaktionen mit P-Glycoprotein wurden zwei sich ergänzende Modelle entwickelt. Der *Calcein-AM-MDR-Assay* diente der Bestimmung von konzentrationsabhängigen Arzneistoff-Effekten auf P-gp durch die schnelle Untersuchung einer großen Anzahl von Testsubstanzen im Sinne eines industrietauglichen, wenig zeit- und kostenintensiven Screening-Modells. Der daraus weiterentwickelte *Calcein-AM-Kinetik-Assay* wurde eingesetzt, um die Art der Interaktion von Testsubstanzen mit P-gp zu bestimmen. Beiden Screening-Modellen liegen primärkultivierte PBCEC als Modellzellen sowie das Calcein-AM/Calcein-System als Indikator zur Detektion der Wechselwirkungen zwischen Testsubstanz und P-gp zugrunde.

Mit dem Calcein-AM-MDR-Assay wurden Validierungssubstanzen als P-gp-Modulatoren und Non-Modulatoren richtig identifiziert. Zwischen starken, mäßigen und schwachen P-gp-Modulatoren konnte gut differenziert werden. Weiterhin war eine Differenzierung strukturell ähnlicher Calciumkanalblocker vom Phenylalkylamin-Typ sowie von Cortisol und Cortison möglich. Mit der Untersuchung von Steroidhormonen konnte auch eine physiologische Funktion von P-gp im Calcein-AM-MDR-Assay gezeigt werden. Aus den Effekt-Konzentrationsprofilen der Validierungssubstanzen wurden mit einem E_{max} -Modell die EC_{50} der Substanzen ermittelt, deren Ranking gut mit Literaturangaben übereinstimmt. Die deutlich niedrigeren EC_{50} der im Calcein-AM-MDR-Assay untersuchten Validierungssubstanzen gegenüber Literaturwerten, die aus Versuchen mit P-gp-überexprimierenden Zelllinien resultieren, unterstreichen die physiologische Bedeutung primärkultivierter Zellen für die Untersuchung von Arzneistoff-P-gp-Interaktionen. Die ABC-Transporter Mrp1 und Mrp2 hatten einen nur geringfügigen bzw. keinen Einfluss auf das Calcein-AM/Calcein-Indikatorsystem. Durch Experimente mit metabolischen Inhibitoren wurde die ATP-Abhängigkeit von P-gp demonstriert. Eine scheinbar P-gp-aktivierende Eigenschaft des Flavonoids Quercetin konnte zwar beobachtet werden, dieser Effekt wurde aber mit dem Einbau von vesikulär gespeichertem P-Glycoprotein in die Zellmembran erklärt. Außerdem wurde über unspezifische Membraneffekte durch Cholesterin und den *fluidizer* TPGS ein deutlicher Einfluss der Membranfluidität auf die Funktion von P-gp festgestellt.

Mit dem Calcein-AM-Kinetik-Assay wurden die Testsubstanzen Nicardipin, PSC-833, Ritonavir, Taxol und Vinblastin auf die Art der Interaktion mit P-gp in Abhängigkeit der Arzneistoff-Konzentration, der Calcein-AM-Konzentration und der Zeit untersucht. Hierbei wurde für die Funktionsweise von P-gp ein Enzym-ähnlicher Mechanismus angenommen, die Berechnung der Kinetik erfolgte nach der Michaelis-Menten-Gleichung. Zur Berechnung der Inhibitionskonstante K_i der untersuchten Testsubstanzen wurden die Michaelis-Konstante K_M und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit v_{\max} der Lineweaver-Burk-Darstellung entnommen. Aufgrund der Untersuchungen mit dem Calcein-AM-Kinetik-Assay wurden PSC-833 und Nicardipin als non-kompetitive P-gp-Inhibitoren eingeteilt. Ritonavir, Taxol sowie Vinblastin wurden als kompetitive P-gp-Substrate klassifiziert.

Die Ergebnisse der Untersuchungen qualifizieren den Calcein-AM-MDR- und Calcein-AM-Kinetik-Assay als empfindliche Screening-Modelle, die vielfältig eingesetzt werden können: 1) für QSAR-Studien zur Aufklärung der Beziehung zwischen Molekülstruktur und P-gp-Affinität, 2) für das *compound profiling* zur Untersuchung von Arzneistoff-P-gp-Interaktionen und 3) für die Suche und Optimierung neuer Leitstrukturen beim *drug design* effektiver P-gp-Inhibitoren zur MDR-Bekämpfung bei Krebserkrankungen sowie hirngängiger ZNS-Therapeutika, die nicht dem aktiven P-gp-Transport unterliegen.

4 Zusammenfassung und Ausblick

4.1 Zusammenfassung

Zielsetzung dieser Dissertation war die Isolierung, Kultivierung und Charakterisierung cerebraler Kapillarendothelzellen vom Schwein (PBCEC) als Modellzellen für Zellkulturmodelle der Blut-Hirn-Schranke, die Charakterisierung eines *in vitro* Permeationsmodells der Blut-Hirn-Schranke als industrietaugliches Permeationsscreening-Modell sowie die Entwicklung eines Screening-Modells zur Untersuchung von Arzneistoff-Interaktionen mit P-Glycoprotein.

- Für das *in vitro* Permeationsmodell der Blut-Hirn-Schranke wurden primärkultivierte PBCEC als Modellzellen eingesetzt. Die Isolierung der Zellen erfolgte nach einer rein enzymatischen Methode aus Schweinehirn und ergab Ausbeuten von 20-50 Mio. PBCEC/Hirn mit einer Zellviabilität von über 95%. Die Kryokonservierung in flüssigem Stickstoff zur Langzeitlagerung der Zellen war problemlos möglich. PBCEC wurden in unterschiedliche Zellkulturgefäße auf beschichtete Kulturoberflächen ausgesät und als Primärkultur unpassagiert, oder als passagierete Primärzelllinie kultiviert. Die Zellen zeigten ein gutes Wachstum und bildeten nach 5-7 Tagen in Kultur konfluente Monolayer. Mit Erreichen von Konfluenz kamen der Wachstums- und Differenzierungsprozess der Zellen zum Stillstand, was mit Aktinfärbungen des Cytoskeletts in verschiedenen Wachstumsstadien belegt wurde. Immunfärbungen des von-Willebrand-Faktors bestätigten den endothelialen Charakter kultivierter PBCEC. Immunfärbungen des ABC-Transporters Mrp2 waren in 7 Tage lang kultivierten Zellen negativ. Dagegen konnte die Expression von P-Glycoprotein in kultivierten PBCEC immunhistochemisch nachgewiesen werden.
- Die Charakterisierung des *in vitro* Permeationsmodells der Blut-Hirn-Schranke erfolgte anhand von Permeationsversuchen mit Parazellulär-Markern. Aufgrund der Untersuchungen wurden folgende Einflussfaktoren standardisiert: Beschichtung von Kulturflächen ($5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ Rattenschwanz-Collagen), Aussaatdichte ($250.000 \text{ PBCEC}/\text{cm}^2$), Kulturdauer (7 Tage), Kulturmedium (serumhaltig), Versuchsdesign (indirekte Probenapplikation, 1,5 ml Akzeptorvolumen, 100 SpM Schüttelgeschwindigkeit), Passagieren von PBCEC (passagierete PBCEC) und Membranfilter (Polyester-Membranfilter). Zur Beurteilung der Trennleistung

des Modells hinsichtlich der Unterscheidung zwischen gut und schlecht permeierenden Substanzen wurden Permeationsversuche mit Modell-Substanzen durchgeführt. Zwischen passiver parazellulärer bzw. transzellulärer Permeation, Transportmechanismen wie dem L-Aminosäure-Carrier und dem ABC-Transporter P-Glycoprotein konnte deutlich differenziert werden. Um die Vergleichbarkeit und Übertragbarkeit von Ergebnissen zu beurteilen, wurden verschiedene *in vitro* Permeationsmodelle der Blut-Hirn-Schranke simuliert. Qualitative Vergleiche waren nur über das Ranking von Modell-Substanzen nach den apparenten Permeationskoeffizienten möglich, quantitative Vergleiche der Absolutwerte waren dagegen nicht möglich. Die Übertragbarkeit von Permeationsdaten auf andere Modelle war nicht gegeben.

- Zur Untersuchung von Arzneistoff-Interaktionen mit P-Glycoprotein wurden der Calcein-AM-MDR-Assay zur Bestimmung konzentrationsabhängiger Arzneistoff-Effekte auf P-gp sowie der Calcein-AM-Kinetik-Assay zur Bestimmung der Art von Arzneistoff-P-gp-Interaktionen entwickelt. Mit dem Calcein-AM-MDR-Assay wurden Validierungssubstanzen als P-gp-Modulatoren und Non-Modulatoren richtig identifiziert. Zwischen starken, mäßigen und schwachen P-gp-Modulatoren sowie strukturell ähnlichen Substanzen konnte gut differenziert werden. Mrp1 und Mrp2 hatten einen nur geringfügigen bzw. keinen Einfluss auf das Indikatorsystem. Die ATP-Abhängigkeit von P-gp wurde in Versuchen mit metabolischen Inhibitoren demonstriert. Durch Cholesterin und TPGS hervorgerufene Änderungen der Membranfluidität hatten einen deutlichen Einfluss auf die Funktion von P-gp. Das Ranking, der aus den Effekt-Konzentrationsprofilen der Validierungssubstanzen ermittelten EC_{50} stimmt mit Literaturangaben überein. Die im Vergleich zu Literaturwerten niedrigeren EC_{50} unterstreichen die physiologische Bedeutung primärkultivierter Zellen für die Untersuchung von Arzneistoffen auf Interaktionen mit P-Glycoprotein. Aufgrund der Untersuchungen mit dem Calcein-AM-Kinetik-Assay wurden Nicardipin und PSC-833 als non-kompetitive P-gp-Inhibitoren klassifiziert. Ritonavir, Taxol und Vinblastin wurden als kompetitive P-gp-Substrate eingestuft. Die Ergebnisse zeigen, dass das *in vitro* Permeationsmodell der Blut-Hirn-Schranke als industrietaugliches Permeations-Screening-Modell verwendet werden kann, und dass der Calcein-AM-MDR- und Calcein-AM-Kinetik-Assay gute Screening-Modelle zur Untersuchung von Arzneistoff-P-gp-Interaktionen darstellen.

4.2 Ausblick

Die Anwendung der in dieser Arbeit vorgestellten Zellkulturmodelle zur Erforschung der Blut-Hirn-Schranke und des ABC-Transporters P-Glycoprotein, sowie deren Verwendung als industrietaugliche Screening-Modelle zur Untersuchung von Arzneistoffen in der präklinischen Phase der Arzneimittelentwicklung erfordert eine kontinuierliche Optimierung und Weiterentwicklung.

Für das *in vitro* Permeationsmodell der Blut-Hirn-Schranke sind dazu weitere Untersuchungen zu Auswirkungen sowohl zellspezifischer als auch material- und methodenspezifischer Einflussfaktoren auf die Permeation von Testsubstanzen notwendig. Daneben muss die Dichtigkeit primärkultivierter PBCEC-Monolayer verbessert werden, um die *in vivo* Situation realistischer darzustellen. Zur Beurteilung der Vorhersagekraft des *in vitro* Permeationsmodells hinsichtlich der Permeation von Arzneistoffen durch die Blut-Hirn-Schranke *in vivo*, sind Permeationsversuche mit einer größeren Anzahl an Testsubstanzen sowie einer *in vitro-in vivo*-Korrelation der Daten durchzuführen.

Für den Calcein-AM-MDR- und Calcein-AM-Kinetik-Assay ist neben einem qualitativen Nachweis von P-Glycoprotein auch dessen quantitative Bestimmung über die gesamte Kulturdauer notwendig. Hierbei muss insbesondere die Auswirkung verschiedener Einflussfaktoren wie z.B. Kulturmedien, Medienzusätze usw. auf die P-gp-Expression der Zellen untersucht werden. Weiterhin muss auch die Variabilität der P-gp-Expression unterschiedlicher Zellchargen überprüft werden. Um die physiologische Bedeutung der Ergebnisse aus Versuchen mit dem Calcein-AM-MDR- und Calcein-AM-Kinetik-Assay zu beurteilen, ist es außerdem erforderlich, die P-gp-Expression der Zellen *in vitro* mit der P-gp-Expression der Zellen *in vivo* zu vergleichen. Als wichtiger Einflussfaktor auf den Calcein-AM-MDR- und Calcein-AM-Kinetik-Assay muss die Auswirkung der Membranfluidität auf die Funktion und Aktivität von P-gp detaillierter beschrieben werden. Dabei ist auch der Einfluss der Arzneistofflipophilie auf die Membranfluidität zu berücksichtigen.

Neben diesen Untersuchungen erscheinen außerdem Vorversuche sinnvoll, den Calcein-AM-MDR-Assay als *high throughput screening*-Modell auszutesten.

5 Materialien und Methoden

5.1 Substanzen

5.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 5.1 führt alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Reagenzien auf.

Tabelle 5.1: Chemikalien und Reagenzien

Substanz	Hersteller
[2- ¹⁴ C]-Diazepam (2,04 GBq/mmol)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, D
[6,6'(n)- ³ H]-Sucrose (348 GBq/mmol)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, D
[<i>mebmt</i> -β- ³ H]-Cyclosporin A (296 GBq/mmol)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, D
L-[4,5- ³ H]Leucin	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, D
[N-Methyl- ³ H]-Morphin (3,09 TBq/mmol)	NEN-Perkin Elmer-Life Sciences, Brüssel, B
[U- ¹⁴ C]-Sucrose (20,9 GBq/mmol)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, D
DL-[4- ³ H]-Propranolol-HCl (925 GBq/mmol)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, D
2,4-Dinitrophenol	Sigma, Taufkirchen, D
2-Desoxy-D-Glucose	Sigma, Taufkirchen, D
5(6)-Carboxyfluorescein	Serva, Heidelberg, D
Amphotericin B	Sigma, Taufkirchen, D
Anti-GFAP (monoklonal, Klon G-A-5, Maus IgG1)	Sigma, Taufkirchen, D
Anti-Mrp2 (monoklonal, Klon M ₂ III-6, Maus IgG2a)	Alexis, Grünberg, D
Anti-P-gp (monoklonal, Klon C219, Maus IgG2a)	Alexis, Grünberg, D
Anti-vWF (Kaninchen IgG-Fraktion des Antiserums)	Sigma, Taufkirchen, D
Anti-Kaninchen-IgG-FITC (aus der Ziege)	Sigma, Taufkirchen, D
Anti-Maus-IgG-FITC (aus dem Schaf)	Chemicon, Hofheim, D
Bovines Serum Albumin, Fraktion V	Roth, Karlsruhe, D
Calcein-Acetoxymethylester (Calcein-AM)	MoBiTec, Göttingen, D
Calciumchlorid-Dihydrat (CaCl ₂ x 2 H ₂ O)	Riedel-de Haën, Seelze, D
Collagen (Rattenschwanz)	Roche, Mannheim, D
Collagen S	Roche, Mannheim, D
Collagenase-Dispase	Roche, Mannheim, D
Cyclosporin A	Novartis, Basel, CH
Dextran (durchschnittliches MG: 63.700 g/mol)	Sigma, Taufkirchen, D
D-Glucose	Merck, Darmstadt, D
Diazepam	Roche, Basel, CH
Di-Kaliumhydrogenphosphat-Trihydrat (K ₂ HPO ₄ x 3 H ₂ O)	Merck, Darmstadt, D
Dimethylsulfoxid (DMSO)	J.T. Baker, Deventer, NL
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O)	Riedel-de Haën, Seelze, D
Dispase II	Roche, Mannheim, D
DMEM/Ham's F12 (1:1)	Biochrom, Berlin, D

Substanz	Hersteller
DMEM/Ham's F12 (1:1), glucosefrei	PAN Systems, Aidenbach, D
Eindeckmedium Aqua Poly Mount [®]	Polysciences, Heidelberg, D
Eindeckmedium Vecta Shield [®]	Linaris, Werteheim-Bettingen, D
Essigsäure 99-100%	Theoretikum, Universität Heidelberg, D
Fibronectin	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Gentamicin	Gibco Life Technologies, Karlsruhe, D
Glutardialdehyd 25%	Merck, Darmstadt, D
Harnstoff	Roth, Karlsruhe, D
HEPES Lösung 1M	Biochrom, Berlin, D
Immersionsöl 3C 247 (Brechungsindex = 1,482)	Chroma, Münster, D
Kaliumchlorid (KCl)	Ferak, Berlin, D
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Riedel-de Haën, Seelze, D
Leukotrien C4 (LTC ₄)	Sigma, Taufkirchen, D
L-Glutamin	Biochrom, Berlin, D
L-Leucin	Sigma, Taufkirchen, D
Magnesiumchlorid-Hexahydrat (MgCl ₂ x 6 H ₂ O)	J.T. Baker, Deventer, NL
Medium 199	Biochrom, Berlin, D
Medium 199 (10x)	Sigma, Taufkirchen, D
Methanol	J.T. Baker, Deventer, NL
MK571	Biomol, Hamburg, D
Morphin-HCl	Roche, Basel, CH
Nagellack, farblos (handelsüblich)	DM Drogeriemarkt, Heidelberg, D
Natriumchlorid (NaCl)	J.T. Baker, Deventer, NL
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Sigma, Taufkirchen, D
Natriumhydroxid (NaOH)	J.T. Baker, Deventer, NL
n-Oktanol	Merck, Darmstadt, D
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt, D
PenStrep	Biochrom, Berlin, D
Percoll [®]	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, D
Pferdeserum, hitzeinaktiviert (Charge 576x)	Biochrom, Berlin, D
Phalloidin-FITC	Sigma, Taufkirchen, D
Propidiumiodid	Sigma, Taufkirchen, D
Propranolol-HCl	Sigma, Taufkirchen, D
Sucrose (Saccharose)	Riedel-de Haën, Seelze, D
Tri-Natriumphosphat-Dodecahydrat (Na ₃ PO ₄ x 12 H ₂ O)	Merck, Darmstadt, D
Triton-X-100	Merck, Darmstadt, D
Trypanblau-Lösung 0,4%	Sigma, Taufkirchen, D
Trypsin (1:250), 0,25% in PBS ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺	Biochrom, Berlin, D
Ultima Gold MV LS-Cocktail	Canberra Packard, Frankfurt, D
Wasser, bidestilliert	Hauseigene Destillationsanlage

5.1.2 Pufferlösungen, Kulturmedien und sonstige Lösungen

Zusätze zu Pufferlösungen und Kulturmedien (Stammlösungen):

Amphotericin B	1,25 mg/ml
Gentamicin	50 mg/ml
HEPES	1 M
L-Glutamin	200 mM
PenStrep	10.000 IE bzw. 10.000 µg/ml
Pferdeserum (hitzeinaktiviert)	

Tabelle 5.2 führt alle in dieser Arbeit verwendeten Pufferlösungen, Kulturmedien und sonstigen Lösungen, sowie deren Zusammensetzung auf.

Tabelle 5.2: Zusammensetzung von Pufferlösungen, Kulturmedien und sonstigen Lösungen

Pufferlösungen

Cerebrospinalflüssigkeit, künstlich (kCSF), pH 7,4

NaCl	6,90 g	118 mM
KCl	0,22 g	3 mM
Na ₃ PO ₄ x 12 H ₂ O	0,27 g	0,7 mM
NaHCO ₃	1,51 g	18 mM
Harnstoff	0,12 g	2 mM
D-Glucose	2,16 g	12 mM
MgCl ₂ x 6 H ₂ O ²	0,15 g	0,8 mM
CaCl ₂ x 2 H ₂ O ³	0,21 g	1,4 mM
Wasser ¹	ad 1000 ml	
PenStrep	10 ml	100 IE/ml bzw. 100 µg/ml
Gentamicin	2 ml	100 µg/ml
Amphotericin B	2 ml	2,5 µg/ml
HEPES	10 ml	10 mM

Krebs-Ringer-Puffer (KRB), pH 7,4

NaCl	8,30 g	142 mM
KCl	0,23 g	3 mM
K ₂ HPO ₄ x 3 H ₂ O	0,34 g	1,5 mM
HEPES	2,40 g	10 mM
D-Glucose	0,72 g	4 mM
MgCl ₂ x 6 H ₂ O ²	0,24 g	1,2 mM
CaCl ₂ x 2 H ₂ O ³	0,21 g	1,4 mM
Wasser ¹	ad 1000 ml	

Phosphat-gepufferte Salze (PBS), Ca²⁺ /Mg²⁺ -frei, pH 7,4

NaCl	8,00 g	137 mM
KCl	0,20 g	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	1,44 g	8,1 mM
KH ₂ PO ₄	0,20 g	1,5 mM
Wasser ¹	ad 1000 ml	

¹ zunächst ca. 90% der angegebenen Wassermenge zugeben, Substanzen darin lösen
pH mit 1 N NaOH oder 1 N HCl auf den angegebenen Wert einstellen
mit Wasser auf angegebenes Volumen auffüllen
ggf. durch 0,22 µm Membranfilter in autoklavierte Flasche filtrieren
ggf. nachstehende Substanzen zugeben

² erst nach Einstellen des pH-Wertes zugeben

³ erst nach Mg-Salz zugeben

Kulturmedien**Einfrriermedium**

Kulturmedium (9% Pferdeserum)	77 ml	
Pferdeserum	13 ml	insg. 20%
DMSO	10 ml	10%

Kulturmedium, serumhaltig (K+)

Medium 199	500 ml	
L-Glutamin	2 ml	0,8 mM *
PenStrep	5 ml	100 IE/ml bzw. 100 µg/ml
HEPES	5 ml	10 mM
Pferdeserum	50 ml	9%

* in Medium 199 bereits 0,7 mM L-Glutamin enthalten, Endkonzentration deswegen 1,5 mM L-Glutamin

Kulturmedium, serumfrei (K-)

DMEM/Ham's F12 (1:1)	500 ml	
L-Glutamin	5 ml	2 mM *
PenStrep	5 ml	100 IE/ml bzw. 100 µg/ml
HEPES	5 ml	10 mM

* in DMEM/Ham's F12 (1:1) bereits 2,5 mM L-Glutamin enthalten, Endkonzentration deswegen 4,5 mM L-Glutamin

Kulturmedium, glucosefrei, serumfrei (K--)

DMEM/Ham's F12 (1:1), glucosefrei	500 ml	
L-Glutamin	5 ml	2 mM *
PenStrep	5 ml	100 IE/ml bzw. 100 µg/ml
HEPES	5 ml	10 mM

* in DMEM/Ham's F12 (1:1) bereits 2,5 mM L-Glutamin enthalten, Endkonzentration deswegen 4,5 mM L-Glutamin

Präparationsmedium

Medium 199	500 ml	
L-Glutamin	2 ml	0,8 mM *
PenStrep	5 ml	100 IE/ml bzw. 100 µg/ml
Gentamicin	1 ml	100 µg/ml
HEPES	5 ml	10 mM

* in Medium 199 bereits 0,7 mM L-Glutamin enthalten, Endkonzentration deswegen 1,5 mM L-Glutamin

Präparationsmedium, serumhaltig

Präparationsmedium	513 ml	
Pferdeserum	50 ml	9%

sonstige Lösungen**BSA-Blockierlösung 1%**

BSA	1 g	1%
KRB	100 ml	

Calcein-AM-Stammlösung 1 mM

Calcein-AM	1 mg	1 mM
DMSO	1 ml	

Calcein-AM-Inkubationslösung 1/2/3 µM

Calcein-AM-Stammlösung 1mM	10/20/30 µl	1/2/3 µM
KRB	10 ml	

5(6)-Carboxyfluorescein-Stammlösung 100 mM, pH 7,4

5(6)-Carboxyfluorescein	3,76 g	100 mM
Wasser	ca. 20 ml	
NaOH	1,14 g	
Wasser	ad 100 ml	

5(6)-Carboxyfluorescein-Stammlösung 25 µM

5(6)-Carboxyfluorescein 100 mM	25 µl	25 µM
KRB	ad 100 ml	

5(6)-Carboxyfluorescein-Lösung 2,5 µM

5(6)-Carboxyfluorescein 25 µM	1 ml	2,5 µM
KRB	ad 10 ml	

Collagen-Stammlösung 2 mg/ml (Rattenschwanz-Collagen)

Collagen	10 mg	2 mg/ml
Essigsäure 0,2%	5 ml	

Dextranlösung 15% (1,06 g/ml)

Präparationsmedium	513 ml	
Dextran	77,5 g	15%

Essigsäure 0,2%

Essigsäure 99-100%	0,2 ml	0,2%
Wasser	ad 100 ml	

Fixierlösung

Paraformaldehyd	3,0 g	3%
PBS	90 ml	
Glutardialdehyd 25%	0,4 ml	0,1%
Saccharose	3,4 g	3,4%
PBS	ad 100 ml	

Natriumhydroxidlösung 1 N

NaOH	4,0 g	1 N
Wasser	ad 100 ml	

Percoll-Lösung 1,03 g/ml

Percoll® (1,131 g/ml)	115 ml	
L-Glutamin	2 ml	0,8 mM
PenStrep	5 ml	100 IE/ml bzw. 100 µg/ml
Gentamicin	1 ml	100 µg/ml
HEPES	5 ml	10 mM
Medium 199 (10x)	13 ml	
KRB	ad 500 ml	

Percoll-Lösung 1,07 g/ml

Percoll® (1,131 g/ml)	270 ml	
L-Glutamin	2 ml	0,8 mM
PenStrep	5 ml	100 IE/ml bzw. 100 µg/ml
Gentamicin	1 ml	100 µg/ml
HEPES	5 ml	10 mM
Medium 199 (10x)	30 ml	
KRB	ad 500 ml	

Phalloidin-FITC-Propidiumiodid-Lösung

Propidiumiodid 1,5 mM	1 μ l	1,5 μ M
Phalloidin-FITC 6,6 μ M	500 μ l	3,3 μ M
KRB	ad 1000 μ l	

Phalloidin-FITC-Stammlösung 6,6 μ M

Phalloidin-FITC	100 μ g	6,6 μ M
Methanol	12 ml	

Primär-Antikörper-Propidiumiodid-Lösung

Propidiumiodid 1,5 mM	1 μ l	1,5 μ M
Antikörper (primär)	50 μ l	1:20
BSA-Blockierlösung 1%	ad 1000 μ l	

Propidiumiodid-Lösung 1,5 μ M

Propidiumiodid 1,5 mM	1 μ l	1,5 μ M
KRB	ad 1000 μ l	

Propidiumiodid-Stammlösung 1,5 mM

Propidiumiodid	10 mg	1,5 mM
Wasser	10 ml	

Sekundär-Antikörper-Lösung

Antikörper (sekundär)	50 μ l	1:20
BSA-Blockierlösung !	ad 1000 μ l	

Triton-X-100-Lösung 0,1%

Triton-X-100	0,1 g	0,1%
KRB	ad 100 ml	

Triton-X-100-Lösung 1%

Triton-X-100	1 g	1%
KRB	ad 100 ml	

5.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 5.3 führt alle in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien auf.

Tabelle 5.3: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Aluminiumfolie	Theoretikum, Universität Heidelberg, D
Einfriergefäße Cellstar® 1,5 ml	Greiner, Frickenhausen, D
Einmalpipetten 5 ml/10 ml/25 ml	Corning Costar, Wiesbaden, D
Einmalspritzen 10 ml Luer Lock	Braun, Melsungen, D
Filtereinheit Steritop® 150 ml/500 ml	Millipore, Eschborn, D
Neutralit pH-Indikatorstäbchen	Merck, Darmstadt, D
Objektträgerkammer Lab-Tek® Permanox® 8 Well	Nunc, Wiesbaden, D
Pasteurpipetten kurz/lang	WU, Mainz, D
Pipettenspitzen Gilson 10 µl/200 µl/1000 µl/5000 µl	Gilson, Langenfeld, D
Plastibrand® PD-Tips 5 ml/12,5 ml	Brand, Wertheim, D
Reaktionsgefäße Safe-Lock 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg, D
Siebgewebe Polymon® 150 µm	NeoLab Migge, Heidelberg, D
Spritzenvorsatzfilter Millex®-GS 0,22 µm	Millipore, Eschborn, D
Spritzenvorsatzfilter Minisart® N 0,22 µm	Sartorius, Göttingen, D
Sterilisierverpackung Melafol®	Melag, Berlin, D
Szintillationsvials 5 ml	Canberra Packard, Frankfurt, D
Verschlußfolie Parafilm® `M`	Brand, Wertheim, D
Zellkulturflaschen 75 cm ²	Corning Costar, Wiesbaden, D
Zellkulturplatten 12 Well	Corning Costar, Wiesbaden, D
Zellkulturplatten 96 Well	Corning Costar, Wiesbaden, D
Zellkulturplatten Transwell Clear® 12 Well, 0,4 µm	Corning Costar, Wiesbaden, D
Zellkulturplatten Transwell® 12 Well, 0,4 µm	Corning Costar, Wiesbaden, D
Zellschaber	Corning Costar, Wiesbaden, D
Zentrifugenröhrchen Falcon 15 ml/50 ml	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Zentrifugenröhrchen Greiner 15ml/50 ml	Greiner, Frickenhausen, D

5.3 Geräte, Geräteeinstellungen, Software

5.3.1 Geräte

Tabelle 5.4 führt alle in dieser Arbeit verwendeten Geräte auf.

Tabelle 5.4: Geräte

Gerät	Hersteller
-85°C Ultra-Tiefkühlschrank UA1085	New Brunswick Scientific, Nürtingen, D
Abstandshalter aus Teflon zur Widerstandsmessung	Theoretikum, Universität Heidelberg, D
Adapter HRP060-CMT	Diagnostic Instruments, Sterling Heights, USA
Autoklav (№ 11499)	Deutsch und Neumann, Berlin, D
Brutschrank BBD6220, heißluftsterilisierbar	Heraeus, Hanau, D
Brutschrank Cytoperm [®] 2, heißluftsterilisierbar	Heraeus, Hanau, D
Brutschrank Memmert Tv 10B	Memmert, Schwabach, D
Einfrierbox Nalgene [®]	Nunc, Wiesbaden, D
Fluoreszenz-Mikrotiterplattenlesegerät Fluoroskan [®] II	BioConcept, Allschwil, CH
Fluoreszenz-Plattenlesegerät Fluoroskan Ascent [®]	Labsystems, Frankfurt, D
Flüssigszintillationszähler Tricarb 2000 CA	Canberra Packard, Frankfurt, D
Gefrierbehälter 18XT für flüssigen Stickstoff	Taylor-Wharton, Husum, D
Inversmikroskop Zeiss ID 03	Zeiss, Jena, D
Kamera Visicam Visitron-1300	Visitron Systems, Puchheim, D
Magnetrührer IKA-Combimag RCT	Ika-Werk, Staufen, D
Mikroskop Leitz Dialux 22	Leica Microsystems, Bensheim, D
pH-Meter	Orion Research, Beverly, USA
Pipette Handstep [®] für PD-Tips	Brand, Wertheim, D
Pipetten für Wechsellspitzen	Labsystems, Frankfurt, D
Pipettierhilfe (Pipetboy [®] , Acuboy [®])	Integra Biosciences, Fernwald, D
Rundschüttler Titramax 101 (3 mm Orbit)	Heidolph-Instruments, Schwabach, D
Thermomixer Eppendorf 5436	Eppendorf, Hamburg, D
Tischzentrifuge Eppendorf 5415D	Eppendorf, Hamburg, D
Transistor-4-Band Radio, ICF-990L, MHz 99,9	Sony, Köln, D
Trockenschrank FUNCTIONline UT 6	Heraeus, Hanau, D
Vakuumpumpe Vacuubrand MZ 2C	Vacuubrand, Wertheim, D
Vortex-Genie [™]	Bender-Hobein, Zürich, CH
Wasserbadrundschtüttler Aquatron	Infors, Bottmingen, CH
Wasserbadschtüttler GFL-1083	GFL, Burgwedel, D
Wasserdestillationsanlage Bi-Dest 2108	GFL, Burgwedel, D
Werkbank CEAG Bio Bench	Envirco, Dortmund, D
Werkbank CEAG Dominit	Envirco, Dortmund, D
Werkbank HERAsafe	Heraeus, Hanau, D
Widerstandsmessgerät Millicell [®] -ERS Elektrodensystem STX-2	Millipore, Eschborn, D
Zählkammer nach Neubauer	Renner, Darmstadt, D
Zentrifuge Beckman TJ-6 TJ-R Refrigeration Unit	Beckman Instruments, München, D
Zentrifuge Sorvall Superspeed RC2-B Sorvall GSA-Rotor	Sorvall, Bad Homburg, D

5.3.2 Geräteeinstellungen

5.3.2.1 Mikroskopie und Fluoreszenzmikroskopie

Für die Mikroskopie und Fluoreszenzmikroskopie wurde ein Leitz Dialux 22 Mikroskop (Leica Microsystems, Bensheim, D) mit folgender Ausstattung verwendet:

- Phasenkontrasteinrichtung
- Objektive 10x / 0,30; 40x / 1,30 Öl; 100x / 1,25 Öl
- Fluoreszenz-Auflichtilluminator 3- λ Ploemopak[®] mit
 - Hg-Hochdrucklampe HBO 100
 - Blaufilter (Filterblock BP 450-490, RKP 510, LP 515)
 - Grünfilter (Filterblock BP 530-560, RKP 580, LP 580)

Alle Bildaufnahmen wurden mit der Digitalkamera Visicam Visitron-1300 gemacht, die über ein HRP060-CMT Adapter auf den Fototubus des Mikroskops aufgesetzt war. Sowohl Steuerung als auch Sicherung des Bildmaterials erfolgten mit einem handelsüblichen PC unter Verwendung der zur Kamera gehörenden Interfacekarte und der Steuerungssoftware EasyControl, Version 2.01 (Visitron Systems, Puchheim, D). Die weitere Bildbearbeitung wurde mit den Programmen Scion Image, Version Beta 4.01 (Scion, Maryland, USA) und Corel Photo-Paint[®] 9 (Corel, Ottawa, CA) durchgeführt.

5.3.2.2 Fluoreszenz-Mikrotiterplattenlesegerät Titertek Fluorskan[®] II

Filter Set	$\lambda_{\text{Ex}} = 485 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em}} = 538 \text{ nm}$
Integration Time	2
Temperatur	Ambient
Scale	Absolut Scale
Calculation	No Calculation

5.3.2.3 Fluoreszenz-Plattenlesegerät Fluoroskan Ascent[®]

Einstellungen zur Fluoreszenzmessung des Calcein-AM-MDR-Assays:

Plate Template	96-Wells Costar 3596
Filter Set	$\lambda_{\text{Ex}} = 485 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em}} = 520 \text{ nm}$
Plate Acceleration	10
Measurement Type	Single
Integration Time	100 ms
Ambient Temperature	37,0°C

Einstellungen zur Fluoreszenzmessung des Calcein-AM-Kinetik-Assays:

Plate Template	96-Wells Costar 3596
Filter Set	$\lambda_{\text{Ex}} = 485 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em}} = 520 \text{ nm}$
Plate Acceleration	10
Measurement Type	Kinetic
Interval Time	30 s
Measurements	120
Integration Time	100 ms
Ambient Temperature	37,0°C

5.3.2.4 Flüssigszintillationszähler Tricarb 2000 CA

Tabelle 5.5 gibt die Geräteeinstellungen des in dieser Arbeit verwendeten Flüssigszintillationszählers Tricarb 2000 CA wieder.

Tabelle 5.5: Geräteeinstellungen Flüssigszintillationszähler Tricarb 2000 CA

Parameter	Radionuklid		
	³ H	¹⁴ C	³ H/ ¹⁴ C
Cycles	1	1	1
Count Time [min]	10	10	10
2 Sigma Coincidence	No	No	No
Counts/Vial	1	1	1
Vials/Standard	1	1	1
Vials/Sample	1	1	1
1 st Vial background	No	No	No
Messkanal A	0-18,6 keV	0-156 keV	0-12 keV
Messkanal B	2-18,6 keV	4-156 keV	12-156 keV
QIP	tSIE	tSIE	AEC
ES Terminator	Count	Count	Count
% of Reference	No	No	No
Data Mode	dpm	dpm	dpm

QIP	Quenchparameter
tSIE	transformierter Spektralindex des externen Standards
AEC	automatische Fensternachführung entsprechend des Quenchgrades
ES Terminator	Zählzeit des externen Standards („Count“: Zählzeit bis Fehler 0,5% beträgt)

5.3.3 Software

Zur Datenerfassung, Daten- und Textverarbeitung, zum Erstellen von Tabellen und Abbildungen wurden die Programme Microsoft® Word 97, Microsoft® Excel 97, Microsoft® Power Point® 97 (Microsoft, Unterschleissheim, D), Microcal Origin® 5.0 (Microcal Software, Northhampton, USA) und CorelDraw® 9 (Corel, Ottawa, CA) verwendet. Die Datenerfassung am Fluoreszenz-Plattenlesegerät Fluoroskan Ascent® erfolgte mit dem Programm Ascent Software®, Version 2.4.1 (Labsystems, Helsinki, FIN). Für den Flüssigszintillationszähler wurde die Software Tricarb 2000 CA® verwendet. Alle Bildaufnahmen wurden mit der Steuerungssoftware EasyControl, Version 2.01 (Visitron Systems, Puchheim, D) gemacht. Für die Bildbearbeitung wurden die Programme Scion Image, Version Beta 4.01 (Scion, Maryland, USA) und Corel Photo-Paint® 9 (Corel, Ottawa, CA) eingesetzt.

5.4 Zellkultur

5.4.1 Vorarbeiten für die Zellkultur

Literatur: Lindl und Bauer, 1994
Morgan und Darling, 1994

Zur Herstellung von Kulturmedien wurden sterile Fertigmedien und sterile Zusätze verwendet. Sämtliche Pufferlösungen und sonstigen Lösungen für die Zellkultur wurden mit bidestilliertem Wasser hergestellt und durch Filtration (Porendurchmesser 0,22 µm) sterilisiert. Glasgeräte, nicht sterile Verbrauchsmaterialien und sonstige für die Zellkultur benötigten nicht sterilen Materialien wurden im Autoklaven (30 min, 121°C, 2 bar) sterilisiert. Alle Arbeitsschritte, für die aseptisches Arbeiten erforderlich war, wurden in einer Laminar-Flow-Werkbank nach Desinfektion der Arbeitsplatte mit 70%igem Isopropanol durchgeführt. Die Brutschrankinnenräume der Brutschränke wurden alle 2 Monate mit der automatischen Desinfektions-Routine bei 180°C für 3 h heißluftsterilisiert.

5.4.2 Isolierung von PBCEC

Literatur: Bowman et al., 1981
Bowman et al., 1983
Audus und Borchardt, 1986a
Audus und Borchardt, 1987
Mischeck et al., 1989
Bowman et al., 1990
Huwyler et al., 1996a
Tewes et al., 1997
Franke et al., 2000

Das zur Isolierung von PBCEC benötigte Schweinehirn wurde morgens am Tag der Präparation vom Fleischversorgungszentrum Mannheim (Schlachthofstraße, 68165 Mannheim) geholt. Geschlachtet wurden männliche und weibliche Tiere der Rassen Deutsches Edelschwein, Deutsches Hausschwein, Deutsches Landschwein und Deutsches Piétrainschwein. Die Schweine wurden aus einem Umkreis von bis zu 100 km geliefert, waren 3-6 Monate alt und hatten ein Gewicht von 90-110 kg. Zur Beruhigung wurden die Tiere nach der Anlieferung im Schlachthof bis zu 24 h in Ställen gehalten und nur nach tierärztlicher Kontrolle für die Schlachtung freigegeben. Die Tötung der Tiere erfolgte mit Strom. Getötete Tiere wurden mit 62°C heißem Wasser gewaschen und mit einer Kratzmaschine entborstet [Haag, 2001, Tierarzt FVZ Mannheim, persönliche Mitteilung]. Nach dem Entfernen der Eingeweide wurden die Tiere mit einer Kettensäge der Länge nach halbiert. Die anschließende Entnahme der Hirnhälften aus dem Schädel wurde selbst getätigt, so dass eine Vorauswahl des verwendeten Hirnmaterials nach dem Zustand des Gewebes getroffen werden konnte. Es wurden 25-30 Hirnhälften entnommen und in künstlicher Cerebrospinalflüssigkeit (kCSF) [Pritchard et al., 1999] auf Eis gelagert bis zur Präparation aufbewahrt. Vom Zeitpunkt der Tötung der Schweine bis zur Entnahme der Hirne vergingen 15-20 min. Von der Tötung der Tiere bis zum Beginn der Präparation im Labor verging nicht mehr als 1 h.

Für die Isolierung von Gehirnkapillarendothelzellen wurden 18-20 Schweinehirnhälften (900-1000 g, 1 Schweinehirn ca. 100 g) verwendet. Zunächst wurden die Hirnhäute, die sie versorgenden Blutgefäße und der Choroid Plexus, gegebenenfalls das Kleinhirn und das verlängerte Rückenmark sorgfältig mit Pinzetten und Skalpell entfernt. Die so gereinigten Hirnhälften wurden dann in eisgekühlter kCSF gewaschen. Nach 2-maliger Kontrolle des Hirngewebes auf Hirnhautüberreste, Blutgefäße

und andere Verunreinigungen, sowie nach den darauffolgenden weiteren Waschschritten wurde die kortikale graue Substanz vom Großhirn mit einem Skalpell abgeschabt. Die graue Substanz wurde zerkleinert und in einem 1000 ml Erlenmeyerkolben mit 100 ml 4°C kaltem Präparationsmedium gesammelt. Danach wurde das Volumen mit Präparationsmedium (37°C) zu 700 ml aufgefüllt und mit 50 ml auf 37°C vorgewärmter, in Präparationsmedium gelöster Dispase ergänzt (Dispase Endkonzentration 5 mg/ml bzw. 0,5% (m/V)). Anschließend wurde der pH-Wert mit 1 N NaOH unter Rühren auf 7,4 eingestellt. Dieser Vorgang wurde nach 1 h wiederholt. Während der 2-stündigen Dispase-Inkubation bei 37°C wurde der Ansatz auf einem Magnetrührer durchmischt. Die Rührgeschwindigkeit wurde gerade so eingestellt, dass der Hirnbrei sich nicht absetzen konnte.

Der Ansatz wurde auf vier Zentrifugenbecher (290 ml) verteilt. Das Volumen wurde mit 4°C kaltem Präparationsmedium aufgefüllt. Nach der anschließenden Zentrifugation (1000 x g, 10 min, 4°C, Sorvall Superspeed RC2-B, Sorvall GSA-Rotor) wurde der Überstand verworfen und das verbliebene Hirngewebe wurde mit 15%iger Dextranlösung aufgeschüttelt. Es wurde erneut zentrifugiert (5800 x g, 15 min, 4°C, Sorvall Superspeed RC2-B, Sorvall GSA-Rotor). Durch die Dextran-Dichtezentrifugation wurde das Hirngewebe in Gehirnkapillaren, Erythrozyten und Zelltrümmer sowie lipophiles Zellmaterial aufgetrennt. Das aufschwimmende lipophile Zellmaterial der grauen Substanz wurde zusammen mit der Dextranlösung abgesaugt und verworfen. Die Pellets wurden in insgesamt 25 ml Präparationsmedium (37°C) resuspendiert. Die Suspensionen wurden in einem 100 ml Erlenmeyerkolben vereinigt. Nach Zugabe von 30 mg Collagenase-Dispase in 5 ml auf 37°C vorgewärmtem Präparationsmedium folgte der zweite enzymatische Verdau (Collagenase-Dispase Endkonzentration 1 mg/ml bzw. 0,1% (m/V)). Unter mäßigem Rühren auf dem Magnetrührer wurde für 1,5-2 h bei 37°C inkubiert. Der Fortgang der Collagenase-Dispase-Inkubation wurde in regelmäßigen Abständen mikroskopisch kontrolliert.

Die erhaltene Zellsuspension wurde durch ein 150 µm Polyester-Monolensiebgewebe (Polymon[®]) filtriert und mit 4°C kaltem Präparationsmedium (serumhaltig) zu 100 ml aufgefüllt. Der Ansatz wurde auf zwei 50 ml Zentrifugenröhrchen verteilt und zentrifugiert (10 min, 130 x g, 4°C, Tischzentrifuge Beckman TJ-6 mit Model TJ-R Refrigeration Unit). Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Zellpellets in je 6 ml serumhaltigem Präparationsmedium aufgeschüttelt und vereinigt. Jeweils 1,5 ml der Zellsuspension wurden auf einen diskontinuierlichen Percollgradienten aus 15

ml Unterphase ($\rho = 1,07 \text{ g/ml}$) und 20 ml Oberphase ($\rho = 1,03 \text{ g/ml}$) vorsichtig aufgetragen. Durch die anschließende Percoll-Dichtezentrifugation (10 min, $1000 \times g$, 4°C , Tischzentrifuge Beckman TJ-6 mit Model TJ-R Refrigeration Unit) wurden die Endothelzellen von Zelltrümmern und Erythrocyten abgetrennt. Zelltrümmer befanden sich als flotierende Bande auf der Oberphase, während Erythrocyten als Pellet in der Unterphase zu finden waren. Gehirnkapillarendothelzellen waren in der Interphase zwischen den Percoll-Lösungen angereichert und wurden durch Absaugen mit einer Pasteurpipette isoliert. Die einzelnen Endothelzell-Fractionen wurden gesammelt und jeweils mit 4°C kaltem Präparationsmedium (serumhaltig) zu 50 ml aufgefüllt. Nach der anschließenden Zentrifugation (10 min, $130 \times g$, 4°C , Tischzentrifuge Beckman TJ-6 mit Model TJ-R Refrigeration Unit) wurden die Pellets in 4°C kaltem Präparationsmedium (serumhaltig) resuspendiert, vereinigt und erneut filtriert. Abermals wurde mit Präparationsmedium (serumhaltig, 4°C) gewaschen und zentrifugiert (10 min, $130 \times g$, 4°C , Tischzentrifuge Beckman TJ-6 mit Model TJ-R Refrigeration Unit). Die gewaschenen Zellen wurden in Einfriermedium (ohne DMSO) aufgenommen. Viabilität und Ausbeute wurden mittels Trypanblau-Ausschlusstest mit einer Neubauer-Zählkammer im Verhältnis 1 : 2 Zellsuspension : Trypanblau unter Verwendung einer 0,4%igen Trypanblau-Lösung bestimmt. Die isolierten PBCEC wurden mit Kulturmedium verdünnt und direkt ausgesät (s. 5.4.3.2 *Aussaat von PBCEC*) und/oder zwecks Kryokonservierung eingefroren. Hierzu wurde die Zellsuspension mit Einfriermedium zu 5 Mio. Zellen/ml verdünnt. Die Endothelzellen wurden in Einfriergefäße überführt und in vorgekühlten (4°C) Einfrierboxen in einem Ultra-Tiefkühlschrank bei -70°C mit einer Abkühlungsrate von $1^\circ\text{C}/\text{min}$ kontrolliert eingefroren. Nach 24 h wurden die Zellen zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff (-196°C) umgesetzt.

Tabelle 5.6 führt die bei der Isolierung von PBCEC verwendeten Materialien und Geräte einschließlich ihrer Anwendung auf.

Tabelle 5.6: Materialien und Geräte zur Isolierung von PBCEC

Materialien und Geräte	Anwendung
künstliche Cerebrospinalflüssigkeit (kCSF) Bechergläser, 2000 ml	Transport der Hirne vom Schlachthof ins Labor Sammeln gereinigter Hirne
Petrischale, 20 cm Durchmesser Pinzette, spitz, abgewinkelt Pinzette, stumpf, gerade Skalpell, Klinge	Entfernen der Hirnhäute, Säuberung der Hirne Gewinnung und Zerkleinerung der grauen Substanz
Dispase II	proteolytische Auflösung des Gehirngewebes Freisetzung von Gehirnkapillaren
Dextranlösung 15%	Dichtezentrifugation, Abtrennen freigesetzter Gehirnkapillaren von zerkleinertem Gehirngewebe
Collagenase-Dispase	collagenolytische und proteolytische Disaggregation der extrazellulären Matrix Freisetzung einzelner Endothelzellen aus Kapillaren
Percoll® Percoll-Lösung ($\rho = 1,03 \text{ g/ml}$ und $\rho = 1,07 \text{ g/ml}$)	Dichtezentrifugation, Abtrennen der Endothelzellen von Zelltrümmern und Erythrozyten
Trypanblau-Lösung 0,4% Zählkammer nach Neubauer Inversmikroskop Zeiss ID 03	Viabilitätsbestimmung isolierter PBCEC quantitative Bestimmung der Zellausbeute
Einfriermedium Cellstar® Einfriergefäße, 1,5 ml Einfrierbox Nalgene® -85°C Ultra-Tiefkühlschrank UA1085 Gefrierbehälter 18XT für flüssigen Stickstoff	kontrolliertes Einfrieren isolierter PBCEC Langzeitlagerung in flüssigem Stickstoff
Präparationsmedium Präparationsmedium (serumhaltig)	alle Inkubationen und Waschvorgänge vor bzw. nach Collagenase-Dispase-Inkubation
Erlenmeyerkolben, 1000 ml mit Magnetrührfisch Erlenmeyerkolben, 100 ml mit Magnetrührfisch Trockenschrank FUNCTIONline UT 6 Magnetrührer IKA-Combimagic RCT	Dispase II-Inkubation Collagenase-Dispase-Inkubation
Neutralit pH-Indikatorstäbchen	pH-Messung von Dispase II- Inkubationslösung und Collagenase-Dispase-Inkubationslösung
Pasteurpipetten, abgebrochene Spitze Pasteurpipetten, intakt (kurz) Vakuumpumpe Vacuubrand MZ 2C	Absaugen des zerkleinerten Gehirngewebes Isolierung von PBCEC nach Percoll-Zentrifugation Absaugen sämtlicher Überstände
Polymon® Siebgewebe (150 μm) über Becherglas (100 ml) gespannt	Filtration der Zellsuspension Entfernen grober Strukturen
Zentrifuge Sorvall Superspeed RC2-B Sorvall GSA-Rotor Zentrifugenbecher, 290 ml	alle Zentrifugationsschritte vor Collagenase-Dispase-Inkubation
Zentrifuge Beckman TJ-6 TJ-R Refrigeration Unit Zentrifugenröhrchen, Falcon, 50 ml Zentrifugenröhrchen, Greiner, 50 ml	alle Zentrifugationsschritte nach Collagenase-Dispase-Inkubation

5.4.3 Kultivierung von PBCEC

Tabelle 6.3 im Anhang gibt einen Überblick der zur Kultivierung von PBCEC verwendeten Zellkulturgefäße mit Angabe von Kulturflächen, Arbeitsvolumina und Volumen-Fläche-Verhältnissen.

5.4.3.1 Beschichtung von Kulturflächen

Literatur: Roche, Produktinformation: Collagen (Rattenschwanz)
Michalopoulos und Pitot, 1975
Audus et al., 1996
Tewes et al., 1997
Tilling et al., 1998
Török, 1999
Thöle, 2000

Für die Beschichtung von Kulturflächen wurde Rattenschwanz-Collagen verwendet. Die Kulturflächen der Zellkulturgefäße wurden mit $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ einer Collagen-Lösung (aus 2 mg/ml Collagen-Stammlösung mit bidestilliertem Wasser hergestellt) für 4 h im Brutschrank bei 37°C , 5% CO_2 und 95% r.F. inkubiert. Anschließend wurde die Collagen-Lösung abgesaugt und die Zellkulturgefäße wurden für 15 min zum Trocknen der Kulturflächen in den Luftstrom der Werkbank gestellt. Unmittelbar danach erfolgte die Aussaat von PBCEC auf die mit Rattenschwanz-Collagen beschichteten Kulturflächen.

Augrund der unterschiedlichen Geometrie von Zellkulturgefäßen bzgl. des Volumen-Fläche-Verhältnisses wurden unterschiedlich konzentrierte Collagen-Lösungen, angepasst an das jeweils verwendete Zellkulturgefäß, eingesetzt.

Tabelle 6.3 im Anhang gibt einen Überblick der zur Beschichtung von Kulturflächen verwendeten Zellkulturgefäße mit Angabe von Beschichtungsmengen, Beschichtungsvolumina und Konzentrationen der eingesetzten Collagen-Lösungen.

Tabelle 5.7 führt die zur Beschichtung von Kulturflächen verwendeten Materialien und Geräte einschließlich ihrer Anwendung auf.

Tabelle 5.7: Materialien und Geräte zur Beschichtung von Kulturflächen

Materialien und Geräte	Anwendung
Collagen (Rattenschwanz) Collagen S	Beschichtungsmaterial zur Beschichtung von Kulturflächen
Fibronectin	Zweitbeschichtung nach Collagen-Beschichtung
Objektträgerkammern 8 Well Zellkulturflaschen 75 cm ² Zellkulturplatten 96 Well Zellkulturplatten Transwell® Zellkulturplatten Transwell Clear®	zu beschichtende Zellkulturgefäße
Brutschrank BBD6220, heißluftsterilisierbar Brutschrank Cytoperm® 2, heißluftsterilisierbar	Collageninkubation von Zellkulturgefäßen
Pasteurpipetten (kurz, lang) Vakuumpumpe Vacuubrand MZ 2C	Absaugen von Collagenlösung
Werkbank CEAG Bio Bench Werkbank CEAG Dominit Werkbank HERASafe	Lufttrocknung von Kulturflächen aseptisches Arbeiten bei der Beschichtung von Kulturflächen

5.4.3.2 Aussaat von PBCEC

Literatur: Biegel und Pachter, 1994
Audus et al., 1996
Török, 1999
Thöle, 2000

Die Aussaat von PBCEC erfolgte entweder direkt nach der Isolierung oder nach einer Kryokonservierungsphase der Zellen in flüssigem Stickstoff.

Zur direkten Aussaat von PBCEC wurde die nach der Isolierung gewonnene Zellsuspension mit Kulturmedium so verdünnt, dass mit einer Dichte von 250.000 Zellen/cm² ausgesät werden konnte. Die Zellsuspension wurde in die mit Collagen vorbehandelten Zellkulturgefäße pipettiert. Diese wurden nach mikroskopischer Kontrolle in den Brutschrank (37°C, 5% CO₂, 95% r.F.) gestellt.

In flüssigem Stickstoff gelagerte Zellen wurden im Wasserbad (37°C) bei leichtem Schütteln der Einfriergefäße angetaut und sofort in Kulturmedium überführt (max. 3 Einfriergefäße mit je 5 Mio. Zellen/ml zu 50 ml Kulturmedium). Nach Zentrifugation (10 min, 130 x g, 4°C) wurde der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in Kulturmedium (4°C) aufgenommen. Die Zellsuspension wurde mit einer Aussaatdichte von 250.000 Zellen/cm² in die mit Collagen vorbehandelten Zellkulturgefäße pipet-

tiert. Diese wurden nach mikroskopischer Kontrolle in den Brutschrank (37°C, 5% CO₂, 95% r.F.) gestellt.

Tabelle 6.3 im Anhang gibt einen Überblick der zur Aussaat von PBCEC verwendeten Zellkulturgefäße mit Angabe von Aussaatdichten und Aussaatvolumina.

Tabelle 5.8 führt die zur Aussaat von PBCEC verwendeten Materialien und Geräte einschließlich ihrer Anwendung auf.

Tabelle 5.8: Materialien und Geräte zur Aussaat von PBCEC

Materialien und Geräte	Anwendung
Kulturmedium (serumhaltig)	Waschen aufgetauter PBCEC Aussaat von PBCEC
Wasserbadrundschtütler Aquatron Wasserbadschtütler GFL-1083	Auftauen kryokonservierter PBCEC
Zentrifuge Beckman TJ-6 TJ-R Refrigeration Unit Zentrifugenröhrchen, Falcon, 50 ml Zentrifugenröhrchen, Greiner, 50 ml	Waschen der Zellsuspension nach dem Auftauen
Plastibrand® PD-Tips 5/12,5 ml Pipette Handystep® für PD-Tips Einmalpipetten, 5/10/25 ml Pipettierhilfe (Pipetboy®, Acuboy®)	Aussaat von PBCEC
Objekträgerkammern 8 Well Zellkulturflaschen 75 cm ² Zellkulturplatten 96 Well Zellkulturplatten Transwell® Zellkulturplatten Transwell Clear®	Zellwachstum, Aktinfärbung, Immunfärbung Kultivierung mit anschließender Passage Durchführung des Calcein-AM-Assays Durchführung von Permeationsversuchen zur Charakterisierung des Permeationsmodells
Inversmikroskop Zeiss ID 03	mikroskopische Kontrolle nach der Aussaat
Brutschrank BBD6220, heißluftsterilisierbar Brutschrank Cytoperm® 2, heißluftsterilisierbar	Kultivierung von PBCEC (37°C, 5% CO ₂ , 95% r.F.)
Werkbank CEAG Bio Bench Werkbank CEAG Dominit Werkbank HERAsafe	aseptisches Arbeiten bei der Aussaat von PBCEC

5.4.3.3 Passagieren von PBCEC

Literatur: Abbott et al., 1992
Franke et al., 1999
Franke et al., 2000

Bis zum Erreichen einer etwa 75-80%igen Konfluenz am dritten Tag in Kultur wurden die Endothelzellen in Zellkulturflaschen gezüchtet. Zum Passagieren von PBCEC wurde das Kulturmedium abgesaugt und zweimal mit je 10 ml 37°C warmem PBS (Ca²⁺- und Mg²⁺-frei) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 5 ml

0,25%iger Trypsinlösung (37°C) innerhalb von 3-5 min bei leichtem Schütteln vorsichtig vom Flaschenboden unter Zuhilfenahme von Zellschabern abgelöst. Das Trypsinisieren wurde mikroskopisch kontrolliert. Durch Zugabe von 5 ml Pferdeserum (4°C) wurde die Trypsinreaktion gestoppt und die Zellsuspension wurde in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellkulturflaschen wurden mit 4°C kaltem Kulturmedium nachgewaschen, die Zellsuspension wurde damit aufgefüllt. Es wurde zentrifugiert (10 min, 130 x g, 4°C), der Überstand wurde verworfen. Die passagierten PBCEC wurden entweder in Kulturmedium aufgenommen und auf vorbeschichtete Transwell®- oder Transwell Clear®-Platten ausgesät (Aussaatdichte 250.000 Zellen/cm², s. 5.4.3.2 Aussaat von PBCEC), oder in Einfriermedium resuspendiert und zur Kryokonservierung eingefroren (s. 5.4.2 *Isolierung von PBCEC*).

Tabelle 5.9 führt die zum Passagieren von PBCEC verwendeten Materialien und Geräte einschließlich ihrer Anwendung auf.

Tabelle 5.9: Materialien und Geräte zum Passagieren von PBCEC

Materialien und Geräte	Anwendung
PBS, Ca ²⁺ -/Mg ²⁺ -frei	Waschen des Zellmonolayers vor Trypsin-Zugabe
Trypsin (1:250) 0,25% in PBS ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺ Zellschaber	Ablösen des Zellrasens von der Kulturfläche
Inversmikroskop Zeiss ID 03	Kontrolle der Trypsin-Reaktion
Pferdeserum	Abstoppen der Trypsin-Reaktion
Kulturmedium, serumhaltig	Waschen der trypsinisierten PBCEC Medium für Aussaat nach dem Passagieren
Zentrifuge Beckman TJ-6 TJ-R Refrigeration Unit Zentrifugenröhrchen, Falcon, 50 ml Zentrifugenröhrchen, Greiner, 50 ml	Waschen trypsinisierter PBCEC
Werkbank CEAG Bio Bench Werkbank CEAG Dominit Werkbank HERAsafe	aseptisches Arbeiten beim Passagieren von PBCEC

5.4.3.4 Kultivierung von PBCEC

Literatur: Tewes et al., 1997
Franke et al., 1999
Török, 1999
Franke et al., 2000
Thöle, 2000

PBCEC wurden im Brutschrank unter Standardkulturbedingungen bei 37°C, 5% CO₂ und 95% r.F. kultiviert.

Bei der Primärkultur von Endothelzellen fand der erste Mediumwechsel 24 h nach der Zellaussaat statt. Danach wurde jeden zweiten Tag, nach 3 und 5 Tagen in Kultur, das Nährmedium gewechselt (Tabelle 5.10 oben, Zellen in Primärkultur).

Bei Zellen, die während der Kultur passagiert werden sollten, fand der erste Mediumwechsel 24 h nach der Aussaat statt (Tabelle 5.10 unten, Zellen mit Passage). Nach 3 Tagen in Kultur (75-80% Konfluenz) konnte das Passagieren der Endothelzellen durchgeführt werden (s. 5.4.3.3 *Passagieren von PBCEC*). 24 h nach der Passage fand der nächste Mediumwechsel statt (4 Tage in Kultur).

24 h vor Versuchsbeginn (6 Tage in Kultur) wurde das serumhaltige Kulturmedium (K+) gegen serumfreies Kulturmedium (K-) ausgetauscht. Versuche wurden standardmäßig nach 7 Tagen in Kultur durchgeführt.

Beim Mediumwechsel wurde das Nährmedium mit einer Pasteurpipette abgesaugt. Zum Absaugen des Mediums aus 75 cm² Zellkulturflaschen wurden lange Pasteurpipetten eingesetzt, für alle anderen Zellkulturgefäße wurden kurze Pasteurpipetten verwendet. Das Nährmedium wurde vorsichtig, ohne die auf der Kulturfläche anhaftenden Zellen zu berühren, abgesaugt. Zellkulturflaschen wurden dazu aufrecht gestellt. Bei Transwell[®]- oder Transwell Clear[®]-Platten erfolgte das Absaugen des Nährmediums zuerst aus dem unteren Kompartiment, anschließend aus dem oberen Kompartiment. Bei der Zugabe des frischen Nährmediums wurde umgekehrt verfahren.

Tabelle 6.3 im Anhang gibt einen Überblick der zur Kultivierung verwendeten Zellkulturgefäße mit Angabe von Kulturvolumina.

Tabelle 5.10 führt das Fütterungsschema von PBCEC während der Zellkultivierung mit Angaben von Aussaat, Passage und Versuch sowie Kulturmedien auf.

Tabelle 5.10: Fütterungsschema von PBCEC

Tage in Kultur		0	1	2	3	4	5	6	7
Zellen in Primärkultur	Mediumwechsel	A	+		+		+	+	V
	Medium		K+		K+		K+	K-	
Zellen mit Passage	Mediumwechsel	A	+		P	+		+	V
	Medium		K+			K+		K-	

AAussaat P Passage V Versuch + Mediumwechsel
 K+Kulturmedium, serumhaltig K- Kulturmedium, serumfrei

Tabelle 5.11 führt die zur Kultivierung von PBCEC verwendeten Materialien und Geräte einschließlich ihrer Anwendung auf.

Tabelle 5.11: Materialien und Geräte zur Kultivierung von PBCEC

Materialien und Geräte	Anwendung
Kulturmedium, serumhaltig (K+) Kulturmedium, serumfrei (K-)	Nährmedien zur Kultivierung von PBCEC
Wasserbadrundschtütler Aquatron Wasserbadschüttler GFL-1083 Zentrifugenröhrchen Falcon 50 ml Zentrifugenröhrchen Greiner 50 ml	Aufwärmen des Nährmediums auf 37°C
Pasteurpipetten kurz/lang Vakuumpumpe Vacuubrand MZ 2C	Absaugen des zu wechselnden Nährmediums
Plastibrand® PD-Tips 5 ml/12,5 ml Pipette Handystep® für PD-Tips	Zugabe von frischem Nährmedium für Zellen in Objektträgerkammern und Zellkulturplatten
Einmalpipetten 10 ml/25 ml Pipettierhilfe (Pipetboy®, Acuboy®)	Zugabe von frischem Nährmedium für Zellen in Zellkulturflaschen
Brutschrank BBD6220, heißluftsterilisierbar Brutschrank Cytoperm® 2, heißluftsterilisierbar	Kultivierung von PBCEC (37°C, 5% CO ₂ , 95% r.F.)
Inversmikroskop Zeiss ID 03	Kontrolle des Zellwachstums
Werkbank CEAG Bio Bench Werkbank CEAG Dominit Werkbank HERAsafe	Herstellung aller Nährmedien aseptisches Arbeiten beim Mediumwechsel

5.4.4 Charakterisierung von PBCEC

5.4.4.1 Zellwachstum und Erscheinungsbild

PBCEC wurden gleich nach der Aussaat, während der Kultivierung täglich und vor jedem Versuch mikroskopisch kontrolliert. Die Betrachtung der Zellen erfolgte mit einem inversen Lichtmikroskop (Zeiss ID 03). Zellwachstum und Erscheinungsbild der Zellen wurden durch Bildaufnahmen nach 1, 3, 5, 7 und 9 Tagen in Kultur dokumentiert. Hierzu wurden die in 8-Well-Objektträgerkammern kultivierten PBCEC 3mal mit KRB (37°C) gewaschen. Der Objektträgeraufsatz wurde entfernt und ein Deckglas wurde aufgesetzt.

Die Bildaufnahmen wurden nach *5.3.2.1 Mikroskopie und Fluoreszenzmikroskopie* gemacht.

Tabelle 5.12 führt die zur Dokumentation von Zellwachstum und Erscheinungsbild verwendeten Materialien und Geräte einschließlich ihrer Anwendung auf.

Tabelle 5.12: Materialien und Geräte zur Dokumentation von Zellwachstum und Erscheinungsbild

Materialien und Geräte	Anwendung
Inversmikroskop Zeiss ID 03 Zellkultur in allen Zellkulturgefäßen	lichtmikroskopische Kontrolle nach Aussaat, während der Kultur und vor Versuchen
KRB	Waschen von PBCEC
Deckgläser Mikroskop Leitz Dialux 22 HRP060-CMT Adapter Kamera Visicam Visitron-1300 PC, Software Scion Image, Corel Photo Paint	Mikroskopie Bildaufnahmen

5.4.4.2 Aktinfärbung

Literatur: Rubin et al., 1991
Török, 1999

Zur Aktinfärbung wurden PBCEC nach 1, 3, 5, 7 und 9 Tagen in Kultur verwendet. Das F-Aktingerüst der Zellen wurde mit Phalloidin-FITC angefärbt, zusätzlich wurde Propidiumiodid zur Zellkernfärbung verwendet. Die in 8-Well-Objektträgerkammern kultivierten Endothelzellen wurden 3-mal mit 4°C kalter KRB-Lösung gewaschen und mit kalter Fixierlösung für 30 min behandelt. Nach 3-maligem Waschen mit KRB (4°C) wurde mit 0,1% Triton-X-100-Lösung für 10 min bei Raumtemperatur permeabilisiert. Danach wurde erneut 3-mal mit 4°C kalter KRB-Lösung gewaschen. Es folgte eine Inkubation mit Phalloidin-FITC-Propidiumiodid-Lösung (3,3 µM Phalloidin-FITC, 1,5 µM Propidiumiodid) unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur für 45 min. Zum Abbruch der Inkubation wurde 5mal mit KRB (4°C) gewaschen. Der Objektträgeraufsatz wurde entfernt, die Zellen wurden mit Aqua Poly Mount[®] oder Vecta Shield[®] eingedeckt und mit einem aufgelegten Deckglas und Nagellack versiegelt. Fluoreszenzmikroskopische Bildaufnahmen wurden nach 5.3.2.1 *Mikroskopie und Fluoreszenzmikroskopie* gemacht.

Tabelle 5.13 führt die zur Aktinfärbung und Fluoreszenzmikroskopie verwendeten Materialien und Geräte einschließlich ihrer Anwendung auf.

Tabelle 5.13: Materialien und Geräte zur Aktinfärbung und Fluoreszenzmikroskopie

Materialien und Geräte	Anwendung
KRB	alle Waschvorgänge
Fixierlösung	Fixierung morphologischer Zellstrukturen Inaktivierung lysosomaler Enzyme Konservierung durch Protein stabilisierung
Triton-X-100-Lösung 0,1%	Permeabilisierung fixierter PBCEC
Phalloidin-FITC-Lösung 3,3 μ M Propidiumiodid-Lösung 1,5 μ M Trockenschrank FUNCTIONline UT 6	F-Aktin-Färbung Zellkernfärbung Inkubation
Eindeckmedium Aqua Poly Mount [®] Eindeckmedium Vecta Shield [®]	Intensivierung der Fluoreszenz
Deckgläser Nagellack, farblos	Versiegelung gefärbter PBCEC
Immersionsöl 3C 247 (Brechungsindex = 1,482) Mikroskop Leitz Dialux 22 HRP060-CMT Adapter Kamera Visicam Visitron-1300 PC, Software Scion Image, Corel Photo-Paint [®]	Fluoreszenzmikroskopie Bildaufnahmen

5.4.4.3 Immunfärbung

Literatur: Bowman et al., 1990
Abbott et al., 1992
Hegmann et al., 1992
Tsuji et al., 1992
Huwylar et al., 1996a
Gutmann et al., 1999a
Török, 1999

Immunfärbungen wurden für die Proteine P-Glycoprotein, Mrp2, GFAP und vWF durchgeführt. Zellkerne wurden mit Propidiumiodid angefärbt.

Die in 8-Well-Objektträgerkammern kultivierten PBCEC wurden 3-mal mit 4°C kalter KRB-Lösung gewaschen und mit 4°C kalter Fixierlösung für 30 min behandelt. Nach 3maligem Waschen wurde mit 0,1% Triton-X-100-Lösung für 10 min bei Raumtemperatur permeabilisiert. Danach wurde erneut 3-mal gewaschen. Mit 1%iger BSA-Blockierlösung wurden bei 37°C für 30 min unspezifische Adsorptionsstellen geblockt. Es folgte eine Inkubation mit Primär-Antikörper-Propidiumiodid-Lösung (Positiv-Kontrolle) bzw. Propidiumiodid-Lösung (Negativ-Kontrolle) unter Lichtausschluss bei 37°C für 60 min. Zum Abbruch der Inkubation wurde 5-mal mit 4°C kalter KRB-

Lösung gewaschen. Danach folgte die Inkubation mit Sekundär-Antikörper-Lösung unter Lichtausschluss bei 37°C für 60 min. Zum Abbruch der Inkubation wurde erneut 5-mal mit 4°C kalter KRB-Lösung gewaschen. Der Objektträgeraufsatz wurde entfernt, die Zellen wurden mit Aqua Poly Mount[®] oder Vecta Shield[®] eingedeckt und mit einem aufgelegten Deckglas und Nagellack versiegelt. Fluoreszenzmikroskopische Bildaufnahmen wurden nach *5.3.2.1 Mikroskopie und Fluoreszenzmikroskopie* gemacht.

Tabelle 5.14 führt die zur Immunfärbung und Fluoreszenzmikroskopie verwendeten Materialien und Geräte einschließlich ihrer Anwendung auf.

Tabelle 5.14: Materialien und Geräte zur Immunfärbung und Fluoreszenzmikroskopie

Materialien und Geräte	Anwendung
Anti-GFAP Ak (monoklonal, Klon G-A-5, Maus IgG1)	Primär-Antikörper gegen GFAP als 1:20 Verdünnung eingesetzt
Anti-Mrp2 Ak (monoklonal, Klon M ₂ III-6, Maus IgG2a)	Primär-Antikörper gegen Mrp2 als 1:20 Verdünnung eingesetzt
Anti-P-gp Ak (monoklonal, Klon C219, Maus IgG2a)	Primär-Antikörper gegen P-gp als 1:20 Verdünnung eingesetzt
Anti-vWF Ak (Kaninchen IgG-Fraktion des Antiserums)	Primär-Antikörper gegen vWF als 1:20 Verdünnung eingesetzt
Anti-Kaninchen-IgG-FITC Ak (aus der Ziege)	Sekundär-Antikörper gegen Kaninchen-IgG als 1:20 Verdünnung eingesetzt
Anti-Maus-IgG-FITC Ak (aus dem Schaf)	Sekundär-Antikörper gegen Maus-IgG als 1:20 Verdünnung eingesetzt
KRB	alle Waschvorgänge
Fixierlösung	Fixierung morphologischer Zellstrukturen Inaktivierung lysosomaler Enzyme Konservierung durch Proteinstabilisierung
Triton-X-100-Lösung 0,1%	Permeabilisierung fixierter PBCEC
BSA-Blockierlösung 1%	Blocken unspezifischer Adsorptionsstellen
Antikörper-Propidiumiodid-Lösung (Positiv-Kontrolle) Propidiumiodid-Lösung 1,5 µM (Negativ-Kontrolle) Trockenschrank FUNCTIONline UT 6	Inkubation Primär-Antikörper Zellkernfärbung
Sekundär-Antikörper-Verdünnung Trockenschrank FUNCTIONline UT 6	Inkubation Sekundär-Antikörper
Eindeckmedium Aqua Poly Mount [®] Eindeckmedium Vecta Shield [®]	Intensivierung der Fluoreszenz
Deckgläser Nagellack, farblos	Versiegelung immungefärbter Zellen
Immersionsöl 3C 247 (Brechungsindex = 1,482) Mikroskop Leitz Dialux 22 HRP060-CMT Adapter Kamera Visicam Visitron-1300 PC, Software Scion Image, Corel Photo-Paint [®]	Fluoreszenzmikroskopie Bildaufnahmen

5.4.4.4 TEER-Bestimmung von PBCEC-Monolayern

Literatur: Biegel und Pachter, 1994
 Millipore, Millicell®-ERS User Guide, 1996
 Török, 1999
 Thöle, 2000

Als Voraussetzung für die Messung des transendothelialen elektrischen Widerstandes (TEER, *transendothelial electrical resistance*) müssen PBCEC auf permeablen Membranenfiltern kultiviert werden. Die Messung des TEER von auf Transwell-Membranfiltereinsätzen kultivierten PBCEC-Monolayern erfolgte mit dem Millicell® -ERS-Gerät und einem STX-2 Elektrodensystem. Das Elektrodensystem bestand aus zwei Elektrodenhaltern, mit jeweils einer Silber-/Silberchlorid-Elektrode zur Messung der Spannung und einer Silberelektrode zur Messung der Stromstärke. Die Elektroden wurden in KRB-Lösung aufbewahrt und vor jeder Messung auf ihre Genauigkeit überprüft. Für TEER-Messungen wurde ein Elektrodenhalter in das Donorkompartiment platziert, der zweite Elektrodenhalter wurde in das Akzeptorkompartiment platziert. Um reproduzierbare Bedingungen zu gewährleisten wurde ein Abstandshalter eingesetzt, um das Elektrodensystem genau fixieren zu können. Damit konnte das Elektrodensystem für jede Messung gleich ausgerichtet werden. Die Bestimmung des TEER erfolgte mit Wechselstrom (rechteckiger Wechselstrom, $\pm 20 \mu\text{A}$ bei 12,5 Hz), so dass auf die Zellen netto keine elektrische Ladung übertragen wurde. Aus den gemessenen Strom- und Spannungswerten ermittelte das Messgerät den Widerstand in Ohm (Ω). Der gemessene Widerstand R_{Filter} wurde nach Gleichung (1) durch Subtraktion des Blindwertes R_{Blind} (Widerstand des beschichteten Filters ohne PBCEC-Monolayer) korrigiert. Der resultierende Wert wurde mit der Filterfläche ($1,13 \text{ cm}^2$) multipliziert, so dass sich der TEER mit der Einheit $\Omega \times \text{cm}^2$ ergab.

$$\text{TEER} = (R_{\text{Filter}} - R_{\text{Blind}}) \times A \quad (1)$$

TEER	Transendothelialer elektrischer Widerstand des PBCEC-Monolayers [$\Omega \times \text{cm}^2$]
R_{Filter}	gemessener Widerstand des PBCEC-Monolayers mit Filter [Ω]
R_{Blind}	gemessener Widerstand des beschichteten Filters ohne PBCEC [Ω]
A	Fläche des Filters [$1,13 \text{ cm}^2$]

5.5 Charakterisierung des *in vitro* Permeationsmodells der Blut-Hirn-Schranke

Zur Charakterisierung des *in vitro* Permeationsmodells der Blut-Hirn-Schranke wurden Permeationsversuche mit Parazellulär-Markern und Modell-Arzneistoffen durchgeführt. Hierbei wurden verschiedene Einflussfaktoren untersucht, die sich auf den resultierenden Permeationskoeffizienten auswirken. Dies waren im Einzelnen die folgenden Einflussfaktoren:

- Beschichtung der Kulturfläche
 - Beschichtungsmaterial
 - Beschichtungsmenge
- Aussaatdichte von PBCEC
- Kulturdauer von PBCEC
- Kulturmedium
- Versuchsdesign
 - Probenapplikation
 - Akzeptorvolumen
 - Schüttelgeschwindigkeit
- Passagieren von PBCEC
- Membranfilter

5.5.1 Durchführung von Permeationsversuchen

Literatur: Eddy et al., 1997
Huwyler et al., 1997
Franke et al., 1999
Török, 1999
Franke et al., 2000
Thöle, 2000

Als Parazellulär-Marker wurden Sucrose (10 μM in KRB, versetzt mit 0,5-1,5 μCi ^3H - oder ^{14}C -Sucrose pro Well) oder Carboxyfluorescein (2,5 μM in KRB) eingesetzt. Die untersuchten Modell-Substanzen waren Cyclosporin A, Diazepam, Morphin und Propranolol sowie die Aminosäure L-Leucin. 10 μM Testlösungen der Substanzen in

KRB wurden mit 0,5-1,5 $\mu\text{Ci/Well}$ des entsprechenden radioaktiven *Tracers* versehen.

Zur Durchführung von Permeationsversuchen wurden die auf Membranfiltern von Transwell Clear[®]-12-Well-Zellkulturplatten kultivierten PBCEC-Monolayer zunächst gewaschen. Hierzu wurde das Kulturmedium zuerst aus dem oberen Donorkompartiment, dann aus dem unteren Akzeptorkompartiment abgesaugt. 37°C warme KRB-Pufferlösung wurde in umgekehrter Reihenfolge zugegeben (zuerst oben 0,5 ml, dann unten 1,5 ml) und die Zellen wurden für 5 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach Absaugen der KRB-Pufferlösung wurden 0,5 ml der auf 37°C vorgewärmten Testlösung in das obere Donorkompartiment pipettiert. Testsubstanzen wurden mindestens als Triplikat ($n = 3$) getestet. Der Permeationsversuch wurde gestartet, indem die Membranfiltereinsätze mit PBCEC-Monolayern in eine mit 1,5 ml KRB pro Well als Akzeptormedium vorbereitete, auf 37°C vorgewärmte 12-Well-Zellkulturplatte umgehängt wurden. Die Zellkulturplatte wurde auf einem Rundschüttler plaziert und kontinuierlich während des Versuchs im Brutschrank bei 37°C mit 100 SpM geschüttelt. Nach 10, 20, 30, 40, 50 und 60 min wurden aus dem Akzeptorkompartiment 100 μl Probe entnommen und durch 37°C warme KRB-Pufferlösung ersetzt. Der Permeationsversuch wurde nach 60 min beendet. Um eine Massenbilanz aufstellen zu können wurde zusätzlich nach 60 min 100 μl Probe aus dem Donorkompartiment entnommen.

Proben aus Permeationsversuchen mit Carboxyfluorescein als Parazellulär-Marker wurden per Fluoreszenzmessung analysiert (5.3.2.2 *Fluoreszenz-Mikrotiterplattenlesegerät Titertek Fluorskan[®] II* bzw. 5.3.2.3 *Fluoreszenz-Plattenlesegerät Fluoroskan Ascent[®]*). Proben aus Permeationsversuchen mit radioaktiven Substanzen wurden nach Zugabe von Szintillatorflüssigkeit geschüttelt (Vortex-Genie[™]) und bei 4°C für 24 h gelagert. Danach wurden die Proben per Flüssigszintillationszählung analysiert (s. 5.3.2.4 *Flüssigszintillationszähler Tricarb 2000 CA*).

5.5.1.1 Einflussfaktor Beschichtung von Kulturflächen

5.5.1.1.1 Beschichtungsmaterial

Die Membranfilter von Transwell Clear[®]-12-Well-Platten wurden mit unterschiedlichen Beschichtungsmaterialien vorbehandelt:

- Collagen S (5 µg/cm²) + Fibronectin (5 µg/cm²)
- Rattenschwanz-Collagen (5 µg/cm²)

Collagen S-Fibronectin-Beschichtung

Die Kulturfläche wurde mit einer wässrigen Collagen S-Lösung (5 µg/cm²) für 4 h im Brutschrank inkubiert. Nach dem Absaugen der Lösung und einer Trocknungszeit von 15 min wurde für weitere 2 h mit in PBS gelöstem Fibronectin (5 µg/cm²) behandelt. Nach erneutem Absaugen wurde das Zellkulturgefäß für 15 min zum Trocknen der Kulturfläche in den Luftstrom der Werkbank gestellt. Unmittelbar im Anschluss erfolgte die Aussaat von PBCEC.

Rattenschwanz-Collagen-Beschichtung

(s. 5.4.3.1 *Beschichtung von Kulturflächen*)

5.5.1.1.2 Beschichtungsmenge

Transwell Clear[®]-12-Well-Platten wurden mit unterschiedlichen Mengen Rattenschwanz-Collagen beschichtet (s. 5.4.3.1 *Beschichtung von Kulturflächen*):

- 5 µg/cm²
- 10 µg/cm²
- 20 µg/cm²

5.5.1.2 Einflussfaktor Aussaatdichte

PBCEC wurden mit 3 unterschiedlichen Dichten auf Transwell Clear[®]-Platten ausgesät (s. 5.4.3.2 *Aussaat von PBCEC*):

- 125.000 Zellen/cm²
- 250.000 Zellen/cm²
- 400.000 Zellen/cm²

5.5.1.3 Einflussfaktor Kulturdauer

PBCEC wurden bis zur Durchführung von Permeationsversuchen 4, 5, 6, 7, 8, 9 und 10 Tage auf Transwell Clear[®]-Platten kultiviert (s. 5.4.3.4 *Kultivierung von PBCEC*).

5.5.1.4 Einflussfaktor Kulturmedium

Der Einfluss von Serum im Kulturmedium wurde getestet. Hierzu wurden Zellen ab Tag 5 in Kultur mit serumfreiem Kulturmedium gefüttert. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit serumhaltigem Kulturmedium (K+) gefüttert wurden. Aus Gründen der Vergleichbarkeit wurde als serumfreies Medium „Kulturmedium, K+“ ohne Serum eingesetzt (s. 5.1.2 *Pufferlösungen, Kulturmedien und sonstige Lösungen*). Vor Versuchsbeginn wurde der TEER von Kontroll- und Testgruppe bestimmt (s. 5.4.4.4 *TEER-Bestimmung von PBCEC-Monolayern*). Permeationsversuche wurden nach 5, 6, 7 und 8 Tagen in Kultur durchgeführt.

5.5.1.5 Einflussfaktor Versuchsdesign

Der Einfluss des Versuchsdesigns auf den apparenten Permeationskoeffizienten wurde anhand der 3 Versuchsparameter Probenapplikation, Akzeptorvolumen und Schüttelgeschwindigkeit untersucht.

5.5.1.5.1 Versuchsparameter Probenapplikation

Es wurde unterschieden zwischen direkter und indirekter Probenapplikation:

Direkte Probenapplikation

Der radioaktivmarkierte *Tracer* wurde zu der bereits auf den Zellen befindlichen Sacrose-Lösung im Donorkompartiment zupipettiert (0,5-1,5 µCi/Well).

Indirekte Probenapplikation

Der radioaktivmarkierte *Tracer* wurde zu der Sucrose-Lösung pipettiert. Diese radioaktive Lösung wurde geschüttelt und anschließend auf die Zellen in das Donorkompartiment gegeben (entsprechend 0,5-1,5 $\mu\text{Ci/Well}$).

5.5.1.5.2 Versuchsparemeter Akzeptorvolumen

Die Auswirkung unterschiedlicher Akzeptorvolumina wurde untersucht. Hierzu wurden Permeationsversuche mit 1 ml und 1,5 ml als Akzeptorvolumen durchgeführt.

5.5.1.5.3 Versuchsparemeter Schüttelgeschwindigkeit

Der Einfluss der Schüttelgeschwindigkeit wurde in Permeationsversuchen untersucht, in denen die Zellkulturplatten bei 100 SpM bzw. 500 SpM geschüttelt wurden.

5.5.1.6 Einflussfaktor Passagieren von PBCEC

Die Auswirkung des Passagierens von PBCEC wurde untersucht. Es wurden Permeationsversuche mit Primärkulturen (keine Passage) und Primärzelllinien (1 Passage) durchgeführt.

Nicht passagierte PBCEC (Primärkultur)

Die Aussaat der Zellen erfolgte direkt nach der Isolierung auf Transwell[®]- oder Transwell Clear[®]-12-Well-Platten). Nach 7 Tagen in Kultur wurden Permeationsversuche durchgeführt.

Passagierte PBCEC (Primärzelllinie)

PBCEC wurden zunächst in Zellkulturflaschen ausgesät. Bei Erreichen von 75-80%iger Konfluenz nach 3 Tagen in Kultur wurden die Zellen passagiert und anschließend auf Transwell[®]- oder Transwell Clear[®]-12-Well-Platten ausgesät. Nach weiteren 4 Tagen in Kultur wurden die PBCEC-Monolayer für Permeationsversuche verwendet (s. 5.4.3.3 *Passagieren von PBCEC*).

5.5.1.7 Einflussfaktor Membranfilter

Der Einfluss des Membranfilters wurde untersucht. Es wurden Polyester membranfilter (Transwell Clear[®]-12-Well-Platte) mit Polycarbonat membranfiltern (Transwell[®]-12-

Well-Platte) hinsichtlich ihres Einflusses auf den apparenten Permeationskoeffizienten P_{app} verglichen.

Die Tabellen 6.1 und 6.2 im Anhang führen die genauen Versuchsbedingungen der Permeationsversuche zur Charakterisierung des Permeationsmodells auf.

Tabelle 5.15 führt die zur Charakterisierung des Permeationsmodells verwendeten Parazellulär-Marker und Modell-Arzneistoffe auf.

Tabelle 5.15: Parazellulär-Marker und Modell-Arzneistoffe zur Charakterisierung des *in vitro* Permeationsmodells

Substanz	Anwendung
5(6)-Carboxyfluorescein	Parazellulär-Marker, fluoreszierend
Sucrose (Saccharose) [6,6'-(n)- ³ H]-Sucrose [U- ¹⁴ C]-Sucrose	Parazellulär-Marker kalte Substanz, ³ H- und ¹⁴ C-markierte Substanz
Cyclosporin A [mebmt-β- ³ H]-Cyclosporin A	Immunsuppressivum, starkes P-gp Substrat kalte Substanz, ³ H-markierte Substanz
Diazepam [2- ¹⁴ C]-Diazepam	Transzellulär-Marker ZNS-wirksamer Tranquilizer (Benzodiazepin) kalte Substanz, ¹⁴ C-markierte Substanz
L-Leucin L-[4,5- ³ H]Leucin	neutrale L-Aminosäure Substrat für den L-Aminosäure-Carrier kalte Substanz, ³ H-markierte Substanz
Morphin-HCl [N-Methyl- ³ H]-Morphin	ZNS-wirksames Opioid-Analgetikum mittelmäßiges P-gp-Substrat kalte Substanz, ³ H-markierte Substanz
Propranolol-HCl DL-[4- ³ H]-Propranolol-HCl	Transzellulär-Marker nichtselektiver β-Rezeptorenblocker, ZNS-gängig kalte Substanz, ³ H-markierte Substanz

Schlecht wasserlösliche Substanzen wurden zunächst in DMSO, Ethanol oder Methanol gelöst. Aus diesen Stammlösungen wurden die Testlösungen in KRB hergestellt. Die Konzentration des organischen Lösungsmittels in der Testlösung war in allen Fällen < 0,5%.

Tabelle 5.16 führt die zur Durchführung von Permeationsversuchen verwendeten Materialien und Geräte einschließlich ihrer Anwendung auf.

Tabelle 5.16: Materialien und Geräte zur Durchführung von Permeationsversuchen

Materialien und Geräte	Anwendung
KRB	Waschen von PBCEC Puffer für Permeationsversuche
Bovines Serum Albumin, Fraktion V	Pufferzusatz als Test auf Albumin-Einfluss
Rundschüttler Titramax 101 Brutschrank Memmert Tv 10B Trockenschrank FUNCTIONline UT 6	Schütteln von Zellkulturplatten Inkubation während des Permeationsversuches
Fluoreszenz-Mikrotiterplattenleser Fluoroskan [®] II Fluoreszenz-Plattenleser Fluoroskan Ascent [®]	Analytik von Carboxyfluorescein
Szintillationsvials, 5 ml Ultima Gold MV LS-Cocktail Flüssigszintillationszähler Tricarb 2000 CA	Analytik radioaktiver Substanzen

5.5.2 Berechnung des apparenten Permeationskoeffizienten P_{app}

Literatur: Eddy et al., 1997
Franke et al., 1999
Török, 1999
Franke et al., 2000
Thöle, 2000

Die Berechnung des apparenten Permeationskoeffizienten P_{app} einer im Permeationsversuch untersuchten Substanz erfolgte aus der Permeationsrate. Hierzu mussten die während des Versuchs aus dem Akzeptorkompartiment entnommenen Proben zuerst quantitativ bestimmt werden. Zur quantitativen Bestimmung von Carboxyfluorescein-Proben wurde eine Eichgerade erstellt, indem Referenzlösungen verschiedener Carboxyfluorescein-Konzentrationen per Fluoreszenzmessung analysiert wurden. Zur quantitativen Bestimmung radioaktiv-markierter Proben wurde eine Referenzlösung bekannter Radioaktivität verwendet, die per Flüssigszintillationszählung analysiert wurde.

Zunächst mussten die quantitativ bestimmten Probenkonzentrationen ab der zweiten Probenentnahme wegen der Verdünnung des Akzeptorvolumens durch das mit frischem Puffer ergänzte Probevolumen nach Gleichung (2) korrigiert werden:

$$c_{n, \text{korr}} = \frac{c_n \times V_{\text{Akzeptor}} + \sum_{i=1}^{n-1} (c_i \times V_{\text{Probe}})}{V_{\text{Akzeptor}}} \quad (\text{für } n > 1) \quad (2)$$

$c_{n, \text{korr}}$	korrigierte Konzentration bei Probenentnahme n [dpm/ml], [$\mu\text{mol/ml}$]
c_n	Konzentration bei Probenentnahme n [dpm/ml], [$\mu\text{mol/ml}$]
V_{Akzeptor}	Akzeptorvolumen [ml]
V_{Probe}	Probenvolumen [ml]
$c_i \times V_{\text{Probe}}$	durch die Probenentnahme aus dem Akzeptor entfernte Substanzmenge [dpm], [μmol]

Aus den korrigierten Konzentrationen $c_{n, \text{korr}}$ wurden durch Multiplikation mit dem Akzeptorvolumen V_{Akzeptor} die permeierten Substanzmengen M_n für die jeweiligen Probenentnahmen nach Gleichung (3) berechnet. Die Ausgangsmenge M_0 wurde analog ermittelt (4).

$$M_n = c_{n, \text{korr}} \times V_{\text{Akzeptor}} \quad (\text{für } n > 1) \quad (3)$$

$$M_0 = c_0 \times V_{\text{Donor}} \quad (\text{für } n > 1) \quad (4)$$

M_n	permeierte Menge bei Probenentnahme n [dpm], [μmol]
$c_{n, \text{korr}}$	korrigierte Konzentration bei Probenentnahme n [dpm/ml], [$\mu\text{mol/ml}$]
M_0	Ausgangsmenge im Donor bei Versuchsbeginn [dpm], [μmol]
c_0	Ausgangskonzentration im Donor bei Versuchsbeginn [dpm/ml], [$\mu\text{mol/ml}$]
V_{Akzeptor}	Akzeptorvolumen [ml]

Der Anteil an Testsubstanz, der vom Versuchsbeginn bis zur jeweiligen Probenentnahme vom Donor in den Akzeptor permeiert ist, wurde nach Gleichung (5) ermittelt:

$$A_n = \frac{M_n}{M_0} \times 100 \quad (\text{für } n > 1) \quad (5)$$

A_n permeierter Anteil bei Probenentnahme n [%]

M_n permeierte Menge bei Probenentnahme n [dpm], [μmol]

M_0 Ausgangsmenge im Donor bei Versuchsbeginn [dpm], [μmol]

Die aus dem 1. Fick'schen Gesetz abgeleitete allgemeine Gleichung zur Berechnung des Permeationskoeffizienten lautet für Sink-Bedingungen nach (6):

$$P = \frac{c_{\text{Akzeptor}} \times V_{\text{Akzeptor}}}{t} \times \frac{1}{A} \times \frac{1}{c_{\text{Donor}}} \quad (6)$$

P Permeationskoeffizient [cm/s]

c_{Akzeptor} Konzentration im Akzeptor [mg/ml]

V_{Akzeptor} Akzeptorvolumen [ml]

t Zeit [s]

A Diffusionsfläche [cm^2]

c_{Donor} Konzentration im Donor bei Versuchsbeginn [mg/ml]

Der permeierte Anteil A_n wurden gegen die Zeit aufgetragen, die Steigung der Geraden wurde als Permeationsrate ermittelt. Um den apparenten Permeationskoeffizienten P_{app} berechnen zu können, wurde Gleichung (6) in Gleichung (7) umgewandelt.

$$P_{app} = \frac{dA}{dt} \times \frac{V_{Akzeptor}}{A} \times \frac{1}{c_0} \times \frac{1}{x} \quad (\text{für } n > 1) \quad (7)$$

P_{app} apparenter Permeationskoeffizient [cm/s]

$\frac{dA}{dt}$ Permeationsrate (Steigung im Permeations-Zeit-Diagramm) [%/s]

$V_{Akzeptor}$ Akzeptorvolumen [ml]

A Fläche des Filters [cm²]

c_0 Ausgangskonzentration im Donor bei Versuchsbeginn [100%]

x Volumenkorrekturfaktor (Verhältnis Akzeptorvolumen : Donorvolumen)

5.5.3 Bestimmung des Verteilungskoeffizienten $P_{Oktanol/Puffer}$

Literatur: Oldendorf, 1974a
Rim et al., 1986
Huwyler et al., 1996a
Rubas und Cromwell, 1997

Zur Bestimmung des Oktanol-Puffer-Verteilungskoeffizienten $P_{Oktanol/Puffer}$ wurde KRB (pH 7,4) als wässrige Phase verwendet, n-Oktanol wurde als Ölphase verwendet. Zuerst wurden beide Phasen jeweils mit der anderen gesättigt. Hierzu wurden 10 ml KRB und 10 ml n-Oktanol in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen pipettiert. Nachdem 5 min bei maximaler Geschwindigkeit geschüttelt wurde (Vortex-Genie™), blieb das Zweiphasen-Gemisch für 24 Stunden bei Raumtemperatur stehen. Danach wurden Öl- und Pufferphase durch Abpipettieren der oberen Ölphase getrennt.

Pro Ansatz wurden 500 µl Pufferphase, 500 µl Ölphase und 0,5 µCi *Tracer* in ein Reaktionsgefäß pipettiert. Es wurden 3 Ansätze einer Substanz pro Bestimmung

gemacht. Die Reaktionsgefäße wurden 3 min bei maximaler Geschwindigkeit geschüttelt (Vortex-Genie™). Dann wurden die Reaktionsgefäße in einem Schüttler (Thermomixer Eppendorf 5436) plziert und bei Raumtemperatur mit 1400 SpM geschüttelt. Nach 2 Stunden folgte zwecks Phasentrennung eine Zentrifugation (1 min, 13.000 UpM, Tischzentrifuge Eppendorf 5415D). Anschließend wurden die Reaktionsgefäße für 24 h bei Raumtemperatur stehengelassen. Pro Ansatz wurden aus beiden Phasen jeweils 3 Proben je 100 µl entnommen und in Szintillationsvials pipetiert. Die Proben wurden nach Zugabe von Szintillatorcocktail geschüttelt (Vortex-Genie™) und bei 4°C für 24 h gelagert. Danach wurden die Proben per Flüssigszintillationszählung analysiert (s. 5.3.2.4 *Flüssigszintillationszähler Tricarb 2000 CA*). Der Verteilungskoeffizient wurde nach Gleichung (8) berechnet.

$$P_{\text{Oktan ol/Puffer}} = \frac{\text{dpm}_{\text{Oktan ol}}}{\text{dpm}_{\text{Puffer}}} \quad (8)$$

$P_{\text{Oktan ol/Puffer}}$	Oktan ol-Puffer Verteilungskoeffizient
$\text{dpm}_{\text{Oktan ol}}$	gemessene Zerfälle der Oktan olphase
$\text{dpm}_{\text{Puffer}}$	gemessene Zerfälle der Pufferphase

Pro Bestimmung des Oktan ol-Puffer-Verteilungskoeffizienten einer Substanz wurden 3 Ansätze gemacht. Pro Ansatz wurden aus beiden Phasen jeweils 3 Proben entnommen. Daraus ergaben sich 3 Verteilungskoeffizienten, die zu einem Verteilungskoeffizienten pro Ansatz gemittelt wurden. Die 3 Verteilungskoeffizienten aus 3 Ansätzen wurden wiederum zu einem Verteilungskoeffizienten pro Bestimmung gemittelt. Die Bestimmung des Verteilungskoeffizienten wurde noch 2mal wiederholt. Der Oktan ol-Puffer-Verteilungskoeffizient einer Substanz wurde aus den 3 Verteilungskoeffizienten der 3 Bestimmungen gemittelt, die Probenanzahl lag somit bei $n = 27$. Der Oktan ol-Puffer-Verteilungskoeffizient wurde als $\log P_{\text{Oktan ol/Puffer}}$ angegeben.

Tabelle 5.17 führt die zur Bestimmung des Verteilungskoeffizienten verwendeten Materialien und Geräte einschließlich ihrer Anwendung auf.

Tabelle 5.17: Materialien und Geräte zur Bestimmung des Verteilungskoeffizienten

Materialien und Geräte	Anwendung
KRB n-Oktanol	Pufferphase Ölphase
[2- ¹⁴ C]-Diazepam [<i>mebmt</i> -β- ³ H]-Cyclosporin A [N-Methyl- ³ H]-Morphin [U- ¹⁴ C]-Sucrose DL-[4- ³ H]-Propranolol-HCl	radioaktivmarkierte Substanzen zur Bestimmung von Verteilungskoeffizienten
Vortex-Genie™ Thermomixer Eppendorf 5436 Tischzentrifuge Eppendorf 5415D	Durchmischen der Phasen Trennung der Phasen
Szintillationsvials, 5 ml Ultima Gold MV LS-Cocktail Flüssigszintillationszähler Tricarb 2000 CA	Analytik radioaktiver Proben

5.6 Calcein-AM-Assay

5.6.1 Calcein-AM-MDR-Assay

Die in 96-Well-Zellkulturplatten 7 Tage lang kultivierten PBCEC wurden mit 37°C warmer KRB-Lösung gewaschen und anschließend für 15 min mit vorgewärmten Lösungen der Testsubstanzen bei 37°C vorinkubiert. Danach wurde für weitere 30 min mit 1 µM Calcein-AM-Inkubationslösung unter Lichtausschluß bei 37°C inkubiert. Zum Abbruch der Inkubation wurde 3-mal mit 4°C kalter KRB-Lösung gewaschen und lichtmikroskopisch kontrolliert. Die Zellen wurden mit 1%iger Triton-X-100-Lösung lysiert. Danach wurde die Fluoreszenz in einem Fluoreszenzplattenlesegerät gemessen (s. 5.3.2.2 *Fluoreszenz-Mikrotiterplattenlesegerät Titertek Fluorskan® II* und 5.3.2.3 *Fluoreszenz-Plattenlesegerät Fluoroskan Ascent®*).

Zur Bestimmung des Einflusses der Proteine Mrp1 und Mrp2 auf den Calcein-AM-MDR-Assay wurde bei der 15-minütigen Vorinkubation von Testsubstanzen zusätzlich mit dem Mrp1-spezifischen Inhibitor MK571 bzw. dem Mrp2-spezifischen Inhibitor LTC4 inkubiert. MK571 wurde 2,5 µM und LTC4 wurde 0,5 µM eingesetzt.

Für den Nachweis der ATP-Abhängigkeit von P-Glycoprotein wurden Endothelzellen ab Tag 4 in Kultur bis zur Durchführung des Calcein-AM-MDR-Assays mit glucosefreiem Nährmedium und 10 mM 2-Desoxy-D-Glucose kultiviert.

Als Kontrolle dienten Zellen, die nicht mit Testsubstanz, sondern nur mit Calcein-AM inkubiert wurden. Als Blindwert dienten unbehandelte Zellen. Testsubstanzen wurden pro Konzentration 6fach, Kontrolle und Blindwert jeweils 12fach bestimmt. Für jede getestete Substanz wurden mindestens 2 weitere Wiederholungsversuche durchgeführt.

5.6.2 Berechnung des konzentrationsabhängigen Effekts einer im Calcein-AM-MDR-Assay untersuchten Testsubstanz

Zur Berechnung des konzentrationsabhängigen Effekts $E(c)$ einer im Calcein-AM-MDR-Assay untersuchten Testsubstanz wurden zunächst der Blindwert, der Kontrollwert und der Substanzwert ermittelt. Hierzu wurden die Mittelwerte der entsprechenden Einzelfluoreszenzen gebildet (Gleichungen 9, 10 und 11).

$$F_{\text{Blind}} = \frac{1}{n} \times \sum_{i=1}^n F_{\text{Blind } i} \quad (n = 12) \quad (9)$$

$$F_{\text{Kontrolle}} = \frac{1}{n} \times \sum_{i=1}^n F_{\text{Kontrolle } i} \quad (n = 12) \quad (10)$$

$$F_{\text{Substanz}(c)} = \frac{1}{n} \times \sum_{i=1}^n F_{\text{Substanz}(c) i} \quad (n = 6) \quad (11)$$

F_{Blind}	Blindwert (unbehandelte Zellen)
$F_{\text{Kontrolle}}$	Kontrollwert (Zellen mit 1 μM Calcein-AM inkubiert)
$F_{\text{Substanz}(c)}$	Substanzwert (Zellen mit Testsubstanz der Konzentration c und mit 1 μM Calcein-AM inkubiert)

Der Blindwert F_{Blind} wurde vom Kontrollwert $F_{\text{Kontrolle}}$ und dem Substanzwert $F_{\text{Substanz}(c)}$ abgezogen, um auf die Eigenfluoreszenz zu korrigieren. Daraus ergaben sich der korrigierte Kontrollwert $F_{\text{Kontrolle,korr}}$ und der korrigierte Substanzwert $F_{\text{Substanz,korr}(c)}$ (Gleichungen 12 und 13).

$$F_{\text{Kontrolle,korr}} = F_{\text{Kontrolle}} - F_{\text{Blind}} \quad (12)$$

$$F_{\text{Substanz,korr}(c)} = F_{\text{Substanz}(c)} - F_{\text{Blind}} \quad (13)$$

$F_{\text{Kontrolle,korr}}$ korrigierter Kontrollwert (Zellen mit 1 μM Calcein-AM inkubiert)

$F_{\text{Substanz,korr}(c)}$ korrigierter Substanzwert (Zellen mit Testsubstanz der Konzentration c und mit 1 μM Calcein-AM inkubiert)

Der konzentrationsabhängige Effekt $E(c)$ wurde aus dem korrigierten Kontrollwert $F_{\text{Kontrolle,korr}}$ und dem korrigierten Substanzwert $F_{\text{Substanz,korr}(c)}$ für jede eingesetzte Konzentration der Testsubstanz nach Gleichung (14) ermittelt.

$$E(c) = \frac{F_{\text{Substanz,korr}(c)}}{F_{\text{Kontrolle,korr}}} \times 100 \quad (14)$$

$E(c)$ konzentrationsabhängiger Effekt der Testsubstanz mit der Konzentration c [%]

Nach (15) resultierte als Bezugswert für die Kontrolle ein Effekt $E_{\text{Kontrolle}}$ von 100%.

$$E_{\text{Kontrolle}} = \frac{F_{\text{Kontrolle,korr}}}{F_{\text{Kontrolle,korr}}} \times 100 \quad (15)$$

$E_{\text{Kontrolle}}$ Effekt der Kontrolle (als Bezugswert 100%)

5.6.3 Berechnung der EC_{50} einer im Calcein-AM-MDR-Assay untersuchten Testsubstanz nach dem E_{max} -Modell

Literatur: Gabrielsson und Weiner, 1997

Die Berechnung der Konzentration für halbmaximalen Effekt EC_{50} einer im Calcein-AM-MDR-Assay untersuchten Testsubstanz erfolgte nach dem E_{max} -Modell. Zunächst wurden die nach 5.6.2 *Berechnung des konzentrationsabhängigen Effektes einer im Calcein-AM-MDR-Assay untersuchten Testsubstanz* ermittelten Effekte $E(c)$

gegen die Konzentrationen aufgetragen. Aus dem Effekt-Konzentrationsprofil wurde mit dem Programm Microcal Origin[®] 5.0 eine E_{\max} -Kurve nach Gleichung (16) berechnet:

$$E(c) = E_{\text{Kontrolle}} + \frac{E_{\max} \times c}{EC_{50} + c} \quad (16)$$

$E(c)$	konzentrationsabhängiger Effekt der Testsubstanz mit der Konzentration c [%]
$E_{\text{Kontrolle}}$	Effekt der Kontrolle (als Bezugswert 100%)
E_{\max}	maximaler Effekt der Testsubstanz [%]
EC_{50}	Konzentration der Testsubstanz für halbmaximalen Effekt [μM]
c	Konzentration der Testsubstanz [μM]

Die Konzentration für halbmaximalen Effekt EC_{50} der untersuchten Testsubstanz wurden der berechneten Kurve entnommen.

5.6.4 Calcein-AM-Kinetik-Assay

Der Calcein-AM-Kinetik-Assay wurde zur Bestimmung der Inhibitionskonstante K_i der Testsubstanzen Nicardipin, PSC-833, Ritonavir, Taxol und Vinblastin durchgeführt. Die in 96-Well-Zellkulturplatten 7 Tage lang kultivierten PBCEC wurden mit 37°C warmer KRB-Lösung gewaschen und anschließend für 15 min mit vorgewärmten Lösungen der Testsubstanzen bei 37°C vorinkubiert. Danach wurde für weitere 60 min mit 1, 2, bzw. 3 μM Calcein-AM-Inkubationslösung unter Lichtausschluß bei 37°C inkubiert. Gleichzeitig, beginnend mit der Calcein-AM-Inkubation, wurde alle 30 s die Fluoreszenz in einem Fluoreszenzplattenlesegerät gemessen (s. 5.3.2.3 *Fluoreszenz-Plattenlesegerät Fluoroskan Ascent[®]*).

Als Kontrolle dienten Zellen, die nicht mit Testsubstanz, sondern nur mit Calcein-AM inkubiert wurden. Als Blindwert dienten unbehandelte Zellen. Die Auto-Hydrolyse von Calcein-AM wurde in leeren Wells (Wells ohne Zellen, nur mit 1, 2 und 3 μM Calcein-AM) bestimmt.

Pro Konzentration Testsubstanz und pro Calcein-AM Konzentration wurde eine 4fach Bestimmung durchgeführt. Kontrolle und Calcein-AM Auto-Hydrolyse wurden pro Calcein-AM Konzentration ebenfalls 4fach bestimmt. Der Blindwert wurde 12fach bestimmt. Für jede getestete Substanz wurde ein Wiederholungsversuch durchgeführt.

5.6.5 Michaelis-Menten-Kinetik, Lineweaver-Burk-Diagramm und Berechnung der Inhibitionskonstante K_i einer im Calcein-AM-Kinetik-Assay untersuchten Testsubstanz

Die im Folgenden aufgeführte Methode zur Darstellung der Kinetiken nach Michaelis-Menten und Lineweaver-Burk sowie zur Berechnung der Inhibitionskonstante K_i einer im Calcein-AM-Kinetik-Assay untersuchten Testsubstanz war für die eingesetzten Calcein-AM-Konzentrationen von 1, 2 und 3 μM sowie die Konzentrationen der Testsubstanz gleich und soll hier verallgemeinert erklärt werden.

Aus den Messwerten wurden zunächst der Blindwert, der Hydrolysewert, der Kontrollwert und der konzentrationsabhängige Substanzwert für jeden Zeitpunkt ermittelt. Hierzu wurden die Mittelwerte der entsprechenden Einzelfluoreszenzen nach (17), (18), (19) und (20) gebildet.

$$F_{\text{Blind}}(t) = \frac{1}{n} \times \sum_{i=1}^n F_{\text{Blind}}(t)_i \quad (n = 12) \quad (17)$$

$$F_{\text{Hydrolyse}}(t) = \frac{1}{n} \times \sum_{i=1}^n F_{\text{Hydrolyse}}(t)_i \quad (n = 4) \quad (18)$$

$$F_{\text{Kontrolle}}(t) = \frac{1}{n} \times \sum_{i=1}^n F_{\text{Kontrolle}}(t)_i \quad (n = 4) \quad (19)$$

$$F_{\text{Substanz}}(t) = \frac{1}{n} \times \sum_{i=1}^n F_{\text{Substanz}}(t)_i \quad (n = 4) \quad (20)$$

$F_{\text{Blind}}(t)$ Blindwert zum Zeitpunkt t (unbehandelte Zellen)

$F_{\text{Hydrolyse}}(t)$ Hydrolysewert zum Zeitpunkt t (Auto-Hydrolyse von Calcein-AM)

$F_{\text{Kontrolle}}(t)$ Kontrollwert zum Zeitpunkt t (Zellen mit Calcein-AM)

$F_{\text{Substanz}}(t)$ Substanzwert zum Zeitpunkt t (Zellen mit Testsubstanz und Calcein-AM)

Für jeden Zeitpunkt wurden pro Calcein-AM-Konzentration der Blindwert $F_{\text{Blind}}(t)$ und der Hydrolysewert $F_{\text{Hydrolyse}}(t)$ von den Fluoreszenzwerten für die Kontrolle $F_{\text{Kontrolle}}(t)$ und die Testsubstanz $F_{\text{Substanz}}(t)$ abgezogen, um auf die Eigenfluoreszenz zu korrigieren. Daraus ergaben sich nach (21) und (22) der korrigierte Kontrollwert $F_{\text{Kontrolle,korr}}(t)$ und der korrigierte Substanzwert $F_{\text{Substanz,korr}}(t)$.

$$F_{\text{Kontrolle,korr}}(t) = F_{\text{Kontrolle}}(t) - F_{\text{Hydrolyse}}(t) - F_{\text{Blind}}(t) \quad (21)$$

$$F_{\text{Substanz,korr}}(t) = F_{\text{Substanz}}(t) - F_{\text{Hydrolyse}}(t) - F_{\text{Blind}}(t) \quad (22)$$

$F_{\text{Kontrolle,korr}}(t)$ korrigierter Kontrollwert zum Zeitpunkt t (Zellen mit Calcein-AM)

$F_{\text{Substanz,korr}}(t)$ korrigierter Substanzwert zum Zeitpunkt t (Zellen mit Testsubstanz und Calcein-AM)

Die für einen Zeitpunkt pro Calcein-AM-Konzentration gemessenen Fluoreszenzen der Testsubstanz PSC-833 waren bei allen eingesetzten Konzentrationen (0,1/0,5/1/2 und 5 μM PSC-833) gleich. Eine vollständige Hemmung von P-gp durch PSC-833 konnte somit bereits ab einer Konzentration von 0,1 μM angenommen werden. Deshalb wurden die für einen Zeitpunkt pro Calcein-AM-Konzentration gemessenen und korrigierten Fluoreszenzen aller eingesetzten PSC-833 Konzentrationen nach (23) zu einem Mittelwert zusammengefasst.

$$F_{\text{PSC,korr}}(t) = \frac{1}{n} \times \sum_{i=1}^n F_{\text{PSC,korr}}(t)_i \quad (n = 20) \quad (23)$$

$F_{\text{PSC,korr}}(t)$ korrigierter Fluoreszenzwert von 0,1/0,5/1/2 und 5 μM PSC-833 zum Zeitpunkt t

Um die Fluoreszenzen ohne Testsubstanz (Kontrolle) und mit Testsubstanz zu berechnen, wurden die Differenzen zwischen den $F_{\text{PSC,korr}}(t)$ -Werten und den Kontrollwerten $F_{\text{Kontrolle,korr}}(t)$ sowie den $F_{\text{PSC,korr}}(t)$ -Werten und den konzentrationsabhängigen Substanzwerten $F_{\text{Substanz,korr}}(t)$ für jeden Zeitpunkt und eingesetzte Calcein-AM Konzentration nach (24) und (25) gebildet. Daraus resultierte $\Delta F_{\text{Kontrolle}}(t)$ bzw. $\Delta F_{\text{Substanz}}(t)$.

$$\Delta F_{\text{Kontrolle}}(t) = F_{\text{PSC, korr}}(t) - F_{\text{Kontrolle, korr}}(t) \quad (24)$$

$$\Delta F_{\text{Substanz}}(t) = F_{\text{PSC, korr}}(t) - F_{\text{Substanz, korr}}(t) \quad (25)$$

$\Delta F_{\text{Kontrolle}}(t)$ Fluoreszenz ohne Testsubstanz zum Zeitpunkt t

$\Delta F_{\text{Substanz}}(t)$ Fluoreszenz mit Testsubstanz zum Zeitpunkt t

Mit den errechneten Werten $\Delta F_{\text{Kontrolle}}(t)$ und $\Delta F_{\text{Substanz}}(t)$ wurden Fluoreszenz-Zeit-Diagramme für 1, 2 und 3 μM Calcein-AM erstellt. Aus den linearen Kurvenabschnitten (Bereich 5-30 min) wurden die Geradensteigungen für jede Konzentration der Testsubstanz ermittelt und als Reaktionsgeschwindigkeit gegen die eingesetzten Calcein-AM-Konzentrationen von 1, 2 und 3 μM aufgetragen. Mit dem Programm Microcal Origin[®] 5.0 wurde für jede Konzentration der untersuchten Testsubstanz die Michaelis-Menten-Kinetik errechnet.

Zur Darstellung des Lineweaver-Burk-Diagramms wurde das Reziprok der Reaktionsgeschwindigkeit gegen das Reziprok der Calcein-AM-Konzentration aufgetragen. Mittels Regressionsgleichung wurden die Michaelis-Konstante K_M (X-Achsenabschnitt) und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit v_{max} (Y-Achsenabschnitt) bestimmt.

Die Berechnung der Inhibitionskonstante K_i einer im Calcein-AM-Kinetik-Assay untersuchten Testsubstanz erfolgte für kompetitive Inhibition aus der Michaelis-Konstante K_M nach Gleichung (26) und für non-kompetitive Inhibition aus der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit v_{max} nach Gleichung (27).

$$K_i = \frac{K_M \times T}{K'_M - K_M} \quad (26)$$

$$K_i = \frac{v'_{\text{max}} \times T}{v_{\text{max}} - v'_{\text{max}}} \quad (27)$$

K_i	Inhibitionskonstante der Testsubstanz [μM]
K_M	Michaelis-Konstante ohne Testsubstanz [μM]
K'_M	Michaelis-Konstante mit Testsubstanz [μM]
T	Konzentration der Testsubstanz [μM]
v'_{max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit mit Testsubstanz [1/min]
v_{max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit ohne Testsubstanz [1/min]

Tabelle 5.18 gibt einen Überblick über die im Calcein-AM-MDR-Assay und Calcein-AM-Kinetik-Assay(*) untersuchten Testsubstanzen.

Tabelle 5.18: Im Calcein-AM-MDR-Assay und Calcein-AM-Kinetik-Assay(*) untersuchte Testsubstanzen

Substanz	Hersteller
D- α -Tocopheryl-Polyethylenglycol-Succinat (TPGS)	Eastman, Kingsport, USA
Adrenalin-HCl	Sigma, Taufkirchen, D
Ascorbinsäure	Roth, Karlsruhe, D
Benzylpenicillin-Na	Sigma, Taufkirchen, D
Chinidin-HCl	Sigma, Taufkirchen, D
Chlorpromazin-HCl	Sigma, Taufkirchen, D
Cholesterin	Sigma, Taufkirchen, D
Clonidin-HCl	Sigma, Taufkirchen, D
Clotrimazol	Sigma, Taufkirchen, D
Clozapin	Sigma, Taufkirchen, D
Codein	Sigma, Taufkirchen, D
Coffein	Sigma, Taufkirchen, D
Colchicin	Sigma, Taufkirchen, D
Cortisol	Sigma, Taufkirchen, D
Cortison	Sigma, Taufkirchen, D
Cyclosporin A	Novartis, Basel, CH
Devapamil-HCl	Knoll, Ludwigshafen, D
Dexamethason	Sigma, Taufkirchen, D
Dexverapamil-HCl	Knoll, Ludwigshafen, D
D-Glucose	Merck, Darmstadt, D
Diazepam	Roche, Basel, CH
Digoxin	Sigma, Taufkirchen, D
Doxorubicin-HCl	Sigma, Taufkirchen, D
Erythromycin	Sigma, Taufkirchen, D
Gallopamil-HCl	Knoll, Ludwigshafen, D
Ivermectin	Sigma, Taufkirchen, D
Levemopamil-HCl	Knoll, Ludwigshafen, D
Loperamid-HCl	Sigma, Taufkirchen, D
Morphin-HCl	Roche, Basel, CH
Nicardipin-HCl (*)	Sigma, Taufkirchen, D
Noscapin-HCl	Sigma, Taufkirchen, D
Papaverin-HCl	Sigma, Taufkirchen, D
PRI-053	Roche, Basel, CH
Progesteron	Sigma, Taufkirchen, D
Promazin-HCl	Sigma, Taufkirchen, D
Propranolol-HCl	Sigma, Taufkirchen, D
PSC-833 (*)	Novartis, Basel, CH
Quercetin	Dr. Willmar Schwabe, Karlsruhe, D
RAD	Novartis, Basel, CH
Rifampicin	Fluka, Buchs, CH
Ritonavir (*)	Abbott, Wiesbaden, D
Saquinavir	Roche, Basel, CH
Taxol (*)	Sigma, Taufkirchen, D
Verapamil-HCl	Sigma, Taufkirchen, D
Vinblastin-Sulfat (*)	Sigma, Taufkirchen, D
Yohimbin-HCl	Sigma, Taufkirchen, D

Schlecht wasserlösliche Substanzen wurden zunächst in DMSO, Ethanol oder Methanol gelöst. Aus diesen Stammlösungen wurden die Testlösungen in KRB hergestellt. Die Konzentration des organischen Lösungsmittels in der Testlösung war in allen Fällen < 0,5%.

Tabelle 5.19 führt die zur Durchführung des Calcein-AM-MDR-Assays und Calcein-AM-Kinetik-Assays verwendeten Materialien und Geräte einschließlich ihrer Anwendung auf.

Tabell 5.19: Materialien und Geräte zur Durchführung des Calcein-AM-MDR-Assays und Calcein-AM-Kinetik-Assays

Materialien und Geräte	Anwendung
Testsubstanzen	s. Tabelle 5.18
KRB	alle Waschvorgänge Herstellung von Testlösungen
Calcein-Stammlösung 1 mM Calcein-Lösung 1/2/3 μ M	P-gp Marker zur Bestimmung von P-gp-Interaktionen
Triton-X-100-Lösung 1%	Lyse von PBCEC Freisetzung von Calcein
Trockenschrank FUNCTIONline UT 6	Inkubation bei 37°C
Fluoreszenz-Mikrotiterplattenlesegerät Fluoroskan [®] II Fluoreszenz-Plattenlesegerät Fluoroskan Ascent [®]	Analytik von Calcein

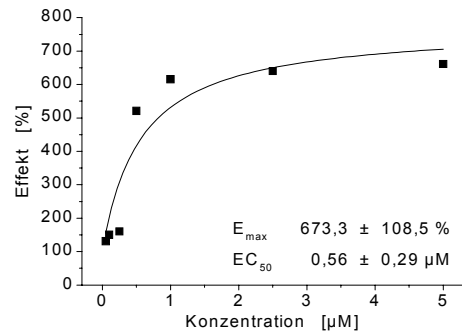
5.7 Fehlerbetrachtung, Statistik

Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Alle linearen Regressionen wurden mit dem Programm Microcal Origin[®] 5.0 (Microcal Software, Northampton, USA) berechnet. Statistische Berechnungen wurden nach Werner, Medizinische Statistik [Werner, 1984] oder unter Verwendung des Programms Microcal Origin[®] 5.0 durchgeführt. Als Voraussetzung zur Durchführung der statistischen Tests wurde eine Normalverteilung der Daten angenommen. Nach vorangegangenen F-Test (Zwei-Stichproben-Test für Streuungsparameter nach Fisher) wurde bei Gleichheit der Varianzen ein einseitiger t-Test durchgeführt (Zwei-Stichproben-t-Test für unverbundene Stichproben nach Student). Bei Ungleichheit der Varianzen folgte eine Varianzanalyse.

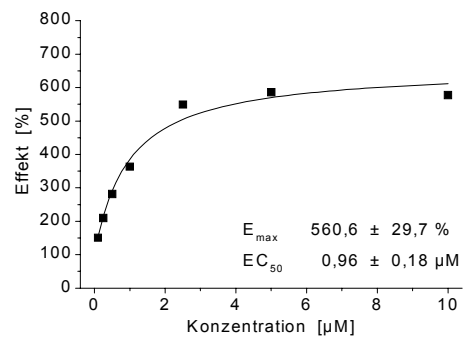
6 Anhang

6.1 Starke P-gp-Modulatoren

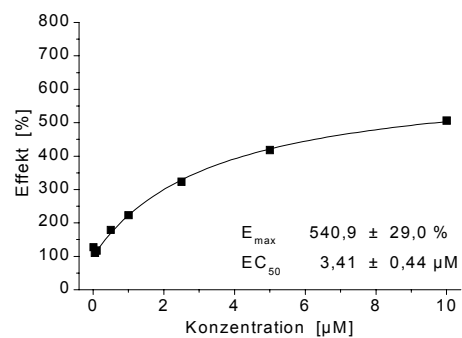
Cyclosporin A		
Konzentration [μM]	Effekt [%]	S.D.
0,05	131,3	46,8
0,1	150,3	25,6
0,25	160,6	25,8
0,5	521,0	131,3
1	615,9	108,4
2,5	640,2	98,2
5	661,1	103,7



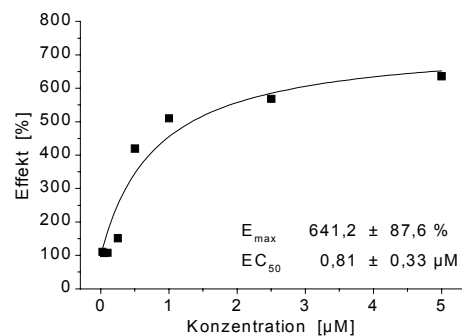
Ivermectin		
Konzentration [μM]	Effekt [%]	S.D.
0,1	150,8	24,9
0,25	210,0	31,3
0,5	281,7	28,8
1	363,9	38,9
2,5	549,6	59,1
5	586,2	61,3



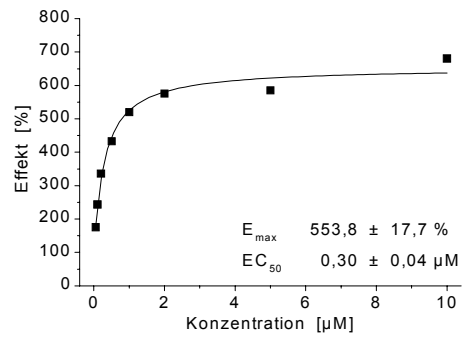
Nicardipin		
Konzentration [μM]	Effekt [%]	S.D.
0,01	127,4	22,4
0,05	110,0	17,2
0,1	117,2	16,0
0,5	179,2	28,6
1	223,3	21,5
2,5	323,3	37,4
5	418,4	51,6
10	506,5	54,1



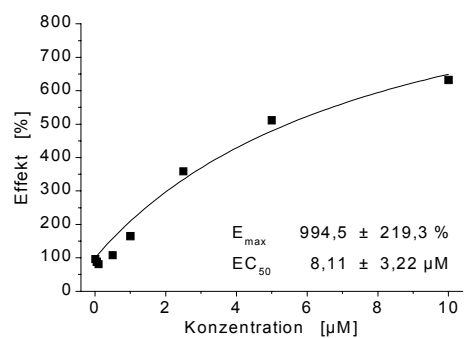
PSC-833		
Konzentration [μM]	Effekt [%]	S.D.
0,025	110,9	20,7
0,05	107,2	25,9
0,1	108,0	24,4
0,25	151,7	33,9
0,5	419,9	80,1
1	510,3	91,2
2,5	568,5	118,4
5	636,3	112,8



RAD		
Konzentration [μM]	Effekt [%]	S.D.
0,05	175,8	23,0
0,1	243,8	36,2
0,2	336,4	39,1
0,5	433,2	46,3
1	520,0	69,8
2	575,8	64,3
5	585,3	64,1
10	680,3	67,1

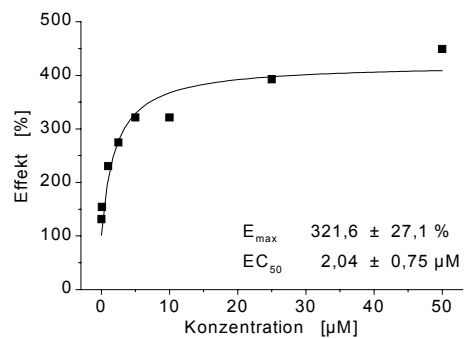


Ritonavir		
Konzentration [μM]	Effekt [%]	S.D.
0,01	96,3	18,5
0,05	87,8	18,1
0,1	80,7	17,9
0,5	107,8	21,3
1	164,7	28,6
2,5	358,5	54,6
5	511,3	85,9
10	632,1	108,8

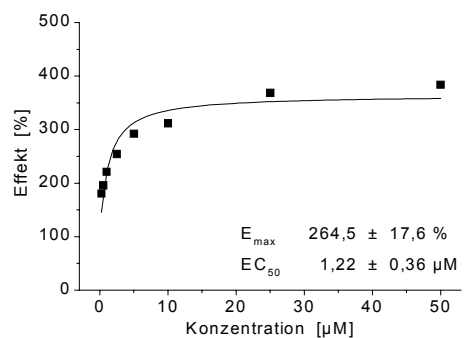


6.2 Mäßige P-gp-Modulatoren

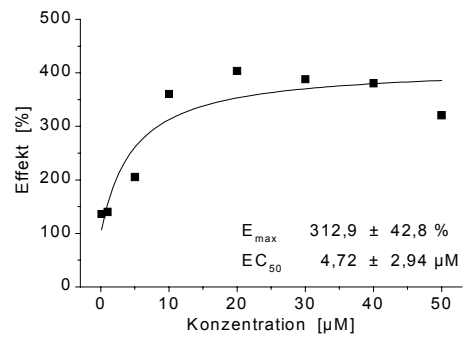
Chinidin		
Konzentration [μM]	Effekt [%]	S.D.
0,01	131,5	20,3
0,1	154,3	29,0
1	230,6	30,0
2,5	274,7	39,7
5	321,5	46,0
10	321,4	46,4
25	392,7	55,4
50	449,4	49,4



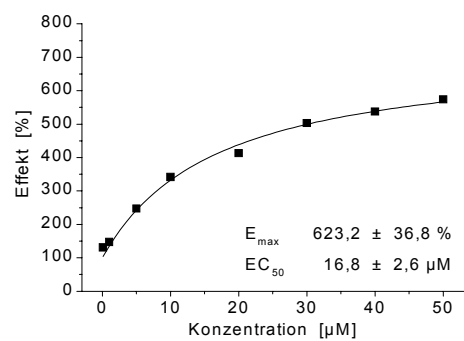
Loperamid		
Konzentration [μM]	Effekt [%]	S.D.
0,25	180,5	28,5
0,5	195,5	39,5
1	221,2	36,3
2,5	254,3	46,1
5	292,4	46,6
10	311,8	50,1
25	368,9	57,9
50	384,1	59,6



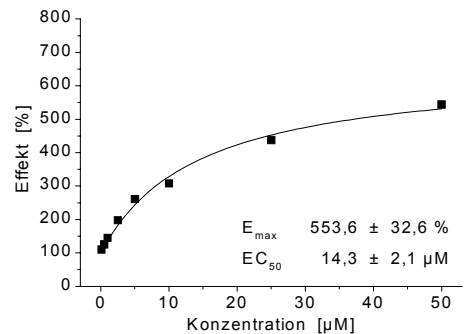
Morphin		
Konzentration [μM]	Effekt [%]	S.D.
0,1	136,4	23,0
1	140,1	22,7
5	205,4	33,2
10	360,7	55,8
20	403,7	62,5
30	388,4	54,8
40	380,7	62,6
50	320,8	53,2



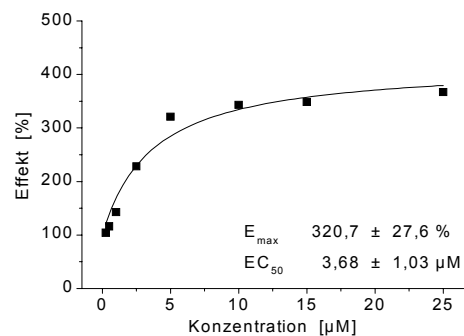
Noscapin		
Konzentration [μM]	Effekt [%]	S.D.
0,1	131,2	24,6
1	147,8	11,4
5	247,7	21,6
10	342,0	34,1
20	413,4	30,7
30	503,3	35,7
40	538,0	39,0
50	574,4	62,1



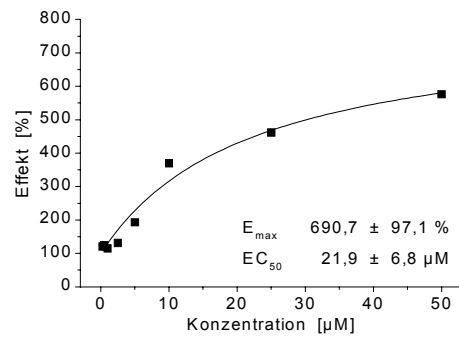
Papaverin		
Konzentration [μM]	Effekt [%]	S.D.
0,1	110,3	15,2
0,5	126,0	21,9
1	145,2	19,1
2,5	197,9	36,0
5	261,2	37,5
10	308,1	38,1
25	437,6	75,3
50	544,0	77,6



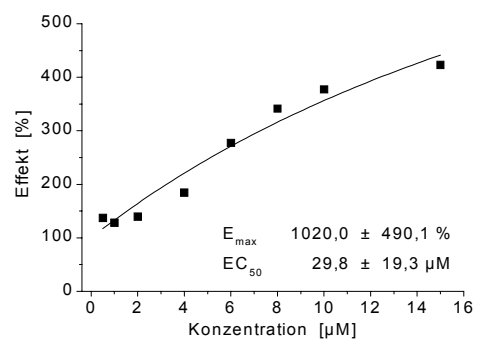
PRI-053		
Konzentration [μM]	Effekt [%]	S.D.
0,25	104,3	10,9
0,5	116,3	18,4
1	143,0	14,0
2,5	228,6	25,9
5	321,3	35,5
10	343,3	37,0
15	348,6	41,3
25	367,4	36,8



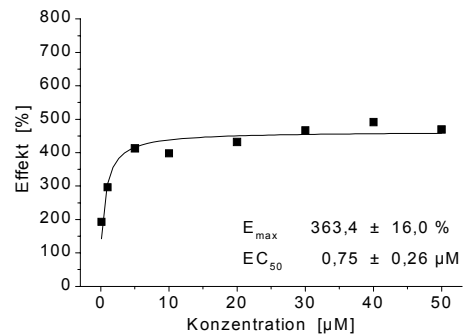
Saquinavir		
Konzentration [μM]	Effekt [%]	S.D.
0,25	121,0	13,4
0,5	125,0	40,6
1	115,4	20,4
2,5	131,3	15,9
5	193,4	23,0
10	370,1	47,2
25	461,6	60,1
50	576,5	78,0



Taxol		
Konzentration [μM]	Effekt [%]	S.D.
0,5	137,2	22,2
1	128,3	12,1
2	139,6	14,0
4	184,5	15,4
6	277,5	32,2
8	341,7	29,9
10	377,6	52,6
15	423,4	46,0

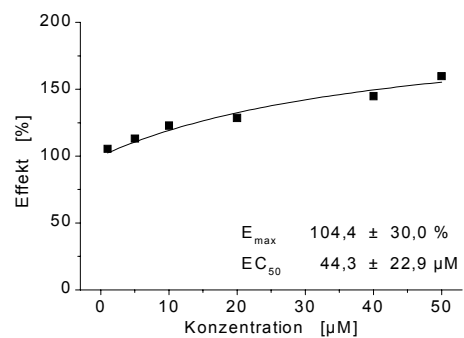


Verapamil		
Konzentration [μM]	Effekt [%]	S.D.
0,1	193,3	17,7
1	296,6	17,1
5	413,0	49,8
10	398,4	28,2
20	431,9	26,6
30	466,8	23,1
40	491,8	63,3
50	469,6	23,1

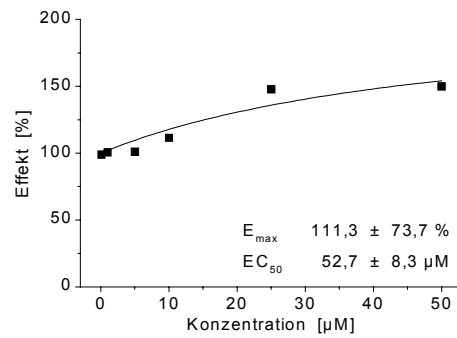


6.3 Schwache P-gp-Modulatoren

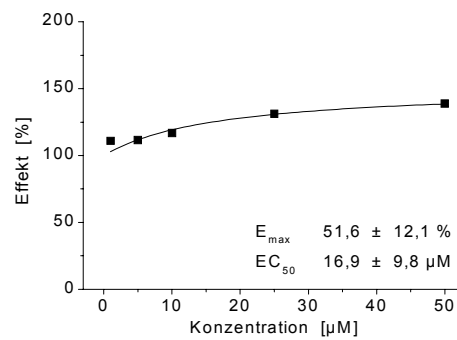
Codein		
Konzentration [μM]	Effekt [%]	S.D.
1	105,5	16,1
5	113,1	16,6
10	122,9	15,9
20	128,6	23,9
40	144,9	21,7
50	159,8	22,6



Digoxin		
Konzentration [μM]	Effekt [%]	S.D.
0,1	98,9	9,8
1	100,6	17,7
5	101,1	15,5
10	111,5	12,5
25	147,8	17,6
50	149,9	18,9

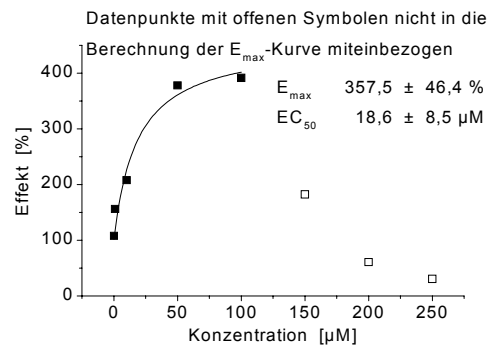


Yohimbin		
Konzentration [μM]	Effekt [%]	S.D.
0,1	98,9	9,8
1	100,6	17,7
5	101,1	15,5
10	111,5	12,5
25	147,8	17,6
50	149,9	18,9

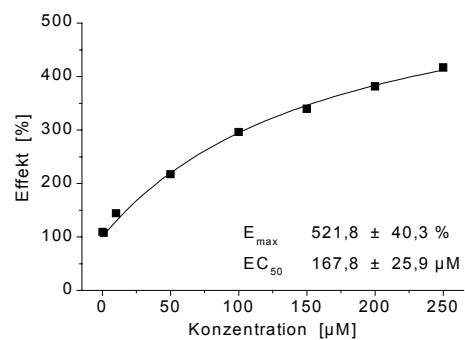


6.4 Borderline-Modulatoren

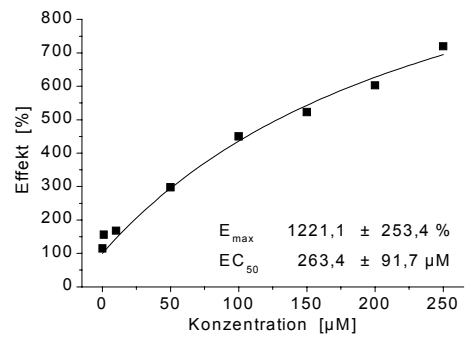
Chlorpromazin		
Konzentration [μM]	Effekt [%]	S.D.
0,1	108,8	15,4
1	156,3	20,6
10	207,9	36,5
50	377,9	56,0
100	391,6	50,4
150	182,3	33,0
200	60,9	10,2
250	31,0	5,0



Clozapin		
Konzentration [μM]	Effekt [%]	S.D.
0,1	109,7	18,0
1	108,0	13,4
10	144,5	17,7
50	217,5	21,8
100	296,5	29,2
150	340,0	33,4
200	381,9	44,8
250	417,2	41,2

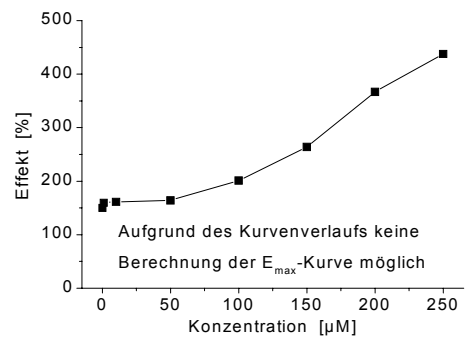


Promazin		
Konzentration [μM]	Effekt [%]	S.D.
0,1	115,1	14,8
1	156,6	73,8
10	168,3	31,1
50	298,1	19,1
100	450,0	31,2
150	523,0	48,9
200	602,9	63,0
250	719,6	79,6

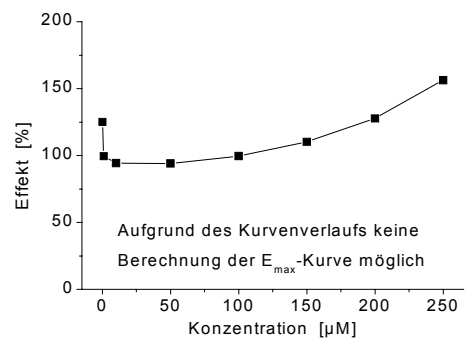


6.5 MDR-Inducer

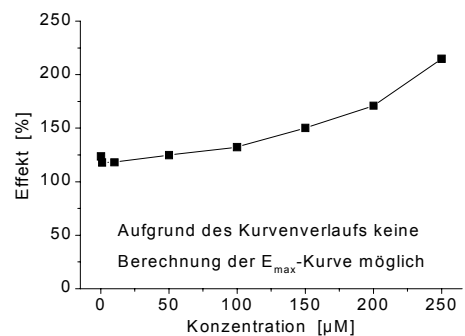
Clotrimazol		
Konzentration [μM]	Effekt [%]	S.D.
0,1	150,2	33,8
1	159,8	42,6
10	161,4	44,6
50	164,2	38,5
100	201,3	46,0
150	264,0	63,4
200	367,1	85,8
250	438,0	103,9



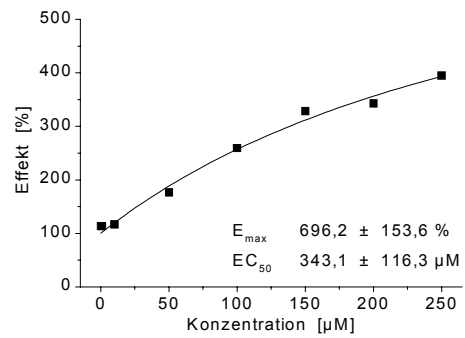
Colchicin		
Konzentration [μM]	Effekt [%]	S.D.
0,1	125,2	22,3
1	99,6	12,9
10	94,4	9,4
50	94,2	8,5
100	99,7	13,9
150	110,3	13,1
200	127,8	16,7
250	156,4	18,2



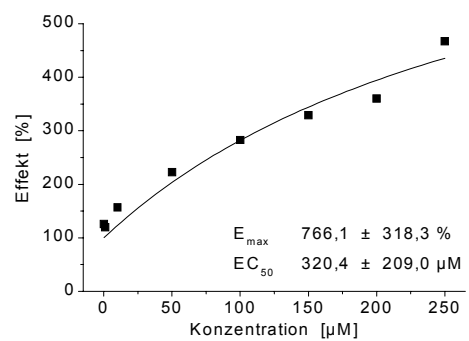
Doxorubicin		
Konzentration [μM]	Effekt [%]	S.D.
0,1	123,6	28,2
1	118,0	34,2
10	118,2	21,4
50	124,8	26,5
100	132,4	27,9
150	150,2	28,3
200	171,0	33,0
250	214,9	35,9



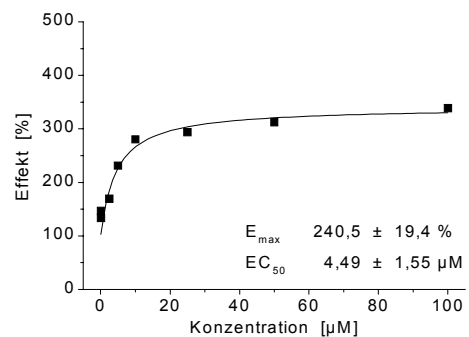
Erythromycin		
Konzentration [μM]	Effekt [%]	S.D.
0,1	113,7	10,5
1	113,6	31,2
10	116,8	17,5
50	176,9	21,8
100	259,7	32,1
150	328,6	24,8
200	343,1	35,4
250	395,2	38,0



Rifampicin		
Konzentration [μM]	Effekt [%]	S.D.
0,1	126,0	15,2
1	119,9	11,9
10	156,9	18,3
50	222,8	29,5
100	283,0	31,8
150	329,3	47,4
200	360,6	38,0
250	467,5	40,9



Vinblastin		
Konzentration [μM]	Effekt [%]	S.D.
0,05	146,7	42,2
0,1	133,5	23,5
2,5	169,5	31,5
5	231,4	39,2
10	280,6	58,7
25	294,0	43,6
50	312,5	54,0
100	338,9	57,9



6.6 Non-Modulatoren

Adrenalin		
Konzentration [μM]	Effekt [%]	S.D.
0,1	101,4	8,6
1	96,8	8,5
10	95,9	12,8
50	93,4	7,3
100	99,2	9,2
150	101,1	6,0
200	99,4	8,4
250	103,9	7,2

Ascorbinsäure		
Konzentration [μM]	Effekt [%]	S.D.
0,1	117,5	19,3
1	96,7	5,7
10	101,6	7,8
50	103,6	7,6
100	102,4	8,1
150	111,5	12,4
200	113,2	9,2
250	114,9	12,0

Benzympenicillin		
Konzentration [μM]	Effekt [%]	S.D.
0,1	111,6	15,1
1	105,9	16,0
10	93,9	11,2
50	105,8	11,8
100	105,2	13,3
150	116,7	11,2
200	115,6	10,6
250	114,1	12,8

Clonidin		
Konzentration [μM]	Effekt [%]	S.D.
0,1	115,3	14,8
1	100,3	11,9
10	113,6	8,4
50	109,7	21,1
100	106,7	14,5
150	109,5	12,0
200	118,1	8,6
250	116,2	2,6

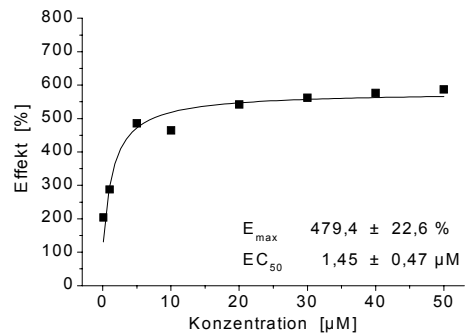
Coffein		
Konzentration [μM]	Effekt [%]	S.D.
0,1	97,6	16,5
1	92,3	16,7
10	94,5	15,7
50	102,0	20,3
100	103,4	24,3
150	98,5	19,1
200	101,1	21,3
250	109,1	20,5

Diazepam		
Konzentration [μM]	Effekt [%]	S.D.
0,1	115,1	10,8
1	118,2	14,1
10	123,1	14,8
50	108,3	12,7
100	88,9	10,2
150	94,8	9,7
200	84,2	11,2
250	102,3	9,4

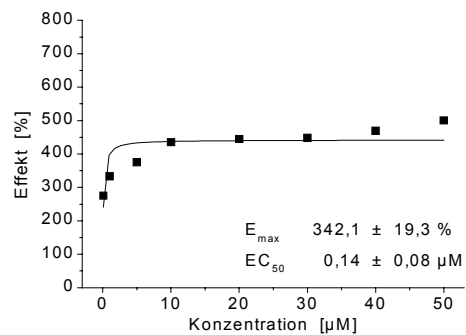
Sucrose		
Konzentration [μM]	Effekt [%]	S.D.
0,1	85,0	12,8
1	134,8	16,9
10	81,9	10,2
50	75,1	10,2
100	74,7	10,3
250	63,0	8,1

6.7 Calciumkanalblocker vom Phenylalkylamin-Typ

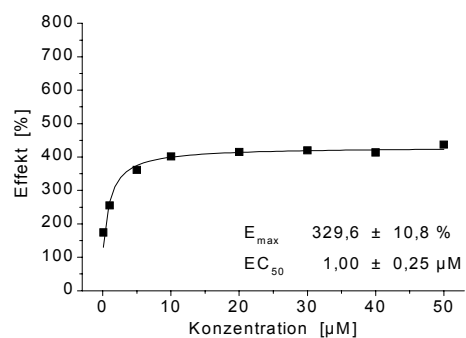
Devapamil		
Konzentration [μM]	Effekt [%]	S.D.
0,1	204,4	28,6
1	287,9	17,5
5	485,6	35,4
10	464,8	30,4
20	542,0	37,4
30	562,8	42,5
40	576,7	44,0
50	587,5	50,5



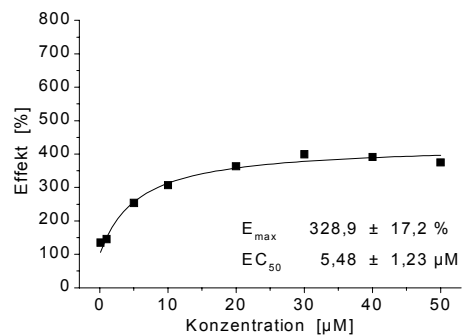
Dexverapamil		
Konzentration [μM]	Effekt [%]	S.D.
0,1	275,4	31,2
1	333,4	24,7
5	375,3	59,1
10	435,6	66,5
20	444,9	51,6
30	448,2	46,4
40	469,4	55,1
50	500,4	29,5



Gallopamil		
Konzentration [μM]	Effekt [%]	S.D.
0,1	174,8	30,3
1	255,3	14,1
5	361,9	16,9
10	402,1	42,9
20	415,3	40,3
30	420,1	18,9
40	414,2	43,0
50	437,2	35,3



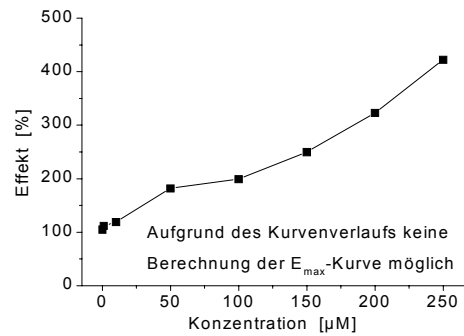
Levemopamil		
Konzentration [μM]	Effekt [%]	S.D.
0,1	135,5	10,8
1	146,0	15,7
5	254,1	20,2
10	307,1	31,7
20	363,5	18,8
30	399,7	17,0
40	391,4	25,3
50	375,1	27,6



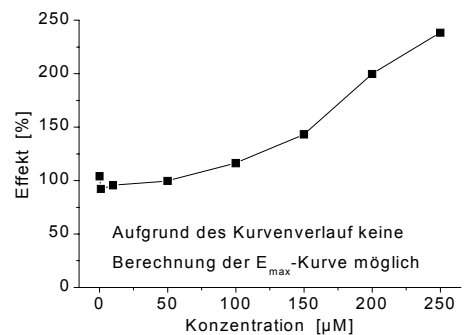
Verapamil s. 6.2 mäßige Modulatoren

6.8 Steroidhormone

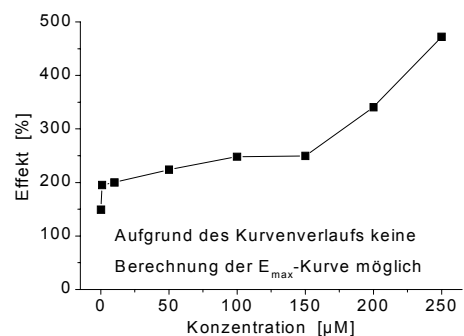
Cortisol		
Konzentration [μM]	Effekt [%]	S.D.
0,1	105,0	18,9
1	111,9	15,7
10	119,0	22,2
50	181,9	27,2
100	199,1	30,3
150	249,7	34,1
200	323,0	45,1
250	422,5	56,7



Cortison		
Konzentration [μM]	Effekt [%]	S.D.
0,1	104,1	16,4
1	92,2	13,8
10	95,6	20,0
50	99,7	16,0
100	116,4	15,6
150	143,2	17,8
200	199,8	37,2
250	238,3	31,5



Dexamethason		
Konzentration [μM]	Effekt [%]	S.D.
0,1	149,2	29,4
1	195,2	44,5
10	200,0	38,7
50	223,8	54,8
100	248,3	56,3
150	249,8	36,5
200	340,7	68,3
250	472,3	73,4



Progesteron		
Konzentration [μM]	Effekt [%]	S.D.
0,1	118,6	11,1
1	133,6	10,5
10	226,6	19,0
50	345,5	28,9
100	517,9	40,0
150	582,7	46,2
200	621,4	56,9
250	701,6	48,4

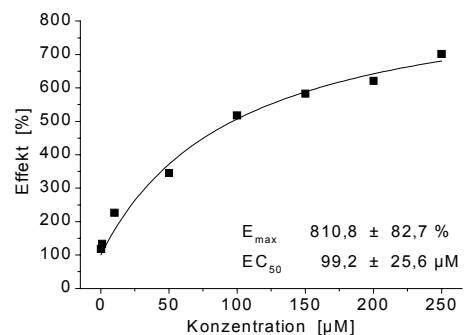


Tabelle 6.1: Versuchsbedingungen zur Untersuchung von Einflussfaktoren auf die Permeation von Parazellulär-Markern

Einflussfaktor	Versuchsbedingungen*										
	Beschichtungsmaterial	Menge [µg/cm ²]	Aussaaddichte [Zellen/cm ²]	Kulturdauer [Tage]	Kulturmedium	Probenapplikation	Akzeptorvolumen [ml]	Schütteln [SpM]	Zellen	Kulturplatte	Marker
Beschichtungsmaterial	RS-Coll Coll S + Fibro	20 20 + 4	150.000	7	K+	indirekt	1	500	unpass	TWC	³ H-S
Beschichtungsmenge	RS-Coll	5 10 20	150.000	7	K+	indirekt	1	500	unpass	TWC	¹⁴ C-S
Aussaaddichte	RS-Coll	5	125.000 250.000 400.000	7	K+	indirekt	1	500	unpass	TWC	¹⁴ C-S
Kulturdauer	RS-Coll	5	250.000	4-10	K+	indirekt	1	500	unpass	TWC	CF
Kulturmedium	RS-Coll	5	250.000	5-10	K+ K-	indirekt	1	500	unpass	TWC	¹⁴ C-S
Probenapplikation	RS-Coll	5	250.000	7	K+	direkt indirekt	1 1,5	100 500	unpass	TWC	¹⁴ C-S
Akzeptorvolumen	RS-Coll	5	250.000	7	K+	indirekt	1 1,5	100 500	unpass	TWC	¹⁴ C-S
Schüttelgeschwindigkeit	RS-Coll	5	250.000	7	K+	indirekt	1 1,5	100 500	unpass	TWC	¹⁴ C-S
Vorbehandlung der Zellen	RS-Coll	5	250.000	7	K+	indirekt	1 1,5	100	pass unpass	TWC	¹⁴ C-S
Zellkulturplatte	RS-Coll	5	250.000	7	K+	indirekt	1,5	100	pass	TW TWC	¹⁴ C-S

* Versuchsdauer 60 min, Proben nach 10, 20, 30, 40, 50 und 60 min entnommen

RS-Coll Rattenschwanz-Collagen

Coll S Collagen S

Fibro Fibronectin

K+ Kulturmedium

K- Kulturmedium, serumfrei

unpass nicht passagiert

pass passagiert

TWC Transwell Clear®

TW Transwell®

³H-S ³H-Sucrose¹⁴C-S ¹⁴C-Sucrose

CF Carboxyfluorescein

Tabelle 6.2: Versuchsbedingungen zur Untersuchung von Einflussfaktoren auf die Permeation von Modellsubstanzen

		Versuchsbedingungen*									
Simulation	Beschichtungsmaterial	Menge [µg/cm ²]	Aussaatdichte [Zellen/cm ²]	Zellen	Kulturdauer [Tage]	Kulturmedium	Probenapplikation	Akzeptorvolumen [ml]	Schütteln [SpM]	Kulturplatte	Marker
1	RS-Coll	20	150.000	unpass	7	K+	indirekt	1	500	TWC	¹⁴ C-S
2	RS-Coll	20	150.000	unpass	7	K-	indirekt	1	500	TWC	¹⁴ C-S
3	RS-Coll	5	250.000	unpass	7	K+	indirekt	1	500	TWC	¹⁴ C-S
4	RS-Coll	5	250.000	pass	7	K+	indirekt	1,5	100	TWC	¹⁴ C-S
5 mit 4% Albumin	RS-Coll	20	150.000	unpass	7	K+	indirekt	1	500	TWC	¹⁴ C-S

* Versuchsdauer 60 min, Proben nach 10, 20, 30, 40, 50 und 60 min entnommen

RS-Coll Rattenschwanz-Collagen K+ Kulturmedium K- Kulturmedium, serumfrei pass passagiert unpass nicht passagiert TWC Transwell Clear® ¹⁴C-S ¹⁴C-Sucrose

Tabelle 6.3: Zellkulturgefäße

Zellkulturgefäß	Kulturfläche/Well [cm ²]	Arbeitsvolumen/Well [ml]	Volumen/Fläche [ml/cm ²]	Beschichtungsmenge [µg/cm ²]	Beschichtungsvolumen [ml]	Collagen-Lösung [µg/ml]	Aussaatdichte [Zellen/cm ²]	Kulturvolumen Aussaatvolumen [ml]
Objektträgerkammer 8-Well	0,8	0,2-0,4	0,25-0,5	5	0,2	20	250.000	0,4
Zellkulturflasche 75 cm ²	75	5-15	0,07-0,2	5	5	75	250.000	10
Zellkulturplatte 96-Well	0,32	0,1-0,2	0,31-0,62	5	0,1	16	250.000	0,2
Transwell® -12-Well-Platte* Transwell Clear®-12-Well-Platte*	1,13	0,5	0,44	5	0,1	50**	250.000	0,5

* Angaben für Membranfilter
** mit 1 cm² als Kulturfläche

[Lit.: Corning® Costar®, Katalog 1999; Nalge Nunc Informationsblatt]

7 Literaturverzeichnis

A

Abbott, N.J., (1992): *Comparative physiology of the blood-brain barrier.* In: Handbook of Experimental Pharmacology 103, 371-396

Abbott, N.J.; Hughes, C.C.W.; Revest, P.A.; Greenwood, J., (1992): *Development and characterisation of a rat brain capillary endothelial culture: towards an in vitro blood-brain barrier.* In: Journal of Cell Science 103, 23-37

Abbott, N.J.; Romero, I.A., (1996): *Transporting therapeutics across the blood-brain barrier.* In: Molecular Medicine Today (3), 106-113

Abken, H.; Jungfer, H.; Albert, W.H.W.; Willecke, K., (1986): *Immortalization of human lymphocytes by fusion with cytoplasts of transformed mouse L cells.* In: The Journal of Cell Biology 103, 795-805

Adachi, Y.; Suzuki, H.; Sugiyama, Y., (2001): *Comparative studies on in vitro methods for evaluating in vivo function of MDR1 P-glycoprotein.* In: Pharmaceutical Research 18(12), 2001

Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Watson, J.D., (1990): *Molekularbiologie der Zelle, 2. Auflage.* VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim

Ambudkar, S.V.; Dey, S.; Hrycyna, C.A.; Ramachandra, M.; Pastan, I.; Gottesman, M.M., (1999): *Biochemical, cellular and pharmacological aspects of the multidrug transporter.* In: Annual Review of Pharmacology and Toxicology 39, 361-398

Ambudkar, S.V.; Lelong, I.H.; Zhang, J.; Cardarelli, C.O.; Gottesman, M.M.; Pastan, I., (1992): *Partial purification and reconstitution of the human multidrug-resistance pump: Characterization of the drug-stimulatable ATP hydrolysis.* In: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 89, 8472-8476

Aoki, J.; Umeda, M.; Takio, K.; Titani, K.; Utsumi, H.; Sasaki, M.; Inoue, K., (1991): *Neural cell adhesion molecule mediates contact-dependent inhibition of growth of near-diploid mouse fibroblast cell line m5S/1M.* In: The Journal of Cell Biology 115(6), 1751-1761

Arboix, M.; Gonzalez Paz, O.; Colombo, T.; D'Incalci, M., (1997): *Multidrug resistance-reversing agents increase vinblastine distribution in normal tissues expressing the P-glycoprotein but do not enhance drug penetration in brain and testis.* In: The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 281(3), 1226-1230

Arnold, J., (1887): *Ueber Theilungsvorgänge an den Wanderzellen, ihre progressiven und regressiven Metamorphosen.* In: Archiv für mikroskopische Anatomie 30, 205-310

Audus, K.L.; Bartel, R.L.; Hidalgo, I.J.; Borchardt, R.T., (1990): *The use of cultured epithelial and endothelial cells for drug transport and metabolism studies.* In: *Pharmaceutical Research* 7(5), 435-451

Audus, K.L.; Borchardt, R.T., (1986b): *Characteristics of the large neutral amino acid transport system of bovine brain microvessel endothelial cell monolayers.* In: *Journal of Neurochemistry* 47, 484-488

Audus, K.L.; Borchardt, R.T., (1987): *Bovine brain microvessel endothelial cell monolayers as a model system for the blood-brain barrier.* In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 507, 9-18

Audus, K.L.; Borchardt, R.T., (1986a): *Charaterization of an in vitro blood-brain barrier model system for studying drug transport and metabolism.* In: *Pharmaceutical Research* 3(2), 81-87

Audus, K.L.; Chikhale, P.J.; Miller, D.W.; Thompson, S.E.; Borchardt, R.T., (1992): *Brain uptake of drugs: The influence of chemical and biological factors.* In: *Advances in Drug Research* 23, 1-64

Audus, K.L.; Ng, L.; Wang, W.; Borchardt, R.T., (1996): *Brain microvessel endothelial cell culture systems.* In: *Pharmaceutical Biotechnology* 8, 239-258

B

Baggetto, L.G., (1998): *The multidrug resistance phenotype: P-glycoprotein, regulation of the mdr genes and other related mechanisms.* In: *Cell Growth and Oncogenesis*, Birkhäuser Verlag, Basel, 279-307

Barnes, D.; Sato, G., (1980a): *Methods for growth of cultured cells in serum-free medium.* In: *Analytical Biochemistry* 102, 255-270

Barnes, D.; Sato, G., (1980b): *Serum-free cell culture: a unifying approach.* In: *Cell* 22, 649-655

Barrand, M.A.; Heppell-Parton, A.C.; Wright, K.A.; Rabbitts, P.H.; Twentyman, P.R., (1994): *A 190-kilodalton protein overexpressed in non-P-glycoprotein-containing multidrug-resistant cells and its relationship to the MRP gene.* In: *Journal of the National Cancer Institute* 86(2), 110-117

Bartmann, A.; Bauer, B., (2000): *2. Blut-Hirn-Schranke-Expertentreffen, Oberflockenbach*

Batrakova, E.V.; Li, S.; Miller, D.W.; Kabanov, A.V., (1999): *Pluronic P85 increases permeability of a broad spectrum of drugs in polarized BBMEC and Caco-2 cell monolayers.* In: *Pharmaceutical Research* 16(9), 1366-1372

- Bauer, B.; Droulle, L.; Grohoski, N.; Fricker, S.; Fricker, G.; Miller, D.S., (2001a):** *Isolated fish brain capillaries: a comparative model to study blood-brain barrier function and its regulation.* MDIBL/NIEHS Center Symposium „Intracellular Sensors of environmental chemicals“, Mount Desert Island Biological Laboratory, Maine, USA
- Bauer, B.; Fricker, G., (2000):** *Standardization of an in vitro transport model of the blood-brain barrier.* In: Archiv der Pharmazie, Pharmaceutical and Medicinal Chemistry 333, Suppl. 2, 61
- Bauer, B.; Fricker, G.; Miller, D.S., (2002):** *Regulation of xenobiotic transport in killifish brain capillaries.* In: The Bulletin 41, Mount Desert Island Biological Laboratory, Maine, USA
- Bauer, B.; Miller, D.S.; Fricker, G., (2001c):** *Transport of paclitaxel in isolated functionally intact brain microvessels and cultured brain capillary endothelial cells.* In: Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology 363, Suppl. R8
- Bauer, B.; Yong, J.; Fricker, G., (2001d):** *Application of an in vitro blood-brain barrier model as a compound profiling system for drug interactions with P-glycoprotein.* In: Archiv der Pharmazie, Pharmaceutical and Medicinal Chemistry 333, Suppl. 2, 61
- Bauer, B.; Yong, J.; Miller, D.S.; Cornelius, M.; Fricker, G., (2001b):** *Compound profiling in a MDR-model of the blood-brain barrier.* IVth International Conference „Cerebral Vascular Biology“, Cambridge
- Beaulieu, E.; Demeule, M.; Pouliot, J.-F.; Averill-Bates, D.A.; Murphy, G.F.; Beliveau, R., (1995):** *P-glycoprotein of blood brain barrier: cross-reactivity of MA b C219 with a 190 kDa protein in bovine and rat isolated brain capillaries.* In: Biochimica et Biophysica Acta 1233, 27-32
- Becker, H.; Quadbeck, G., (1952):** *Tierexperimentelle Untersuchungen über die Funktionsweise der Blut-Hirnschranke.* In: Zeitschrift für Naturforschung 7b(9/10), 493-497
- Begley, D.J., (1996):** *The blood-brain barrier: principles for targeting peptides and drugs to the central nervous system.* In: Journal of Pharmacy and Pharmacology 48, 136-146
- Begley, D.J.; Squires, L.K.; Zlokovic, B.V.; Mitrovic, D.M.; Hughes, C.C.W.; Revest, P.A.; Greenwood, J., (1990):** *Permeability of the blood-brain barrier to the immunosuppressive cyclic peptide cyclosporin A.* In: Journal of Neurochemistry 55, 1222-1230
- Behnsen, G., (1926):** *Über die Farbstoffspeicherung im Zentralnervensystem der weissen Maus in verschiedenen Alterszuständen.* In: Zeitschrift für Zellforschung 4, 515-572
- Bénistant, C.; Dehouck, M.-P.; Fruchart, J.-C.; Cecchelli, R.; Lagarde, M., (1995):** *Fatty acid composition of brain capillary endothelial cells: effect of the coculture with astrocytes.* In: Journal of Lipid Research 36, 2311-2319

Bergmann, R.; Brust, P.; Johannsen, B., (1998): *Differentiation between specific and nonspecific effects related to P-glycoprotein inhibition in immortalized rat brain endothelial cells.* In: International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics 36(1), 46-49

Betz, A.L., (1985): *Identification of hypoxanthine transport and xanthine oxidase activity in brain capillaries.* In: Journal of Neurochemistry 44, 574-579

Betz, A.L.; Goldstein, G.W., (1978): *Polarity of the blood-brain barrier: neutral amino acid transport into isolated brain capillaries.* In: Science 202, 225-227

Beuckmann, C.; Hellwig, S.; Galla, H.-J., (1995): *Induction of the blood/brain-barrier-associated enzyme alkaline phosphatase in endothelial cells from cerebral capillaries in mediated via cAMP.* In: European Journal of Biochemistry 229, 641-644

Biedl, A.; Kraus, R., (1898): *Über eine bisher unbekannte toxische Wirkung der Galensäuren auf das Centralnervensystem.* In: Centralblatt für innere Medizin 47, 1185-1200

Biedler, J.L.; Riehm, H., (1970): *Cellular resistance to actinomycin D in chinese hamster cells in vitro: cross-resistance, radioautographic, and cytogenetic studies.* In: Cancer Research 30, 1174-1184

Biegel, D.; Pachter, J.S., (1994): *Growth of brain microvessel endothelial cells on collagen gels: applications to the study of blood-brain barrier physiology and CNS inflammation.* In: In Vitro Cellular & Developmental Biology 30A(9), 581-588

Biegel, D.; Spencer, D.D.; Pachter, J.S., (1995): *Isolation and culture of human brain microvessel endothelial cells for the study of blood-brain barrier properties in vitro.* In: Brain Research 692, 183-189

Bignami, A.; Eng, L.F.; Dahl, D.; Uyeda, C.T., (1972): *Localization of the glial fibrillary acidic protein in astrocytes by immunofluorescence.* In: Brain Research 43, 429-435

Black, P.McL., (1991a): *Brain tumors, part 1.* In: The New England Journal of Medicine 324(21), 1471-1476

Black, P.McL., (1991b): *Brain tumors, part 2.* In: The New England Journal of Medicine 324(22), 1555-1564

Blott, E.J.; Higgins, C.F.; Linton, K.J., (1999): *Cysteine-scanning mutagenesis provides no evidence for the extracellular accessibility of the nucleotide-binding domains of the multidrug resistance transporter P-glycoprotein.* In: The EMBO Journal 18(23), 6800-6808

Bogman, K.; Peyer, A.-K.; Török, M.; Küsters, E.; Drewe, J., (2001): *HMG-CoA reductase inhibitors as P-glycoprotein modulation.* In: British Journal of Pharmacology 132, 1183-1192

-
- Borchardt, R.T.; Smith, P.L.; Wilson, G., (1996):** *General principles in the characterization and use of model systems for biopharmaceutical studies.* In: *Pharmaceutical Biotechnology* 8, 1-11
- Borst, P., (1997):** *Introduction: Multidrug resistance proteins.* In: *Seminars in Cancer Biology* 8, 131-134
- Borst, P.; Evers, R.; Kool, M.; Wijnholds, J., (2000a):** *A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated protein.* In: *Journal of the National Cancer Institute* 92(16), 1295-1302
- Borst, P.; Evers, R.; Kool, M.; Wijnholds, J., (1999):** *The multidrug resistance protein family.* In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1461, 347-357
- Borst, P.; Schinkel, A.H., (1996):** *What have we learnt thus far from mice with disrupted P-glycoprotein genes ?.* In: *European Journal of Cancer* 32A(6), 985-990
- Borst, P.; Schinkel, A.H.; Smit, J.J.M.; Wagenaar, E.; van Deemter, L.; Smith, A.J.; Eijdem, E.W.H.M.; Baas, F.; Zaman, G.J.R., (1993):** *Classical and novel forms of multidrug resistance and the physiological functions of P-glycoprotein in mammals.* In: *Pharmacology & Therapeutics* 60, 289-299
- Borst, P.; Zelcer, N., van Helvoort, A., (2000b):** *ABC-transporters in lipid transport.* In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1486, 128-144
- Bowman, P.D.; Betz, A.L.; Ar, D.; Wolinsky, J.S.; Penney, J.B.; Shivers, R.R.; Goldstein, G.W., (1981):** *Primary culture of capillary endothelium from rat brain.* In: *In Vitro* 17(4), 353-362
- Bowman, P.D.; Betz, A.L.; Goldstein, G.W., (1979):** *Characteristics of cultured brain capillaries.* In: *The Journal of Cell Biology* 83, 95a
- Bowman, P.D.; du Bois, M.; Dorovini-Zis, K.; Shivers, R.R., (1990):** *Microvascular endothelial cells from brain.* In: *Cell Culture Techniques in Heart and Vessel Research* (Piper, H.M.; Springer Verlag) , 140-157
- Bowman, P.D.; Ennis, S.R.; Rarey, K.E.; Betz, A.L.; Goldstein, G.W., (1983):** *Brain microvessel endothelial cells in tissue culture: a model for study of blood-brain barrier permeability.* In: *Annals of Neurology* 14, 396-402
- Bradbury, M.W.B., (1985):** *The Blood-Brain Barrier. Transport across the cerebral endothelium.* In: *Circulation Research* 57(2), 213-222
- Bradbury, M.W.B., (1993):** *The Blood-Brain Barrier.* In: *Experimental Physiology* 78, 453-472
- Brightman, M.W., (1992):** *Ultrastructure of brain endothelium.* In: *Handbook of Experimental Pharmacology* 103, 1-19

Brightman, M.W.; Reese, T.S., (1969): *Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain.* In: The Journal of Cell Biology 40(3), 648-677

Brosnan, C.F.; Claudio, L.; Martiney, J.A., (1992): *The blood-brain barrier during immune responses.* In: Seminars in the Neurosciences 4, 193-200

Broxterman, H.J.; Sonneveld, P.; Feller, N.; Ossenkoppele, G.J.; Währer, D.C.R.; Eekman, C.A.; Schoester, M.; Lankelma, J.; Pinedo, H.M.; Löwenberg, B.; Schuurhuis, G.J., (1996): *Quality control of multidrug resistance assays in adult acute leukemia: correlation between assays for P-glycoprotein expression and activity.* In: Blood 87(11), 4809-4816

Brust, P.; Bergmann, R.; Johannsen, B., (1995): *Specific binding of [3H]imipramine indicates the presence of a specific serotonin transport system on endothelial cells of porcine brain.* In: Neuroscience Letters 194, 21-24

Buchwald, P.; Bodor, N., (1998): *Octanol-water partition: searching for predictive models.* In: Current Medicinal Chemistry 5, 353-380

Buzney, S.M.; Massicotte, S.J.; Hetu, N.; Zetter, B.R., (1983): *Retinal vascular endothelial cells and pericytes. Differential growth characteristics in vitro.* In: Investigative Ophthalmology 24, 470-480

C

Caldwell, P.R.B.; Seegal, B.C.; Hsu, K.C.; Das, M.; Soffer, R.L., (1976): *Angiotensin-converting enzyme: vascular endothelial localization.* In: Science 191, 1050-1051

Callaghan, R.; Stafford, A.; Epand, R.M., (1993): *Increased accumulation of drugs in a multidrug resistant cell line by alteration of membrane biophysical properties.* In: Biochimica et Biophysica Acta 1175, 277-282

Cancilla, P.A.; DeBault, L.E., (1983): *Neutral amino acid transport properties of cerebral endothelial cells in vitro.* In: Journal of Neuropathology and Experimental Neurology 42(2), 191-199

Carson, M.P.; Haudenschield, C.C., (1986): *Microvascular endothelium and pericytes: high yield, low passage cultures.* In: In Vitro Cellular & Developmental Biology 22(6), 344-354

Cecchelli, R.; Dehouck, B.; Descamps, L.; Fenart, L.; Buee-Scherrer, V.; Duhem, C.; Lundquist, S.; Rentfel, M.; Torpier, G.; Dehouck, M.-P., (1999): *In vitro model for evaluating drug transport across the blood-brain barrier.* In: Advanced Drug Delivery Reviews 36, 165-178

Cefalu, W.T.; Pardridge, W.M., (1985): *Restrictive transport of a lipid-soluble peptide (cyclosporin) through the blood-brain barrier.* In: Journal of Neurochemistry 45, 1954-1956

Cerletti, A.; Drewe, J.; Fricker, G.; Eberle, A.N.; Huwyler, J., (2000): *Endocytosis and transcytosis of an immunoliposome-based brain drug delivery system.* In: Journal of Drug Targeting 8(6), 435-446

Chikhale, E.G.; Burton, P.S.; Borchardt, R.T., (1995): *The effect of verapamil on the transport of peptides across the blood-brain barrier in rats: kinetic evidence for an apically polarized efflux mechanism.* In: The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 273(1), 298-303

Chikhale, E.G.; Ng, K.-Y.; Burton, P.S.; Borchardt, R.T., (1994): *Hydrogen bonding potential as a determinant of the in vitro and in situ blood-brain barrier permeability of peptides.* In: Pharmaceutical Research 11(3), 412-419

Chiou, W.L.; Chung, S.M.; Wu, T.C., (2000): *Potential role of P-glycoprotein in affecting hepatic metabolism of drugs.* In: Pharmaceutical Research 17(8), 903-905

Clark, J., (1983): *Reducing the requirement for serum supplements in high yield microcarrier cell culture.* In: Hormonally Defined Media. A tool in Cell Biology, Hrsg. G. Fischer, R.J. Wieser, Springer Verlag, 6-15

Cole, S.P.C.; Bhardwaj, G.; Gerlach, J.H.; Mackie, J.E.; Grant, C.E.; Almquist, K.C.; Stewart, A.J.; Kurz, E.U.; Duncan, A.M.V.; Deeley, R.G., (1992): *Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line.* In: Science 258, 1650-1654

Cole, S.P.C.; Deeley, R.G., (1998): *Multidrug resistance mediated by the ATP-binding cassette transporter protein MRP.* In: BioEssays 20(11), 931-940

Cole, S.P.C.; Kruh, G.D.; Belinsky, M.G., (1999): *Re: Characterization of MOAT-C and MOAT-D, new members of the MRP/cMOAT subfamily of transporter proteins.* In: Journal of the National Cancer Institute 91(10), 888-889

Cole, S.P.C.; Sparks, K.E.; Fraser, K.; Loe, D.W.; Grant, C.E.; Wilson, G.M.; Deeley, R.G., (1994): *Pharmacological characterization of multidrug resistant MRP-transfected human tumor cells.* In: Cancer Research 54, 5902-5910

Cordon-Cardo, C.; O'Brien, J.P.; Casals, D.; Rittman-Grauer, L.; Biedler, J.L.; Melamed, M.R.; Bertino, J.R., (1989): *Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites.* In: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 86, 695-698

Cornelius, M.; Bauer, B.; Fricker, G., (2001): *Interactions of Hypericum perforatum L. compounds with P-glycoprotein in an in vitro model of the blood-brain barrier.* In: Archiv der Pharmazie, Pharmaceutical and Medicinal Chemistry 333, Suppl. 1, 11

Cornford, E.M.; Hyman, S., (1999): *Blood-brain barrier permeability to small and large molecules.* In: Advanced Drug Delivery Reviews 36, 145-163

Crone, C., (1963): *The permeability of capillaries in various organs as determined by use of the indicator diffusion method.* In: Acta Physiologica Scandinavica 58, 292-305

Crone, C., (1965): *The permeability of brain capillaries to non-electrolytes.* In: Acta Physiologica Scandinavica 64, 407-417

Crone, C.; Olesen, S.P., (1982): *Electrical resistance of brain microvascular endothelium.* In: Brain Research 241, 49-55

D

Dalet, C.; Fehlmann, M.; Debey, P., (1982): *Use of Percoll density gradient centrifugation for preparing isolated rat hepatocytes having long-term viability.* In: Analytical Biochemistry 122, 119-123

Danø, K., (1973): *Active outward transport of daunomycin in resistant Ehrlich ascites tumor cell.* In: Biochimica et Biophysica Acta 323, 466-483

Davis, T.P.; Abbruscato, T.J.; Brownson, E.; Hruby, V.J., (1995): *Conformationally constrained peptide drugs targeted at the blood-brain barrier.* In: NIDA research monograph 154, 47-60

de Boer, A.G.; Breimer, D.D., (1996): *Reconstitution of the blood-brain barrier in cell culture for studies of drug transport and metabolism.* In: Advanced Drug Delivery Reviews 22, 251-264

de Boer, A.G.; de Lange, E.C.M.; van der Sandt, I.C.J.; Breimer, D.D., (1998): *Transporters and the blood-brain barrier (BBB).* In: International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics 36(1), 14-15

de Boer, A.G.; Gaillard, P.J.; Breimer, D.D., (1999): *The transference of results between blood-brain barrier cell culture systems.* In: European Journal of Pharmaceutical Sciences 8, 1-4

de Lange, E.C.M.; de Bock, G.; Schinkel, A.H.; de Boer, A.G.; Breimer, D.D., (1998): *BBB transport and P-glycoprotein functionality using mdr1A (-/-) and wild-type mice. Total brain versus microdialysis concentration profiles of rhodamine-123.* In: Pharmaceutical Research 15(11), 1657-1665

de Vries, H.E.; Kuiper, J.; de Boer, A.G.; van Berkel, T.J.C.; Breimer, D.D., (1993): *Characterization of the scavenger receptor on bovine cerebral endothelial cells in vitro.* In: Journal of Neurochemistry 61, 1813-1821

DeBault, L.E.; Cancilla, P.A., (1980): *γ -glutamyl transpeptidase in isolated brain endothelial cells: induction by glial cells in vitro.* In: Science 207, 653-655

Deeley, R.G.; Cole, S.P.C., (1997): *Function, evolution and structure of multidrug resistance protein (MRP).* In: Seminars in Cancer Biology 8, 193-204

- Defazio, G.; Ribatti, D.; Nico, B.; Ricchiutti, F.; de Salvia, R.; Roncali, L.; Livrea, P., (1997):** *Endocytosis of horseradish peroxidase by brain microvascular and umbilical vein endothelial cells in culture: an ultrastructural and morphometric study.* In: Brain Research Bulletin 43(5), 467-472
- Dehouck, M.-P.; Jolliet-Riant, P.; Bree, F.; Fruchart, J.-C.; Cecchelli, R.; Tillement, J.-P., (1992):** *Drug transfer across the blood-brain barrier: correlation between in vitro and in vivo models.* In: Journal of Neurochemistry 58, 1790-1797
- Dehouck, M.-P.; Meresse, S.; Delorme, P.; Fruchart, J.-C.; Cecchelli, R., (1990):** *An easier, reproducible, and mass-production method to study the blood-brain barrier in vitro.* In: Journal of Neurochemistry 54, 1798-1801
- Deli, M.A.; Dehouck, M.-P.; Abraham, C.S.; Cecchelli, R.; Joo, F., (1995):** *Penetration of small molecular weight substances through cultured bovine brain capillary endothelial cell monolayers: the early effects of cyclic adenosine 3', 5'- monophosphate.* In: Experimental Physiology 80, 675-678
- Demeule, M.; Shedid, D.; Beaulieu, E.; Del Maestro, R.F.; Moghrabi, A.; Ghosn, P.B.; Mouldjian, R.; Berthelet, F.; Beliveau, R., (2001):** *Expression of multidrug-resistance P-glycoprotein (MDR1) in human brain tumors.* In: International Journal of Cancer 93, 62-66
- Dempsey, E.W.; Wislocki, G.B., (1955):** *An electron microscopic study of the blood-brain barrier in the rat, employing silver nitrate as a vital stain.* In: Journal of Biophysical and Biochemical Cytology 1(3), 245-256
- di Pietro, A.; Dayan, G.; Conseil, G.; Steinfels, E.; Krell, T.; Trompier, D.; Baubichon-Cortay, H.; Jault, J.-M., (1999):** *P-glycoprotein-mediated resistance to chemotherapy in cancer cells: using recombinant cytosolic domains to establish structure-function relationships.* In: Brazilian Journal of Medical and Biological Research 32(8), 925-939
- Dietel, M.; Arps, H.; Gerding, D.; Trapp, M.; Niendorf, A., (1987):** *Establishment of primary cell cultures: Experiences with 155 cell strains.* In: Klinische Wochenschrift 65, 507-512
- Dintaman, J.M.; Silverman, J.A., (1999):** *Inhibition of P-glycoprotein by D- α -tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate (TPGS).* In: Pharmaceutical Research 16(10), 1550_1556
- Dobbie, M.S.; Stewart, V.C.; Heales, S.J.R.; Clark, J.B.; Hurst, R.D., (2001):** *Neurons do not contribute to barrier integrity in a novel tri-culture model of the blood-brain barrier.* IVth International Conference „Cerebral Vascular Biology“, Cambridge
- Döppenschmitt, S.; Langguth, P.; Regårdh, C.G.; Andersson, T.B.; Hilgendorf, C.; Spahn-Langguth, H., (1999):** *Characterization of binding properties to human P-glycoprotein: development of a [3 H]verapamil radioligand-binding assay.* In: The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 288(1), 348-357

Döppenschmitt, S.; Spahn-Langguth, H.; Regardh, C.G.; Langguth, P., (1999): *Role of P-glycoprotein-mediated secretion in absorptive drug permeability: an approach using passive membrane permeability and affinity to P-glycoprotein.* In: *Journal of Pharmaceutical Sciences* 88(10), 1067-1072

Dorovini-Zis, K.; Prameya, R.; Bowman, P.D., (1991): *Culture and characterization of microvascular endothelial cells derived from human brain.* In: *Laboratory Investigation* 64(3), 425-436

Drewe, J.; Gutmann, H.; Fricker, G.; Török, M.; Beglinger, C.; Huwyler, J., (1999): *HIV protease inhibitor ritonavir: a more potent inhibitor of P-glycoprotein than the cyclosporine analog SDZ PSC 833.* In: *Biochemical Pharmacology* 57, 1147-1152

Drewes, L.R., (1999): *What is the blood-brain barrier ? A molecular perspective.* In: *Advances in Experimental Medicine and Biology* 474, 111-122

Drion, N.; Lemaire, M.; Lefauconnier, J.-M.; Scherrmann, J.-M., (1996): *Role of P-glycoprotein in the blood-brain transport of colchicine and vinblastine.* In: *Journal of Neurochemistry* 67(4), 1688-1693

Drori, S.; Eytan, G.D.; Assaraf, Y.G., (1995): *Potentialiation of anticancer-drug cytotoxicity by multidrug-resistance chemo-sensitizers involves alterations in membrane fluidity leading to increased membrane permeability.* In: *European Journal of Biochemistry* 228(3), 1020-1029

DuBois, R.N.; Simpson, E.R.; Tuckey, J.; Lambeth, J.D.; Waterman, M.R., (1981): *Evidence for a higher molecular weight precursor of cholesterol side-chain-cleavage cytochrome P-450 and induction of mitochondrial and cytosolic proteins by corticotropin in adult bovine adrenal cells.* In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78(2), 1028-1032

Dulbecco, R.; Freeman, G., (1959): *Plaque production by the polyoma virus.* In: *Virology* 8, 396-397

E

Eagle, H., (1955): *Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture.* In: *Science* 122, 501-504

Eddy, E.P.; Maleef, B.E.; Hart, T.K.; Smith, P.L., (1997): *In vitro models to predict blood-brain barrier permeability.* In: *Advanced Drug Delivery Reviews* 23, 185-198

Edwards, H.R., (2001): *Drug delivery via the blood-brain barrier.* In: *Nature* 4(3), 221-222

Ehrlich, P., (1885): *Das Sauerstoff-Bedürfniss des Organismus. Eine farbenanalytische Studie..* In: *Verlag von August Hirschwald* , 1-167

Endicott, J.A.; Ling, V., (1989): *The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance.* In: Annual review of biochemistry 58, 137-171

Enerbäck, L.; Svensson, I., (1980): *Isolation of rat peritoneal mast cells by centrifugation on density gradients of Percoll.* In: Journal of Immunological Methods 39, 135-145

Eneroth, A.; Åstöm, E.; Hoogstraate, J.; Schrenk, D.; Conrad, S.; Kauffmann, H.-M.; Gjellan, K., (2001): *Evaluation of a vincristine resistant Caco-2 cell line for use in a calcein-AM extrusion screening assay for P-glycoprotein interaction.* In: European Journal of Pharmaceutical Sciences 12, 205-214

Essodaigui, M.; Broxterman, H.J.; Garnier-Suillerot, A., (1998): *Kinetic analysis of calcein and calcein-acetoxymethylester efflux mediated by the multidrug resistance protein and P-glycoprotein.* In: Biochemistry 37, 2243-2250

Evers, R.; Kool, M.; Smith, A.J.; van Deemter, L.; de Haas, M.; Borst, P., (2000): *Inhibitory effect of the reversal agents V-104, GF120918 and Pluronic L61 on MDR1 Pgp-, MRP1- and MRP2-mediated transport.* In: British Journal of Cancer 83(3), 366-374

Eytan, G.E.; Regev, R.; Oren, G.; Assaraf, Y.G., (1996): *The role of passive transbilayer drug movement in multidrug resistance and its modulation.* In: The Journal of Biological Chemistry 271(22), 12897-12902

F

Faso, L.; Trowbridge, R.S.; Quan, W.; Yao, X.-L.; Jenkins, E.C.; Maciulis, A.; Bunch, T.D.; Wisniewski, H.M., (1994): *Characterization of a strain of cerebral endothelial cells derived from goat brain which retain their differentiated traits after long-term passage.* In: In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal 30A, 226-235

Feller, N.; Broxterman, H.J.; Währer, D.C.R.; Pinedo, H.M., (1995a): *ATP-dependent efflux of calcein by the multidrug resistance protein (MRP): no inhibition by intracellular glutathione depletion.* In: FEBS Letters 368, 385-388

Feller, N.; Kuiper, C.M.; Lankelma, J.; Ruhdal, J.K.; Scheper, R.J.; Pinedo, H.M.; Broxterman, H.J., (1995b): *Functional detection of MDR1/P170 and MRP/P190-mediated multidrug resistance in tumour cells by flow cytometry.* In: British Journal of Cancer 72, 543-549

Fenart, L.; Buee-Scherrer, V.; Descamps, L.; Duhem, C.; Poullain, M.-G.; Cecchelli, R.; Dehouck, M.-P., (1998): *Inhibition of P-glycoprotein: rapid assessment of its implication in blood-brain barrier integrity and drug transport to the brain by an in vitro model of the blood-brain barrier.* In: Pharmaceutical Research 15(7), 993-1000

Ferry, D.R., (1998): *Testing the role of P-glycoprotein expression in clinical trials: applying pharmacological principles and best methods for detection together with good clinical trials methodology.* In: International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics 36(1), 29-40

Ferté, J., (2000): *Analysis of the tangled relationships between P-glycoprotein-mediated multidrug resistance and the lipid phase of the cell membrane.* In: European Journal of Biochemistry 267, 277-294

Fischer, D.; Kissel, T., (2001): *Histochemical characterization of primary capillary endothelial cells from porcine brains using monoclonal antibodies and fluorescein isothiocyanate-labelled lectins: implications for drug delivery.* In: European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 52, 1-11

Fischer, S.; Renz, D.; Schaper, W.; Karliczek, G.F., (1996): *Effects of barbiturates on hypoxic cultures of brain derived microvascular endothelial cells.* In: Brain Research 707, 47-53

Folkman, J.; Haudenschild, C.C.; Zetter, B.R., (1979): *Long-term culture of capillary endothelial cells.* In: Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America 76(10), 5217-5221

Fontaine, M.; Elmquist, W.F.; Miller, D.W., (1996): *Use of rhodamine 123 to examine the functional activity of P-glycoprotein in primary cultured brain microvessel endothelial cell monolayers.* In: Life Sciences 59(18), 1521-1531

Ford, J.M., (1996): *Experimental reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by pharmacological chemosensitisers.* In: European Journal of Cancer 32a(6), 991-1001

Ford, J.M.; Hait, W.N., (1990): *Pharmacology of drugs that alter multidrug resistance in cancer.* In: Pharmacological Reviews 42(3), 155-199

Ford, J.M.; Hait, W.N., (1993): *Pharmacologic circumvention of multidrug resistance.* In: Cytotechnology 12, 171-212

Ford, J.M.; Prozialeck, W.C.; Hait, W.N., (1988): *Structural features determining activity of phenothiazines and related drugs for inhibition of cell growth and reversal of multidrug resistance.* In: Molecular Pharmacology 35, 105-115

Förtig, H., (1929): *Die Bluthirnschranke.* In: Zentralblatt für Haut- und Geschlechtskrankheiten 28(7/8), 369-398

Franke, H.; Galla, H.-J.; Beuckmann, C.T., (1999): *An improved low-permeability in vitro-model of the blood-brain barrier: transport studies on retinoids, sucrose, haloperidol, caffeine and mannitol.* In: Brain Research 818, 65-71

Franke, H.; Galla, H.-J.; Beuckmann, C.T., (2000): *Primary cultures of brain microvessel endothelial cells: a valid and flexible method to study drug transport through the blood-brain barrier in vitro.* In: Brain Research Protocols 5, 248-256

Fricker, G.; Drewe, J.; Miller, D.S., (1998): *Excretion of a fluorescent rapamycin-derivative in proximal kidney tubules is mediated by P-glycoprotein.* In: International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics 36(2), 67-69

Friden, P.M., (1996): *Utilization of an endogenous cellular transport system for the delivery of therapeutics across the blood-brain barrier.* In: Journal of Controlled Release 46, 117-128

Fromm, M.F., (2000): *P-glycoprotein: a defense mechanism limiting oral bioavailability and CNS accumulation of drugs.* In: International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics 38(2), 69-74

Fromm, M.F.; Kim, R.B.; Stein, C.M.; Wilkinson, G.R.; Roden, D.M., (1999): *Inhibition of P-glycoprotein-mediated drug transport. A unifying mechanism to explain the interaction between digoxin and quinidine.* In: Circulation 99, 552-557

Fujita, T.; Yamada, H.; Fukuzumi, M.; Nishimaki, A.; Yamamoto, A.; Muranishi, S., (1997): *Calcein is excreted from the intestinal mucosal cell membrane by the active transport system.* In: Life Sciences 60(4/5), 307-313

G

Gabrielsson, J.; Weiner, D., (1997): *Pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis: concepts and applications.* In: Swedish Pharmaceutical Society ,

Gaillard, P.J.; van der Sandt, I.C.J.; Voorwinden, L.H.; Vu, D.; Lyngholm-Nielsen, J.; de Boer, A.G.; Breimer, D.D., (2000): *Astrocytes increase the functional expression of P-glycoprotein in an in vitro model of the blood-brain barrier.* In: Pharmaceutical Research 17(10), 1198-1205

Galla, H.-J., (2000): *Zellkulturmodelle für die Pharmaforschung.* In: BIOforum 3, 123-125

Garberg, P., (1998): *In vitro models of the blood-brain barrier.* In: Alternatives to Laboratory Animals 26, 821-847

Garrigues, A.; Ezan, E.; Orlowski, S., (2001): *P-glycoprotein ATPase activity modulation as a strategy for in-vitro testing interaction with drugs.* 3rd FEBS Advanced Lecture Course "ATP-Binding Cassette (ABC) Proteins: From Genetic Disease To Multidrug Resistance", Gosau

Garrigues, A.; Nugier, J.; Ferté, J.; Orlowski, S.; Ezan, E., (2000): *In vitro drug screening assay for testing interaction with P-glycoprotein based on its ATPase activity.* AAPS Annual Meeting, Indianapolis

Gellin, J.; Brown, S.; Marshall Graves, J.A.; Rothschild, M.; Schook, L.; Womack, J.; Yerle, M., (2000): *Comparative gene mapping workshop: progress in agriculturally important animals.* In: Mammalian Genome 11, 140-144

Georges, E.; Sharom, F.J.; Ling, V., (1990): *Multidrug resistance and chemosensitization: therapeutic implications for cancer chemotherapy.* In: *Advances in Pharmacology* 21, 185-220

Germann, U.A., (1996): *P-glycoprotein - a mediator of multidrug resistance in tumour cells.* In: *European Journal of Cancer* 32a(6), 927-944

Ghazanfari, F.A.; Stewart, R.R., (2001): *Characteristics of endothelial cells derived from the blood-brain barrier and of astrocytes in culture.* In: *Brain Research* 890, 49-65

Gherzi-Egea, J.-F.; Minn, A.; Siest, G., (1988): *A new aspect of the protective functions of the blood-brain barrier : activities of four drug-metabolizing enzymes in isolated rat brain microvessels.* In: *Life Sciences* 42(24), 2515-2523

Gitlin, J.D.; D'Amore, P.A., (1983): *Cultur of retinal capillary cells using selective growth media.* In: *Microvascular Research* 26, 74-80

Glynn, S.L.; Yazdanian, M., (1998): *In vitro blood-brain barrier permeability of nevirapine compared to other HIV antiretroviral agents.* In: *Journal of Pharmaceutical Sciences* 87(3), 306-310

Golden, P.L.; Pardridge, W.M., (1999): *P-glycoprotein on astrocyte foot processes of unfixed isolated human brain capillaries.* In: *Brain Research* 819, 143-146

Goldmann, E.E., (1909): *Die äussere und innere Sekretion des gesunden und kranken Organismus im Lichte der "vitalen Färbung".* In: *Beiträge zur klinischen Chirurgie* 64, 192-265

Goldmann, E.E., (1913): *Vitalfärbung am Zentralnervensystem. Beitrag zur Pathologie des Plexus Chorioideus und der Hirnhäute.* In: *Verlag der königlichen Akademie der Wissenschaften, Berlin*, 1-60

Goldstein, G.W.; Betz, A.L., (1983): *Recent advances in understanding brain capillary function.* In: *Annals of Neurology* 14, 389-395

Goldstein, G.W.; Betz, A.L., (1986): *The Blood-Brain Barrier.* In: *Scientific American* 255, 70-79

Goldstein, G.W.; Betz, A.L.; Bowman, P.D., (1984): *Use of isolated brain capillaries and cultured endothelial cells to study the blood-brain barrier.* In: *Federation Proceedings* 43(2), 191-195

Goldstein, M.N.; Hamm, K.; Amrod, E., (1966): *Incorporation of tritiated actinomycinD into drug-sensitive and drug-resistant HeLa cells.* In: *Science* 151, 1555-1556

Goldstein, M.N.; Slotnick, I.J.; Journey, L.J., (1960): *In vitro studies with HeLa cell lines sensitive and resistant to actinomycin D.* In: *Annals New York Academy Sciences* 89, 474-483

Good, N.E.; Winget, G.D.; Winter, W.; Connolly, T.; Izawa, S.; Singh, R.M.M., (1966): *Hydrogen ion buffers for biological research.* In: *Biochemistry* 5, 467-477

Goodfellow, H.R.; Sardini, A.; Ruetz, S.; Callaghan, R.; Gros, P.; McNaughton, P.A.; Higgins, C.F., (1996): *Protein kinase C-mediated phosphorylation does not regulate drug transport by the human multidrug resistance P-glycoprotein.* In: *The Journal of Biological Chemistry* 271(23), 13668-13674

Gottesman, M.M.; Pastan, I., (1988): *The multidrug transporter, a double-edged sword.* In: *The Journal of Biological Chemistry* 263(25), 12163-12166

Gottesman, M.M.; Pastan, I., (1993): *Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter.* In: *Annual Review of Biochemistry* 62, 385-427

Griffiths, J.B.; Pirt, S.J., (1967): *The uptake of amino acids by mouse cells (strain LS) during growth in batch culture and chemostat culture: the influence of cell growth rate.* In: *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological sciences* 168, 421-438

Guillot, F.L.; Audus, K.L., (1990): *Angiotensin peptide regulation of fluid-phase endocytosis in brain microvessel endothelial cell monolayers.* In: *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 10, 827-834

Gumbleton, M.; Audus, K.L., (2001): *Progress and limitations in the use of in vitro cell cultures to serve as a permeability screen for the blood-brain barrier.* In: *Journal of Pharmaceutical Sciences* 90(11), 1681-1698

Gutmann, H.; Fricker, G.; Drewe, J.; Török, M.; Miller, D.S., (1999b): *Interactions of HIV protease inhibitors with ATP-dependent drug export proteins.* In: *Molecular Pharmacology* 56, 383-389

Gutmann, H.; Török, M.; Fricker, G.; Huwyler, J.; Beglinger, C.; Drewe, J., (1999a): *Modulation of multidrug resistance protein expression in porcine brain capillary endothelial cells in vitro.* In: *Drug Metabolism and Disposition* 27(8), 937-941

H

Ham, R.G., (1965): *Clonal growth of mammalian cells in a chemically defined, synthetic medium.* In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 53, 288-293

Ham, R.G., (1983): *Growth of normal human cells in defined media.* In: *Hormonally Defined Media. A tool in Cell Biology*, Hrsg. G. Fischer, R.J. Wieser, Springer Verlag, 16-30

Harrison, R.G., (1907): *Observations on the living developing nerve fiber.* In: *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 7, 140-143

Hegmann, E.J.; Bauer, H.C.; Kerbel, R.S., (1992): *Expression and functional activity of P-glycoprotein in cultured cerebral capillary endothelial cells.* In: Cancer Research 52, 6969-6975

Hennig, B.; Boissonneault, G.A.; Glauert, H.P., (1989): *Effects of serum type on growth and permeability properties of cultured endothelial cells.* In: Experimental Cell Research 181, 589-596

Henthorn; T.K.; Liu, Y.; Mahapatro, M.; Ng, K.-Y., (1999): *Active transport of fentanyl by the blood-brain barrier.* In: The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 289(2), 1084-1089

Herman, I.M.; D'Amore, P.A., (1985): *Microvascular pericytes contain muscle and nonmuscle actins.* In: The Journal of Cell Biology 101, 43-52

Higgins, C.F., (1992): *ABC-Transporters: from microorganisms to man.* In: Annual Review of Cell Biology 8, 67-113

Higgins, C.F., (1995): *The ABC of channel regulation.* In: Cell 82, 693-696

Higgins, C.F.; Callaghan, R.; Linton, K.J.; Rosenberg, M.F.; Ford, R.C., (1997): *Structure of the multidrug resistance P-glycoprotein.* In: Seminars in Cancer Biology 8, 135-142

Higgins, C.F.; Gottesman, M.M., (1991): *Is the multidrug transporter a flippase ?.* In: Trends in Biochemical Sciences 17, 18-21

Higgins, C.F.; Hiles, I.D.; Salmond, G.P.C.; Gill, D.R.; Downie, J.A.; Evans, I.J.; Holland, I.B.; Gray, L.; Buckel, S.D.; Bell, A.W.; Hermodson, M.A., (1986): *A family of related ATP-binding subunits coupled to many distinct biological processes in bacteria.* In: Nature 323, 448-450

Higgins, C.F.; Linton, K.J., (2001): *The xyz of ABC transporters.* In: Science 293(7), 1782-1784

Hipfner, D.R.; Deeley, R.G.; Cole, S.P.C., (1999): *Structural, mechanistic and clinical aspects of MRP1.* In: Biochimica et Biophysica Acta 1461, 359-376

Hoheisel, D.; Nitz, T.; Franke, H.; Wegener, J.; Hakvoort, A.; Tilling, T.; Galla, H.-J., (1998): *Hydrocortisone reinforces the blood-brain barrier properties in a serum free cell culture system.* In: Biochemical and Biophysical Research Communications 244, 312-316

Holley, R.W., (1975): *Control of growth of mammalian cells in cell culture.* In: Nature 258(11), 487-490

Holló, Z.; Homolya, L.; Davis, C.W.; Sarkadi, B., (1994): *Calcein accumulation as a fluorometric functional assay of the multidrug transporter.* In: Biochimica et Biophysica Acta 1191, 384-388

Holló, Z.; Homolya, L.; Hegedus, T.; Müller, M.; Szakacs, G.; Jakab, K.; Antal, F.; Sarkadi, B., (1998): *Parallel functional and immunological detection of human multidrug resistance proteins, P-glycoprotein and MRP1.* In: *Anticancer Research* 18, 2981-2988

Holló, Z.; Homolya, L.; Hegedüs, T.; Sarkadi, B., (1996): *Transport properties of the multidrug resistance-associated protein (MRP) in human tumour cells.* In: *FEBS Letters* 383, 99-104

Homolya, L.; Holló, L.; Germann, U.A.; Pastan, I.; Gottesman, M.M.; Sarkadi, B., (1993): *Fluorescent cellular indicators are extruded by the multidrug resistance protein.* In: *The Journal of Biological Chemistry* 268(29), 21493-21496

Homolya, L.; Holló, Z.; Müller, M.; Mechetner, E.B.; Sarkadi, B., (1996): *A new method for quantitative assessment of P-glycoprotein-related multidrug resistance in tumour cells.* In: *British Journal of Cancer* 73, 849-855

Hoshi, H.; Kan, M.; McKeehan, W.L., (1987): *Direct analysis of growth factor requirements for isolated human fetal hepatocytes.* In: *In Vitro Cellular & Developmental Biology* 23(10), 723-732

Hosoi, H.; Dilling, M.B.; Liu, L.N.; Danks, M.K.; Shikata, T.; Sekulic, A.; Abraham, R.T.; Lawrence Jr., J.C.; Houghton, P.J., (1998): *Studies on the mechanism of resistance to rapamycin in human cancer cells.* In: *Molecular Pharmacology* 54, 815-824

Huai-Yun, H.; Secrest, D.T.; Mark, K.S.; Carney, D.; Brandquist, C.; Elmquist, W.F.; Miller, D.W., (1998): *Expression of multidrug resistance-associated protein (MRP) in brain microvessel endothelial cells.* In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 243, 816-820

Huisman, M.T.; Smit, J.W.; Wiltshire, H.R.; Hoetelmans, R.M.W.; Beijnen, J.H.; Schinkel, A.H., (2001): *P-glycoprotein limits oral bioavailability, brain and fetal penetration of saquinavir even with high doses of ritonavir.* In: *Molecular Pharmacology* 59(4), 806-813

Huwylar, J.; Drewe, J.; Gutmann, H.; Thöle, M.; Fricker, G., (1998): *Modulation of morphine-6-glucuronide penetration into the brain by P-glycoprotein.* In: *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics* 36(2), 69-70

Huwylar, J.; Drewe, J.; Klusemann, C.; Fricker, G., (1996a): *Evidence for P-glycoprotein-modulated penetration of morphine-6-glucuronide into brain capillary endothelium.* In: *British Journal of Pharmacology* 118(8), 1879-1885

Huwylar, J.; Fricker, G.; Török, M.; Schneider, M.; Drewe, J., (1997): *Transport of clonidine across cultured brain microvessel endothelial cells.* In: *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 282(1), 81-85

Huwylar, J.; Wu, D.; Pardridge, W.M., (1996b): *Brain drug delivery small molecules using immunoliposomes.* In: *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 93, 14164-14169

I

Igarashi, Y.; Utsumi, H.; Chiba, H.; Yamada-Sasamori, Y.; Tobioka, H.; Kamimura, Y.; Furuuchi, K.; Kokai, Y.; Nakagawa, T.; Mori, M.; Sawada, N., (1999): *Glial cell line-derived neurotrophic factor induces barrier function of endothelial cells forming the blood-brain barrier.* In: Biochemical and Biophysical Research Communications 261, 108-112

Ishikawa, T., (1992): *The ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump.* In: Trends in Biochemical Sciences 17, 463-468

Ito, K.; Kusahara, H.; Sugiyama, Y., (1999): *Effects of intestinal CYP3A4 and P-glycoprotein on oral drug absorption - theoretical approach.* In: Pharmaceutical Research 16(2), 225-231

J

Jaffe, E.A.; Hoyer, L.W.; Nachman, R.L., (1974): *Synthesis of von Willebrand factor by cultured human endothelial cells.* In: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 71(5), 1906-1909

Jaffe, E.A.; Hoyer, L.W.; Nachman, R.L., (1973b): *Synthesis of antihemophilic factor antigen by cultured human endothelial cells.* In: The Journal of Clinical Investigation 52, 2757-2764

Jaffe, E.A.; Nachman, R.L.; Becker, C.G.; Minick, C.R., (1973a): *Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins.* In: The Journal of Clinical Investigation 52, 2745-2756

Jang, S.H.; Wientjes, M.G.; Au, J.L.-S., (2001): *Kinetics of P-glycoprotein-mediated efflux of paclitaxel.* In: The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 298(3), 1236-1242

Janzer, R.C.; Raff, M.C., (1987): *Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells.* In: Nature 325, 253-257

Jetté, L.; Murphy, G.F.; Beliveau, R., (1998): *Drug binding to P-glycoprotein is inhibited in normal tissues following SDZ-PSC 833 treatment.* In: International Journal of Cancer 76, 729-737

Jetté, L.; Murphy, G.F.; Leclerc, J.-M.; Beliveau, R., (1995): *Interaction of drugs with P-glycoprotein in brain capillaries.* In: Biochemical Pharmacology 50(10), 1701-1709

Johnson, M.D.; Anderson, B.D., (1999): *In vitro models of the blood-brain barrier to polar permeants: comparison of transmonolayer flux measurements and cell uptake kinetics using cultured cerebral capillary endothelial cells.* In: Journal of Pharmaceutical Sciences 88(6), 625

Johnstone, R.W.; Ruefli, A.A.; Smyth, M.J., (2000): *Multiple physiological functions for multidrug transporter P-glycoprotein ?*. In: Trends in Biochemical Sciences 25, 1-6

Jolliet-Riant, P.; Tillement, J.-P., (1999): *Drug transfer across the blood-brain barrier and improvement of brain delivery*. In: Fundamental and Clinical Pharmacology 13, 16-26

Joly, B.; Fardel, O.; Cecchelli, R.; Chesne, C.; Puozzo, C.; Guillouzo, A., (1995): *Selective drug transport and P-glycoprotein activity in an in vitro blood-brain barrier model*. In: Toxicology in Vitro 9(4), 357-364

Jones, P.M.; George, A.M., (1998): *A new structural model for P-glycoprotein*. In: Journal of Membrane Biology 166,, 133-147

Jones, P.M.; George, A.M., (2000): *Symmetry and structure in P-glycoprotein and ABC transporters. What goes around comes around*. In: European Journal of Biochemistry 267, 5298-5305

Jonker, J.W.; Wagenaar, E.; van Deemter, L.; Gottschlich, R.; Bender, H.M.; Dassenbrock, J.; Schinkel, A.H., (1999): *Role of blood-brain barrier P-glycoprotein in limiting brain accumulation and sedative side-effects of asimadoline, a peripherally acting analgesic drug*. In: British Journal of Pharmacology 127, 43-50

Joo, F., (1985): *The blood-brain barrier in vitro: ten years of research on microvessels isolated from the brain*. In: Neurochemistry International 7(1), 1-25

Joo, F., (1992): *The cerebral microvessels in culture, an update*. In: Journal of Neurochemistry 58, 1-17

Joo, F., (1993): *The blood-brain barrier in vitro: the second decade*. In: Neurochemistry International 23(6), 499-521

Joyce, N.C.; Haire, M.F.; Palade, G.E., (1985): *Contractile proteins in pericytes II. Immunocytochemical evidence for the presence of two isomyosins in graded concentrations*. In: The Journal of Cell Biology 100, 1387-1395

Juliano, R.L.; Ling, V., (1976): *A surface glycoprotein modulating drug permeability in chinese hamster ovary cell mutants*. In: Biochimica et Biophysica Acta 455, 152-162

K

Karaszi, E.; Jakab, K.; Homolya, L.; Szakacs, G.; Hollo, Z.; Telek, B.; Kiss, A.; Rejto, L.; Nahajevszky, S.; Sarkadi, B.; Kappelmayer, J., (2001): *Calcein assay for multidrug resistance reliably predicts therapy response and survival rate in acute myeloid leukaemia*. In: British Journal of Haematology 112, 308-314

Karlson, P.; Doenecke, D.; Koolman, J., (1994): *Biochemie für Naturwissenschaftler, 14. Auflage*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart

- Katoh, M.; Nakajima, M.; Yamazaki, H.; Yokoi, T., (2000):** *Inhibitory potencies of 1,4-dihydropyridine calcium antagonists to P-glycoprotein-mediated transport: comparison with the effects on CYP3A4.* In: *Pharmaceutical Research* 17(10), 1189-1197
- Katoh, M.; Nakajima, M.; Yamazaki, H.; Yokoi, T., (2001):** *Inhibitory effects of CYP3A4 substrates and their metabolites on P-glycoprotein-mediated transport.* In: *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 12, 505-513
- Kawahara, M.; Sakata, A.; Miyashita, T.; Tamai, I.; Tsuji, A., (1999):** *Physiologically based pharmacokinetics of digoxin in mdr1a knockout mice.* In: *Journal of Pharmaceutical Sciences* 88(12), 1281-1287
- Keppler, D.; Leier, I.; Jedlitschky, G., (1997):** *Transport of glutathione conjugates and glucuronides by the multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2.* In: *Biological Chemistry* 378, 787-791
- Kerr, K.M.; Sauna, Z.E.; Ambudkar, S.V., (2001):** *Correlation between steady-state ATP hydrolysis and vanadate-induced ADP trapping in human P-glycoprotein.* In: *The Journal of Biological Chemistry* 276(12), 8657-8664
- Kim, A.E.; Dintaman, J.M.; Waddell, D.S.; Silverman, J.A., (1998b):** *Saquinavir, an HIV protease inhibitor, is transported by P-glycoprotein.* In: *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 286(3), 1439-1445
- Kim, R.B.; Fromm, M.F.; Wandel, C.; Leake, B.; Wood, A.J.J.; Roden, D.M.; Wilkinson, G.R., (1998a):** *The drug transporter P-glycoprotein limits oral absorption and brain entry of HIV-1 protease inhibitors.* In: *Journal of Clinical Investigation* 101(2), 289-294
- Kim, R.B.; Wandel, C.; Leake, B.; Cvetkovic, M.; Fromm, M.F.; Dempsey, P.J.; Roden, M.M.; Belas, F.; Chaudhary, A.K.; Roden, D.M.; Wood, A.J.J.; Wilkinson, G.R., (1999):** *Interrelationship between substrates and inhibitors of human CYP3A and P-glycoprotein.* In: *Pharmaceutical Research* 16(3), 408-414
- King, M.; Su, W.; Chang, A.; Zuckerman, A.; Pasternak, G.W., (2001):** *Transport of opioids from the brain to the periphery by P-glycoprotein: peripheral actions of central drugs.* In: *Nature* 4(3), 268-274
- Klein, I.; Sarkadi, B.; Varadi, A., (1999):** *An inventory of the human ABC proteins.* In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1461, 237-262
- Kniesel, U.; Risau, W.; Wolburg, H., (1996):** *Development of blood-brain barrier tight junctions in the rat cortex.* In: *Developmental Brain Research* 96, 229-240
- Kochi, S.; Takanaga, H.; Matsuo, H.; Naito, M.; Tsuruo, T.; Sawada, Y., (1999):** *Effect of cyclosporin A of tacrolimus on the function of blood-brain barrier cells.* In: *European Journal of Pharmacology* 372, 287-295
- Koggel, A.; Spahn-Langguth, H.; Langguth, P., (2002):** *Interaction of beta-adrenoceptor antagonists with P-glycoprotein: correlation between drug lipophilicity and binding properties in vitro.* 4th European Graduate Student Meeting, Frankfurt

- Kolber, A.R.; Bagnell, C.R.; Krigman, M.R.; Hayward, J., Morell, P., (1979):** *Transport of sugars into microvessels isolated from rat brain: a model for the blood-brain barrier.* In: Journal of Neurochemistry 33, 419-432
- König, J.; Nies, A.; Cui, Y.; Leier, I.; Keppler, D., (1999):** *Conjugate export pumps of the multidrug resistance protein (MRP) family: localization, substrate specificity, and MRP2-mediated drug resistance.* In: Biochimica et Biophysica Acta 1461, 377-394
- Kramer, R.H., (1985):** *Extracellular matrix interactions with the apical surface of vascular endothelial cells.* In: Journal of Cell Science 76, 1-16
- Krause, D.; Mischeck, U.; Galla, H.-J.; Dermietzel, R., (1991):** *Correlation of zonula occludens ZO-1 antigen expression and transendothelial resistance in porcine and rat cultured cerebral endothelial cells.* In: Neuroscience Letters 128, 301-304
- Kreamer, B.L.; Staecker, J.L.; Sawada, N; Sattler, G.L.; Hsia, M.T.S.; Pitot, H.C., (1986):** *Use of a low-speed, iso-density Percoll centrifugation method to increase the viability of isolated rat hepatocyte preparations.* In: In Vitro Cellular & Developmental Biology 22(4), 201-211
- Krishan, A.; Morgan Fitz, C.; Andritsch, I., (1997):** *Drug retention, efflux, and resistance in tumour cells.* In: Cytometry 29, 279-285
- Krogh, A., (1946):** *The active and passive exchanges of inorganic ions through the surfaces of living cells and through living membranes generally.* In: Proceedings of the Royal Society of London 133, 140-200
- Kummer-Fremgen, B., (1993):** *Identifizierung der 5 β -Cholestan-3 α , 7 α , 12 α -triole und Salze langkettiger Fettsäuren bindenden Proteine der Endothelzellen des Schweinehirns - Untersuchungen zur Funktion der Blut-Hirn-Schranke im Lipidtransport.* Dissertation, Freiburg i. B.
- Kusuhara, H.; Sugiyama, Y., (2002):** *Role of transporters in the tissue-selective distribution and elimination of drugs: transporters in the liver, small intestine, brain and kidney.* In: Journal of Controlled Release 78, 43-54
- Kusuhara, H.; Suzuki, H.; Naito, M.; Tsuruo, T.; Sugiyama, Y., (1998b):** *Characterization of efflux transport of organic anions in a mouse brain capillary endothelial cell line.* In: The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 285(3), 1260-1265
- Kusuhara, H.; Suzuki, H.; Sugiyama, Y., (1998a):** *The role of P-glycoprotein and canalicular multispecific organic anion transporter in the hepatobiliary excretion of drugs.* In: Journal of Pharmaceutical Sciences 87(9), 1025-1040
- Kusuhara, H.; Suzuki, H.; Terasaki, T.; Kakee, A.; Lemaire, M.; Sugiyama, Y., (1997):** *P-glycoprotein mediates the efflux of quinidine across the blood-brain barrier.* In: The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 283(2), 574-580

L

Laterra, J.J.; Goldstein, G.W., (1992): *The blood-brain barrier in vitro and in culture.* In: Handbook of Experimental Pharmacology 103, 417-437

Lautier, D.; Canitrot, Y.; Deeley, R.G.; Cole, S.P.C., (1996): *Multidrug resistance mediated by the multidrug resistance protein (MRP) gene.* In: Biochemical Pharmacology 52, 967-977

Lawrenson, J.G.; Reid, A.R.; Finn, T.M.; Orte, C.; Allt, G., (1999): *Cerebral and pial microvessels: differential expression of γ -glutamyl transpeptidase and alkaline phosphatase.* In: Anatomy and Embryology 199, 29-34

Lechardeur, D.; Phung-Ba, B.; Wils, P.; Scherman, D., (1996): *Detection of the multidrug resistance P-glycoprotein in healthy tissues: the example of the blood-brain barrier.* In: Annals de Biologie Clinique 54, 31-36

Legrand, O.; Simonin, G.; Perrot, J.-Y.; Zittoun, R.; Marie, J.-P., (1998): *P-gp and MRP activities using calcein-AM are prognostic factors in adult acute myeloid leukemia patients.* In: Blood 91(12), 4480-4488

Lemaire, M.; Bruelisauer, A.; Guntz, P.; Sato, H., (1996): *Dose-dependent brain penetration of SDZ PSC 833, a novel multidrug resistance-reversing cyclosporin, in rats.* In: Cancer Chemotherapy and Pharmacology 38, 481-486

Lemaire, M.; Tillement, J.P., (1982): *Role of lipoproteins and erythrocytes in the in vitro binding and distribution of cyclosporin A in the blood.* In: Journal of Pharmacy and Pharmacology 34, 715-718

Lentz, K.A.; Polli, J.W.; Wring, S.A.; Humphreys, J.E.; Polli, J.E., (2000): *Influence of passive permeability on apparent P-glycoprotein kinetics.* In: Pharmaceutical Research 17(12), 1456-1460

Leo, A.; Hansch, C.; Elkins, D., (1971): *Partition coefficients and their uses.* In: Chemical Reviews 71(6), 525-616

Letrent, S.P.; Polli, J.W.; Humphreys, J.E.; Pollack, G.M.; Brouwer, K.R.; Brouwer, K.L.R., (1999): *P-glycoprotein-mediated transport of morphine in brain capillary endothelial cells.* In: Biochemical Pharmacology 58, 951-957

Levin, V.A., (1980): *Relationship of octanol/water partition coefficient and molecular weight to rat brain capillary permeability.* In: Journal of Medicinal Chemistry 23, 682-684

Lewandowsky, M., (1900): *Zur Lehre von der Cerebrospinalflüssigkeit.* In: Zeitschrift für klinische Medizin 40, 480-494

Lierse, W.; Horstmann, E., (1965): *Quatitative anatomy of the cerebral vascular bed with especial emphasis on homogeneity and inhomogeneity in small parts of the gray and white matter.* In: Acta Neurologica Scandinavica Suppl. 14, 15-19

- Liminga, G.; Nygren, P.; Larsson, R., (1994):** *Microfluorometric evaluation of calcein acetoxymethyl ester as a probe for P-glycoprotein-mediated resistance: effects of cyclosporine A and its nonimmunosuppressive analogue SDZ PSC 833.* In: *Experimental Cell Research* 212, 291-296
- Lindl, T.; Bauer, J., (1993):** *Zell- und Gewebekultur.* In: Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 3. Auflage ,
- Ling, V., (1987):** *Multidrug resistance and P-glycoprotein expression.* In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 507, 7-8
- Litman, T.,Nielsen,D.; Skovsgaard, T.; Zeuthen, T.; Stein, W.D., (1997a):** *ATPase activity of P-glycoprotein related to emergence of drug resistance in Ehrlich ascites tumor cell lines.* In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1361, 147-158
- Litman, T.; Zeuthen, T.; Skovsgaard, T.; Stein, W.D., (1997b):** *Structure-activity relationship of P-glycoprotein interacting drugs: kinetic characterization of their effects on ATPase activity.* In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1361, 159-168
- Litman, T.; Zeuthen, T.; Skovsgaard, T.; Stein, W.D., (1997c):** *Competitive, non-competitive and cooperative interactions between substrates of P-glycoprotein as measured by its ATPase activity.* In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1361, 169-176
- Loe, D.W.; Deeley, R.W.; Cole, S.P.C., (1996):** *Biology of the multidrug resistance-associated protein, MRP.* In: *European Journal of Cancer* 32a(6), 945-957
- Loewit, M., (1881):** *Ueber den Einfluss der Gallensauerer Salze auf die Herzthaetigkeit sowie auf einige Functionen der peripheren und centralen Nervensubstanzen.* In: *Zeitschrift für Heilkunde* 2, 459-495
- Loo, T.W.; Clarke, D.M., (1999):** *Determining the structure and mechanism of the human multidrug resistance P-glycoprotein using cysteine-scanning mutagenesis and thiol-modification techniques.* In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1461, 315-325
- Lou, D.-A.; Hu, F., (1987):** *Co-distribution of von Willebrand factor and fibronectin in cultured rhesus endothelial cells.* In: *Histochemical Journal* 19, 431-438
- Lu, P.; Liu, R.; Sharom, F.J., (2001):** *Drug transport by reconstituted P-glycoprotein in proteoliposomes.* In: *European Journal of Biochemistry* 268, 1687-1697
- Luker, G.D.; Pica, C.M.; Kumar, A.S.; Covey, D.F.; Piwnica-Worms, D., (2000):** *Effects of cholesterol and enantiomeric cholesterol of P-glycoprotein localization and function in low-density membrane domains.* In: *Biochemistry* 39, 7651-7661
- Lund, L., (1999):** *A cell culture model of the blood-brain barrier.* Dissertation, Royal Danish School of Pharmacy

M

Maciag, T.; Cerundolo, J.; Ilsley, S.; Kelley, P.R.; Forand, R., (1979): *An endothelial cell growth factor from bovine hypothalamus: Identification and partial characterization.* In: Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America 76(11), 5674-5678

Maciag, T.; Weinstein, R., (1983): *The Growth and differentiation of human endothelial cells.* In: Hormonally Defined Media. A tool in Cell Biology, Hrsg. G. Fischer, R.J. Wieser, Springer Verlag, 68-78

Malan-Shibley, L.; Iype, P.T., (1981): *The influence of culture conditions on cell morphology and tyrosine aminotransferase levels in rat liver epithelial cell lines.* In: Experimental Cell Research 131, 363-371

Male, D.K., (1992): *Immunology of brain endothelium and the blood-brain barrier.* In: Handbook of Experimental Pharmacology 103, 397-415

Marbeuf-Gueye, C.; Salerno, M.; Quidu, P.; Garnier-Suillerot, A., (2000): *Inhibition of the P-glycoprotein- and multidrug resistance protein-mediated efflux of anthracyclines and calceinacetoxymethyl ester by PAK-104P.* In: European Journal of Pharmacology 391, 207-216

Martin, C.; Berridge, G.; Higgins, C.F.; Mistry, P.; Charlton, P.; Callaghan, R., (2000): *Communication between multiple drug binding sites on P-glycoprotein.* In: Molecular Pharmacology 58(3), 624-632

Mathieu, F.; Galmier, M.-J.; Pognat, J.-F.; Petit, J.; Lartigue, C., (1999): *Transepithelial transport of bepridil in the human intestinal cell line, Caco-2, using two media, DMEM and HBSS.* In: International Journal of Pharmaceutics 181, 203-217

Matsumura, T.; Yamanaka, T.; Hashizume, S.; Irie, Y.; Nitta, K., (1975): *Tissue dispersion, cell harvest and fluid suspension culture by the use of bacterial neutral protease.* In: The Japanese Journal of Experimental Medicine 45(5), 377-382

Matsuo, H.; Wakasugi, M.; Takanaga, H.; Ohtani, H.; Naito, M.; Tsuruo, T.; Sawada, Y., (2001): *Possibility of the reversal of multidrug resistance and the avoidance of side effects by liposomes modified with MRK-16, a monoclonal antibody to P-glycoprotein.* In: Journal of Controlled Release 77, 77-86

Matsuoka, Y.; Okazaki, M.; Kitamura, Y.; Taniguchi, T., (1999): *Developmental expression of P-glycoprotein (multidrug resistance gene product) in the rat brain.* In: Journal of Neurobiology 39(3), 383-392

Matsuzaki, J.; Yamamoto, C.; Miyama, T.; Takanaga, H.; Matsuo, H.; Ishizuka, H.; Kawahara, Y.; Kuwano, M.; Naito, M.; Tsuruo, T.; Sawada, Y., (1999): *Contribution of P-glycoprotein to bunitrolol efflux across blood-brain barrier.* In: Biopharmaceutics & Drug Disposition 20, 85-90

- Maxwell, K.; Berliner, J.A.; Cancilla, P.A., (1987):** *Induction of γ -glutamyl transpeptidase in cultured cerebral endothelial cells by a product released by astrocytes.* In: Brain Research 410, 309-314
- Maynard, E.A.; Schultz, R.L.; Pease, D.C., (1957):** *Electron microscopy of the vascular bed of rat cerebral cortex.* In: American Journal of Anatomy 100, 409-433
- Mazurkowitz, J.; Vaughan, D.W.; Franzblau, C., (1980):** *A morphometric study of vascular smooth muscle cells in culture.* In: In Vitro 16(4), 337-345
- Mazzoni, A.; Trave, F., (1993):** *Cytoplasmic membrane cholesterol and doxorubicin cytotoxicity in drug-sensitive and multidrug-resistant human ovarian cancer cells.* In: Oncology Research 5(2), 75-82
- Méresse, S.; Dehouck, M.-P.; Delorme, P.; Bensaïd, M.; Tauber, J.-P.; Delbart, C.; Fruchart, J.-C.; Cecchelli, R., (1989):** *Bovine brain endothelial cell express tight junctions and monoamine oxidase activity in long-term culture.* In: Journal of Neurochemistry 53, 1363-1371
- Meyer, J.; Mischeck, U.; Veyhl, M.; Henzel, K.; Galla, H.-J., (1990):** *Blood-brain barrier characteristic enzymatic properties in cultured brain capillary endothelial cells.* In: Brain Research 514, 305-309
- Michalopoulos, G.; Pitot, H.C., (1975):** *Primary culture of parenchymal liver cells on collagen membranes.* In: Experimental Cell Research 94, 70-78
- Michelson, S.; Slate, D., (1992):** *A mathematical model of the P-glycoprotein pump as a mediator of multi-drug resistance.* In: Bulletin of Mathematical Biology 54(6), 1023-1038
- Miller, D.S.; Fricker, G.; Drewe, J., (1997):** *P-glycoprotein-mediated transport of a fluorescent rapamycin derivative in renal proximal tubules.* In: The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 282(1), 440-444
- Miller, D.S.; Graeff, C.; Droulle, L.; Fricker, S.; Fricker, G., (2002):** *Xenobiotic efflux pumps in isolated fish brain capillaries.* In: American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology 282, R191-R198
- Miller, D.S.; Nobmann, S.; Gutmann, H.; Török, M.; Drewe, J.; Fricker, G., (2000):** *Xenobiotic transport across isolated brain microvessels studied by confocal microscopy.* In: Molecular Pharmacology 58(6), 1357-1367
- Miller, D.W.; Audus, K.L.; Borchardt, R.T., (1992):** *Application of cultured endothelial cells of the brain microvasculature in the study of the blood-brain barrier.* In: Journal of Tissue Culture Methods 14, 217-224
- Minn, A.; Gherzi-Egea, J.-F.; Perrin, R.; Leininger, B.; Siest, G., (1991):** *Drug metabolizing enzymes in the brain and cerebral microvessels.* In: Brain Research Reviews 16, 65-82

Mischeck, U.; Meyer, J.; Galla, H.-J., (1989): *Characterization of γ -glutamyl transpeptidase activity of cultured endothelial cells from porcine brain capillaries.* In: Cell and Tissue Research 256, 221-226

Mistry, P.; Stewart, A.J.; Dangerfield, W.; Okiji, S.; Liddle, C., Bootle, D.; Plumb, J.A.; Templeton, D.; Charlton, P., (2001): *In vitro and in vivo reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by a novel potent modulator, XR9576.* In: Cancer Research 61, 749-758

Misumi, Y.; Misumi, Y.; Miki, K.; Takatsuki, A.; Tamura, G.; Ikehara, Y., (1986): *Novel blockade by Brefeldin A of intracellular transport of secretory proteins in cultured rat hepatocytes.* In: The Journal of Biological Chemistry 261(24), 11398-11403

Mitsunaga, Y.; Takanaga, H.; Matsuo, H.; Naito, M.; Tsuruo, T.; Ohtani, H.; Sawada, Y., (2000): *Effect of bioflavonoids on vincristine transport across blood-brain barrier.* In: European Journal of Pharmacology 395, 193-201

Moltke, L.L.; Greenblatt, D.J., (2001): *Drug transporters revisited.* In: Journal of Clinical Psychopharmacology 21(1), 1-3

Montaudon, D.; Vrignaud, P.; Londos-Gagliardi, D., Robert, J., (1986): *Fluorescence anisotropy of cell membranes of doxorubicin-sensitive and -resistant rodent tumoral cells.* In: Cancer Research 46, 5602-5605

Morgan, S.J.; Darling, D.C., (1994): *Kultur tierischer Zellen.* Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg

Morgan, J.F.; Morton, H.J.; Parker, R.C., (1950): *Nutrition of animal cells in tissue culture. Initial studies on a synthetic medium.* In: Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 73, 1-8

Mutschler, E.; Geisslinger, G.; Kroemer, H.K.; Schäfer-Korting, M., (2001): *Arzneimittelwirkungen, 8. Auflage.* Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart

N

Neuhoff, S.; Langguth, P.; Dressler, C.; Andersson, T.B.; Regardh, C.G.; Spahn-Langguth, H., (2000): *Affinities at the verapamil binding site of MDR1-encoded P-glycoprotein: drugs and analogs, stereoisomers and metabolites.* In: International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics 38(4), 168-179

Nico, B.; Cantino, D.; Sassoe Pognetto, M.; Bertossi, M.; Ribatti, D.; Roncalli, L., (1994): *Orthogonal arrays of particles (OAPs) in perivascular astrocytes and tight junctions in endothelial cells. A comparative study in developing and adult brain microvessels.* In: Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology 26(1), 103-109

Norinder, U.; Sjöberg, P.; Österberg, T., (1998): *Theoretical calculations and prediction of brain-blood partitioning of organic solutes using MolSurf parametrization and PLS statistics.* In: Journal of Pharmaceutical Sciences 87(8), 952-959

O

Ohnishi, T.; Tamai, I.; Sakanaka, K.; Sakata, A.; Yamashima, T.; Yamashita, J.; Tsuji, A., (1995): *In vivo and in vitro evidence for ATP-dependency of P-glycoprotein-mediated efflux of doxorubicin at the blood-brain barrier.* In: Biochemical Pharmacology 49(10), 1541-1544

Oldendorf, W.H., (1974a): *Lipid solubility and drug penetration of the blood-brain barrier.* In: Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 147, 813-816

Oldendorf, W.H., (1974b): *Blood-brain barrier permeability to drugs.* In: Annual Review of Pharmacology 14, 239-248

Orte, C.; Lawrenson, J.G.; Finn, F.M.; Reid, A.R.; Allt, G., (1999): *A comparison of blood-brain barrier and blood-nerve barrier endothelial cell markers.* In: Anatomy and Embryology 199, 509-517

Otis, K.W.; Avery, M.L.; Broward-Partin, S.M.; Hansen, D.K.; Behlow Jr., H.W.; Scott, D.O.; Thompson, T.N., (2001): *Evaluation of the BBMEC model for screening the CNS permeability of drugs.* In: Journal of Pharmacological and Toxicological Methods 45, 71-77

Owen, A.; Pirmohamed, M.; Tettey, J.N.; Morgan, P.; Chadwick, D.; Park, B.K., (2001): *Carbamazepine is not a substrate for P-glycoprotein.* In: British Journal of Clinical Pharmacology 51, 345-349

P

Pallares-Trujillo, J.; Domenech, C.; Grau-Oliete, M.R.; Fillat-Rivera, M.P., (1993): *Role of cell cholesterol in modulation vincristine uptake and resistance.* In: International Journal of Cancer 55, 667-671

Paneitz, A.; Kroemer, H.K., (2001): *Wie Arzneistoffe sich gegenseitig beeinflussen.* In: Pharmazeutische Zeitung 16, 10-15

Pardridge, W.M., (1991): *Chimeric peptide pharmaceutical delivery through the blood-brain barrier.* In: Peptide Drug Delivery to the Brain, Raven Press , 239-279

Pardridge, W.M., (1995a): *Preface:overview of brain drug delivery.* In: Advanced Drug Delivery Reviews 15, 1-3

Pardridge, W.M., (1995b): *Transport of small molecules through the blood-brain barrier: biology and methodology.* In: Advanced Drug Delivery Reviews 15, 5-36

Pardridge, W.M., (1995c): *Vector-mediated peptide drug delivery to the brain.* In: *Advanced Drug Delivery Reviews* 15, 109-146

Pardridge, W.M., (1999): *Blood-brain barrier biology and methodology.* In: *Journal of NeuroVirology* 5, 556-569

Pardridge, W.M.; Eisenberg, J.; Yang, J., (1985): *Human blood-brain barrier insulin receptor.* In: *Journal of Neurochemistry* 44, 1771-1778

Pardridge, W.M.; Triguero, D.; Yang, J.; Cancilla, P.A., (1990): *Comparison of in vitro and in vivo models of drug transcytosis through the blood-brain barrier.* In: *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 253(2), 884-891

Pastan, I.; Willingham, M.C.; Gottesman, M.M., (1991): *Molecular manipulations of the multidrug transporter: a new role for transgenic mice.* In: *The FASEB Journal* 5, 2523-2528

Pauli-Magnus, C.; von Richter, O.; Burk, O.; Ziegler, A.; Mettang, T.; Eichelbaum, M.; Fromm, M.F., (2000): *Characterization of the major metabolites of Verapamil as substrates and inhibitors of P-glycoprotein.* In: *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 293, 376-382

Paulson, O.B.; Newman, E.A., (1987): *Does the release of potassium from astrocyte endfeet regulate cerebral blood flow ?.* In: *Science* 237, 896-898

Penney, J.B.; Bowman, P.D.; Betz, A.L.; Wolinsky, J.S.; Goldstein, G.W., (1980): *Ultrastructural features of endothelial cells cultured from brain capillaries.* In: *Neurology* 30, 407

Pertoft, H.; Rubin, K.; Kjellen, L.; Laurens, T.C.; Klingeborn, B., (1977): *The viability of cells grown or centrifuged in a new density gradient medium, Percoll.* In: *Experimental Cell Research* 110, 449-457

Phillips, P.; Kumar, P.; Kumar, S.; Waghe, M., (1979): *Isolation and characterization of endothelial cells from rat and cow brain white matter.* In: *Journal of Anatomy* 129(2), 261-272

Pollard, T.D.; Cooper, J.A., (1986): *Actin and actin-binding proteins. A critical evaluation of mechanisms and functions.* In: *Annual Review of Biochemistry* 55, 987-1035

Polli, J.W.; Wring, S.A.; Humphreys, J.E.; Huang, L.; Morgan, J.B.; Webster, L.O.; Serabjit-Singh, C.S., (2001): *Rational use of in vitro P-glycoprotein assays in drug discovery.* In: *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 299(2), 620-628

Polsinelli, M.; Ciferri, O.; Cassani, G.; Albertini, A., (1964): *Mechanism of resistance to actinomycin in bacillus subtilis.* In: *Journal of Bacteriology* 99(6), 1567-1572

Ponec, M.; Kempenaar, J.; Shroot, B.; Caron, J.-C., (1986): *Glucocorticoids: binding affinity and lipophilicity.* In: *Journal of Pharmaceutical Sciences* 75(10), 973-975

Preiss, R., (1998): *P-glycoprotein and related transporters.* In: International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics 36(1), 3-8

Pritchard, J.B.; Sweet, D.H.; Miller, D.S.; Walden, R., (1999): *Mechanism of organic anion transporter across the apical membrane of choroid plexus.* In: The Journal of Biological Chemistry 274(47), 33382-33387

R

Ramu, A.; Pollard, H.B.,Rosario,L.M., (1989): *Doxorubicin resistance in P388 leukemia - evidence for reduced drug influx.* In: International Journal of Cancer 44, 539-547

Rapoport, S.I.; Ohno, K.; Pettigrew, K.D., (1979): *Drug entry into the brain.* In: Brain Research 172, 354-359

Raub, T.J.; Audus, K.L., (1990): *Adsorptive endocytosis and membrane recycling by cultured primary bovine brain microvessel endothelial cell monolayers.* In: Journal of Cell Science 97, 127-138

Raub, T.J.; Kuentzel, S.L.; Sawada, G.A., (1992): *Permeability of bovine brain microvessel endothelial cells in vitro: barrier tightening by a factor released from astroglia cells.* In: Experimental Cell Research 199, 330-340

Rauh, J.; Meyer, J.; Beuckmann, C.; Galla, H.-J., (1992): *Development of an in vitro cell culture system to mimic the blood-brain barrier.* In: Progress in Brain Research 91, 117-121

Raviv, Y.; Pollard, H.B.; Bruggeman, E.P.; Pastan, I.; Gottesman, M.M., (1990): *Photosensitized labeling of a functional multidrug transporter in living drug-resistant tumor cells.* In: The Journal of Biological Chemistry 265(7), 3975-3980

Reese, T.S.; Karnovsky, M.J., (1967): *Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase.* In: The Journal of Cell Biology 34, 207-217

Régina, A.; Demeule, M.; Laplante, A.; Jodoin, J.; Dagenais, C.; Berthelet, F.; Moghrabi, A.; Beliveau, R., (2001): *Multidrug resistance in brain tumors: roles of the blood-brain barrier.* In: Cancer and Metastasis Reviews 20, 13-25

Régina, A.; Koman, A.; Piciotti, M.; El Hafny, B.; Center, M.S.; Bergmann, R.; Couraud, P.-O.; Roux, F., (1998): *Mrp1 multidrug resistance-associated protein and P-glycoprotein expression in rat brain microvessel endothelial cells.* In: Journal of Neurochemistry 71, 705-715

Reichel, A., (2001): *P-glycoprotein in vitro assays and their in vivo relevance.* 3. Blut-Hirn-Schranke Expertentreffen, Bad Herrenalb

Reiners Jr., J.J.; Pavone, A.; Cantu, A.R.; Auerbach, C.; Malkinson, A.M., (1992): *Differential expression of cytochrome P-450 in proliferating and quiescent cultures of murine lung epithelial cells.* In: Biochemical and Biophysical Research Communications 183(1), 193-198

Rim, S.; Audus, K.L.; Borchardt, R.T., (1986): *Relationship of octanol/buffer and octanol/water partition coefficients to transcellular diffusion across brain microvessel endothelial cell monolayers.* In: International Journal of Pharmaceutics 32, 79-84

Risau, W.; Engelhardt, B.; Wekerle, H., (1990): *Immune function of the blood-brain barrier: in complete presentation of protein (auto-)antigens by rat brain microvascular endothelium in vitro.* In: The Journal of Cell Biology 110, 1757-1766

Risau, W.; Wolburg, H., (1990): *Development of the blood-brain barrier.* In: Trends in Neuroscience 13(5), 174-178

Robinson, P.J.; Rapoport, S.I., (1992): *Transport of drugs.* In: Handbook of Experimental Pharmacology 103, 279-300

Robinson, R.A.; Teneyck, C.J.; Hart, M.N., (1986): *Growth control in cerebral microvessel-derived endothelial cells.* In: Brain Research 384, 114-120

Rohen, J.W.; Yokochi, C.; Lütjen-Drecoll, E., (1998): *Anatomie des Menschen, 4. Auflage.* Schattauer Verlag

Romiti, N.; Tongiani, R.; Cervelli, F.; Chieli, E., (1998): *Effects of curcumin on P-glycoprotein in primary cultures of rat hepatocytes.* In: Life Sciences 62(25), 2349-2358

Rose, J.M.; Peckham, S.L.; Scism, J.L.; Audus, K.L., (1998): *Evaluation of the role of P-glycoprotein in ivermectin uptake by primary cultures of bovine brain microvessel endothelial cells.* In: Neurochemical Research 23(2), 203-209

Rosenberg, M.F.; Callaghan, R.; Ford, R.C.; Higgins, C.F., (1997): *Structure of the multidrug resistance P-glycoprotein to 2.5 nm resolution de-termined by electron microscopy and image analysis.* In: The Journal of Biological Chemistry 272(16), 10685-10694

Rothnie, A.; Theron, D.; Soceneantu, L.; Martin, C.; Traikia, M.; Berridge, G.; Higgins, C.F.; Devaux, P.F.; Callaghan, R., (2001): *The importance of cholesterol in maintenance of P-glycoprotein activity and its membrane perturbing influence.* In: European Biophysics Journal 30(6), 430-442

Roux, F.; Durieu-Trautmann, O.; Chaverot, N.; Claire, M.; Mailly, P.; Bourre, J.-M.; Strosberg, A.D.; Couraud, P.-O., (1994): *Regulation of gamma-glutamyl transpeptidase and alkaline phosphatase activities in immortalized rat brain microvessel endothelial cells.* In: Journal of Cellular Physiology 159, 101-113

Roux, MM.E.; Borrel, A., (1898): *Tétanos cérébral et immunité contre le tétanos.* In: Annales de l'Institut Pasteur 4, 225-238

Rubas, W.; Cromwell, M.E.M., (1997): *The effect of chemical modifications on octanol/water partition (log D) and permeabilities across Caco-2 monolayers.* In: *Advanced Drug Delivery Reviews* 23, 157-162

Rubin, L.L.; Hall, D.E.; Porter, S.; Barbu, K.; Cannon, C.; Horner, H.C.; Janatpour, M.; Liaw, C.W.; Manning, K.; Morales, J.; Tanner, L.I.; Tomaselli, K.J.; Bard, F., (1991): *A cell culture model of the blood-brain barrier.* In: *The Journal of Cell Biology* 115(6), 1725-1735

Rupnick, M.A.; Carey, A.; Williams, S.K., (1988): *Phenotypic diversity in cultured cerebral microvascular endothelial cells.* In: *In Vitro Cellular & Developmental Biology* 24(5), 435-444

Rutten, M.J.; Hoover, R.L.; Karnovsky, M.J., (1987): *Electrical resistance and macromolecular permeability of brain endothelial monolayer cultures.* In: *Brain Research* 425, 301-310

S

Saeki, T.; Ueda, K.; Tanigawara, Y.; Hori, R.; Komano, T., (1993): *Human P-glycoprotein transports cyclosporin A and FK506.* In: *The Journal of Biological Chemistry* 268(9), 6077-6080

Saheki, A.; Terasaki, T.; Tamai, I.; Tsuji, A., (1994): *In vivo and in vitro blood-brain barrier transport of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors.* In: *Pharmaceutical Research* 11(2), 305-311

Sakata, A.; Tamai, I.; Kawazu, K.; Deguchi, Y.; Ohnishi, T.; Saheki, A.; Tsuji, A., (1994): *In vivo evidence for ATP-dependent and P-glycoprotein-mediated transport of cyclosporin A at the blood-brain barrier.* In: *Biochemical Pharmacology* 48(10), 1989-1992

Sargent, J.M.; Coley, H.M.; Williamson, C.; Taylor, C., (1998): *Evidence of ABC transporters in fresh tumor cells from patients with ovarian cancer.* In: *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics* 36(1), 64-66

Sarkadi, B.; Müller, M., (1997): *Search for specific inhibitors of multidrug resistance in cancer.* In: *Seminars in Cancer Biology* 8, 171-182

Sarkadi, B.; Müller, M.; Homolya, L.; Hollo, Z.; Seprodi, J.; Germann, U.A.; Gottesman, M.M.; Price, E.M.; Boucher, R.C., (1994): *Interaction of bioactive hydrophobic peptides with the human multidrug transporter.* In: *The FASEB Journal* 8, 766-770

Sato, G.H., (1983): *Divining the role of serum in cell culture.* In: *Hormonally Defined Media. A tool in Cell Biology*, Hrsg. G. Fischer, R.J. Wieser, Springer Verlag, 2-3

Sauna, Z.E.; Ambudkar, S.V., (2000): *Evidence for a requirement for ATP hydrolysis at two distinct steps during a single turnover of the catalytic cycle of human P-glycoprotein.* In: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97(6), 2515-2520

Saunders, N.R.; Dziegielewska, K.M.; Mollgard, K.; Risau, W.; Wolburg, H., (1991): *The importance of the blood-brain barrier in fetuses and embryos.* In: Trends in Neuroscience 14(1), 14-15

Scarborough, G.A., (1995): *Drug-stimulated ATPase activity of the human P-glycoprotein.* In: Journal of Bioenergetics and Biomembranes 27(1), 37-41

Schaaf, S., (2000): *Diagnose und Therapie primärer Hirntumoren, 2. Auflage.* Leipziger Universitätsverlag

Scheulen, M.E., (1998): *Clinical relevance of P-glycoprotein with respect to the application of resistance modifiers.* In: International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics 36(1), 41-46

Schinkel, A.H., (1997): *The physiological function of drug-transporting P-glycoproteins.* In: Seminars in Cancer Biology 8, 161-170

Schinkel, A.H., (1998): *Pharmacological insights from P-glycoprotein knockout mice.* In: International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics 36(1), 9-13

Schinkel, A.H., (1999): *P-Glycoprotein, a gatekeeper in the blood-brain barrier.* In: Advanced Drug Delivery Reviews 36, 179-194

Schinkel, A.H.; Borst, P., (1991): *Multidrug resistance mediated by P-glycoproteins.* In: Seminars in Cancer Biology 8, 213-226

Schinkel, A.H.; Kemp, S.; Dolle, M.; Rudenko, G.; Wagenaar, E., (1993): *N-glycosylation and deletion mutants of the human MDR1 P-glycoprotein.* In: The Journal of Biological Chemistry 268(10), 7474-7481

Schinkel, A.H.; Mayer, U.; Wagenaar, E.; Mol, C.A.A.M.; van Deemter, L.; Smit, J.J.M.; van der Valk, M.A.; Voordouw, A.C.; Spits, H.; van Tellingen, O.; Zijlmans, J.M.J.M.; Fibbe, W.E.; Borst, P., (1997): *Normal viability and altered pharmacokinetics in mice lacking mdr1-type (drug-transporting) P-glycoproteins.* In: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 94(8), 4028-4033

Schinkel, A.H.; Mol, C.A.A.M.; Wagenaar, E.; van Deemter, L.; Smit, J.J.M.; Borst, P., (1995a): *Multidrug resistance and the role of P-glycoprotein knockout mice.* In: European Journal of Cancer 31A(7/8), 1295-1298

Schinkel, A.H.; Roelofs, M.E.M.; Borst, P., (1991): *Characterization of the human MDR3 P-glycoprotein and its recognition by P-glycoprotein-specific monoclonal antibodies.* In: Cancer Research 51, 2628-2635

- Schinkel, A.H.; Smit, J.J.M.; van Tellingen, O.; Beijnen, J.H.; Wagenaar, E.; van Deemter, L.; Mol, C.A.A.M.; van der Valk, M.A.; Robanus-Maandag, E.C.; te Riele, H.P.J.; Berns, A.J.M.; Borst, P., (1994):** *Disruption of the mouse mdr1a P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs.* In: *Cell* 77, 491-502
- Schinkel, A.H.; Wagenaar, E.; Mol, C.A.A.M.; van Deemter, L., (1996):** *P-glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs.* In: *The Journal of Clinical Investigation* 97(11), 2517-2524
- Schinkel, A.H.; Wagenaar, E.; van Deemter, L.; Mol, C.A.A.M.; Borst, P., (1995b):** *Absence of the mdr1a P-glycoprotein in mice affects tissue distribution and pharmacokinetics of dexamethasone, digoxin, and cyclosporin A.* In: *Journal of Clinical Investigation* 96, 1698-1705
- Schlosshauer, B., (1993):** *The blood-brain barrier: Morphology, molecules and neurothelin.* In: *BioEssays* 15(5), 341-346
- Schor, A.M.; Schor, S.L., (1986):** *The isolation and culture of endothelial and pericytes from the bovine retinal microvasculature: a comparative study with large vessel vascular cells.* In: *Microvascular Research* 32, 21-38
- Schroeter, M.L.; Mertsch, K.; Giese, H.; Müller, S.; Sporbert, A.; Hickel, B.; Blasig, I.E., (1999):** *Astrocytes enhance radical defence in capillary endothelial cells constituting the blood-brain barrier.* In: *FEBS Letters* 449, 241-244
- Schulze, C.; Smales, C.; Rubin, L.L.; Staddon, J.M., (1997):** *Lysophosphatidic acid increases tight junction permeability in cultured brain endothelial cells.* In: *Journal of Neurochemistry* 68, 991-1000
- Schumacher, U.; Mollgård, K., (1997):** *The multidrug-resistance P-glycoprotein (Pgp, MDR1) is an early marker of blood-brain barrier development in the microvessels of the developing human brain.* In: *Histochemistry and Cell Biology* 108, 179-182
- Schwarz, U.I.; Gramatte, T.; Krappweis, J.; Oertel, R.; Kirch, W., (2000):** *P-glycoprotein inhibitor erythromycin increases oral bioavailability of talinolol in humans.* In: *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics* 38(4), 161-167
- Seelig, A., (1998):** *A general pattern for substrate recognition by P-glycoprotein.* In: *European Journal of Biochemistry* 251, 252-261
- Seelig, A.; Landwojtowicz, E., (2000):** *Structure-activity relationship of P-glycoprotein substrates and modifiers.* In: *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 12, 31-40
- Seetharaman, S.; Barrand, M.A.; Maskell, L.; Scheper, R.J., (1998a):** *Multidrug resistance-related transport proteins in isolated human brain microvessels and in cells cultured from these isolates.* In: *Journal of Neurochemistry* 70(3), 1151-1159

- Seetharaman, S.; Maskell, L.; Scheper, R.J.; Barrand, M.A., (1998b):** *Changes in multidrug transporter protein expression in endothelial cells cultured from isolated human brain microvessels.* In: *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics* 36(2), 81-83
- Senior, A.E.; Gadsby, D.C., (1997):** *ATP hydrolysis and mechanism in P-glycoprotein and CFTR.* In: *Seminars in Cancer Biology* 8, 143-150
- Shah, M.V.; Audus, K.L.; Borchardt, R.T., (1989):** *The application of bovine brain microvessel endothelial-cell monolayers grown onto polycarbonate membranes in vitro to estimate the potential permeability of solutes through the blood-brain barrier.* In: *Pharmaceutical Research* 6(7), 624-627
- Shapiro, A.B.; Fox, K.; Lam, P.; Ling, V., (1999):** *Stimulation of P-glycoprotein-mediated drug transport by prazosin and progesterone - evidence for a third drug-binding site.* In: *European Journal of Biochemistry* 259, 841-850
- Sharom, F.J., (1997):** *The P-glycoprotein efflux pump: how does it transport drugs ?.* In: *Journal of Membrane Biology* 160, 161-175
- Sharom, F.J.; Liu, R.; Romsicki, Y.; Lu, P., (1999):** *Insights into the structure and substrate interactions of the P-glycoprotein multidrug transporter from spectroscopic studies.* In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1461, 327-345
- Shi, F.; Audus, K.L., (1994):** *Biochemical characteristics of primary and passaged cultures of primate brain microvessel endothelial cells.* In: *Neurochemical Research* 19(4), 427-433
- Shirai, A.; Naito, M.; Tatsuta, T.; Dong, J.; Hanaoka, K.; Mikami, K.; Ohara, T.; Tsuro, T., (1994):** *Transport of cyclosporin A across the brain capillary endothelial cell monolayer by P-glycoprotein.* In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1222, 400-404
- Sikic, B.I., (1993):** *Modulation of multidrug resistance: at the threshold.* In: *Journal of Clinical Oncology* 11(9), 1629-1635
- Sims, D.E., (1986):** *The pericyte - a review.* In: *Tissue & Cell* 18(2), 153-174
- Sinicrope, F.A.; Dudeja, P.K.; Bissonnette, B.M.; Safa, A.R.; Brasitus, T.A., (1992):** *Modulation of P-glycoprotein-mediated drug transport by alterations in lipid fluidity of rat liver canalicular membrane vesicles.* In: *The Journal of Biological Chemistry* 267(35), 24995-25002
- Slotnick, I.J.; Sells, B.H., (1964):** *Actinomycin resistance in bacillus subtilis.* In: *Science* 146, 407-408
- Smit, J.J.M.; Schinkel, A.H.; Oude Elferink, R.P.J.; Groen, A.K.; Wagenaar, E.; van Deemter, L.; Mol, C.A.A.M.; Ottenhoff, R.; van der Lugt, N.M.T.; van Roon, M.A.; van der Valk, M.A.; Offerhaus, G.J.A.; Berns, A.J.M.; Borst, P., (1993):** *Homozygous disruption of the murine mdr2 P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease.* In: *Cell* 75, 451-462

- Smith, Q.R.; Rapoport, S.I., (1986):** *Cerebrovascular permeability coefficients to sodium, potassium and chloride.* In: *Journal of Neurochemistry* 46, 1732-1742
- Sorg, B., (2001):** *Synthese, Charakterisierung und pharmakologische Untersuchung zucker-verbundener Therapeutika zur zielgerichteten Therapie von Krebserkrankungen.* Dissertation, DKFZ Heidelberg
- Spahn-Langguth, H.; Langguth, P., (2001):** *Grapefruit juice enhances intestinal absorption of the P-glycoprotein substrate talinolol.* In: *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 12, 361-367
- Spatz, H., (1933):** *Die Bedeutung der vitalen Färbung für die Lehre vom Stoffaustausch zwischen dem Zentralnervensystem und dem übrigen Körper.* In: *Archiv für Psychiatrie* 101, 267-358
- Spatz, M.; Bembry, J.; Dodson, R.F.; Hervonen, H.; Murray, M.R., (1980):** *Endothelial cell cultures derived from isolated cerebral microvessels.* In: *Brain Research* 191, 577-582
- Spoelstra, E.C.; Westerhoff, H.V.; Pinedo, H.M.; Dekker, H.; Lankelma, J., (1994):** *The multidrug-resistance-reverser verapamil interferes with cellular P-glycoprotein-mediated pumping of daunorubicin as a non-competing substrate.* In: *European Journal of Biochemistry* 221, 363-373
- Staddon, J.M.; Rubin, L.L., (1996):** *Cell adhesion, cell junctions and the blood-brain barrier.* In: *Current Opinion in Neurobiology* 6, 622-627
- Staddon, J.M.; Rubin, L.L., (1999):** *The cell biology of the blood-brain barrier.* In: *Annual Review of Neuroscience* 22, 11-28
- Stanness, K.A.; Guatteo, E.; Janigro, D., (1996):** *A dynamic model of the blood-brain barrier "in vitro".* In: *NeuroToxicology* 17(2), 481-496
- Stanness, K.A.; Neumaier, J.F.; Sexton, T.J.; Grant, G.A.; Emmi, A.; Maris, D.O.; Janigro, D., (1999):** *A new model of the blood-brain barrier: co-culture of neuronal, endothelial and glial cells under dynamic conditions.* In: *Neuroreport* 10, 3725-3731
- Stanness, K.A.; Westrum, L.E.; Fornaciari, E.; Mascagni, P.; Nelson, J.A.; Stenglein, S.G.; Myers, T.; Janigro, D., (1997):** *Morphological and functional characterization of an in vitro blood-brain barrier model.* In: *Brain Research* 771, 329-342
- Stein, W.D., (1997):** *Kinetics of the multidrug transporter (P-glycoprotein) and its reversal.* In: *Physiological Review* 77(2), 545-590
- Steinhausen, M., (1993):** *Medizinische Physiologie, 3. Auflage.* Gustav Fischer Verlag
- Stern, L., (1921):** *Le liquide céphalorachidien au point de vue de ses rapports avec la circulation sanguine et avec les éléments nerveux de l'axe cérébrospinal.* In: *Schweizer Archiv für Neurologie* 8, 215-232

Stewart, P.A.; Beliveau, R.; Rogers, K.A., (1996): *Cellular localization of P-glycoprotein in brain versus gonadal capillaries.* In: The Journal of Histochemistry and Cytochemistry 44(7), 679-685

Stewart, P.A.; Wiley, M.J., (1981): *Developing nervous tissue induces formation of blood-brain barrier characteristics in invading endothelial cells: a study using quail-chick transplantation chimeras.* In: Developmental Biology 84, 183-192

Strom, S.C.; Michalopoulos, G., (1982): *Collagen as a substrate for cell growth and differentiation.* In: Methods in Enzymology 82, 544-555

Sugiyama, Y.; Kushihara, H.; Suzuki, H., (1999): *Kinetic and biochemical analysis of carrier-mediated efflux of drugs through the blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers: importance in the drug delivery to the brain.* In: Journal of Controlled Release 62, 179-186

Suzuki, H.; Terasaki, T.; Sugiyama, Y., (1997): *Role of efflux transport across the blood-brain barrier and blood-cerebrospinal fluid barrier on the disposition of xenobiotics in the central nervous system.* In: Advanced Drug Delivery Reviews 25, 257-285

T

Takakura, Y.; Audus, K.L.; Borchardt, R.T., (1991): *Blood-brain barrier: transport studies in isolated brain capillaries and in cultured brain endothelial cells.* In: Advances in Pharmacology 22, 137-165

Takaoka, T.; Yasumoto, S.; Katsuta, H., (1975): *A simple method for the cultivation of rat liver cells.* In: The Japanese Journal of Experimental Medicine 45(5), 317-326

Tanigawara, Y., (2000): *Role of P-glycoprotein in drug disposition.* In: Therapeutic Drug Monitoring 22, 137-140

Tao-Cheng, J.-H.; Nagy, Z.; Brightman, M.W., (1987): *Tight junctions of brain endothelium in vitro are enhanced by astroglia.* In: The Journal of Neuroscience 7(10), 3293-3299

Tatsuta, T.; Naito, M.; Ohara, T.; Sugawara, I.; Tsuruo, T., (1992): *Functional involvement of P-glycoprotein in blood-brain barrier.* In: The Journal of Biological Chemistry 267(28), 20383-20391

Taylor, A.M.; Storm, J.; Soceneantu, L.; Linton, K.J.; Gabriel, M.; Martin, C.; Woodhouse, J.; Blott, E.; Higgins, C.F.; Callaghan, R., (2001): *Detailed characterization of cysteine-less P-glycoprotein reveals subtle pharmacological differences in function from wild-type protein.* In: British Journal of Pharmacology 134, 1609-1618

Teifel, M.; Friedl, P., (1996): *Establishment of the permanent microvascular endothelial cell line PBMEC/C1-2 from porcine brains.* In: Experimental Cell Research 228, 50-57

- Tennant, J.R., (1964):** *Evaluation of the trypan blue technique for determination of cell viability.* In: Transplantation 2(6), 685-694
- Terasaki, T.; Hosoya, K., (1999):** *The blood-brain barrier efflux transporters as a detoxifying system for the brain.* In: Advanced Drug Delivery Reviews 36, 195-209
- Terasaki, T.; Tsuji, A., (1994):** *Drug delivery to the brain utilizing blood-brain barrier transport systems.* In: Journal of Controlled Release 29, 163-169
- Tewes, B.; Franke, H.; Hellwig, S.; Hoheisel, D.; Decker, S.; Griesche, D.; Tilling, T.; Wegener, J.; Galla, H.-J., (1997):** *Preparation of endothelial cells in primary cultures obtained from the brains of 6-month-old pigs.* In: Drug transport across the blood-brain barrier: in vitro and in vivo techniques, de Boer A.G. and Sutanto W., eds, Harwood Academic Publishers, Amsterdam, 91-97
- Theis, J.G.W.; Chan, H.S.L.; Greenberg, M.L.; Malkin, D.; Karaskov, V.; Moncica, I.; Koren, G.; Doyle, J., (1998):** *Increased systemic toxicity of sarcoma chemotherapy due to combination with the P-glycoprotein inhibitor cyclosporin.* In: International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics 36(2), 61-64
- Thews, G.; Mutschler, E.; Vaupel, P., (1999):** *Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie des Menschen, 5. Auflage.* Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart
- Thiebaut, F.; Tsuruo, T.; Hamada, H.; Gottesman, M.M.; Pastan, I.; Willingham, M.C., (1989):** *Immunohistochemical localization in normal tissue of different epitopes in the multidrug transport protein P170: evidence for localization in brain capillaries and crossreactivity of one antibody with a muscle protein.* In: The Journal of Histochemistry and Cytochemistry 37, 159-164
- Thiebaut, F.; Tsuruo, T.; Hamada, H.; Gottesman, M.M.; Pastan, I.; Willingham, M.C., (1987):** *Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissue.* In: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 84, 7735-7738
- Thöle, M., (2000):** *Arzneistofftransport and der Blut-Hirn Schranke: Drug Targeting mit liposomalen Konjugaten.* Dissertation, Universität Heidelberg
- Thyberg, J., (1996):** *Differentiated properties and proliferation of arterial smooth muscle cells in culture.* In: International Review of Cytology 169, 183-267
- Tiberghien, F.; Loo, F., (1996):** *Ranking of P-glycoprotein substrates and inhibitors by a calcein-AM fluorometry screening assay.* In: Anti-Cancer Drugs 7, 568-578
- Tilling, T.; Korte, D.; Hoheisel, D.; Galla, H.-J., (1998):** *Basement membrane proteins influence brain capillary endothelial barrier function in vitro.* In: Journal of Neurochemistry 71,
- Tontsch, U.; Bauer, H.-C., (1991):** *Glial cells and neurons induce blood-brain barrier related enzymes in cultured cerebral endothelial cells.* In: Brain Research 539, 247-253

Tontsch, U.; Bauer, H.-C., (1989): *Isolation, characterization and long-term cultivation of porcine and murine cerebral capillary endothelial cells.* In: *Microvascular Research* 37, 148-161

Török, M., (1996): *Permeability and transport of clonidine and benzylpenicillin across the blood-brain barrier.* Diplomarbeit, Basel

Török, M., (1999): *Molecular and functional aspects of cerebral microvascular endothelial cells in culture.* Dissertation, Basel

Török, M.; Gutmann, H.; Fricker, G.; Drewe, J., (1999): *Sister of P-glycoprotein expression in different tissues.* In: *Biochemical Pharmacology* 57, 833-835

Török, M.; Huwyler, J.; Drewe, J.; Gutmann, H.; Fricker, G., (1998): *Transport of the β -lactam antibiotic benzylpenicillin and the dipeptide glycylsarcosine by brain capillary endothelial cells in vitro.* In: *Drug Metabolism and Disposition* 26(11), 1144-1148

Triguero, D.; Buciak, J.; Pardridge, W.M., (1990): *Capillary depletion method for quantification of blood-brain barrier transport of circulating peptides and plasma proteins.* In: *Journal of Neurochemistry* 54, 1882-1888

Tsuji, A., (1998): *P-glycoprotein-mediated efflux transport of anticancer drugs at the blood-brain barrier.* In: *Therapeutic Drug Monitoring* 20(5), 588-590

Tsuji, A.; Tamai, I., (1999): *Carrier-mediated or specialized transport of drugs across the blood-brain barrier.* In: *Advanced Drug Delivery Reviews* 36, 277-290

Tsuji, A.; Tamai, I., (1997): *Blood-brain barrier function of P-glycoprotein.* In: *Advanced Drug Delivery Reviews* 25, 287-298

Tsuji, A.; Tamai, I.; Sakata, A.; Tenda, Y.; Terasaki, T., (1993): *Restricted transport of cyclosporin A across the blood-brain barrier by a multidrug transporter, P-glycoprotein.* In: *Biochemical Pharmacology* 46(6), 1096-1099

Tsuji, A.; Terasaki, T.; Takabatake, Y.; Tenda, Y.; Tamai, I.; Yamashima, T.; Moritani, S.; Tsuruo, T.; Yamashita, J., (1992): *P-glycoprotein as the drug efflux pump in primary cultured bovine brain capillary endothelial cells.* In: *Life Sciences* 51(18), 1427-1437

Tsuruo, T.; Iida, H.; Tsukagoshi, S.; Sakurai, Y., (1981): *Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia in vivo and in vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil.* In: *Cancer Research* 41, 1967-1972

Tunggal, J.K.; Melo, T.; Ballinger, J.R.; Tannock, I.F., (2000): *The influence of expression of P-glycoprotein on the penetration of anticancer drugs through multicellular layers.* In: *International Journal of Cancer* 86, 101-107

Twentyman, P.R., (1992): *Cyclosporins as drug resistance modifiers.* In: *Biochemical Pharmacology* 43(1), 109-117

Twentyman, P.R.; Versantvoort, C.H.M., (1996): *Experimental modulation of MRP (multidrug resistance-associated protein)-mediated resistance.* In: *European Journal of Cancer* 32a(6), 1002-1009

U

Ueda, K.; Cornwell, M.M.; Gottesman, M.M.; Pastan, I.; Roninson, I.B.; Ling, V.; Riordan, J.R., (1986): *The mdr1 gene, responsible for multidrug-resistance, codes for P-glycoprotein.* In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 141(3), 956-962

Ueda, K.; Taguchi, Y.; Morishima, M., (1997): *How does P-glycoprotein recognize its substrates ?.* In: *Seminars in Cancer Biology* 8, 151-159

Ueda, K.; Yoshida, A.; Amachi, T., (1999): *Recent progress in P-glycoprotein research.* In: *Anti-Cancer Drug Design* 14, 115-121

Uyeda, C.T.; Eng, L.F.; Bignami, A., (1972): *Immunological study of the glial fibrillary acidic protein.* In: *Brain Research* 37, 81-89

V

Valverde, M.A.; Bond, T.D.; Hardy, S.P.; Taylor, J.C.; Higgins, C.F.; Altamirano, J.; Alvarez-Leefmans, F.J., (1996): *The multidrug resistance P-glycoprotein modulates cell regulatory volume decrease.* In: *The EMBO Journal* 15(17), 4460-4468

Valverde, M.A.; Diaz, M.; Sepulveda, F.V.; Gill, D.R.; Hyde, S.C.; Higgins, C.F., (1992): *Volume-regulated chloride channels associated with the human multidrug-resistance P-glycoprotein.* In: *Nature* 355, 830-833

van Asperen, J.; Mayer, U.; van Tellingen, O.; Beijnen, J.H., (1997a): *The functional role of P-glycoprotein in the blood-brain barrier.* In: *Journal of Pharmaceutical Sciences* 86(8), 881-884

van Asperen, J.; van Tellingen, O.; Sparreboom, A.; Schinkel, A.H.; Nooijen, W.J.; Beijnen, J.H., (1997b): *Enhanced oral bioavailability of paclitaxel in mice treated with the P-glycoprotein blocker SDZ PSC 833.* In: *British Journal of Cancer* 76(9), 1181-1183

van Bree, J.B.M.M.; Audus, K.L.; Borchardt, R.T., (1988b): *Carrier-mediated transport of baclofen across monolayers of bovine brain endothelial cells in primary culture.* In: *Pharmaceutical Research* 5(6), 369-371

van Bree, J.B.M.M.; de Boer, A.G.; Danhof, M.; Breimer, D.D., (1992a): *Drug transport across the blood-brain barrier. I. Anatomical and physiological aspects.* In: *Pharmaceutisch Weekblad Scientific Edition* 14(5), 305-310

van Bree, J.B.M.M.; de Boer, A.G.; Danhof, M.; Breimer, D.D., (1992b): *Drug transport across the blood-brain barrier. II. Experimental techniques to study drug transport.* In: Pharmaceutisch Weekblad Scientific Edition 14(6), 338-348

van Bree, J.B.M.M.; de Boer, A.G.; Danhof, M.; Breimer, D.D., (1993): *Drug transport across the blood-brain barrier. III. Mechanisms and methods to improve drug delivery to the central nervous system.* In: Pharmacy World & Science 15(1), 2-9

van Bree, J.B.M.M.; de Boer, A.G.; Danhof, M.; Ginsel, L.A.; Breimer, D.D., (1988a): *Characterization of an "in vitro" blood-brain barrier: effects of molecular size and lipophilicity on cerebrovascular endothelial transport rates of drugs.* In: The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 247(3), 1233-1239

van Tellingen, O., (2001): *The importance of drug-transporting P-glycoproteins in toxicology.* In: Toxicology Letters 120, 31-41

van Veen, H.W.; Callaghan, R.; Soceneantu, L.; Sardini, A.; Konings, W.N.; Higgins, C.F., (1998): *A bacterial antibiotic-resistance gene that complements the human multi-drug-resistance P-glycoprotein gene.* In: Nature 391, 291-295

van Zuylen, L.; Sparreboom, A.; vanderGaast, A.; van der Burg, M.E.L.; van Beurden, V.; Bol, C.J.; Woestenborghs, R.; Palmer, P.A.; Verweij, J., (2000): *The orally administered P-glycoprotein inhibitor R101933 does not alter the plasma pharmacokinetics of docetaxel.* In: Clinical Cancer Research 6, 1365-1371

W

Wacher, V.J.; Wu, C.-Y.; Benet, L.Z., (1995): *Overlapping substrate specificities and tissue distribution of cytochrome P450 3A and P-glycoprotein: implications for drug delivery and activity in cancer chemotherapy.* In: Molecular Carcinogenesis 13, 129-134

Wagner, D.D.; Olmsted, J.B.; Marder, V.J., (1982): *Immunolocalization of von Willebrand protein in Weibel-Palade bodies of human endothelial cells.* In: The Journal of Cell Biology 95, 355-360

Walker, I.; Nicholls, D.; Irwin, W.J.; Freeman, S., (1994): *Drug delivery via active transport at the blood-brain barrier: affinity of a prodrug of phosphonoformate for the large amino acid transporter.* In: International Journal of Pharmaceutics 104, 157-167

Walker, J.E.; Saraste, M.; Runswick, M.J.; Gay, N.J., (1982): *Distantly related sequences in the a- and b-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold.* In: The EMBO Journal 1(8), 945-951

Walter, F.K., (1929): *Die Blut-Liquorschranke – eine physiologische und klinisch Studie.* Georg Thieme Verlag

-
- Walter, F.K., (1933):** *Die allgemeinen Grundlagen des Stoffaustausches zwischen dem Zentralnervensystem und dem übrigen Körper.* In: Archiv für Psychiatrie 101, 195-230
- Wang, E.-J.; Casciano, C.N.; Clement, R.P.; Johnson, W.W., (2001a):** *Inhibition of P-glycoprotein transport function by grapefruit juice psoralen.* In: Pharmaceutical Research 18(4), 432-438
- Wang, E.; Casciano, C.N.; Clement, R.P.; Johnson, W.W., (2001b):** *Active transport of fluorescent P-glycoprotein substrates: evaluation as markers and interaction with inhibitors.* In: Biochemical and Biophysical Research Communications 289, 580-585
- Wang, E.; Casciano, C.N.; Clement, R.P.; Johnson, W.W., (2001c):** *HMG-CoA reductase inhibitors (statins) characterized as direct inhibitors of P-glycoprotein.* In: Pharmaceutical Research 18(6), 800-806
- Wegener, J.; Sieber, M.; Galla, H.-J., (1996):** *Impedance analysis of epithelial and endothelial cell monolayers cultured on gold surfaces.* In: Journal of Biochemical and Biophysical Methods 32, 151-170
- Weibel, E.R.; Palade, G.E., (1964):** *New cytoplasmic components in arterial endothelia.* In: The Journal of Cell Biology 23, 101-112
- Weiler-Güttler, H.; Zinke, H.; Möckel, B.; Frey, A.; Gassen, H.G., (1989):** *cDNA cloning and sequence analysis of the glucose transporter from porcine blood-brain barrier.* In: Biological Chemistry Hoppe-Seyler 370, 467-473
- Werner, J., (1984):** *Medizinische Statistik.* Urban & Schwarzenberg Verlag
- White, F.P.; Dutton, G.R.; Norenberg, M.D., (1981):** *Microvessels isolated from rat brain: localization of astrocyte processes by immunohistochemical techniques.* In: Journal of Neurochemistry 36(1), 328-332
- Wieser, R.J.; Schütz, S.; Tschank, G.; Thomas, H.; Dienes, H.-P.; Oesch, F., (1990):** *Isolation and characterization of a 60-70-kDa plasma membrane glycoprotein involved in the contact-dependent inhibition of growth.* In: The Journal of Cell Biology 111(6), 2681-2692
- Wigler, P.W., (1999):** *PSC833, cyclosporin A and dexniguldipine effects on cellular calcinein retention and inhibition of the multidrug resistance pump in human leukemic lymphoblasts.* In: Biochemical and Biophysical Research Communications 257, 410-413
- Williams, S.K.; Gillis, J.F.; Matthews, M.A.; Wagner, R.C.; Bitensky, M.W., (1980):** *Isolation and characterization of brain endothelial cells: morphology and enzyme activity.* In: Journal of Neurochemistry 35(2), 374-381
- Wolburg, H.; Neuhaus, J.; Kniesel, U.; Krauß, B.; Schmid, E.-M.; Öcalan, M.; Farrell, C.; Risau, W., (1994):** *Modulation of tight junction structure in blood-brain barrier endothelial cells.* In: Journal of Cell Science 107, 1347-1357

Wolf, S.; Seehaus, B.; Minol, K.; Gassen, H.G., (1996): *Die Blut-Hirn-Schranke: Eine Besonderheit des cerebralen Mikrozirkulationssystems.* In: *Naturwissenschaften* 83, 302-311

Wu, D.; Pardridge, W.M., (1999): *Blood-brain barrier transport of reduced folic acid.* In: *Pharmaceutical Research* 16(3), 415-419

Y

Yamada, K.M., (1983): *Cell surface interactions with extracellular materials.* In: *Annual Review of Biochemistry* 52, 761-799

Yamazaki, M.; Neway, W.E.; Ohe, T.; Chen, I.; Rowe, J.F.; Hochman, J.H.; Chiba, M.; Lin, J.H., (2001): *In vitro substrat identification studies for P-glycoprotein-mediated transport: species difference and predictability of in vivo results.* In: *The Journal of Pharmacology and Experimental Pharmaceutics* 296(3), 723-735

Yang, J.J.; Kim, K.-J.; Lee, V.H.L., (2000): *Role of P-glycoprotein in restricting Propranolol transport in cultured rabbit conjunctival epithelial cell layers.* In: *Pharmaceutical Research* 17(5), 533-538

Young, R.C.; Mitchell, R.C.; Brown, T.H.; Ganellin, C.R.; Griffiths, R.; Jones, M.; Rana, K.K.; Saunders, D.; Smith, I.R.; Sore, N.E.; Wilks, T.J., (1988): *Development of a new physicochemical model for brain penetration and its application to the design of centrally acting H₂ receptor histamine antagonists.* In: *Journal of Medicinal Chemistry* 31(3), 656-671

Yu, H.; Sinko, P.J., (1997): *Influence of the microporous substratum and hydrodynamics on resistances to drug transport in cell culture systems: calculation of intrinsic transport parameters.* In: *Journal of Pharmaceutical Sciences* 86(12), 1448-1457

Z

Zhang, Y.; Han, H.; Elmquist, W.F.; Miller, D.W., (2000): *Expression of various multi-drug resistance-associated protein (MRP) homologues in brain microvessel endothelial cells.* In: *Brain Research* 876, 148-153

Zlokovic, B.V.; Apuzzo, M.L.J., (1998): *Strategies to circumvent vascular barriers of the central nervous system.* In: *Neurosurgery* 43(4), 877-878

Zordan-Nudo, T.; Ling, V.; Liu, Z.; Georges, E., (1993): *Effects of nonionic detergents on P-glycoprotein drug binding and reversal of multidrug resistance.* In: *Cancer Research* 53, 5994-6000