

# Transport- und Biotransformationsstudien mit Amidinprodrugs



Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Ulrike Schwering

Kiel, 2010

Referent:

Prof. Dr. B. Clement

Korreferent:

Prof. Dr. T. Kunze

Tag der mündlichen Prüfung:

27. Juli 2010

Zum Druck genehmigt:

27. Juli 2010

Prof. Dr. Lutz Kipp  
(Dekan)

Meiner Großmutter

Lucie Gehner



„In der Wissenschaft gleichen wir alle nur den Kindern,  
die am Rande des Wissens hier und da einen Kiesel aufheben,  
während sich der weite Ozean des Unbekannten vor unseren Augen erstreckt.“

Isaac Newton



<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1 BIOTRANSFORMATION</b>	<b>3</b>
<b>1.2 BIOTRANSFORMATIONSREAKTIONEN</b>	<b>3</b>
<b>1.3 DAS PRODRUGPRINZIP</b>	<b>4</b>
<b>2. TRANSPORT- UND PERMEABILITÄTSSTUDIEN MIT PENTAMIDIN UND DESSEN PRODRUGS IN CACO-2 ZELLEN</b>	<b>5</b>
<b>2.1 EINLEITUNG</b>	<b>5</b>
2.1.1 GRUNDLAGEN DES ABSORPTIONSVORGANGS	5
2.1.2 ANATOMIE DES DÜNNDARMS	5
2.1.3 RESORPTIONSBARRIEREN UND -MECHANISMEN IM DÜNNDARM	6
2.1.3.1 Resorptionsbarrieren auf zellulärer Ebene	6
2.1.3.2 Resorptionsmechanismen	9
2.1.3.3 Funktionelle Resorptionsbarrieren	10
2.1.3.4 ATP-binding cassette (ABC) Transportproteine	11
2.1.3.5 Enzymatische Resorptionsbarrieren	11
2.1.4 ABSORPTIONSMODELLE	11
2.1.4.1 <i>In vivo</i> Modelle	11
2.1.4.2 <i>In situ</i> Modelle	12
2.1.4.3 <i>In vitro</i> Modelle	12
2.1.4.3.1 Everted gut sac Methode	12
2.1.4.3.2 Ussing Kammer	12
2.1.4.3.3 Zellkulturmodelle	13
2.1.5 CACO-2 ZELLEN	13
2.1.6 BIOPHARMAZEUTISCHES KLASSIFIZIERUNGSSYSTEM	14
2.1.7 PARASITÄRE ERKRANKUNGEN	15
2.1.7.1 Afrikanische Schlafkrankheit	15
2.1.7.2 Leishmaniose	20
2.1.7.3 Malaria	20
2.1.7.4 Pneumocystis Pneumonie	22
2.1.8 ARZNEISTOFFPROFIL DES PENTAMIDINS	22
2.1.8.1 Pharmakodynamik	23
2.1.8.1.1 Wirkmechanismus	23
2.1.8.1.2 Nebenwirkungen	24
2.1.8.2 Pharmakokinetik	25

2.1.8.2.1	Absorption und Aufnahme	25
2.1.8.2.2	Verteilung und Elimination	26
2.1.9	PRODRUGS VOM PENTAMIDIN	26
<b>2.2</b>	<b>ZIELSETZUNG</b>	<b>29</b>
<b>2.3</b>	<b>METHODEN</b>	<b>30</b>
2.3.1	<i>IN VITRO</i> STUDIEN MIT CACO-2 ZELLEN	30
2.3.1.1	Zellkultur	30
2.3.1.2	Anzucht der Zellen	30
2.3.1.3	Zellzahlbestimmung	31
2.3.1.4	Passagieren der Zellen	31
2.3.1.5	Kryokonservierung	32
2.3.1.6	Auftauen der Zellen	33
2.3.1.7	Charakterisierung der Zellen	33
2.3.1.7.1	Zellwachstum und Erscheinungsbild	33
2.3.1.7.2	Bestimmung des transepithelialen Widerstandes	33
2.3.1.7.3	Bestimmung der Diffusion von parazellulären Markern durch den Zellmonolayer	34
2.3.1.8	Aufnahme- und Effluxversuche	35
2.3.1.8.1	Anzucht der Zellen	35
2.3.1.8.2	Versuchsdurchführung	35
2.3.1.8.2.1	Aufnahmeversuche	35
2.3.1.8.2.2	Effluxversuche	36
2.3.1.8.2.3	Bestimmung des Proteingehalts	37
2.3.1.9	Permeabilitätsversuche	38
2.3.1.9.1	Anzucht der Zellen	38
2.3.1.9.2	Allgemeine Versuchsdurchführung	38
2.3.1.9.2.1	Vorbereitung	38
2.3.1.9.2.2	Transportversuche: apikal nach basolateral	39
2.3.1.9.2.3	Transportversuche: basolateral nach apikal	40
2.3.1.10	HPLC Analytik	41
2.3.1.10.1	Analytik zur Trennung von Pentoximester, Diamidoxim, Monoamidoxim und Pentamidin	41
2.3.1.10.2	Kalibrierung	42
2.3.1.10.3	Analytik für O-Succinylpentamidin, Valpentamidin und O-Carboxymethylpentamidin	42
2.3.2	<i>IN VITRO</i> STUDIEN MIT ENZYMQUELLEN	43
2.3.2.1	Gewinnung porciner Lebermikrosomen	43
2.3.2.2	Inkubationen mit porcinen Lebermikrosomen	43



2.3.2.3 HPLC Analytik	44
2.3.2.3.1 Analytik zur Trennung von Diamidoxim, Monoamidoxim und Pentamidin	44
2.3.2.3.2 Kalibrierung und Wiederfindung	45
<b>2.4 ERGEBNISSE</b>	<b>46</b>
2.4.1 VERGLEICH DER ABLÖSEMETHODEN DER ZELLEN	46
2.4.2 AUFNAHME- UND EFFLUXSTUDIEN	48
2.4.2.1 Pentamidin	48
2.4.2.2 Diamidoxim	54
2.4.2.3 Diamidoxim mit porcinen Lebermikrosomen	60
2.4.2.4 Pentoximester	61
2.4.2.5 O-Carboxymethylpentamidin	66
2.4.2.6 O-Succinylpentamidin	68
2.4.2.7 Valpentamidin	69
2.4.3 PERMEABILITÄTSSTUDIEN	70
2.4.3.1 Pentamidin	70
2.4.3.2 Monoamidoxim	72
2.4.3.3 Diamidoxim	73
2.4.3.4 O-Carboxymethylpentamidin	74
2.4.3.5 O-Succinylpentamidin	76
2.4.3.6 Valpentamidin	77
<b>2.5 DISKUSSION</b>	<b>78</b>
<b>3. QUANTIFIZIERUNG VON MARC</b>	<b>84</b>
<b>3.1 EINLEITUNG</b>	<b>84</b>
3.1.1 REDUKTION <i>N</i> -HYDROXYLIERTER VERBINDUNGEN	84
3.1.2 MOLYBDOENZYME	85
3.1.2.1 <i>N</i> -reduktiver Metabolismus der Molybdoenzyme	87
3.1.2.2 Mitochondriale Amidoxim reduzierende Komponente mARC	87
3.1.3 SCHILDDRÜSE	89
3.1.4 BLUT	90
3.1.5 HEK-293 ZELLEN	92
<b>3.2 THEMA UND ZIELSETZUNG</b>	<b>93</b>
<b>3.3 METHODEN</b>	<b>97</b>
3.3.1 KULTIVIERUNG VON HEK-293 ZELLEN	97
3.3.2 AUFNAHME- UND METABOLISMUSSTUDIEN MIT HEK-293 ZELLEN	97
3.3.3 ISOLIERUNG PRIMÄRER SCHILDDRÜSENFOLLIKEL	98
3.3.4 KULTIVIERUNG PRIMÄRER SCHILDDRÜSENFOLLIKEL	101

## Inhaltsverzeichnis

---

3.3.5	KULTIVIERUNG VERSCHIEDENER SCHILDDRÜSENZELLINIEN	101
3.3.6	ISOLIERUNG PRIMÄRER PORCINER HEPATOZYTEN	103
3.3.7	KULTIVIERUNG PRIMÄRER PORCINER HEPATOZYTEN	104
3.3.8	GEWINNUNG VERSCHIEDENER HUMANER BLUTZELLEN	105
3.3.9	SUBSTRATABHÄNGIGE UNTERSUCHUNGEN MIT HUMANEN BLUTZELLEN	106
3.3.10	BLUTZELLUNTERSUCHUNGEN HINSICHTLICH MARC 1	106
3.3.11	HPLC-ANALYTIK ZUR TRENNUNG VON BENZAMIDOXIM UND BENZAMIDIN AUS ZELLKULTURPROBEN	107
3.3.12	KALIBRIERUNG	107
3.3.13	BERECHNUNG DER MICHAELIS-MENTEN-PARAMETER	108
3.3.14	INHIBITIONSSTUDIEN MIT PORCINEN LEBERMITOCHONDRIEN	108
3.3.15	HPLC-ANALYTIK ZUR TRENNUNG VON BENZAMIDOXIM UND BENZAMIDIN AUS NADH- HALTIGEN PROBEN	109
3.3.16	SDS-POLYACRYLAMIDGELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE)	110
3.3.17	IMMUNOBLOT-ANALYSE (WESTERNBLOT)	112
3.3.18	ANTI-HMARC 2 ANTIKÖRPER	113
3.3.19	ELISA	114
<b>3.4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>116</b>
3.4.1	BESTIMMUNG DER <i>N</i> -REDUKTIVEN AKTIVITÄT	116
3.4.1.1	Caco-2 Zellen	117
3.4.1.2	HEK-293 Zellen	121
3.4.1.3	Porcine Hepatozyten	125
3.4.1.4	Porcine Schilddrüsenfollikel	129
3.4.2	STUDIEN MIT SCHILDDRÜSENZELLINIEN	133
3.4.3	STUDIEN MIT HUMANEN BLUTZELLEN	135
3.4.4	INHIBITIONSSTUDIEN DER BENZAMIDOXIMREDUKTION	137
3.4.5	CHARAKTERISIERUNG DER PROTEINEXPRESSION	141
3.4.5.1	Westernblots	141
3.4.5.1.1	Testung kommerzieller Antikörper	141
3.4.5.1.2	Testung humaner Zelllinien auf mARC Expression	145
3.4.5.1.3	Testung humaner Blutzellen auf mARC-Expression	147
3.4.5.1.4	Testung von Mitochondrien porciner Gewebe	149
3.4.5.2	ELISA	150
3.4.6	ELISA	154
<b>3.5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>156</b>
<b>4.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK</b>	<b>163</b>

<b>5. MATERIALIEN UND GERÄTE</b>	<b>168</b>
<b>5.1 SUBSTANZEN</b>	<b>168</b>
<b>5.2 MATERIALIEN</b>	<b>170</b>
<b>5.3 GERÄTE</b>	<b>171</b>
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>172</b>
<b>7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>181</b>
<b>8. STRUKTURFORMELVERZEICHNIS</b>	<b>183</b>



---

# 1. Einleitung

Die erste Barriere, die eine oral applizierte Verbindung auf dem Weg in den Körper überwinden muss, ist der Gastrointestinaltrakt. Der Dünndarm stellt den natürlichen Aufnahmeort für Nährstoffe dar und hier wird auch ein Großteil der oral verabreichten Arzneistoffe absorbiert. Als Darreichungsformen für die Applikation *per os* sind Tabletten oder Kapseln gebräuchlich. Einer der großen Vorteile der oralen Darreichungsform ist die wesentlich höhere Compliance der Patienten im Vergleich zur parenteralen Arzneiform. Besonders wichtig ist dieses bei Arzneistoffen, die in der Langzeittherapie zum Einsatz kommen. Des Weiteren ist die parenterale Gabe eines Arzneistoffs mit wesentlich höheren Kosten verbunden als die orale Applikation (Mutschler *et al.*, 2001). Bei der Entwicklung von Arzneistoffen, die in der Therapie tropischer Erkrankungen von Patienten in besonders armen Regionen der Erde eingesetzt werden sollen, ist es von hoher Relevanz, die Kosten für die Patienten so gering wie möglich zu gestalten. Die orale Arzneiform ist am besten geeignet, denn die Applikation ist besonders einfach und es werden keine hohen Anforderungen an die hygienischen Bedingungen, wie die Sterilität von Injektionswasser und Injektionsbesteck, sowie die Ausbildung des Personals gestellt (Wagner und Hohmann, 2004).

Die in der pharmazeutischen Forschung generierten potentiellen Arzneistoffkandidaten sind häufig Verbindungen, die eine geringe Löslichkeit im wässrigen Milieu besitzen. Damit weisen sie auch eine zu geringe intestinale Permeabilität auf, um die Verbindung als orale Arzneiform verwenden zu können. Um die Bioverfügbarkeit von Arzneistoffen zu erhöhen, werden häufig Prodrugs entwickelt, von denen im Vergleich zur aktiven Wirkform deutlich höhere Konzentrationen resorbiert werden. Diese Prodrugs werden anschließend durch körpereigene Enzyme zur aktiven Wirkform metabolisiert, um dann ihre Wirkung zu entfalten. Somit besteht die Notwendigkeit eines Selektionsverfahrens, mit dem Aussagen zur intestinalen Permeabilität und zu pharmakokinetischen und pharmakologischen Eigenschaften der potentiellen Prodrugkandidaten getätigt werden können, um die Wirkstoffkandidaten mit dem höchsten Anwendungspotential herauszufiltern.

Neben *in vivo* Studien an Tiermodellen eignen sich hierfür die wesentlich kostengünstigeren *in vitro* Studien mit intestinalen Zellkultursystemen wie zum Beispiel der Caco-2 Zelllinie (Amidon *et al.*, 1995).

Weiterhin werden Zellkulturmodelle wie Caco-2 Zellen, HEK-293 Zellen und primäre Zellkulturen wie Hepatozyten häufig für Untersuchungen von Enzymen verwendet. Somit ist es von großem Interesse, diese Zellkultursysteme auf das Vorhandensein des zu studierenden Enzyms zu untersuchen. An der Reduktion von *N*-hydroxylierten Verbindungen ist das kürzlich entdeckte Molybdänkofaktor-abhängige Enzym mARC beteiligt (Havemeyer *et al.*, 2006). *N*-hydroxylierte Verbindungen werden als Prodrugprinzip für Amidine verwendet. Neben den Untersuchungen der Transportvorgänge von Prodrugs ist es für deren Entwicklung von hoher Relevanz, die an der Aktivierung zur Wirkform beteiligten Enzymsysteme zu beschreiben.

Zur weiteren Charakterisierung von mARC ist es von Interesse, Unterschiede in der Gewebeverteilung zu untersuchen. Auch für eine solche Fragestellung kann man Zellkultursysteme verwenden, besonders primäre Zellkulturen können für Experimente dieser Art herangezogen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Permeabilitätsstudien von verschiedenen im Arbeitskreis synthetisierten Prodrugs des Pentamidins durchgeführt werden. Pentamidin wird zur Therapie und Prophylaxe der Afrikanischen Schlafkrankheit eingesetzt. Die Afrikanische Schlafkrankheit zählt zu den „Neglected Diseases“, es besteht dringender Bedarf an oral verfügbaren Arzneistoffen. Weiterhin sollte anhand von Studien mit Zellkultursystemen das Enzym mARC untersucht werden. Das Enzym mARC ist am Metabolismus von *N*-hydroxylierten Verbindungen beteiligt, die als Prodrugs für Amidine, wie dem Pentamidin, angewendet werden können. Es sollte eine Quantifizierung auf Proteinebene durchgeführt werden, um die Tauglichkeit der Zellkultursysteme für Untersuchungen mit *N*-hydroxylierten Verbindungen zu sichern. Weiterhin sollte anhand von primären Zellkulturen eine Gewebeverteilung von mARC erstellt werden. Daraus könnten Hinweise auf die bislang unbekannte physiologische Bedeutung von mARC erhalten werden.

## 1.1 Biotransformation

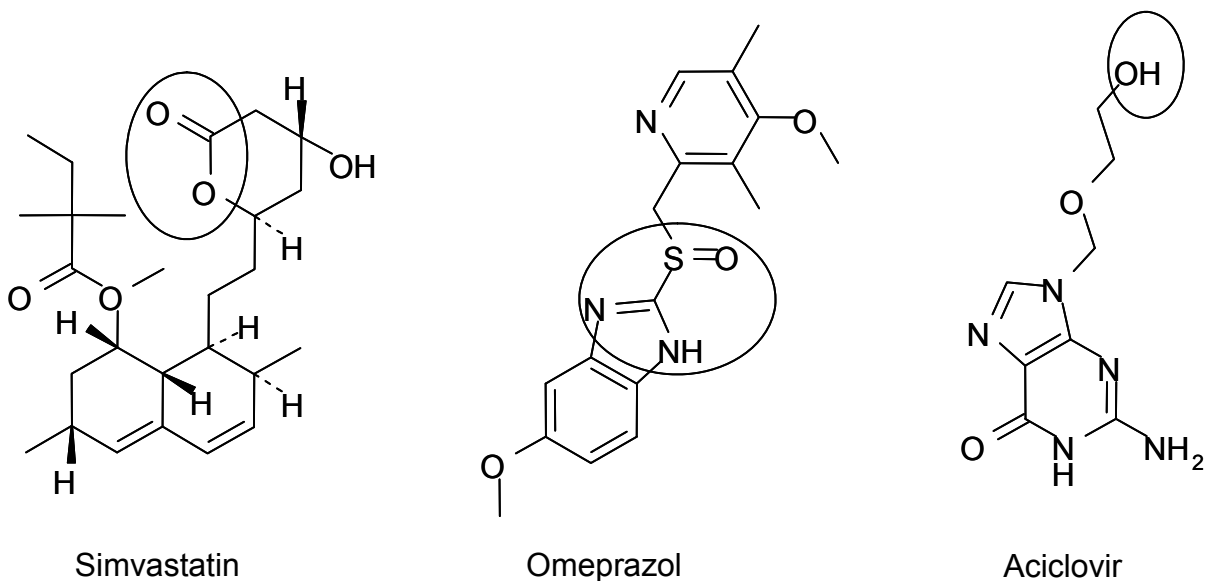
Die Umwandlung von körperfremden Stoffen, sogenannten Xenobiotika, bezeichnet man als Biotransformation. Lipophile Xenobiotika können nicht renal eliminiert werden und würden sich im Fettgewebe bis hin zu toxischen Konzentrationen anreichern. Biotransformationen jedoch ermöglichen deren Umwandlung in hydrophilere, leichter ausscheidbare Metabolite, welche dann über die Faeces oder den Urin ausgeschieden werden. Die Biotransformation findet hauptsächlich in der Leber statt, aber auch in untergeordneter Form in anderen Organen wie Darm, Niere, Lunge, Milz, Muskulatur, Haut oder Blut. Die beteiligten Enzyme liegen entweder strukturgebunden an der Membran des Endoplasmatischen Retikulums und der Mitochondrien oder gelöst im Cytosol vor (Mutschler *et al.*, 2001). Neben der Bioinaktivierung (Entgiftung) kann es durch die Stoffwechselfvorgänge jedoch auch zur Bioaktivierung und zu Toxifizierungen kommen. Die Bioaktivierung ist im Falle der Applikation von Prodrugs erwünscht. Prodrugs stellen unwirksame Verbindungen dar, die erst durch Biotransformation aktiviert werden und daraufhin ihren therapeutischen Effekt entfalten (Testa, 1995).

## 1.2 Biotransformationsreaktionen

Generell werden Biotransformationsreaktionen in zwei Phasen (Phase I und Phase II) eingeteilt. In Phase I-Reaktionen werden durch Oxidationen, Reduktionen, Hydrolysen und Eliminationen funktionelle Gruppen (-OH, -SH, -NH<sub>2</sub>) in unpolare Moleküle eingeführt, während in Phase II-Reaktionen durch Transferasen katalysierte Konjugationsreaktionen ablaufen. Dabei werden die bereits vorhandenen oder die in Phase I eingeführten funktionellen Gruppen zur Konjugation mit endogenen, hydrophilen Molekülen (z.B. Glucuronsäure, Schwefelsäure, Aminosäuren oder Glutathion) genutzt. Die entstandenen Verbindungen weisen danach eine derart verbesserte Wasserlöslichkeit auf, dass sie über die Niere oder Galle ausgeschieden werden können (Testa, 1995). Die Komplexität der ablaufenden Reaktionen nach Applikation eines Pharmakons verdeutlicht die Notwendigkeit von Biotransformationsstudien im Bereich der Arzneistoffentwicklung. Grundlegende Studien werden zunächst *in vitro* an subzellulären Enzymfraktionen (Mikrosomen, Mitochondrien), gereinigten Enzymen oder an Zellkulturen (Hepatozyten, Caco-2 Zellen) durchgeführt (Testa und Jenner, 1976).

### 1.3 Das Prodrugprinzip

Ein Prodrug ist eine inaktive oder weniger aktive Substanz, die erst durch den Metabolismus in die aktive Wirkform überführt wird (Albert, 1958). Diesen Verbindungen kommt eine strategische Bedeutung zu, wenn die eigentliche Wirkform, würde sie direkt appliziert werden, nicht oder in zu geringem Maße absorbiert wird oder nicht selektiv genug den gewünschten Wirkort erreichen würde. Das Ziel der Einführung der Prodruggruppe besteht zumeist in der Verbesserung der Bioverfügbarkeit der resultierenden Verbindung (Ettmayer *et al.*, 2004). So können durch die Einführung bestimmter funktioneller Gruppen gezielt Stoffeigenschaften wie z.B. die Basizität oder die Lipophilie verändert werden, um dadurch die passive Diffusionsgeschwindigkeit zu verbessern. Um ein Wirkstoffmolekül einem speziellen Transporter zugänglich zu machen, und damit einen aktiven Transport der Verbindung zu ermöglichen, können z.B. Aminosäuren angefügt werden. Es sind auch rein chemische Prodrugaktivierungen (z.B. Hydrolysen) möglich, aber weitaus häufiger sind die enzymatisch katalysierten Aktivierungsreaktionen anzutreffen (Ettmayer *et al.*, 2004).



**Abbildung 1-1: Beispiele für Blockbuster Prodrugs (Ettmayer *et al.*, 2004)**

Neben dem Ziel der Verbesserung der pharmakokinetischen Stoffeigenschaften und darüber eine Erhöhung der oralen Bioverfügbarkeit, kann man mittels eines applizierten Prodrugs ebenso versuchen, die Passage der Blut-Hirn-Schranke zu ermöglichen.



---

## **2. Transport- und Permeabilitätsstudien mit Pentamidin und dessen Prodrugs in Caco-2 Zellen**

### **2.1 Einleitung**

#### **2.1.1 Grundlagen des Absorptionsvorgangs**

Bevor ein Arzneistoff im Dünndarm resorbiert werden kann, passiert dieser zunächst die Mundhöhle und Speiseröhre (Ösophagus), um dann in den Magen zu gelangen. Im Magen spielt die Absorption von Arzneistoffen eine untergeordnete Rolle, hier finden die Zerkleinerung und der Aufschluss der aufgenommenen Nahrung statt. Der Mageninhalt wird über den Pylorus in den etwa 25 – 30 cm langen Zwölffingerdarm (Duodenum) entleert. Der Dünndarm ist insgesamt 5 – 7 m lang und wird in die weiteren Abschnitte Leerdarm (Jejunum) und Krummdarm (Ileum) unterteilt. Das Duodenum ist der für die Resorption von Nährstoffen und Xenobiotika hauptsächlich verantwortliche Darmabschnitt. An den Dünndarm schließt sich der Dickdarm (Kolon) an, dessen Aufgaben die Eindickung des Speisebreies und die Steuerung der Darmentleerung sind. Im Dickdarm findet keine Absorption von Nährstoffen mehr statt, hier werden ausschließlich Wasser und Salze absorbiert, was letztlich zur Eindickung des Speisebreies führt (Thews *et al.*, 1999).

#### **2.1.2 Anatomie des Dünndarms**

Die Wand des Dünndarms gliedert sich in die Schleimhaut, die neben dem einschichtigen Epithel und dem Schleimhautbindegewebe eine eigene feine Muskulatur enthält. Die Schleimhaut ist umgeben von einer Ringmuskelschicht, an die sich nach außen hin eine Längsmuskelschicht anschließt. Dazwischen liegen zwei Nervengeflechte, die die Schleimhaut innervieren und die Muskulatur versorgen.

Die Schleimhaut ist so strukturiert, dass eine starke Oberflächenvergrößerung erzielt wird. Den ersten Faktor stellen die zirkulären Schleimhautfalten (Ring- oder Kerckring-Falten) dar und die sich darauf befindlichen etwa 1 mm hohen Zotten sind der zweite Vergrößerungsfaktor. Das Epithel der Zotten besteht vorwiegend aus Saumzellen (Enterozyten), zwischen die vereinzelt schleimproduzierende Becherzellen eingestreut sind. Die Enterozyten tragen an der lumenständigen Seite dicht beieinander stehende protoplasmatische Fortsätze, die sogenannten Mikrovilli, wodurch eine weitere Oberflächenvergrößerung erreicht wird. Dicht unter dem Epithel liegt ein engmaschiges Kapillarnetz, welches der Versorgung der Zotten und der Aufnahme der resorbierten Stoffe dient. Im Zentrum jeder Zotte befindet sich ein Lymphgefäß. Das Dünndarmepithel gehört zu den Geweben mit der höchsten Teilungsrate im Körper. Die Resorption findet hauptsächlich in der Zottenspitze statt, während die sekretorischen Aktivitäten in den Krypten lokalisiert sind (Thews *et al.*, 1999).

### **2.1.3 Resorptionsbarrieren und -mechanismen im Dünndarm**

Bei der Verteilung von Arzneistoffen im Körper spielt deren Permeabilität von Membranen eine bedeutende Rolle. Die Menge des Arzneistoffs, die nach oraler Gabe die Pfortader erreicht, hängt hauptsächlich von der Rate des präsystemischen Metabolismus auf der Stufe der Enterozyten ab. Dieser wird durch die drei Phasen: 1. Aufnahme in die Enterozyten, 2. Biotransformation und 3. Efflux aus den Enterozyten charakterisiert (Kullak-Ublick und Becker, 2003).

#### **2.1.3.1 Resorptionsbarrieren auf zellulärer Ebene**

Wirkstoffe, die aus dem Darmlumen in das Blut aufgenommen werden sollen, müssen mehrere Diffusionsschichten überwinden. Die erste Schicht ist die so genannte „unstirred water layer“ oder Mucusschicht (Mutschler *et al.*, 2001). Darauf folgt die Glykokalyx, die zum größten Teil aus Glykoproteinen besteht und im Gegensatz zur Mucusschicht integraler Bestandteil der Mikrovillimembran ist. Die nächsten Barrieren bilden die apikale Membran, das Cytoplasma der Enterozyten, die basolaterale Membran, die Basalmembran und anschließend das Membranfenster der venösen Kapillaren (Thews *et al.*, 1999). Die

Absorptionsbarrieren im Dünndarm sind die Mucusschicht, die apikale Enterozytenmembran und die tight junctions.

Als Grenze zwischen apikalen und basolateralen Zellbereichen bestehen zwischen den Enterozyten enge Zell-Zell-Kontakte, die tight junctions oder zonulae occludentes (Mutschler *et al.*, 2001). Die tight junction ist eine Region, in der der äußerste Bereich der Lipiddoppelschicht von benachbarten Zellen miteinander verschmolzen ist und so die Bewegung von gelösten Stoffen durch diesen Bereich anhand der Ladung, Größe und Form des Moleküls aber auch durch die Selektivität und die Dimension des Pfades restriktiert. Hieraus resultiert die charakteristische Polarisierung der Enterozyten. Der Abstand der Zellmembranen im Bereich der tight junctions beträgt im Darm etwa 12 Å, somit können nur kleine Moleküle diese Poren passieren (Adson *et al.*, 1994).

### Wirkstoffaufnahme

Die effektive Permeabilität wird indirekt über den Massentransport mit Caco-2 Zellen oder mit Hilfe der Perfusionsmethode gemessen. Das Fick'sche Gesetz lässt sich zu folgender Gleichung zusammenfassen:

$$J_m = P_m \cdot c_m = dm / dt \cdot 1/A \quad \text{Gleichung: 2-1}$$

mit:

- $J_m$  Massentransport durch die Darmwand
- $P_m$  effektive Permeabilität
- $c_m$  Konzentration des Wirkstoffs an der Membran

Die entscheidenden Kenngrößen für die Resorption eines Arzneistoffs sind demnach die Permeabilität der Darmwand und die Konzentration des gelösten Stoffes.

Für die anschließende passive Diffusion durch die Darmwand gilt die umgewandelte Formel des Fick'schen Gesetzes:

$$J_m = D_m \cdot dc_m / dx = D_m \cdot [c_m(0) - c_m(h)] / h \quad \text{Gleichung: 2-2}$$

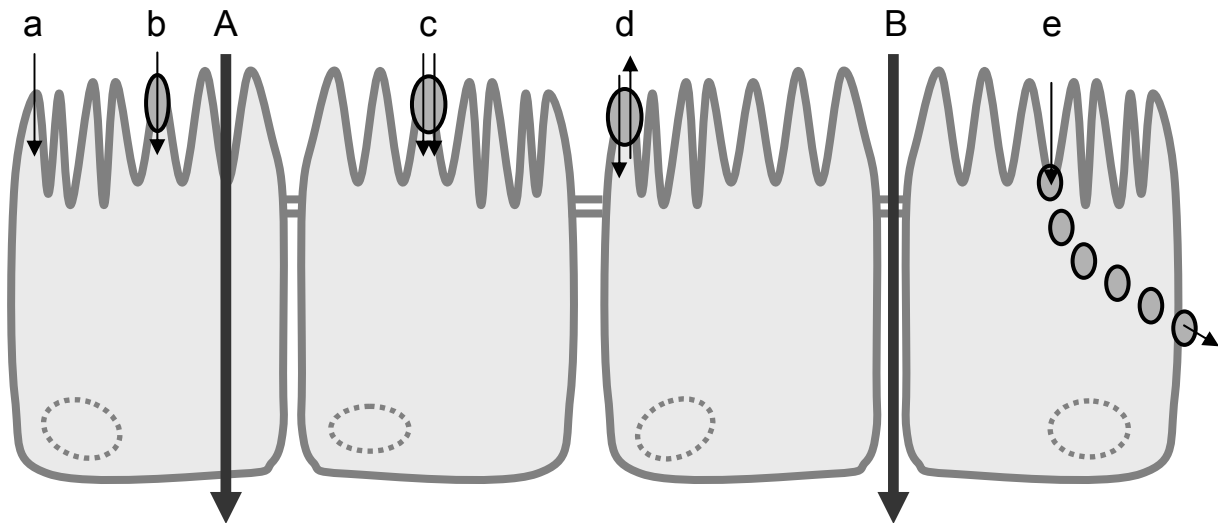
mit:

- $J_m$  Massentransport durch die Darmwand
  - $h$  Dicke der Diffusionsschicht
  - $c_m$  Konzentration des Wirkstoffs auf der apikalen Seite (0) und der basolateralen Seite (h)
  - $D_m$  Diffusionskoeffizient der Membran
- $$D_m = RT / 6\pi\eta r N_A$$
- $R$  Gaskonstante
  - $T$  Temperatur
  - $\eta$  Viskosität
  - $r$  Molekülradius
  - $N_A$  Avogadrokonstante

Wie aus der Gleichung entnommen werden kann, ist das Konzentrationsgefälle die treibende Kraft der Resorption. Aus dem Diffusionskoeffizienten wird zudem deutlich, dass die Resorption für große Moleküle erschwert ist.

### 2.1.3.2 Resorptionsmechanismen

Generell werden Transportprozesse in transzelluläre und parazelluläre Vorgänge unterteilt.



**Abbildung 2-1: Zelluläre Transportwege**

A: transzellulärer Transport; a: passive Diffusion; b: Uniport; c: Symport; d: Antiport; e: Endozytose/Transzytose; B: parazellulärer Transport (Chan *et al.*, 2004)

Die parazelluläre Diffusion kommt besonders bei hydrophilen Molekülen zum Tragen, die nur in geringem Ausmaß transzellulär absorbiert werden können und somit hauptsächlich parazellulär, also durch die tight junctions hindurch aufgenommen werden. Die Diffusion ist abhängig von der Molekülgröße, der Ladung und der Hydrophilie der Substanz.

Lipophile Verbindungen werden vornehmlich transzellulär transportiert, hierbei unterteilt man weiter in:

**Passive Diffusion:** Die Diffusion unterliegt dem Fick'schen Gesetz, nach dem der Stofftransport dem Konzentrationsgradienten, der Membranfläche sowie dem Verteilungskoeffizienten der betreffenden Substanz direkt proportional und umgekehrt proportional der Membrandicke ist. Die Diffusionsgeschwindigkeit wird vom substanzspezifischen Diffusionskoeffizienten bestimmt und ist nicht hemmbar. Quantitativ gesehen steht die Diffusion durch die Lipidmatrix bei der Stoffaufnahme in den Organismus im Vordergrund.

**Erleichterte Diffusion:** Die carrier-vermittelte Diffusion ist auch ein passiver Prozess, bei dem die treibende Kraft ebenso der Konzentrationsgradient ist.

Bei hydrophilen Substanzen mit geringer Membranpermeabilität ermöglicht die Wechselwirkung mit speziellen Proteinen, sog. Carriern (Schleppern), eine Transportbeschleunigung, die durch eine pulsierende Bewegung von Ladung und Bindungsstellen der Carrierproteine zustande kommt. Die erleichterte Diffusion ist durch Strukturspezifität, Sättigung des Transportsystems bei hohen Substratkonzentrationen, sowie Hemmbarkeit durch Inhibitoren, jedoch nicht durch Stoffwechselgifte charakterisiert.

**Aktiver Transport:** Hierbei pumpen transmembranäre Proteine Moleküle und/oder Ionen von einer Membranseite zur anderen. Dieser Prozess ist energieabhängig und kann auch gegen den Konzentrationsgradienten erfolgen. Der Prozess ist durch Substanzen mit ähnlicher chemischer Struktur kompetitiv und durch Stoffwechselgifte nichtkompetitiv hemmbar. Man unterteilt diese Vorgänge weiter in Uniport, Symport und Antiport (Abbildung 2-1: Zelluläre Transportwege).

**Endozytose/Transzytose:** Unter Endozytose versteht man die Internalisierung von extrazellulären Partikeln oder Flüssigkeiten durch Membranvesikel. Die Phagozytose bezeichnet die Aufnahme größerer Partikel durch spezialisierte Zellen, die Pinozytose meint die Endozytose von Flüssigkeiten. Transzytose ist der Transport eines Vesikels samt Inhalt, sowohl flüssig als auch partikulär, durch die Zelle. Der Inhalt der Vesikel wird in unveränderter Form auf der anderen Seite der tight junctions wieder ausgeschleust. Quantitativ gesehen ist diese Resorptionsform nur für wenige Pharmaka von Bedeutung (Thews *et al.*, 1999).

### 2.1.3.3 Funktionelle Resorptionsbarrieren

Sowohl in der apikalen als auch in der basolateralen Membran der Enterozyten sind transmembranäre Proteine verankert, die unter Energieverbrauch Substanzen auch gegen den Konzentrationsgradienten von einer Seite der Membran auf die andere pumpen. Transportproteine sind an der aktiven Aufnahme von Aminosäuren, Oligopeptiden, Monosacchariden, Mono- und Dicarbonsäuren, Gallensäuren, verschiedenen wasserlöslichen Vitaminen und auch von zahlreichen Xenobiotika aus dem Darmlumen in die Pfortader beteiligt. Umgekehrt sind in der apikalen Enterozytenmembran aber auch Transportproteine präsent, die für den aktiven Efflux von Xenobiotika aus den intestinalen Zellen zurück in das Darmlumen verantwortlich sind und somit den sekretorischen Detoxifizierungsmechanismus unterstützen und gleichzeitig eine intestinale Resorptionsbarriere darstellen (Tsuji und Tamai, 1996).

#### **2.1.3.4 ATP-binding cassette (ABC) Transportproteine**

Die ABC-Transporter sind in den Enterozyten sowohl an der apikalen als auch an der basolateralen Membran lokalisiert. Sie spielen eine bedeutende Rolle in der Limitierung der Resorption und in der Verhinderung der Akkumulation von potentiell toxischen Verbindungen. Weiterhin sind sie verantwortlich für Resistenzen von zahlreichen anderen Substanzen in Tumorzellen. Das charakterisierendste Merkmal dieser Transporterfamilie ist eine besonders geschützte ATP-bindende Kasette aus 200-250 Aminosäuren, die aus zwei Nucleotid-bindenden Domänen besteht, welche zur cytoplasmatischen Seite der Zellmembran hin gerichtet ist (Chan *et al.*, 2004).

#### **2.1.3.5 Enzymatische Resorptionsbarrieren**

Die Enzyme in den Zellen des intestinalen Epithels stellen die erste metabolische Barriere für eine oral applizierte Verbindung dar. Die Enterozyten enthalten verschiedene metabolische Enzyme, einschließlich der Cytochrom P450 Enzyme, die wichtigste Enzymklasse für den Phase I Metabolismus. Außerdem sind auch verschiedene für den Phase II Metabolismus verantwortliche Enzyme vorhanden, sowie Esterasen und Peptidasen. Diese Enzyme können die orale Bioverfügbarkeit einer Substanz herabsetzen, Interaktionen hervorrufen und die interindividuelle Variabilität der Bioverfügbarkeit einer Verbindung beeinflussen (Gan und Thakker, 1997).

### **2.1.4 Absorptionsmodelle**

Um vom Darm in die Blutbahn zu gelangen, muss ein Arzneistoff das Epithel, welches Teil der Lamina propria ist, und die Wand des jeweiligen Blutgefäßes überwinden. Um den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Absorption so genau wie möglich zu untersuchen, ist die Auswahl des am besten geeigneten Modells für den zu untersuchenden Arzneistoff zwingend erforderlich.

#### **2.1.4.1 *In vivo* Modelle**

Der wesentliche Vorteil der *in vivo* Modelle ist die Berücksichtigung der dynamischen Komponenten der mesenterischen Blutzirkulation, der Mucusschicht und weiterer Faktoren, die die Löslichkeit des Arzneistoffs beeinflussen. Das am weitesten

verbreitete Versuchstier für *in vivo* Studien ist die Ratte. Der entscheidende Nachteil der *in vivo* Versuche liegt darin, dass die einzelnen Teilbereiche im Prozess der Absorption nicht separat betrachtet werden können und so die individuell geschwindigkeitsbestimmenden Faktoren nicht identifizierbar sind.

### **2.1.4.2 *In situ* Modelle**

Für diese Methode wird das Abdomen eines Versuchstiers per Bauchschnitt eröffnet und die Gefäße des Dünndarms stabil perfundiert. Die Lösung des zu untersuchenden Arzneistoffs wird dann direkt in den Dünndarm gespritzt. Die Umgehung des Magens hat den Vorteil, dass der Arzneistoff nicht durch das saure Milieu des Magens zersetzt werden kann. Der Nachteil ist, dass das verwendete Anaesthetikum die intestinale Absorption beeinflussen kann (Yuasa *et al.*, 1993).

### **2.1.4.3 *In vitro* Modelle**

#### **2.1.4.3.1 Everted gut sac Methode**

Hierfür wird umgestülpter Rattendarm verwendet. Dieser wird am Ende verschlossen und dann mit Medium gefüllt. Nachdem auch das andere Ende verschlossen wurde, kann man mehrere kleine „Säcke“ abtrennen. Diese werden dann einzeln inkubiert und nach den entsprechenden Zeiten wird das Medium, das sich in dem umgestülpten Darmstück befand, analysiert. Dieses Modell ist für die Bestimmung des parazellulären Transports hydrophiler Substanzen gut geeignet (Barthe *et al.*, 1998).

#### **2.1.4.3.2 Ussing Kammer**

Die Ussing-Kammer ist eine elektrophysiologische Apparatur zur Bestimmung der Barriere- und Transporteigenschaften des lebenden Epithels. Mit Hilfe dieses Modells können Sekretionsvorgänge an verschiedenen Epithelien und auch an Monolayern aus der Zellkultur untersucht werden. Das Gewebe wird hierfür zwischen zwei mit Ringerlösung gefüllte Kammerhälften eingespannt (Ussing und Zerahn, 1951).



### 2.1.4.3.3 Zellkulturmodelle

Hierfür eignen sich humane Adenokarzinom-Zelllinien, z.B. HT-29 und Caco-2, die viele Eigenschaften von differenzierten intestinalen Zellen aufweisen.

Zellkulturmodelle weisen einige Vorteile gegenüber den bisher beschriebenen Absorptionsmodellen für Arzneistoffe auf. Die Permeabilität und der Metabolismus eines Arzneistoffs kann relativ schnell untersucht werden, die Arzneistoffabsorption kann unter kontrollierten Bedingungen studiert werden, die Zellkulturen zeichnen sich durch einfache und unkomplizierte Handhabung aus, störende Einflüsse des Mucus-Layers und der Muskelschicht sind nicht vorhanden und Zellkulturen ermöglichen Studien an humanen Zellen. Besonders bei der Entwicklung von Prodrugs mit dem Hintergrund der besseren intestinalen Verfügbarkeit kann der Einsatz von Zellkulturmodellen viel Zeit einsparen, denn automatisierte Verfahren und HTS (High Throughput Screening) sind durchführbar. Außerdem ermöglichen sie die Minimierung zeitaufwändiger, teurer und teilweise kontrovers diskutierter Tierversuche.

Als nachteilig im Vergleich zur *in vivo* bzw. *in situ* Situation kann beurteilt werden, dass physiologische Faktoren, die die Darmpassage beeinflussen, z.B. Mucus-Bildung (Diffusionsbarriere), Gallensalze und Cholesterol (Solubilisierung) in Zellkulturmodellen nicht vorhanden sind. Das Caco-2 Modell ist außerdem ein statisches Modell, das nur Zellen eines Zelltyps tumoralen Ursprungs enthält. Die Eigenschaften einer Zelllinie variieren mit der Zeit, was sich in genotypischen Veränderungen widerspiegelt. Um reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen, müssen Zellen einer definierten, vor allem aber limitierten Passagezahl für eine Versuchsreihe verwendet werden. Ein weiterer Nachteil der Zellkulturmodelle ist die teilweise schwierige Extrapolation der Daten auf die *in vivo* Situation – ein Problem, das jedoch fast alle *in vitro* Modelle gemein haben (Artursson, 1991).

### 2.1.5 Caco-2 Zellen

Die Caco-2 Zellen wurden 1974 von dem dänischen Arzt J. Fogh aus dem Colon-Adenokarzinom eines 72jährigen männlichen Patienten kaukasischer Rasse isoliert und charakterisiert (Fogh *et al.*, 1977). Die Caco-2 Zellen sind immortale und adhärente Zellen, die unter normalen Zellkulturbedingungen spontan ausdifferenzieren und morphologische, sowie physiologische Ähnlichkeit mit dem Dünndarmepithel des Menschen aufweisen. Die Zellen polarisieren, bilden Dome und

## 2.1 Einleitung

---

einen gut ausgebildeten Bürstensaum mit entsprechender Enzymausstattung sowie tight junctions als Verbindungen zwischen benachbarten Zellen. Caco-2 Zellen bilden keinen Mucus-Layer, was in Studien zum Arzneistofftransport jedoch ausgenutzt wird, um die beteiligten Mechanismen unabhängig von diesem zu untersuchen. Bei der Anzucht der Caco-2 Zellen auf beispielsweise Polycarbonatfiltern bilden sie Monolayer aus ausdifferenzierten, säulenartigen Zellen (sog. Zylinder- bzw. Palisaden- Epithel) mit Mikrovilli und tight junctions auf der apikalen Seite. Die Zellkerne befinden sich im Allgemeinen im basalen Bereich der Zellen (Artursson, 1991).

### 2.1.6 Biopharmazeutisches Klassifizierungssystem

Die Bedeutung der Caco-2 Zelllinie als *in vitro* Modell für biopharmazeutische Permeabilitätsuntersuchungen manifestiert sich unter anderem durch die Industrierichtlinie der amerikanischen FDA (Food and Drug Administration), welche ein Klassifizierungssystem für pharmazeutische Wirkstoffe aus schnell freisetzenden, festen, oral applizierbaren Formulierungen vorschlägt. Das sogenannte Biochemical Classification System (BCS) teilt Arzneistoffe anhand ihrer Löslichkeit und ihrer in Caco-2 Zellen ermittelten Permeabilitätskoeffizienten in vier Klassen ein (Amidon *et al.*, 1995).

BCS-Klasse	Löslichkeit	Permeabilität
I	hoch	hoch
II	niedrig	hoch
III	hoch	niedrig
IV	niedrig	niedrig

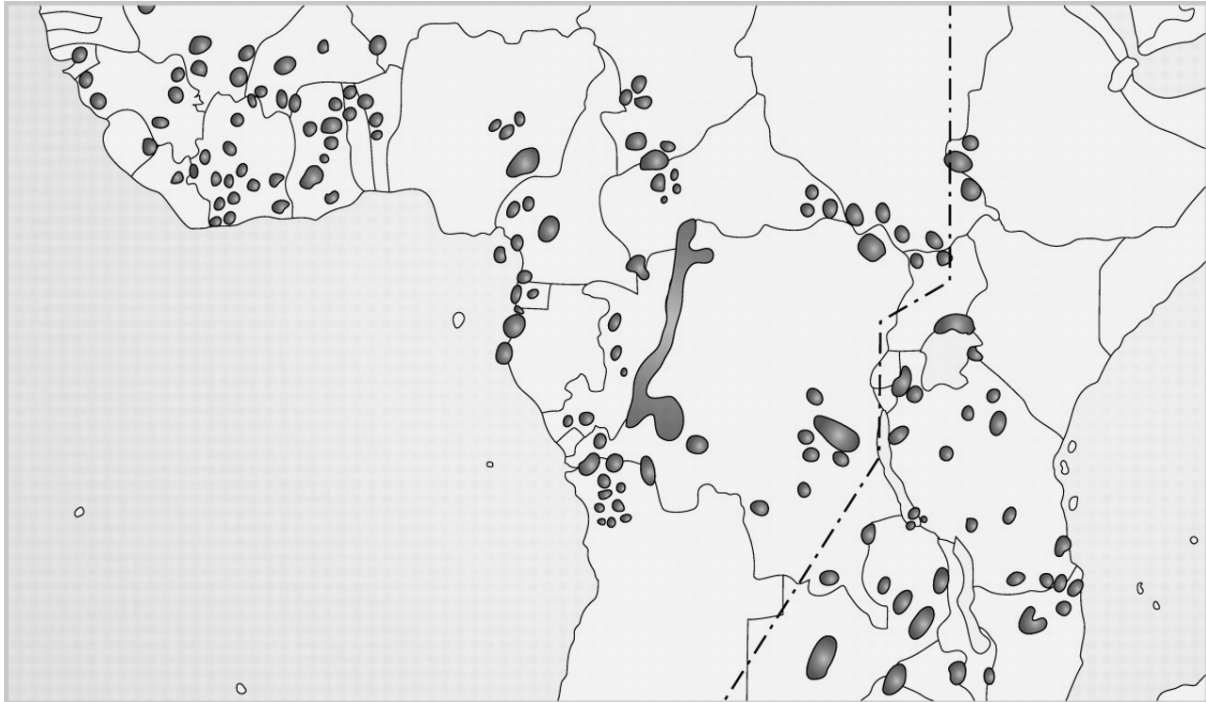
Nur ein Arzneistoff, der aus der Tablette herausgelöst wird, kann als gelöste Verbindung die Darmwand erreichen und dann dort resorbiert werden. Die Freisetzung des Wirkstoffs wird durch die Löslichkeit der Substanz bestimmt. Die Löslichkeit einer Substanz kann als „hoch“ bewertet werden, wenn sich der Arzneistoff in seiner Höchstdosierung über den gesamten pH-Bereich des Dünndarms (pH 1-8) in 250 ml Flüssigkeit löst. Die Menge an gelöster Verbindung, die tatsächlich ins Blut gelangt, wird durch die Permeabilität bestimmt. Eine hohe Permeabilität liegt vor, wenn mehr als 90 % des Arzneistoffs resorbiert werden

(*FDA-Guidance*). Mit dieser Einteilung kann man Aussagen zur zu erwartenden Resorption nach oraler Applikation tätigen. Laut FDA kann nach einer Einordnung des Arzneistoffs in Gruppe I und II auf eine Bioverfügbarkeitsstudie verzichtet werden, was in einer erheblichen Kostenersparnis resultiert.

## **2.1.7 Parasitäre Erkrankungen**

### **2.1.7.1 Afrikanische Schlafkrankheit**

Die Afrikanische Schlafkrankheit ist eine durch Trypanosomen ausgelöste Tropenerkrankung, die auch als Afrikanische Trypanosomiasis bezeichnet wird (Wagner und Hohmann, 2004). Die Übertragung der Trypanosomen erfolgt durch die Tsetsefliege, eine tagaktive, stechende und blutsaugende sogenannte Zungenfliege (*Glossina spec.*), die die Infektion ihrerseits durch Menschen oder Tiere, welche mit den humanpathogenen Erregern infiziert sind, erworben hat. Die Tsetsefliege kommt südlich der Sahara und nördlich der Kalahariwüste vor und hält sich hauptsächlich in der Vegetation an Seen und Flüssen, in Galeriewäldern und in bewaldeten Gebieten der Savanne auf (WHO, 2006). Die Fliege sticht vor allem im Freien und sie wird durch dunkle Kleidung angezogen (Wagner und Hohmann, 2004). Das Gebiet südlich der Sahara umfasst 36 der 52 afrikanischen Länder, darunter die ärmsten der Welt. Es leben ca. 60 Millionen Menschen in den Risikogebieten, von denen ca. 3 – 4 Millionen medizinisch betreut werden (WHO, 2006). In den 60er Jahren des letzten Jahrhunderts war die Afrikanische Schlafkrankheit aus den Gebieten südlich der Sahara durch groß angelegte Bekämpfungsprogramme, die auf die Tsetsefliege und die Trypanosomen abzielten, nahezu verschwunden. Zum Ende der 90er Jahre kehrte die Krankheit zurück (Mäser *et al.*, 2003). Aktuell sind zwischen 50.000 und 70.000 Fälle bekannt, wobei die Zahl der nichtdiagnostizierten und damit auch unbehandelten Fälle auf ca. 300.000 bis 500.000 geschätzt wird (WHO, 2006). Man unterscheidet bei der Afrikanischen Schlafkrankheit je nach übertragender *Trypanosoma brucei* Subspecies die west- und die ostafrikanische Form (Abbildung 2-2).



**Abbildung 2-2: Die Verbreitung der Afrikanischen Schlafkrankheit. Die gestrichelte Linie markiert etwa die Grenze zwischen den endemischen Herden der west- und der ostafrikanischen Form (Stich et al., 2002).**

Die westafrikanische Form wird durch *Trypanosoma brucei gambiense* übertragen und zeichnet sich durch eine oft lange aber variable asymptomatische Phase aus. Der chronische Verlauf der Erkrankung kann sich über Jahre hinziehen. Die ostafrikanische Form hingegen wird durch *Trypanosoma brucei rhodesiense* übertragen, die akute, fiebrige Infektion bricht eine bis drei Wochen nach dem infektiösen Stich aus und führt in mehr als 80 % der Fälle innerhalb von sechs Monaten zum Tod (Chappuis et al., 2005). Als weiterer humanpathogener Erreger ist *Trypanosoma cruzi* bekannt, welcher in Lateinamerika die Chagas-Krankheit hervorruft (Barrett et al., 2003).

Die Afrikanische Schlafkrankheit verläuft grundsätzlich in zwei Phasen. An der Einstichstelle der Tsetsefliege entsteht in ca. 50 % der Rhodesiense-Infektionen ein rotes, teigiges Geschwür, der sogenannte Trypanosomenschanter.

Der Schanker heilt häufig nach drei bis vier Wochen mit oberflächlicher Hautabschuppung ab. Die erste, hämolympathische Phase der Erkrankung beginnt mit der Invasion der Parasiten in das Blut- und Lymphsystem. Diese Phase ist charakterisiert durch generelles Unwohlsein, Kopfschmerzen und unspezifisches Fieber. Die Gambiense-Infektionen beginnen sehr unspezifisch, was dazu führt, dass die Krankheit häufig unerkannt oder fehldiagnostiziert wird. Hier ist ein typisches

Zeichen die Lymphknotenschwellung im hinteren Dreieck des Nackens, das sogenannte Winterbottomsche Zeichen. Thomas Winterbottom beobachtete im späten 18. Jahrhundert, dass Sklavenhändler die Nacken auf Schwellungen hin untersuchten und diese als Indikation für eine schläfrige Missstimmung ansahen, womit die jeweiligen Sklaven für den Verkauf wertlos waren (Stich und Steverding, 2002).

In der zweiten, meningoenzephalitischen Phase dringen die Trypanosomen in innere Organe und auch in das zentrale Nervensystem ein. Warum und wie es zur ZNS-Invasion kommt, ist nicht geklärt, vermutlich erfolgt der Eintritt über den Plexus choroideus. In dieser Phase werden die Kopfschmerzen heftiger und die Schlafstörungen, eine Schläfrigkeit tagsüber und nächtliche Schlaflosigkeit, welche durch Störungen des zirkadianen Schlafrhythmus bedingt sind, manifestieren sich (Barrett *et al.*, 2003). Weitere klinische Auffälligkeiten sind mentale Unruhe mit erhöhter Reizbarkeit, Abgeschlagenheit und Persönlichkeitsstörungen und eine verzögerte aber verstärkte Schmerz Wahrnehmung. Häufig kommt es zu Gewichtsverlust, Amenorrhoe und Impotenz. Wenn die Krankheit unbehandelt bleibt, sterben die Patienten unweigerlich an den Konsequenzen der heftigen Abgeschlagenheit, der Immunschwäche, des tiefen Komas, der Krämpfe, häufig aber auch an bakteriellen Infektionen wie Pneumonie oder Meningitis (Chappuis *et al.*, 2005). Die afrikanische Schlafkrankheit führt unbehandelt unweigerlich zum Tod, die Heilungsraten sind jedoch relativ hoch, wenn die Patienten im frühen Stadium behandelt werden.

### **Therapie**

Die Chemotherapie der Afrikanischen Schlafkrankheit ist die wichtigste Therapieform, denn Trypanosomen sind resistent gegenüber dem Trypanosomen-Lysis-Faktor (TLF), einem „non-immune killing factor“, der in humanem Serum *in vivo* und *in vitro* für die Lyse von *T. brucei* verantwortlich ist, woraus sich die Wirtsspezifität ergibt (Mehlhorn, 2001). Zur Therapie der haemolymphatischen Phase werden Suramin und Pentamidin eingesetzt, letzteres jedoch nur gegen *T. b. gambiense*. Die Behandlung der zweiten Phase, in der die Erreger bereits in das ZNS eingewandert sind, gestaltet sich als deutlich komplizierter, denn die Verbindungen müssen die Blut-Hirn-Schranke überwinden. Es werden lipophile Arsenverbindungen wie z.B. Melarsoprol eingesetzt, deren Toxizität bei einem Fünftel der behandelten Patienten

## 2.1 Einleitung

---

eine Enzephalopathie hervorruft und eine nicht unbeachtliche Patientenzahl (2-12 %) stirbt aufgrund der Folgen der Behandlung. Die ungewöhnlich hohen Rezidivraten nach einer Behandlung mit Melarsoprol deuten auf zunehmende Resistenzentwicklungen hin (Fairlamb, 2003). Eine mögliche Erklärung dafür ist die zu beobachtende Kreuzresistenz zwischen arsenhaltigen Melaminophenyl-Verbindungen und Diamidinen, die wiederum auf den Verlust des P2 Aminopurintransporters in der Trypanosomenmembran zurückzuführen ist (Bray *et al.*, 2003). Bei Infektionen mit *T. b. gambiense* kann im zweiten Stadium neben Melarsoprol auch Eflornithin eingesetzt werden, das bei arsenunempfindlichen Patienten eine Wirkung zeigt (Mehlhorn, 2001). Es besteht die dringende Notwendigkeit der Entwicklung oral verfügbarer Arzneistoffe zur Behandlung der Afrikanischen Schlafkrankheit. Das Pentamidinanalogen DB75 zeigt keine besseren Eigenschaften als Pentamidin, wohl aber das oral verfügbare Prodrug DB289, welches sich in klinischen Studien befindet (Fairlamb, 2003). Die Verbindung DB820 zeigt im Tiermodell auch im zweiten Stadium Wirksamkeit, das O-Methyl-Amidoxim-Prodrug DB844 kann auch oral appliziert werden (Barrett *et al.*, 2007). Allerdings ist die Entwicklung dieser Verbindungen wegen angeblich zu hoher Toxizität gestoppt worden. Offenbar waren diese Verbindungen aber auch nicht in der Lage, das zweite Stadium der Afrikanischen Schlafkrankheit zu heilen (Wenzler *et al.*, 2009). Ein weiteres Diamidin, das Triazenderivat Diminazen, das in der Veterinärmedizin für die Behandlung der Tierseuche Nagana, hervorgerufen durch *T. congolense*, *T. vivax* und *T. brucei*, zugelassen ist, wird teilweise auch am Menschen eingesetzt. Diminazen zeigt allerdings auch eine Kreuzresistenz mit Melarsoprol (Fairlamb, 2003). Die Strukturformeln der genannten Verbindungen sind in Abbildung 2-3: Strukturformeln einiger trypanozoider Chemotherapeutika. dargestellt.



### 2.1.7.2 Leishmaniose

Die Leishmaniose ist eine nahezu weltweit verbreitete Infektionskrankheit, die durch 21 Leishmania-Arten hervorgerufen wird. Leishmanien sind einzellige, mit den Trypanosomen verwandte Parasiten, die durch den Stich der 2-3 mm langen weiblichen Sandmücke übertragen werden. In den Risikogebieten leben 350 Millionen Menschen, es sind weltweit 12 Millionen Menschen mit Leishmanien infiziert und es kommen jährlich zwei Millionen Neuinfektionen hinzu, davon 1,5 Millionen mit kutaner und 500.000 Menschen mit viszeraler Leishmaniose (WHO, 2008). Grundsätzlich unterscheidet man kutane, mukokutane und viscerale Leishmaniose. Patienten mit kutaner Leishmaniose haben vulkanförmige, schlecht heilende Wunden an unbedeckten Körperteilen, die lebenslänglich entstellen und stigmatisieren. Extreme Verstümmelungen erleiden Menschen mit mukokutaner Leishmaniose, wobei es nach primärer Hautläsion zu Schleimhautschäden mit Ulzerationen in Nase, Mund, Rachen und Kehlkopf kommt. Die gefährlichste Form ist die viszerale Leishmaniose, die schleichend mit Müdigkeit und Schwäche einsetzt, im weiteren Verlauf werden Milz und Leber befallen, die dann dramatisch anschwellen. Unbehandelt kann die Erkrankung zum Tod führen, nachdem auch das Knochenmark und die Lymphknoten befallen sind. Durch eine deutliche Dezimierung der Immunzellen, sterben Betroffene häufig an sekundären bakteriellen oder viralen Infekten. Die Behandlung ist schwierig, es wird vornehmlich liposomales Amphotericin B eingesetzt, das sich in Leber und Milz anreichert. Außerdem werden toxische fünfwertige Antimonverbindungen appliziert. Für die Behandlung antimonresistenter Stämme ist Pentamidin als Reservepräparat zugelassen (Wagner und Hohmann, 2004).

### 2.1.7.3 Malaria

Malaria ist eine durch Plasmodien verursachte Infektionskrankheit, die durch den Stich einer weiblichen, etwa 6 mm langen Stechmücke der Gattung *Anopheles* übertragen wird (Wagner und Hohmann, 2004). Malaria ist eine der gefährlichsten Tropenkrankheiten, denn 40 % der Weltbevölkerung leben in den Risikogebieten, von denen die meisten Länder zu den ärmsten der Welt zählen. Von den 2,5 Milliarden Menschen in den Risikogebieten infizieren sich 500 Millionen pro Jahr und mehr als eine Million stirbt jährlich an Malaria (WHO, 2007). Je nach Parasitenart



unterscheidet man vier verschiedene humane Malariaarten. Der gefährlichste Erreger ist *Plasmodium falciparum*. Er gilt als Hauptursache von schweren Malaria-Erkrankungen und Todesfällen. Über den Stich der Anophelesmücke gelangen die Sporozoiten in Blut und Lymphe, erreichen so die Leber und dringen in die Parenchymzellen ein, in denen sich die Sporozoiten zu Schizonten entwickeln, aus denen dann Merozoiten freigesetzt werden. Die Merozoiten befallen Erythrozyten und wachsen unter Glucose- und Hämoglobinverbrauch zu Schizonten heran. Der herangereifte Schizont zerfällt in viele Merozoiten, der Erythrozyt platzt und die Merozoiten suchen neue Erythrozyten auf. Dieser Zyklus läuft in regelmäßigen Intervallen ab, der Zerfall der Erythrozyten ruft Fieber bei den Patienten hervor, daher die Bezeichnung Wechselfieber. Nach einigen Schizogonie-Generationen entwickeln sich Geschlechtsstadien der Plasmodien, die im Blut zirkulieren. Werden diese durch erneuten Stich der Anophelesmücke aufgenommen, entwickelt sich im Mitteldarm der Mücke die befruchtete Eizelle, aus der dann durch Kernvermehrung tausende Sporozoiten entstehen. Mit der Sporozoitenwanderung in die Speicheldrüse und der Übertragung auf einen neuen Wirt schließt sich der Parasitenzyklus. Bei *Plasmodium vivax* und *Plasmodium ovale* entstehen in der Leber neben Schizonten Hypnozoiten. Diese „schlafenden“ Parasitenstadien können über Jahre in der Leber persistieren, sich später wieder zu Schizonten entwickeln und darüber zu einem Rezidiv führen. Die Erkrankung beginnt mit grippeähnlichen Symptomen wie Fieber, Kopf- und Gelenkschmerzen, sowie Anämie. Zusätzlich können metabolische Störungen, Krampfanfälle oder Nierenversagen auftreten. Die Therapie der Malaria greift in die Entwicklung der sich vermehrenden Gewebe- oder Blutschizonten oder Gametozyten ein. Chloroquin ist das Mittel der Wahl bei Malaria tertiana und Malaria quartana, das bei resistenten Stämmen gegen Mefloquin ausgetauscht werden kann. Malaria tropica wird mit einer Kombination aus Chinin und Doxycyclin behandelt. Gegen Hypnozoiten in der Leber wirkt Primaquin (Wagner und Hohmann, 2004). Auch Pentamidin zeigt eine Wirksamkeit gegen *Plasmodium falciparum*, ohne dabei Kreuzresistenzen mit den Standardpräparaten der Malariatherapie hervorzurufen (Bray *et al.*, 2003). Neben der Therapie spielt die Expositions- und Chemoprophylaxe eine entscheidende Rolle, wobei erstere Mückenstiche verhindern und letztere die Vermehrungsformen in Blut bzw. Leber bekämpfen soll (Wagner und Hohmann, 2004).

### 2.1.7.4 Pneumocystis Pneumonie

Die Pneumocystis Pneumonie (PcP) ist eine opportunistische Erkrankung, die im Menschen durch den Schlauchpilz *Pneumocystis jiroveci* hervorgerufen wird (Stringer, 2002). Der fakultativ pathogene Erreger ähnelt klinisch und lichtmikroskopisch den Trypanosomen, für die er auch bis zum Ende der 1980er Jahre gehalten wurde (Stringer *et al.*, 2002). Der Pilz kommt ubiquitär vor und infiziert die meisten Menschen während der Kindheit, wobei Gesunde nicht erkranken. Eine Immunsuppression in Folge einer HIV-Infektion, Tumorerkrankung, Chemotherapie oder Organtransplantation, fördert die Vermehrung der Parasiten im Alveolarraum und den Ausbruch der Erkrankung, deren Symptome unproduktiver Husten, Atemnot und Fieber sind. Die Erreger binden sich an Alveolarepithelzellen vom Typ 1. Diese degenerieren, es resultiert eine vermehrte Durchlässigkeit der alveolo-kapillären Membran mit nachfolgendem Austritt von Flüssigkeit in den Alveolarraum und einem verminderten Gehalt an Surfactant-Faktor. Hypoxie und letztlich respiratorische Insuffizienz kennzeichnen das fortgeschrittene Erkrankungsstadium. Unbehandelt führt die PcP durch respiratorische Insuffizienz zum Tode. Bei rechtzeitiger Behandlung liegt die Heilungsrate bei 90 %. Zur Therapie werden Cotrimoxazol oder Pentamidin i.v. appliziert. Die antiretrovirale Therapie während der PcP-Behandlung ist problematisch, denn Nebenwirkungen, Unverträglichkeiten und Interaktionen der PcP-Medikation schränken die gleichzeitige Behandlung mit einigen antiretroviralen Substanzen ein. Bei einer Unterschreitung der CD4-Zellzahl von 200/µl werden als Prophylaxe Cotrimoxazol und Pentamidin als Inhalation gegeben. Die PcP war auch nach Einführung der Prophylaxe die häufigste AIDS-definierende Erkrankung. Heute tritt unter einer modernen antiretroviralen Therapie die PcP kaum noch auf (Hoffmann *et al.*, 2007).

### 2.1.8 Arzneistoffprofil des Pentamidins

Pentamidin ist ein aromatisches Diamidin, das als Pentamidinisethionat unter dem Namen Pentacrinat<sup>®</sup> im Handel ist. Pentamidin ist zugelassen zur Prophylaxe und Therapie der Pneumocystis Pneumonie, für die Therapie der viszeralen und kutanen Leishmaniose sowie für die Therapie des Frühstadiums der Trypanosomiasis mit *Trypanosoma gambiense* als Erreger (ABDA Datenbank, 2007). Diamidine haben eine lange Geschichte in der Behandlung der humanen Infektionen mit Protozoen.

In den 20er Jahren wurden mit dem Hintergrund, dass eine induzierte Hypoglykämie trypanosomale Infektionen beim Menschen heilen könnte, nach dem Vorbild des Synthalins, ein Diguandin, eine große Anzahl an verwandten Verbindungen synthetisiert. Darunter befand sich auch das 4,4'-Diamidino-diphenoxypentan (Pentamidin), das von A.J. Ewins im Pharmazeutischen Unternehmen May & Baker, UK, synthetisiert wurde (Lourie und Yorke, 1939). In den frühen 1940er Jahren wurde Pentamidin erfolgreich bei Patienten mit Afrikanischer Schlafkrankheit ohne Anzeichen für eine Beteiligung des ZNS und viszeraler Leishmaniose eingesetzt. 1958 gab es erste Erfolge bei der Behandlung der interstitiellen plasmazellulären Säuglingspneumonie mit Pentamidin. Seit Mitte der 80er Jahre wird Pentamidin zur Prophylaxe und Therapie der Pneumocystis Pneumonie bei AIDS-Patienten eingesetzt (Sands *et al.*, 1985).

### **2.1.8.1 Pharmakodynamik**

#### **2.1.8.1.1 Wirkmechanismus**

Der Wirkmechanismus der Diamidine gegen Protozoen konnte bislang nicht in Gänze aufgeklärt werden, in der Literatur sind jedoch verschiedene Ansätze zur Erklärung des therapeutischen Effektes zu finden. Eine wesentliche Rolle spielt die Akkumulation des Pentamidins im Mitochondrium, wo es sequenzspezifisch an die kleine Furche der kDNA bindet. Die Trypanosomen haben nur ein Mitochondrium, dessen Chromosomensatz als Netzwerk von über 1000 verketteten DNA-Zirkeln verschiedener Größe (Mini- und Maxizirkel) organisiert ist, welches als Kinetoplast (kDNA) bezeichnet wird. Die kDNA ist reich an Adenin- und Thyminbasen und kodiert rRNA und mitochondriale Proteine, die für die Energiegewinnung des Parasiten essentiell sind (Simpson, 1986; Shapiro und Englund, 1995). Pentamidin lagert sich an die AT-Region der kleinen Furche der DNA-Doppelhelix, bindet mit direkten Wasserstoffbrückenbindungen an N-Atome zweier Adenine und überspannt somit symmetrisch etwas mehr als vier AT-Basenpaare (Edwards *et al.*, 1992). Diamidine binden vorzugsweise an kDNA, was zu deren Linearisierung und somit zur Hemmung der Kinetoplastenreplikation und -funktion und letztlich zur Apoptose des Parasiten führt (Schnauffer *et al.*, 2002). Nukleäre DNS weist im Vergleich zur kDNA nur wenige adenin- und thyminreiche Stellen auf, was die geringe Diamidinkonzentration in der Wirtszelle erklärt (Basselin *et al.*, 2002).

Interaktionen mit Aminosäuretransportern, z.B. Lysin-Arginin Transporter (Gutteridge, 1969) und die Bildung unlöslicher Komplexe mit diphosphonukleotidhaltigen Coenzymen (NADH, FAD, Coenzym A) unterbinden die oxidative Phosphorylierung und DNA Synthese des Erregers (Makulu und Waalkes, 1975). Weiterhin wurde die Inhibition verschiedener Enzyme wie der Proteinkinase A (Soeiro *et al.*, 2005), Dihydrofolat-Reduktase (Makulu und Waalkes, 1975), Topoisomerase II (Wang und Englund, 2001) und S-Adenosyl-Methionin-Decarboxylase (Bitonti *et al.*, 1986) beschrieben. Pentamidin hemmt die S-Adenosyl-Methionin-Decarboxylase, die S-Adenosyl-methionin in Decarboxy-S-Adenosylmethionin überführt, wodurch die Überführung von Putrescin zum biogenen Amin Spermin verhindert wird. Somit entsteht auch kein Trypanothion, ein lebensnotwendiger Kofaktor im Redox-Puffersystem der Trypanosomatiden, das vergleichbar mit dem Glutathion-System bei Säugetieren ist (Frayha *et al.*, 1997).

Die Malariaparasiten *Plasmodium falciparum* verwenden Aminosäuren, die sie durch Hydrolyse von Hämoglobin der von ihnen befallenen Erythrozyten gewinnen, für den Einbau in ihre parasitären Proteine und zur Energiegewinnung (Francis *et al.*, 1997). Beim Hämoglobinabbau entstehen hohe Konzentrationen des für die Parasiten toxischen Ferriprotoporphyrins IX (FPIX), welches normalerweise durch die Parasiten zum untoxischen Hämosin kristallisiert wird. Nicht infizierte Erythrozyten vermögen Pentamidin nicht aufzunehmen. Eine Infektion mit Plasmodien induziert auf der Erythrozytenoberfläche jedoch die Expression parasitenspezifischer Poren, über die das Pentamidin in großen Mengen aufgenommen wird. Pentamidin inhibiert die Bildung des Hämosins aus FPIX durch direkte Interaktion mit FPIX, womit die Wirkung von Pentamidin gegen Plasmodien erklärt werden kann (Stead *et al.*, 2001).

### **2.1.8.1.2 Nebenwirkungen**

Es können nach intravenöser Pentamidinapplikation schwere, teils lebensbedrohliche Nebenwirkungen wie anaphylaktischer Schock, Hypertension, Hypotension, Hypoglykämie, Hyperglykämie, Diabetes mellitus, Pankreatitis, kardiale Arrhythmien, Leukopenie, Thrombozytopenie, Nephrotoxizität und Hepatotoxizität auftreten. Als lokale Reaktionen wurden an der Einstichstelle Schwellungen, Entzündungen, Abzessbildungen und Muskelnekrosen beobachtet (ABDA Datenbank, 2004). Durch Behandlungen mit Pentamidinisethionat kann es zu Verlängerungen des QT-Intervalls um mehr als 480 ms kommen und es wurde auch von Torsade de

Pointes berichtet (Simkó *et al.*, 2008). Die Störungen des Glucosestoffwechsels beruhen auf der zytotoxischen Wirkung des Pentamidins auf die  $\beta$ -Zellen des Pankreas. Beim Zugrundegehen der  $\beta$ -Zellen wird zunächst blutzuckersenkendes Insulin freigesetzt, es kommt zur Hypoglykämie. Da die zerstörten Zellen nicht in der Lage sind, sich zu regenerieren und die Insulinproduktion wieder aufzunehmen, kommt es letztendlich zur Hyperglykämie (Saï *et al.*, 1983).

### 2.1.8.2 Pharmakokinetik

#### 2.1.8.2.1 Absorption und Aufnahme

Pentamidin hat ein Molekulargewicht von 340 g/mol, die Verbindung ist eine starke Base mit einem  $pK_a$ -Wert von 11,4 und liegt somit unter physiologischem pH-Wert protoniert vor. Pentamidin zeigt mittlere lipophile Eigenschaften, wird oral nicht resorbiert und muss intramuskulär oder sehr langsam intravenös appliziert werden.

Pentamidin wird in großen Mengen von den Trypanosomen aufgenommen. Die Verbindung gelangt über den P2 Aminopurintransporter in die *Trypanosoma brucei*. Dieser Transport verläuft aktiv mit einem  $K_m$  von 0,84  $\mu\text{M}$  und einem  $V_{\text{max}}$  von  $9,35 \text{ pmol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot(10^8\text{Zellen})^{-1}$  und Pentamidin ist weiterhin in der Lage, den Adenosintransport in die Trypanosomen über den P2-Transporter deutlich zu inhibieren (Carter *et al.*, 1995). Trotz bekannter Kreuzresistenzen von arsenhaltigen Melaminophenyl-Verbindungen und Diamidinen, bedingt durch den Untergang der P2-Transporter, bleiben die Parasiten empfindlich gegenüber Pentamidin (Barrett und Gilbert, 2006). Dieser Zusammenhang lässt sich darüber erklären, dass mindestens drei Transporter identifiziert wurden, die am Pentamidintransport in die *Trypanosoma brucei* beteiligt sind. Neben dem P2-Transporter wird Pentamidin über einen Transporter mit geringer Kapazität aber hoher Affinität, bezeichnet als HAPT1 ( $K_m$ : 36 nM), und einen Transporter mit hoher Kapazität aber geringer Affinität, bezeichnet als LAPT1 ( $K_m$ : 56  $\mu\text{M}$ ), in die Trypanosomen aufgenommen. Keiner dieser beiden Transporter konnte durch arsenhaltige Melaminophenyl-Verbindungen inhibiert werden (de Koning, 2001).

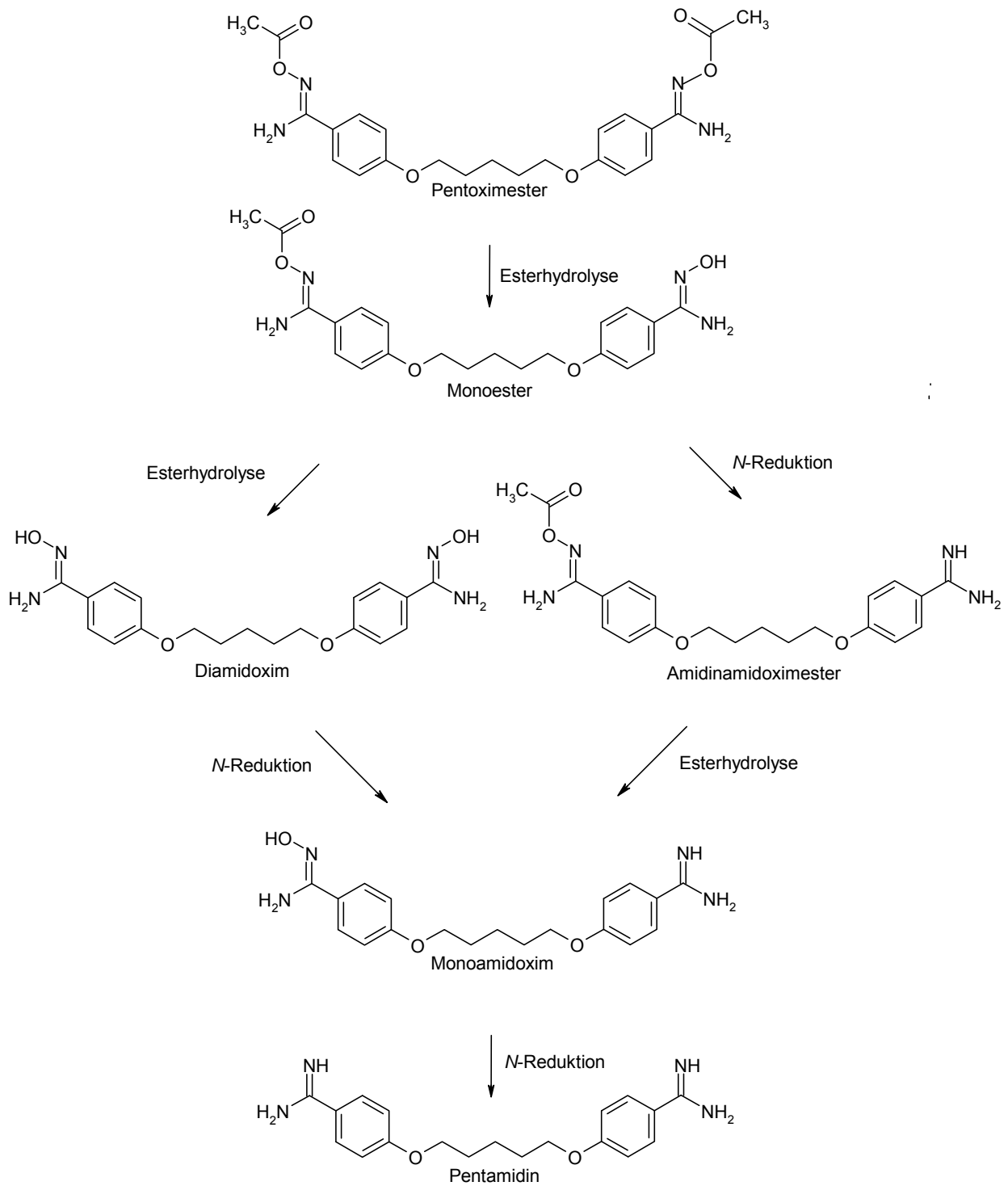
### 2.1.8.2.2 Verteilung und Elimination

Pentamidin wird oral nur in sehr geringen Mengen aufgenommen und muß daher intravenös oder intramuskulär verabreicht werden. Nach i.v. Gabe von 4 mg Pentamidinisethionat pro kg Körpergewicht über 2 h werden maximale Plasmaspiegel von etwa 0,5 µg/ml erreicht, nach intramuskulärer Injektion der gleichen Dosis beträgt die maximale Konzentration im Plasma etwa 0,2 µg/ml. *In vitro* beträgt die Plasmaproteinbindung 69 %. Die Eliminationshalbwertszeit wird mit 6,4 h angegeben. Das scheinbare Verteilungsvolumen von 140 l und das Verteilungsvolumen im steady state von 821 l, deuten auf eine hohe Gewebefixierung hin. Die Plasmaclearance beträgt 248 l/h, wobei 2,5 % der applizierten Menge innerhalb von 24 h unverändert renal ausgeschieden werden (ABDA Datenbank, 2004). Das Pentamidin reichert sich hauptsächlich in Niere, Lunge, Pankreas und Leber an (Berger *et al.*, 1990).

### 2.1.9 Prodrugs vom Pentamidin

Unter physiologischen Bedingungen liegen Amidine als mesomeriestabilisierte Kationen mit einem  $pK_a$  von 11,6 vor (Albert *et al.*, 1948). Daraus resultiert eine schlechte orale Bioverfügbarkeit. *N*-hydroxylierte Amidine weisen dagegen eine geringere Basizität auf ( $pK_a \sim 5$ ), sind somit unter physiologischen Bedingungen unprotoniert und daher besser oral verfügbar. Amidoxime werden *in vitro* und *in vivo* zu Amidinen reduziert (Clement *et al.*, 1988b; Clement und Zimmermann, 1988; Hauptmann *et al.*, 1988). Amidoxime werden als Prodrugs verwendet, wobei sich deren Bedeutung in der recht großen Zahl der Arzneistoffe und Entwicklungsprodukte widerspiegelt.

Durch Veresterung des Diamidoxims erhält man das doppelte Prodrug des Pentamidins, den Pentoximester. Der Pentoximester ist ebenfalls unter physiologischen Bedingungen unprotoniert und gut bioverfügbar. Die metabolische Aktivierung des Pentoximesters zu seiner Wirkform Pentamidin ist in Abbildung 2-4: Aktivierung des Pentoximesters durch Esterhydrolyse und wiedergegeben. Untersuchungen hierzu wurden bereits von Schwarz (1996), Riekert (1999) und Bürenheide (2006) durchgeführt.

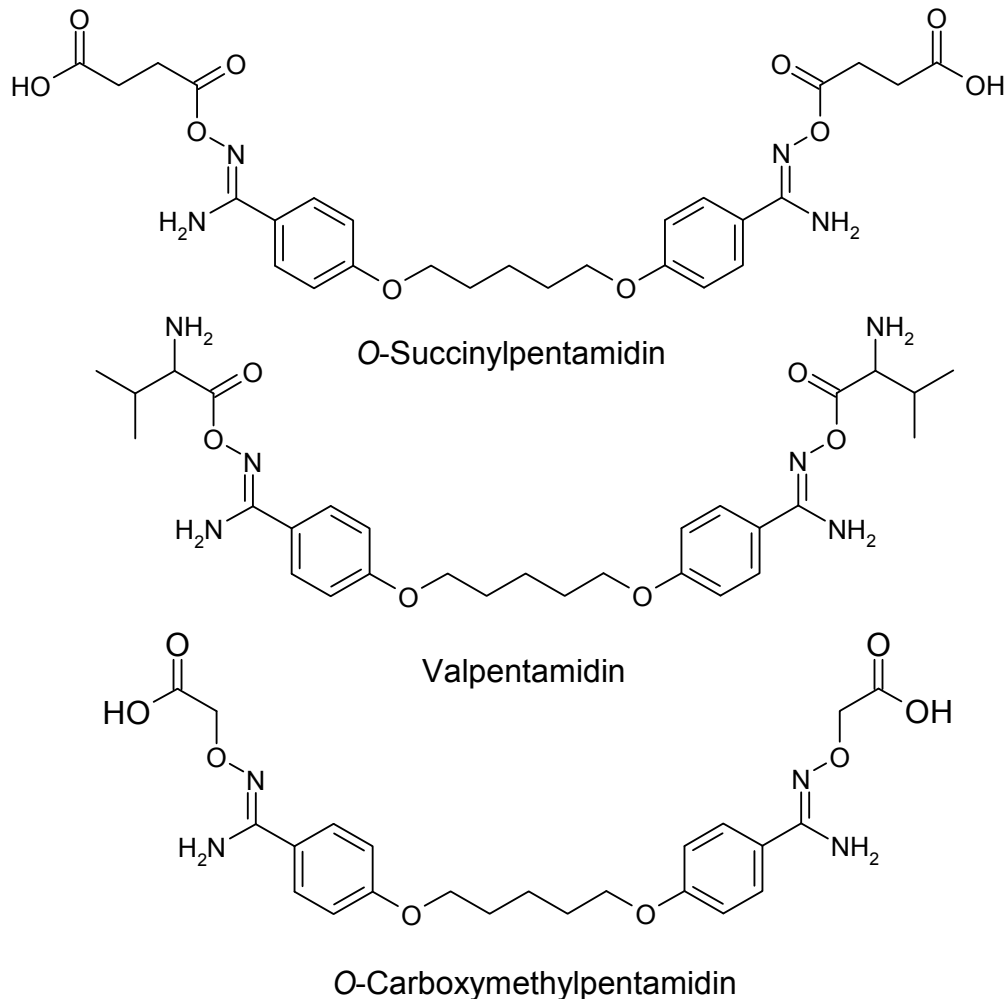


**Abbildung 2-4: Aktivierung des Pentoximesters durch Esterhydrolyse und N-Reduktion zum Pentamidin Bürenheide (2006).**

## 2.1 Einleitung

---

Auf der Suche nach einem Pentamidinprodrug, welches nicht nur oral verfügbar ist, sondern auch in der Lage ist, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden, wurden weitere Prodrugs entwickelt. Das O-Succinylpentamidin, das Val-pentamidin und das O-Carboxymethylpentamidin wurden im Rahmen dieser Arbeit hinsichtlich ihrer Resorption und Permeabilität von Caco-2 Zellen untersucht.



**Abbildung 2-5: Weitere im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Prodrugs**

Eine oral verfügbare Form des Pentamidins wäre für die schwer zugänglichen und medizinisch schlecht versorgten Regionen der tropischen Gebiete wünschenswert, insbesondere für die Prophylaxe der PcP und der Therapie der Afrikanischen Schlafkrankheit. Eine i.v. Applikation erfordert im Gegensatz zur peroralen Gabe eine ambulante Versorgung mit strenger Beobachtung der Patienten.



## 2.2 Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den Resorptionsvorgängen vom Pentamidin und verschiedenen seiner Prodrugs an einem intestinalen Zellkulturmodell, den Caco-2 Zellen. Der Absorptionsvorgang der Prodrugs sollte hinsichtlich des Mechanismus und auch der dabei entstehenden Metabolite untersucht werden. Aus den vorangegangenen *in vitro* und *in vivo* Studien blieb die Frage offen, ob der Pentoximester direkt oder das durch eventuell vorangegangenen Metabolismus im Darmlumen entstandene Diamidoxim absorbiert wird. Dazu sollte zunächst die Kultivierung der Caco-2 Zelllinie etabliert werden. Im Folgenden wurde eine Methode zur Durchführung von Aufnahmestudien etabliert. Für die Quantifizierung der Arzneistoffmengen sollten bestehende HPLC-Methoden auf größere Probenvolumina angepasst werden. Einige Teilschritte des Metabolismus sollten auch detailliert mit Schweinelebermikrosomen untersucht werden, um die Ergebnisse dann mit denen der Caco-2 Studien zu vergleichen. Im Weiteren sollten die Permeabilitätskoeffizienten der Prodrugs zum Vergleich untereinander und auch gegenüber der aktiven Wirkform Pentamidin bestimmt werden, um daran Aussagen hinsichtlich des höchsten Anwendungspotentials für einen oral verfügbaren Arzneistoff in der Therapie der Afrikanischen Schlafkrankheit zu treffen.

## 2.3 Methoden

### 2.3.1 *In vitro* Studien mit Caco-2 Zellen

#### 2.3.1.1 Zellkultur

Die Caco-2 Zelllinie stammt aus dem ausdifferenzierten Adenokarzinom des Kolons eines 72 Jahre alten männlichen Patienten der kaukasischen Rasse und wurde 1974 von dem dänischen Arzt J. Fogh und seinen Kollegen entnommen. Die Caco-2 Zellen wurden bei der ECACC, Salisbury, Großbritannien mit der Passagezahl 40 erworben. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Materialien wurden in Kapitel 5 aufgelistet.

#### 2.3.1.2 Anzucht der Zellen

Die kryokonservierten Zellen vom ECACC wurden im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und die gesamte Lösung wurde zügig in eine Gewebekulturflasche mit einer Wachstumsfläche von 25 cm<sup>2</sup> überführt, die 7 ml Kulturmedium enthielt, das auf 37 °C temperiert war. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und konstanter Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die Luftfeuchtigkeit wurde durch eine mit Wasser gefüllte Wanne im Bodenbereich des Brutschranks aufrechterhalten. Um dem Keimwachstum in dem Wasser entgegenzuwirken, wurden dem Wasser 2 % (m/V) Kupfer(II)-sulfat-pentahydrat zugesetzt. Die Zellen wurden in Dulbecos modified Eagle Medium mit Glutamax-I, 4500 mg/l D-Glucose ohne Natriumpyruvat (DMEM) unter Zusatz von 10 % FCS und 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 1,5 mg Glutamin bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen gezüchtet. Nach durchschnittlich drei Tagen waren die Zellen konfluent gewachsen und konnten passagiert werden. Die folgende Kultur der Zellen erfolgte in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen. Sowohl das Passagieren der Zellen als auch das Abfüllen von Zellsuspensionen für die folgenden Einfrier- und Auftauvorgänge wurden unter möglichst keimfreien Bedingungen unter einer Reinraumwerkbank (*laminar flow box*) durchgeführt.

### 2.3.1.3 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl wurde mikroskopisch mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer durchgeführt. Die Zellzahl wurde nach der folgenden Formel berechnet:

$$\text{Zellkonzentration/1 ml} = \text{Zellzahl} \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \cdot \text{Volumenfaktor}$$

Eine zu 80-90 % bewachsene Zellkulturflasche mit einer Wachstumsfläche von 75 cm<sup>2</sup> enthielt sechs Millionen Zellen.

### 2.3.1.4 Passagieren der Zellen

Zellen, die unter Laborbedingungen gezüchtet werden, müssen in einem teilungsaktiven Zustand gehalten werden. Nach Erreichen einer bestimmten Zelldichte endet die Teilungsaktivität, was als „Kontakthemmung“ bezeichnet wird. Somit werden die Zellen, nachdem der Zellrasen etwa 80-90 % des Kulturflaschenbodens bedeckt hat, mit Trypsin abgelöst und neu ausgesät.

Der Zellrasen wurde mit 5 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen. Nach Absaugen der PBS wurden 5,5 ml PBS zusammen mit 0,5 ml Trypsin-Lösung zugegeben. Die Lösung wird in der Kulturflasche geschwenkt, um eine möglichst gute Durchmischung zu erzielen und dann wurde die Kulturflasche bei 37 °C für 5 min im Brutschrank inkubiert. Trypsin spaltet die Zell-Zell-Verbindungen und die Verbindungen zwischen den Zellen und der Kulturflasche. Der Ablösevorgang sollte dennoch beobachtet werden. Denn eine kürzere Inkubationszeit konnte dazu führen, dass gesunde Zellen, die fest an dem Flaschenboden hafteten, nicht abgelöst werden. Zu lange Inkubationszeit wiederum kann dazu führen, dass es neben der Spaltung von Zellverbindungen auch zu Schädigungen der Zellmembranen kommen kann. Hielt man die Kulturflasche gegen das Licht, konnte der Ablösevorgang überprüft werden. Durch leichtes Klopfen an der Flaschenwand konnten Zellen, die sich noch nicht abgelöst haben, von der Wand entfernt werden. Die erhaltene Zellsuspension wird dann zur weiteren Anzucht der Zellen in Gewebekulturflaschen und auch zur Anzucht auf Platten für Experimente verwendet. Für die weitere Kultur wurden 1-1,5 ml der erhaltenen Zellsuspension, je nach Bewachungszustand, vor dem Ablösen und nach Kulturdauer bis zum nächsten Ablösen, in eine neue Kulturflasche mit 18 ml angewärmtem Medium überführt. Die Zelldichte sollte beim Aussäen etwa 10.000 Zellen pro cm<sup>2</sup> betragen. Bringt man zu viele Zellen in einer neuen Flasche aus, so sind die Zellen zu rasch konfluent gewachsen und die

Teilungsaktivität endet. Werden sie jedoch in zu geringer Zelldichte ausgesät, so werden sie ungenügend anwachsen, denn für ein optimales Wachstumsverhalten benötigen die Zellen die Nähe ihrer Artgenossen.

Die Flaschen wurden geschwenkt, um die Lösung gut zu durchmischen, damit die Zellen gleichmäßig über den gesamten Flaschenboden verteilt werden und dann bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und konstanter Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die Zellen wurden zweimal pro Woche passagiert und über 20 Passagen für Versuche verwendet.

### 2.3.1.5 Kryokonservierung

Nach Erreichen der Konfluenz wurde das Medium abgezogen, 5 ml PBS zugegeben und die Flasche fünfmal geschwenkt. Anschließend wurde die Lösung abgezogen und 5,5 ml PBS zusammen mit 0,5 ml Trypsin-Lösung zugegeben. Die Flasche wurde zur Durchmischung der Lösungen geschwenkt und dann für 5 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Zur Inaktivierung des Trypsins durch Calcium und Magnesium wurde die gesamte Suspension mit 5 ml Medium in einem 15 ml Röhrchen vereint und 10 min bei 360 g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgezogen und die Zellen anschließend in 1 ml RPMI, welches 9 % FCS enthielt, resuspendiert. Dann wurde tropfenweise unter Schütteln des Röhrchens 0,8 ml Einfriermedium zugegeben und die Suspension zur Durchmischung zweimal auf- und abpipettiert. Dann wurden je 1 ml der Zellsuspension, die dann zwei bis fünf Millionen Zellen enthielt, in ein Kryoröhrchen gegeben und diese sofort in ein Eisbad überführt. Nach 30 min wurden die Kryoröhrchen in einen auf 4 °C temperierten Einfriercontainer gestellt, der dann über Nacht bei -80 °C gelagert wurde. Dieser Container war mit Isopropanol gefüllt und die Temperatur sank darin um 1 °C pro Minute. Am darauf folgenden Tag wurden die Kryoröhrchen in den Stickstofftank überführt und bei -196 °C gelagert. In flüssigem Stickstoff können die Zellen mehrere Jahre gelagert werden. Es wurde ein Zellstock der Passagezahlen 44, 45 und 46 angelegt.

Einfriermedium:	20 %	DMSO
	25,45 %	FCS
	55,55 %	RPMI

### 2.3.1.6 Auftauen der Zellen

Um Zellen aus dem angelegten Zellstock wieder aufzutauen, wurde ein Kryoröhrchen aus dem Stickstofftank entnommen und die Zellsuspension unter kontinuierlichem Bewegen rasch in einem auf 37 °C temperierten Wasserbad aufgetaut. Sobald die letzten Eiskristalle geschmolzen waren, wurde das Röhrchen unter die Reinraumwerkbank gebracht und die gesamte Suspension in eine Zellkulturflasche mit einer Wachstumsfläche von 25 cm<sup>2</sup> überführt, die 7 ml auf 37 °C erwärmtes Zellkulturmedium enthielt. Die Zellkulturflasche wurde zur Durchmischung vorsichtig geschwenkt und dann zügig in den Brutschrank gestellt. Nach ca. drei bis vier Tagen Inkubation unter den in Kap. 2.3.1.2 angegebenen Bedingungen, waren die Zellen konfluent gewachsen und konnten wie in Kap. 2.3.1.4 beschrieben, passagiert werden. Die erhaltene Zellsuspension wurde auf zwei 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen, die je 18 ml Zellkulturmedium enthielten, aufgeteilt. Nach weiterer Inkubation über drei bis vier Tage konnten die Zellen dann für Versuche auf Platten ausgesät werden.

### 2.3.1.7 Charakterisierung der Zellen

#### 2.3.1.7.1 Zellwachstum und Erscheinungsbild

Das Zellwachstum und Erscheinungsbild der Zellen wurde nach dem Aussäen, bei jedem Mediumwechsel und vor den Experimenten durch Betrachten der Kulturgefäße in einem inversen Mikroskop beurteilt.

#### 2.3.1.7.2 Bestimmung des transepithelialen Widerstandes

Um das Wachstum und die Konfluenz eines Zellmonolayers zu bewerten und daran Aussagen treffen zu können, wann der Monolayer dicht genug gewachsen ist, also die tight junctions so verschlossen sind, dass keine Lücken mehr zwischen den Zellen vorhanden sind, durch die die zu untersuchenden Arzneistoffe direkt hindurch treten könnten, bestimmt man den TEER-Wert, der transepitheliale elektrische Widerstand des Monolayers. Hierzu wurde ein epitheliales Volt-Ohmmeter verwendet, ausgestattet mit einer so genannten „Chopstickelektrode“, bei der ein Elektrodenhalter 2,5 mm kürzer ausgeführt war als der andere, was Verletzungen des Zellmonolayers verhinderte. Die Elektrode wurde vor der Messung ca. 15 min in auf 37 °C temperiertem Transportpuffer equilibriert. Der gemessene Widerstand des

Monolayers wird um den Widerstand der reinen Polyestermembran korrigiert. Dazu wurde ein Filter ohne Zellen mit Zellkulturmedium versehen und parallel zu den Zellen unter den in Kap. 2.3.1.9.1 angegebenen Bedingungen inkubiert. Der TEER-Wert wird in  $\Omega\cdot\text{cm}^2$  angegeben. Der transepitheliale Widerstand sollte mindestens  $280 \Omega\cdot\text{cm}^2$  aufweisen (Artursson, 1989; Hidalgo *et al.*, 1989; Neuhoff *et al.*, 2005). Filtereinsätze mit Zellen, die diesen Wert unterschritten, wurden nicht für Transportexperimente verwendet.

### **2.3.1.7.3 Bestimmung der Diffusion von parazellulären Markern durch den Zellmonolayer**

Neben der Bestimmung des transepithelialen Widerstandes wurde nach dem Transportexperiment der prozentuale Durchgang von einem parazellulären Marker durch den Zellmonolayer bestimmt. Geeignet sind z.B. Mannitol, Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) oder Lucifergelb. Hierfür wurden in das obere Kompartiment 500  $\mu\text{l}$  Transportmedium pH 6,5 gegeben, in dem Lucifergelb in einer Konzentration von 100  $\mu\text{g/ml}$  enthalten war. Im unteren Kompartiment waren 1500  $\mu\text{l}$  Transportmedium pH 7,4 enthalten. Nach 60 min Inkubation bei 37 °C im Platteninkubator bei 350 Umdrehungen pro min wurden jeweils Proben des Mediums des unteren Kompartiments entnommen und deren Fluoreszenzintensität bestimmt. Hierfür wurden jeweils zweimal 200  $\mu\text{l}$  der Ausgangslösung als 100 % Wert, der Probelösungen und des Transportmediums als Blindwert in die Vertiefungen einer 96-well-Platte (F-Plate, Nunc) gegeben. Anschließend wurde die Fluoreszenzintensität bei  $\lambda_{\text{Ex}}$  490 nm und  $\lambda_{\text{Em}}$  535 nm gemessen. Der Durchgang an Lucifergelb durfte wie bei Michael (2000) beschrieben, nicht höher als 1 % pro Stunde sein. Filter, die einen höheren Durchgang aufwiesen, wurden nicht mit in die Auswertung einbezogen.

### 2.3.1.8 Aufnahme- und Effluxversuche

#### 2.3.1.8.1 Anzucht der Zellen

Zellzählungen ergaben, dass eine zu 80–90 % bewachsene Flasche sechs Millionen Zellen enthielt. Von der nach dem Trypsinisieren erhaltenen Zellsuspension wurde 1 ml in 11,5 ml Medium gegeben und gut durchmischt. Von dieser Suspension wurden je 500 µl per Eppendorf-Pipette in jede Vertiefung einer 12-well-Platte gegeben, die bereits je 1000 µl Medium pro Vertiefung enthielt. Zur Durchmischung wurden die Platten vorsichtig geschwenkt und dann im Brutschrank über zehn Tage inkubiert. Das Medium wurde dreimal pro Woche gewechselt.

#### 2.3.1.8.2 Versuchsdurchführung

##### 2.3.1.8.2.1 Aufnahmeversuche

Das Medium der Zellen wurde am Tag vor dem Versuch gewechselt. Der Transportpuffer wurde zunächst auf 37 °C temperiert und mit 1 N NaOH auf pH 7,4 eingestellt. Der Transportpuffer hatte folgende Zusammensetzung:

Transportpuffer pH 7,4:	10 mM	HEPES
	25 mM	D-(+)-Glucose
	100 ml	HBSS (10x)
	ad 1000 ml	Aqua bidest.

Die Zellen wurden mit je 1 ml Transportpuffer pro Vertiefung der 12-well-Platte gewaschen, wobei die Zugabe möglichst langsam und vorsichtig über den Rand der Vertiefung mit Hilfe einer Multipipette erfolgte. Zum Abziehen des Mediums und des Puffers wurde ein Absauggerät verwendet. Hierbei war darauf zu achten, dass man mit der Pipettenspitze nicht den Zellrasen berührte, da sich dieser dadurch ablösen könnte. Nach erneuter Zugabe von 1 ml Transportpuffer pro Vertiefung wurden die Zellen über 30 min im Platteninkubator bei 37 °C und 350 Umdrehungen pro min vorinkubiert. Anschließend wurde der Puffer abgezogen und die Zellen erneut mit je 1 ml Transportpuffer je Vertiefung gewaschen. Der Versuch wurde mit der Zugabe von 500 µl Transportpuffer, in dem die zu untersuchende Substanz gelöst war, gestartet. War es notwendig, die Substanzen in DMSO zu lösen, so wurde die Stammlösung so verdünnt, dass die Endkonzentration an DMSO in der

Inkubationslösung unter 1 % lag. Die 12-well-Platten wurden für die entsprechenden Versuchszeiten bei 37 °C und 350 Umdrehungen pro min im Platteninkubator inkubiert. Nach den entsprechenden Zeiten wurde der Puffer der einzelnen Vertiefungen rasch abgezogen und jeweils in Reaktionsgefäße überführt. Zum Abstoppen der Substanzaufnahme wurden die Zellen jeweils mit 1 ml eiskaltem Transportpuffer gewaschen. Nach sorgfältigem Absaugen des Transportpuffers wurden jeweils 500 µl Methanol je Vertiefung zugegeben und die Platten mit Deckel 10 min auf dem Vortexer mit Multiaufsatz geschüttelt. Die Lösung, welche nun die aus den Zellen extrahierten Substanzen enthielt, wurde abgezogen und in Reaktionsgefäße überführt. Die Medium- und Methanolproben wurden bis zur Gehaltsbestimmung per HPLC bei -80 °C gelagert. Zum Ablösen der Zellen wurden in jeweils zwei Vertiefungen pro 12-well-Platte je 500 µl 1 N NaOH gegeben. Nach Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur wurde die erhaltene Suspension zur Bestimmung des Proteingehalts verwendet. In einem Vorversuch wurden auch andere Möglichkeiten der Zellablösung verglichen. Neben 1 N NaOH kamen Zellschaber und Ultraschall, hierbei sowohl das Ultraschallbad als auch eine Ultraschallsonde, die direkt in die Vertiefung der Platte gehalten wurde, zum Einsatz.

### **2.3.1.8.2.2 Effluxversuche**

Für die Bestimmung des Effluxes aus Caco-2 Zellen wurden diese zunächst über 120 min mit der zu untersuchenden Substanz inkubiert, um die Zellen mit der Substanz zu laden. Dazu wurden die Zellen wie in Kap. 2.3.1.8.1 beschrieben angezüchtet und anschließend, wie in Kap. 2.3.1.8.2.1 aufgeführt, vorinkubiert und inkubiert. Es wurden nach 30, 60, 90 und 120 min Proben vom Puffer und von den Zellen (durch Extraktion mit MeOH) genommen, um daran die erfolgreiche Aufnahme zu überprüfen. Nach 120 min wurde das Medium der für den Efflux vorgesehenen Zellen abgezogen und die Zellen zweimal mit auf 37 °C temperiertem Transportmedium pH 7,4 gewaschen. Anschließend wurde das Effluxexperiment mit der Zugabe von jeweils 500 µl Transportpuffer pH 7,4 zu den Zellen gestartet und diese über weitere 120 min inkubiert. Nach den entsprechenden Zeitpunkten wurde der Puffer in Reaktionsgefäße überführt und die Zellen zweimal mit eiskaltem Transportpuffer pH 7,4 gewaschen. Dann wurden jeweils 500 µl Methanol zugegeben und die Platten 10 min auf dem Vortexer mit Multiaufsatz geschüttelt.



Auch die Methanolproben wurden in Reaktionsgefäße überführt. Bis zur Analytik der Proben per HPLC wurden diese bei  $-80\text{ °C}$  aufbewahrt. Von jeweils zwei Vertiefungen je 12-well-Platte wurden die Zellen mit je  $500\text{ }\mu\text{l}$   $1\text{ N NaOH}$  über Nacht abgelöst, um mit der erhaltenen Suspension eine Bestimmung des Proteingehalts, wie in Kap. 2.3.1.8.2.3 beschrieben, durchzuführen.

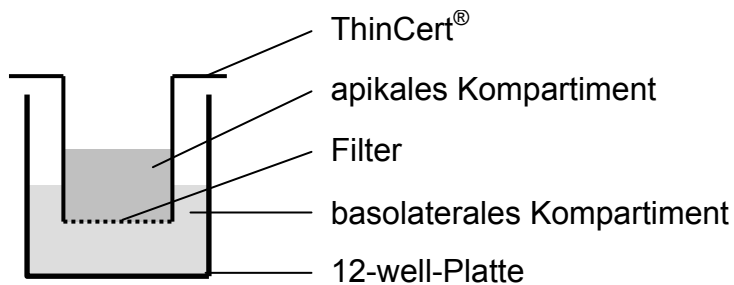
### **2.3.1.8.2.3 Bestimmung des Proteingehalts**

Um den Proteingehalt der Zellen zu bestimmen, müssen diese zunächst mit  $1\text{ N NaOH}$  von den 12-well-Platten abgelöst werden. Zur Neutralisation der NaOH wurden die Proben im Verhältnis 1:1 mit  $1\text{ N HCl}$  verdünnt. Anschließend wurde der Proteingehalt nach der BCA-Methode (Smith *et al.*, 1985) bestimmt. Die Probelösung wurde mit dem BCA-Protein-Assay-Reagenz gemischt, welches aus Natriumcarbonat, Natriumhydrogencarbonat, 2,2'-Bis(4-aminophenyl)-5,6-dihydro-1,2,4-triazin-4,4'-dicarbonsäure, Natriumtartrat und Kupfersulfat in  $0,2\text{ N}$  Natronlauge zusammengesetzt war. Die Bestimmung eines Blindwerts und einer Kalibrierung erfolgten parallel zur Proteingehaltsbestimmung der Probelösung. Die Kalibriergerade wurde durch den Einsatz von fünf verschiedenen konzentrierten Lösungen eines Rinderserumalbumin-Standards erstellt. Die Inkubation erfolgte in 96-well-Platten über  $50\text{ min}$  in der auf  $44\text{ °C}$  temperierten Kammer des UV-Plattenlesers. Die Bestimmung der Absorption erfolgte bei  $562\text{ nm}$ .

### 2.3.1.9 Permeabilitätsversuche

#### 2.3.1.9.1 Anzucht der Zellen

Für Versuche mit Transwells wurden 12-well-Platten verwendet, die Filter aus PET mit einer Fläche von  $113,1 \text{ mm}^2$  und  $2 \cdot 10^6$  Poren pro  $\text{cm}^2$  mit einem Porendurchmesser von  $0,4 \text{ }\mu\text{m}$  enthielten. Hierfür wurden von der durch Trypsinisieren erhaltenen Zellsuspension  $2,4 \text{ ml}$  zu  $6 \text{ ml}$  mit Medium verdünnt und davon dann jeweils  $500 \text{ }\mu\text{l}$  auf jeden Filter gegeben. In das untere Kompartiment wurden  $1,5 \text{ ml}$  Medium gegeben.



#### **Abbildung 2-6: Transwell schematisch**

Die Zellen wurden über 10 bis 21 Tage im Brutschrank unter den in Kap. 2.3.1.2 angegebenen Bedingungen inkubiert. Das Zellkulturmedium wurde dreimal pro Woche gewechselt, wobei darauf zu achten war, dass die empfindlichen Monolayer nicht von den Filtern abgelöst wurden. Dies erreicht man, indem zunächst das Medium aus dem unteren Kompartiment und dann das aus dem oberen Kompartiment abgezogen wurde. Bei der Zugabe von Medium befüllt man zuerst das obere Kompartiment und anschließend das Untere.

#### 2.3.1.9.2 Allgemeine Versuchsdurchführung

##### 2.3.1.9.2.1 Vorbereitung

Am Tag vor dem Versuch wurde das Medium der Zellen gewechselt. Die Transportpuffer wurden auf  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  temperiert und auf pH 6,5 bzw. 7,4 mit  $1 \text{ N NaOH}$  eingestellt. Die Transportpuffer hatten folgende Zusammensetzung:

---

Transportpuffer pH 6,5	10 mM MES 100 ml HBSS (10x) ad 1000 ml Aqua bidest.
Transportpuffer pH 7,4	10 mM HEPES 25 mM D-(+)-Glucose 100 ml HBSS (10x) ad 1000 ml Aqua bidest.

Das Zellkulturmedium wurde vorsichtig mit Hilfe eines Absauggerätes abgezogen, anschließend im oberen Kompartiment durch 500 µl Transportpuffer mit pH 6,5 und im unteren Kompartiment durch 1500 µl Transportpuffer mit pH 7,4 ersetzt. Nach einer Präinkubation über 30 min im Platteninkubator bei 37 °C und 350 Umdrehungen pro min wurde der TEER-Wert der einzelnen Monolayer, wie in Kap. 2.3.1.7.2 beschrieben, gemessen. Anschließend wurde das Medium aus beiden Kompartimenten sorgfältig abgezogen.

#### **2.3.1.9.2.2 Transportversuche: apikal nach basolateral**

Für Transportversuche von apikal nach basolateral wurden jeweils in das obere Kompartiment 600 µl Transportpuffer pH 6,5 gegeben, der die zu untersuchende Substanz enthielt. War es notwendig, die Substanzen zunächst in DMSO zu lösen, wurde die Stammlösung anschließend so verdünnt, dass die Endkonzentration an DMSO in der Inkubationslösung unter 1 % lag. Die Filter wurden dann zügig in Vertiefungen einer 12-well-Platte gesetzt, die jeweils 1500 µl Transportpuffer pH 7,4 enthielten. Für die Bestimmung der tatsächlichen Konzentration an zu untersuchender Substanz im oberen Kompartiment zu Beginn der Inkubation wurden direkt nach dem Einsetzen der Filter 100 µl der apikalen Lösung entnommen, die dann später der HPLC zugeführt wurden. Nach den entsprechenden Zeiten wurden die Filter jeweils in die Vertiefungen einer 12-well-Platte überführt, die je 1500 µl Transportmedium pH 7,4 enthielten. Nach dem letzten Zeitpunkt wurden die Monolayer erneut mit Transportpuffer gewaschen und es wurde eine weitere TEER-Wert Bestimmung durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen, wie in Kap. 2.3.1.7.3 beschrieben, mit Lucifergelblösung inkubiert.

### 2.3.1.9.2.3 Transportversuche: basolateral nach apikal

Für Transportversuche von basolateral nach apikal wurden jeweils 500 µl Transportmedium pH 6,5 auf die Filter gegeben und diese anschließend in 12-well-Platten überführt, deren Vertiefungen jeweils 1500 µl Transportpuffer pH 7,4 enthielten, in dem die zu untersuchende Substanz gelöst war. Wenn es notwendig war, die Substanzen zunächst in DMSO zu lösen, wurde die Stammlösung anschließend so verdünnt, dass die Endkonzentration an DMSO in der Inkubationslösung unter 1 % lag. Für die Bestimmung der tatsächlichen Ausgangskonzentration im basolateralen Kompartiment, wurden daraus direkt nach dem Einsetzen der Filter 100 µl entnommen. Nach den entsprechenden Inkubationszeiten wurden vorsichtig 400 µl aus dem apikalen Kompartiment abgezogen und durch 400 µl Transportpuffer pH 6,5 ersetzt. Nach dem letzten Zeitpunkt wurden die Monolayer erneut mit Transportpuffer gewaschen und es wurde eine weitere TEER-Wert Bestimmung durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen wie in Kap. 2.3.1.7.3 beschrieben mit Lucifergelblösung inkubiert.

#### Auswertung

Die zu jedem Zeitpunkt durch den Filter gelangte Arzneistoffmenge wurde berechnet und gegen die Zeit aufgetragen. Die Steigung der Geradengleichung wurde durch lineare Regression ermittelt und zur Berechnung des apparenten Permeabilitätskoeffizienten ( $P_{app}$ ) in cm/s nach folgender Formel verwendet:

$$P_{app} = \frac{dQ/dt}{n_0} \cdot \frac{1}{A} \cdot V_{donor} \quad \text{Gleichung 2-3}$$

$dQ/dt$  transportierte Menge pro Zeiteinheit aus der Regressionsgeraden

(µmol/s)

A Fläche des Monolayers (cm<sup>2</sup>)

$n_0$  Stoffmenge bei  $t = 0$  min

$V_{donor}$  Volumen in dem Donorkompartiment

### 2.3.1.10 HPLC Analytik

#### 2.3.1.10.1 Analytik zur Trennung von Pentoximester, Diamidoxim, Monoamidoxim und Pentamidin

Die Prodrugs und ihre Metaboliten wurden wie bei Schwarz (1996) beschrieben synthetisiert.

Zur Trennung der zu analysierenden Substanzen wurde die bei Bürenheide (2006) beschriebene HPLC-Methode mit wenigen Veränderungen verwendet. Der eingesetzte Eluent wurde nach Herstellung durch einen Sartorius Membranfilter (0,45 µm) filtriert und im Ultraschallbad 15 min entgast.

HPLC-Pumpe	Waters 1525	
Detektor	Waters 486 Tunable Absorbance Detektor	
Autosampler	Waters 717 plus Autosampler	
Integrator	Breeze™ Aufnahme- und Auswertesoftware (Version 3.20)	
Stationäre Phase	LiChrocart® 125-4 mm LiChrospher 60, RP-select B Partikelgröße 5 µm, Vorsäule RP-select B 4-4 mm (Merck, Darmstadt)	
Mobile Phase	52 % 10 mM Octylsulfonat, 20 mM Tetramethylammoniumchlorid, pH 3,0; 48 % MeOH (v/v)	
Flussrate	1,0 ml / min	
Laufzeit	30 min	
Injektionsvolumen	10 µl; 150 µl	
Detektion	UV 260 nm Fluorimetrie: $\lambda_E$ 275 nm, $\lambda_{Em}$ 340 nm	
Retentionszeiten	Diester:	12,6 min ± 0,5 min
	Monoester:	14,4 min ± 0,5 min
	Amidinamidoximester:	15,6 min ± 0,5 min
	Diamidoxim:	18,4 min ± 0,5 min
	Monoamidoxim:	22,1 min ± 0,5 min
	Pentamidin:	25,9 min ± 0,5 min

### 2.3.1.10.2 Kalibrierung

Zur Quantifizierung der gebildeten Metabolite wurden Sechs-Punkt-Kalibrierungen mit einem Kalibrierbereich von 0,5-100  $\mu\text{M}$  für ein Injektionsvolumen von 10  $\mu\text{l}$  und 0,1-10  $\mu\text{M}$  für ein Injektionsvolumen von 150  $\mu\text{l}$  erstellt. Hierfür wurden definierte Stoffmengen in dem für die Inkubation verwendeten Transportpuffer bzw. in Methanol gelöst.

### 2.3.1.10.3 Analytik für O-Succinylpentamidin, Valpentamidin und O-Carboxymethylpentamidin

Der verwendete Eluent wurde nach Herstellung durch einen Sartorius Membranfilter (0,45  $\mu\text{m}$ ) filtriert und im Ultraschallbad 15 min entgast.

HPLC-Pumpe	Waters 1525	
Detektor	Waters 486 Tunable Absorbance Detektor	
Autosampler	Waters 717 plus Autosampler	
Integrator	Breeze™ Aufnahme- und Auswertesoftware (Version 3.20)	
Stationäre Phase	LiChrocart® 250·4 mm LiChrospher 100, RP 18 endcapped, Partikelgröße 5 $\mu\text{m}$ , Vorsäule RP-select B 4·4 mm, (Merck, Darmstadt)	
Mobile Phase	0,1 % Trifluoressigsäure 24 % Acetonitril	
Flussrate	0,7 ml / min	
Laufzeit	20 min	
Injektionsvolumen	10 $\mu\text{l}$ ; 150 $\mu\text{l}$	
Detektion	UV 260 nm	
Retentionszeiten	Diamidoxim:	8,4 min $\pm$ 0,5 min
	Monoamidoxim:	9,5 min $\pm$ 0,5 min
	Pentamidin:	10,9 min $\pm$ 0,5 min
	O-Succinylpentamidin:	12,5 min $\pm$ 0,5 min
	Valpentamidin:	14,8 min $\pm$ 0,5 min
	O-Carboxymethylpentamidin:	17,3 min $\pm$ 0,5 min

## 2.3.2 *In vitro* Studien mit Enzymquellen

### 2.3.2.1 Gewinnung porciner Lebermikrosomen

Die verwendeten Schweinelebern wurden direkt von einem lokalen Schlachthof (Bordesholm) bezogen. Die Organe wurden nach der Schlachtung in eisgekühltem 20 mM Phosphatpuffer (1 mM Na<sub>2</sub>-EDTA, pH 7,4) transportiert. Zur Weiterverarbeitung der Leber wurden die Leberlappen zunächst mit 50 mM Phosphatpuffer (1 mM Na<sub>2</sub>-EDTA, pH 7,4) perfundiert und gewaschen. Das so erhaltene Gewebe wurde in kleine Stücke zerschnitten und in einem handelsüblichen Fleischwolf zerkleinert. Die Suspension wurde mit dem gleichen Volumen Phosphatpuffer verdünnt und mit einem Durchflusshomogenisator homogenisiert. Die weitere Gewinnung der Mikrosomen erfolgte durch differentielle Ultrazentrifugation (Clement *et al.*, 1996). Die Mikrosomen wurden bei -80 °C gelagert. Die Proteingehaltsbestimmung wurde wie in Kap. 2.3.1.8.2.3 beschrieben durchgeführt.

### 2.3.2.2 Inkubationen mit porcinen Lebermikrosomen

Die Durchführung der Inkubationen erfolgte in Anlehnung an die bei Rieckert (1999) beschriebene Methode. Die Inkubationen wurden unter aeroben Bedingungen bei 37 °C im Schüttelwasserbad bzw. bei 4 °C im Kühlkeller im Multiaufsatz des Vortexers in 1,5 ml Reaktionsgefäßen durchgeführt. Ein typischer Ansatz für die mikrosomalen Biotransformationsstudien setzte sich aus 0,1 mg mikrosomalem Protein, 1 mM NADH, 1 mM Substrat in 50 mM Phosphatpuffer pH 6,3 zusammen. Für das Diamidoxim und das Monoamidoxim wurden 100 mM Stammlösungen in DMSO eingesetzt. Der Inkubationsansatz hatte ein Gesamtvolumen von 150 µl. Nach fünfminütiger Vorinkubation bei 37 °C erfolgte der Start der Reaktion durch Zugabe von 1 mM NADH. Die gesamte Inkubationsdauer betrug 120 min. Nach den entsprechenden Inkubationszeiten wurde die Reaktion durch die Zugabe von 150 µl eiskaltem Methanol gestoppt. Anschließend wurde jeweils 5 min mit einem Vortexer geschüttelt und bei 10.000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde der HPLC zugeführt.

### 2.3.2.3 HPLC Analytik

#### 2.3.2.3.1 Analytik zur Trennung von Diamidoxim, Monoamidoxim und Pentamidin

Die Prodrugs und ihre Metaboliten wurden wie bei Schwarz (1996) beschrieben synthetisiert.

Zur Trennung der zu analysierenden Substanzen wurde die bei Bürenheide (2006) beschriebene HPLC-Methode mit wenigen Veränderungen verwendet. Der eingesetzte Eluent wurde nach Herstellung durch einen Sartorius Membranfilter (0,45 µm) filtriert und im Ultraschallbad 15 min entgast.

HPLC-Pumpe	Waters 1525
Detektor	Waters 486 Tunable Absorbance Detektor
Autosampler	Waters 717 plus Autosampler
Integrator	Breeze™ Aufnahme- und Auswertesoftware (Version 3.20)
Stationäre Phase	LiChrocart® 125-4 mm LiChrospher 60, RP-select B Partikelgröße 5 µm, Vorsäule RP-select B 4-4 mm (Merck, Darmstadt)
Mobile Phase	52 % 10 mM Octylsulfonat, 20 mM Tetramethyl- ammoniumchlorid, pH 3,0; 48 % MeOH (v/v)
Flussrate	1,0 ml / min
Laufzeit	30 min
Injektionsvolumen	10 µl
Detektion	UV 260 nm Fluorimetrie: $\lambda_{Ex}$ 275 nm, $\lambda_{Em}$ 340 nm
Retentionszeiten	Diamidoxim: 18,4 min ± 0,5 min Monoamidoxim: 22,1 min ± 0,5 min Pentamidin: 25,9 min ± 0,5 min



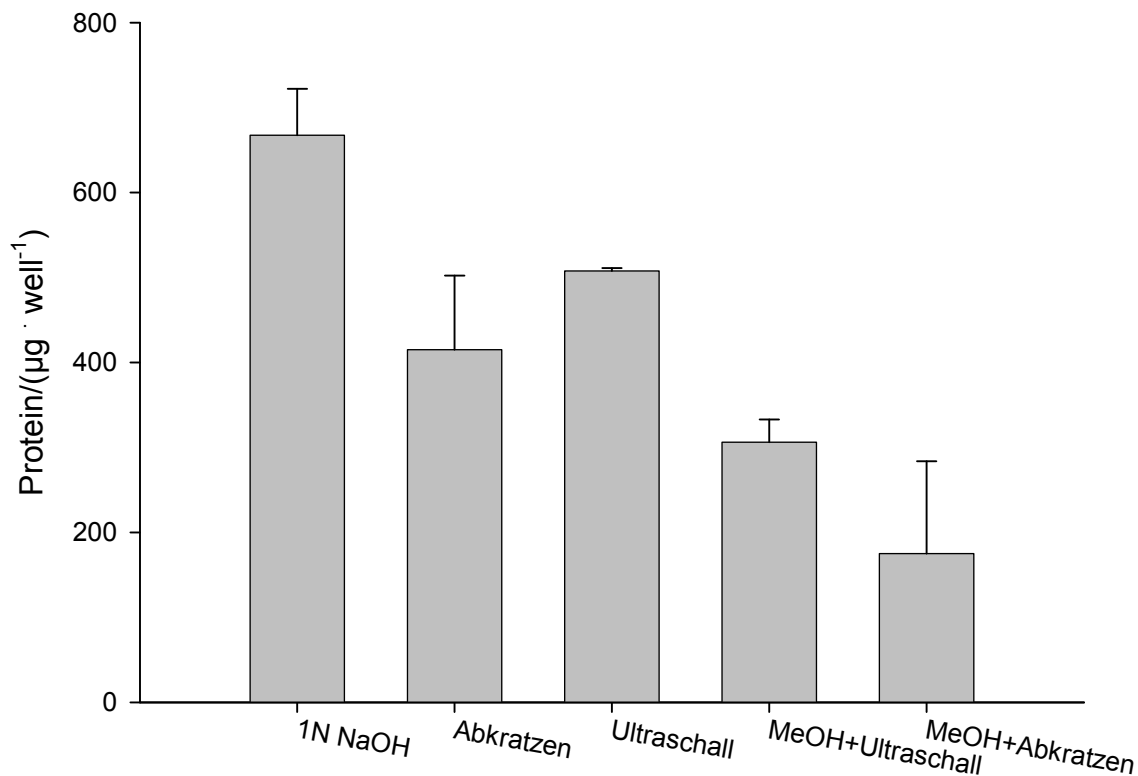
#### **2.3.2.3.2 Kalibrierung und Wiederfindung**

Für die Kalibrierung wurden Lösungen vom Monoamidoxim und vom Pentamidin in sechs Konzentrationen von 0,5-100  $\mu\text{M}$  in 50 mM Phosphatpuffer pH 6,3 und Methanol im Verhältnis 1:1 (v/v) eingesetzt. Für die Bestimmung der Wiederfindung wurden Lösungen vom Monoamidoxim und Pentamidin in den gleichen Konzentrationen wie für die Kalibrierungen verwendet. Zusätzlich enthielten die Lösungen jedoch 0,1 mg hitzedenaturierte porcine Lebermikrosomen und 1 mM NADH in einem Gesamtansatz von 150  $\mu\text{l}$ . Die weitere Aufarbeitung der Ansätze erfolgte wie in Kap. 2.3.2.2 beschrieben.

## 2.4 Ergebnisse

### 2.4.1 Vergleich der Ablösemethoden der Zellen

Die Ergebnisse der Aufnahme- und Effluxstudien können auf die Zellzahl oder auf den Proteingehalt der Zellen pro Vertiefung der 12-well-Platte bezogen werden. Für die Bestimmung der Zellzahl müssen noch lebende Zellen z.B. mit Trypsin abgelöst und anschließend unter dem Mikroskop ausgezählt werden. Danach ist es nicht mehr möglich, die Zellen der Vertiefung in den Versuch mit einzubeziehen. Um die Substanzen für die Auswertung des Versuchs aus den Zellen zu extrahieren, gibt man Methanol auf den Zellrasen. Dadurch platzen jedoch die Zellen, was eine anschließende Zellzählung per Mikroskop unmöglich macht. Des Weiteren weist die Methode der Zellzählung eine sehr hohe Standardabweichung auf und ist somit weniger gut geeignet als der Bezug der Ergebnisse auf den Proteingehalt der Zellen pro Vertiefung der 12-well-Platte. Auch in der Literatur werden Ergebnisse von Aufnahmestudien mit Caco-2 Zellen auf den Proteingehalt bezogen (Glahn *et al.*, 1998; Lenaerts *et al.*, 2005; Shimizu *et al.*, 2008). Es wurden zunächst verschiedene Ablösemethoden angewendet und die Proteinmengen verglichen, welche Rückschlüsse auf die Anzahl der abgelösten Zellen zuließen (Abbildung 2-7).



**Abbildung 2-7: Einfluss der Ablösemethode auf den Proteingehalt**

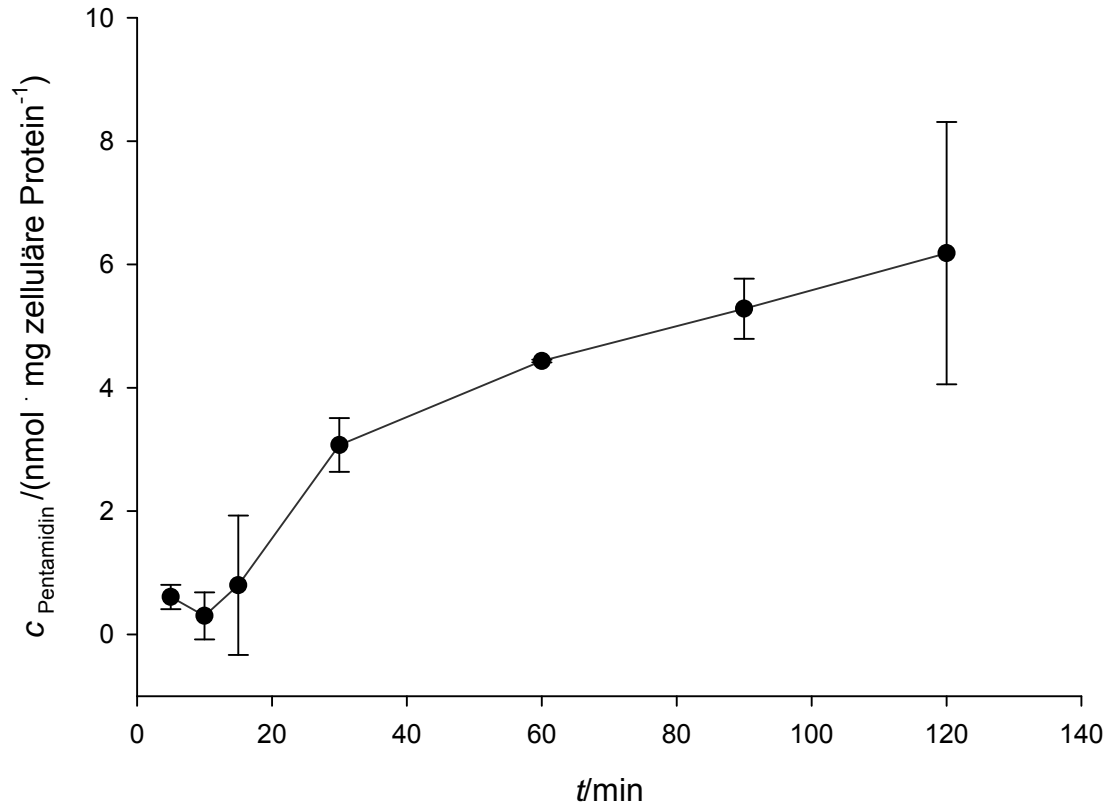
Die Zellen wurden unter den in Kap. 3.1.2.1 beschriebenen Bedingungen angezchtet. Die Durchführung der Proteinbestimmung ist in Kap. 3.1.2.2.3 beschrieben. Die ermittelten Proteinmengen sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus zwei parallelen Inkubationen.

Die Inkubation der Zellen mit 1 N NaOH über Nacht, wies im Vergleich zum Zellschaber, dem Ultraschallbad und der Ultraschallsonde die höchsten extrahierten Proteinmengen auf. Somit war davon auszugehen, dass die Methode mit NaOH die ist, welche die meisten Zellen von der Platte abzulösen vermochte. Die Ultraschallablösung zeigte eine geringere Standardabweichung als die NaOH-Methode, aber die extrahierte Proteinmenge war deutlich geringer. Der Zellschaber war nicht geeignet, da die Proteinmenge deutlich kleiner war, bei erhöhter Standardabweichung. Für die Versuche wurden die Zellen zur Extraktion der Substanzen zunächst mit Methanol versetzt und anschließend für die Proteinbestimmung von der Platte abgelöst. Vergleich man die abgelösten Proteinmengen von Ultraschall und Zellschaber nach Methanolbehandlung mit der NaOH-Methode, so wurde deren Unterlegenheit sehr deutlich. Somit wurden die Zellen in den weiteren Versuchen mit 1 N NaOH abgelöst.

### 2.4.2 Aufnahme- und Effluxstudien

#### 2.4.2.1 Pentamidin

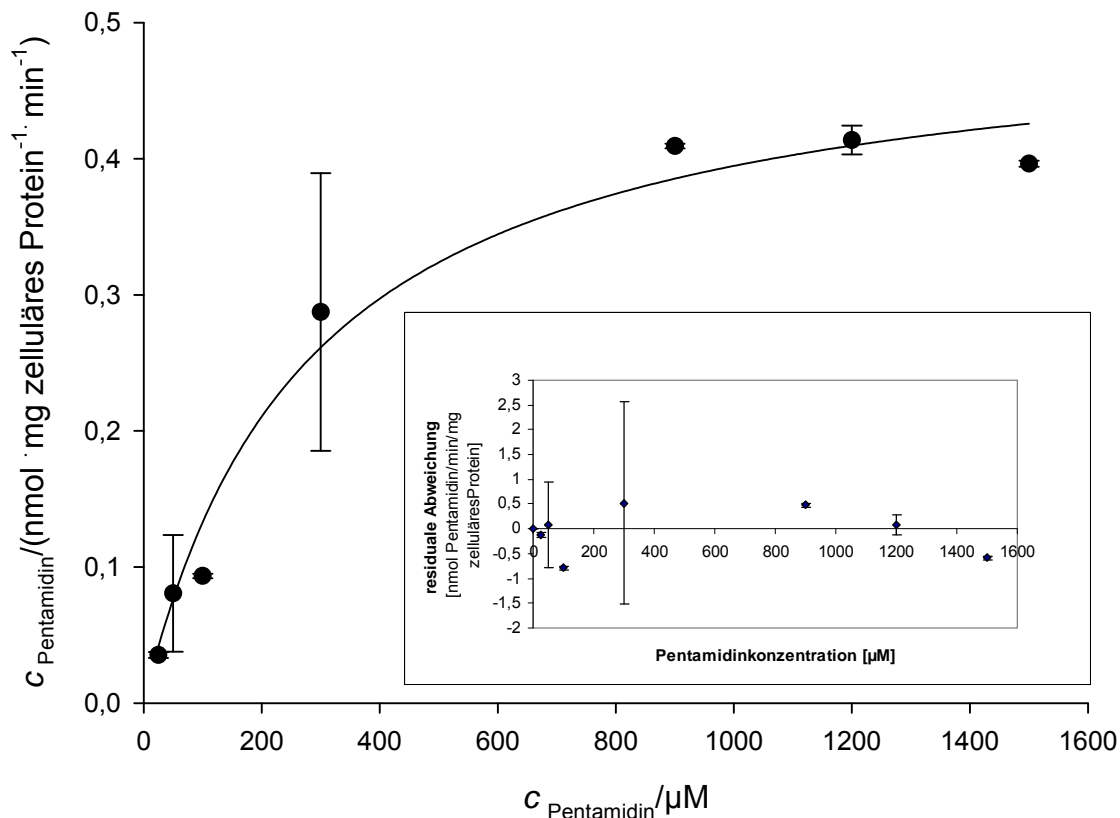
Pentamidin wurde zunächst als 50  $\mu\text{M}$  Lösung über 120 min inkubiert.



**Abbildung 2-8: Zeitabhängigkeit der Pentamidinaufnahme**

Die Zellen wurden mit einer 50  $\mu\text{M}$  Pentamidinlösung inkubiert. Die Durchführung ist in Kap. 2.3.1.8.2.1 beschrieben. Die Pentamidinkonzentrationen wurden mittels der in Kap. 2.3.1.10.1 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Konzentrationen sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus zwei parallelen Inkubationen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

Die Pentamidinaufnahme in die Zellen zeigte einen biphasischen Verlauf (Abbildung 2-8). Bis zu 30 min fand die Aufnahme rasch und linear statt, im zweiten Teil des Kurvenverlaufs, bis hin zu 120 min, stieg die Aufnahme vom Pentamidin nur noch mit deutlich geringerer Steigung an. Dieser Kurvenverlauf zeigte, dass die Aufnahme von Pentamidin in die Zellen durch zwei verschiedene Aufnahmeprozesse bestimmt wurde. Für die folgenden Versuche wurde somit eine Inkubationszeit von 20 min gewählt. Im Folgenden wurde Pentamidin in Konzentrationen von 25 bis 1500  $\mu\text{M}$  über 20 min inkubiert.

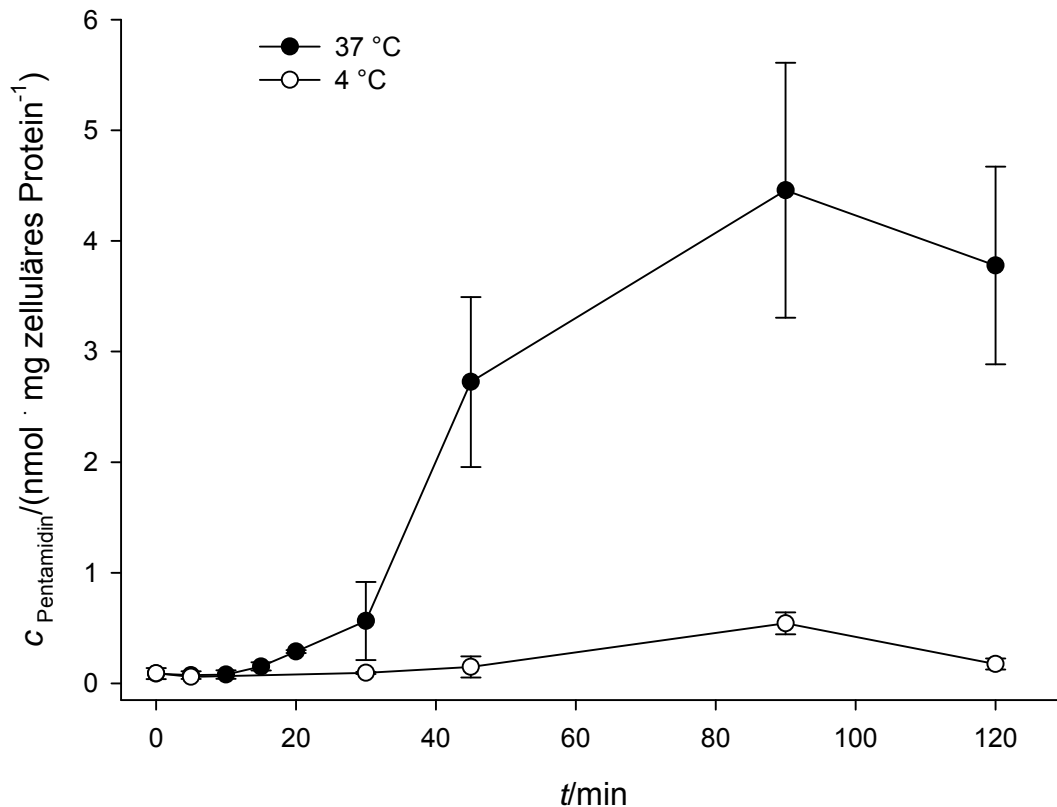


**Abbildung 2-9: Konzentrationsabhängigkeit der Pentamidinaufnahme**

Die Inkubationszeit betrug 20 min. Die Durchführung ist in Kap. 2.3.1.8.2.1 beschrieben. Die Pentamidinkonzentrationen wurden mittels der in Kap. 2.3.1.10.1 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Konzentrationen sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus zwei parallelen Inkubationen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

Die Konzentrationsabhängigkeit (Abbildung 2-9) zeigte keinen linearen, sondern einen hyperbolen Verlauf. Nach der Michaelis-Menten-Kinetik ließen sich die folgenden kinetischen Parameter berechnen:

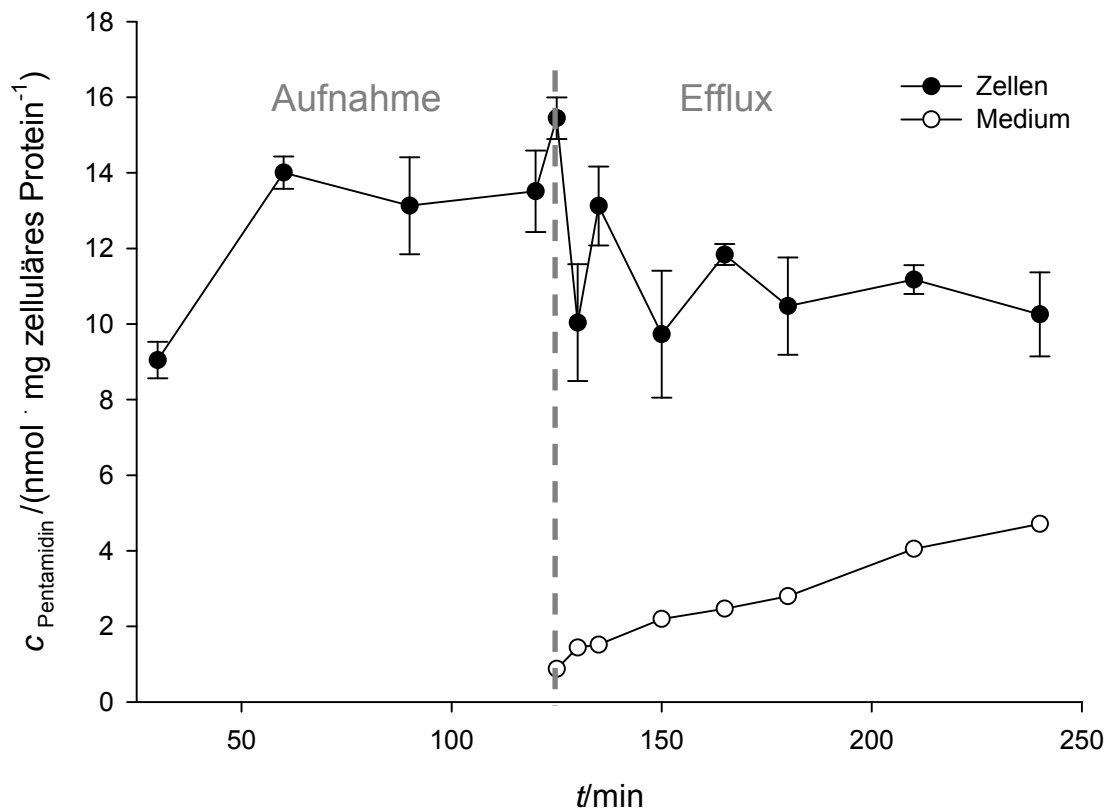
$K_m = 280 \pm 67 \mu\text{M}$  und  $V_{\text{max}} = 0,5 \pm 0,1 \text{ nmol} \cdot \text{mg zelluläres Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ . Dies ist ein weiterer Hinweis für einen aktiven Aufnahmeprozess und spricht gegen die passive Diffusion von Pentamidin in die Caco-2 Zellen bei 20 min Inkubationszeit. Der relativ große  $K_m$ -Wert wies jedoch darauf hin, dass es sich hier um einen Aufnahmeprozess von untergeordneter Rolle handelt, der für die orale Aufnahme von Pentamidin klinisch keine Relevanz hat. Um diesen Sachverhalt weiter zu charakterisieren, wurde Pentamidin vergleichend bei 4 °C und 37 °C inkubiert.



**Abbildung 2-10: Temperaturabhängigkeit der Pentamidinaufnahme**

Die Zellen wurden mit einer 50  $\mu\text{M}$  Pentamidinlösung inkubiert. Die Durchführung ist in Kap. 2.3.1.8.2.1 beschrieben. Die Pentamidinkonzentrationen wurden mittels der in Kap. 2.3.1.10.1 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Konzentrationen sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus zwei parallelen Inkubationen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

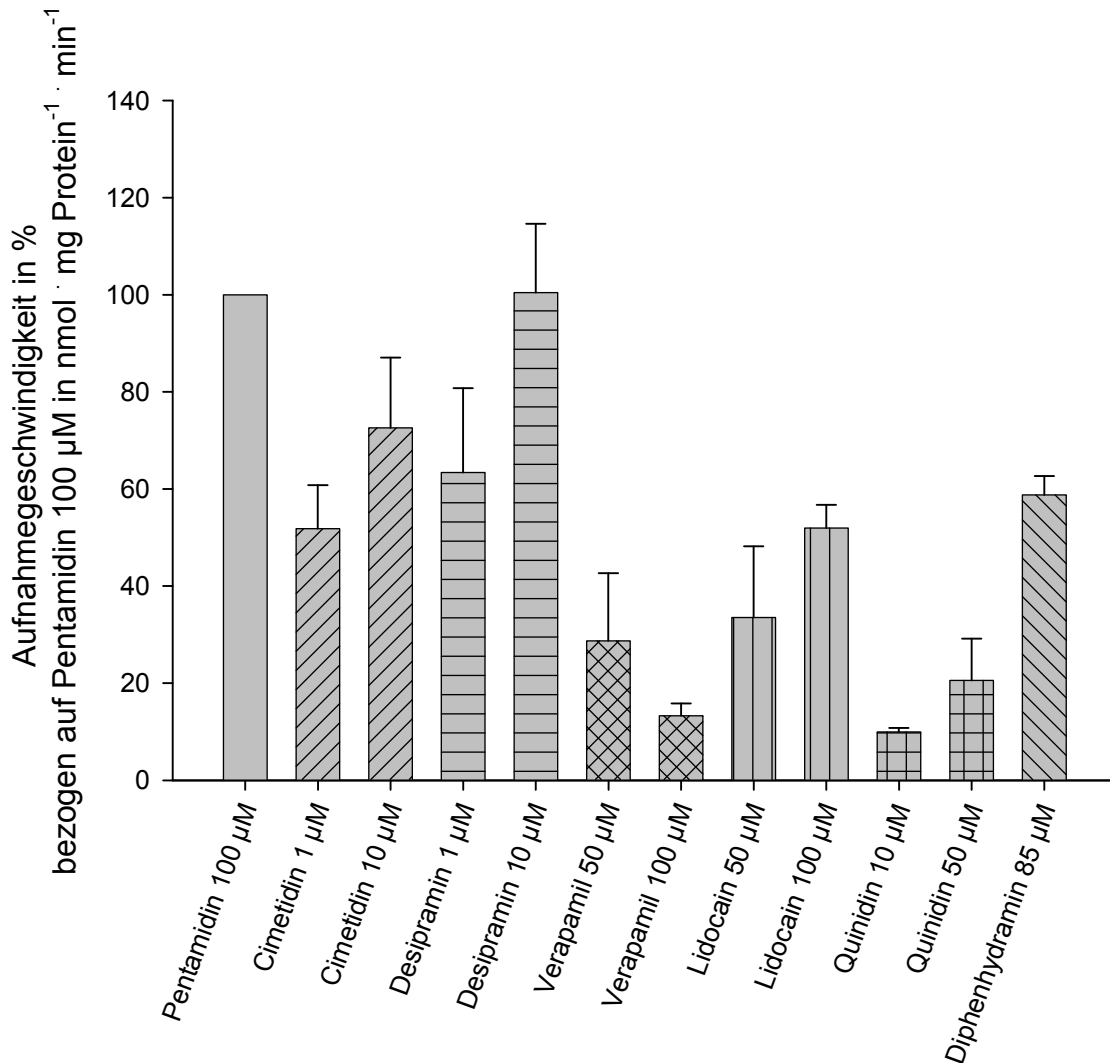
Bei 37 °C wurde im Vergleich zu 4 °C deutlich mehr Pentamidin in die Zellen aufgenommen, bei 4 °C fand nahezu keine Aufnahme in die Zellen statt (Abbildung 2-10). Nach 90 min Inkubationszeit wurde bei 37 °C 8,2-fach mehr Pentamidin in die Caco-2 Zellen aufgenommen als bei 4 °C. Die deutlich höheren Aufnahmeraten bei 37 °C sind ein weiterer Hinweis auf einen aktiven Aufnahmeprozess und sprachen gegen passive Diffusion. Von Interesse war weiterhin, ob Pentamidin in der Lage ist, die Zellen wieder zu verlassen und in welchem Maße. Dies sollte mit einer Effluxstudie genauer untersucht werden.



**Abbildung 2-11: Pentamidinaufnahme und -efflux**

Die Zellen wurden mit einer 100  $\mu\text{M}$  Pentamidinlösung inkubiert. Die Durchführung ist in Kap. 2.3.1.8.2.2 beschrieben. Die Pentamidinkonzentrationen wurden mittels der in Kap. 2.3.1.10.1 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Konzentrationen sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus drei parallelen Inkubationen.

Abbildung 2-11 zeigt die Ergebnisse der Effluxstudie. Während einer zweistündigen Inkubation der Zellen mit einer Pentamidinlösung wurden die Zellen mit Pentamidin geladen. Nach dem Waschen der Zellen, um die außen an den Zellen haftende Substanz abzulösen, wurden die Zellen in substanzfreiem Puffer inkubiert. Die Pentamidinkonzentration sank in den Zellen während der Inkubation in reinem Puffer. Im umliegenden Medium jedoch stieg die Pentamidinkonzentration linear über die Zeit an. Zur weiteren Charakterisierung des Aufnahmeprozesses von Pentamidin wurde Pentamidin zusammen mit Inhibitoren von verschiedenen intestinalen Transportern inkubiert.



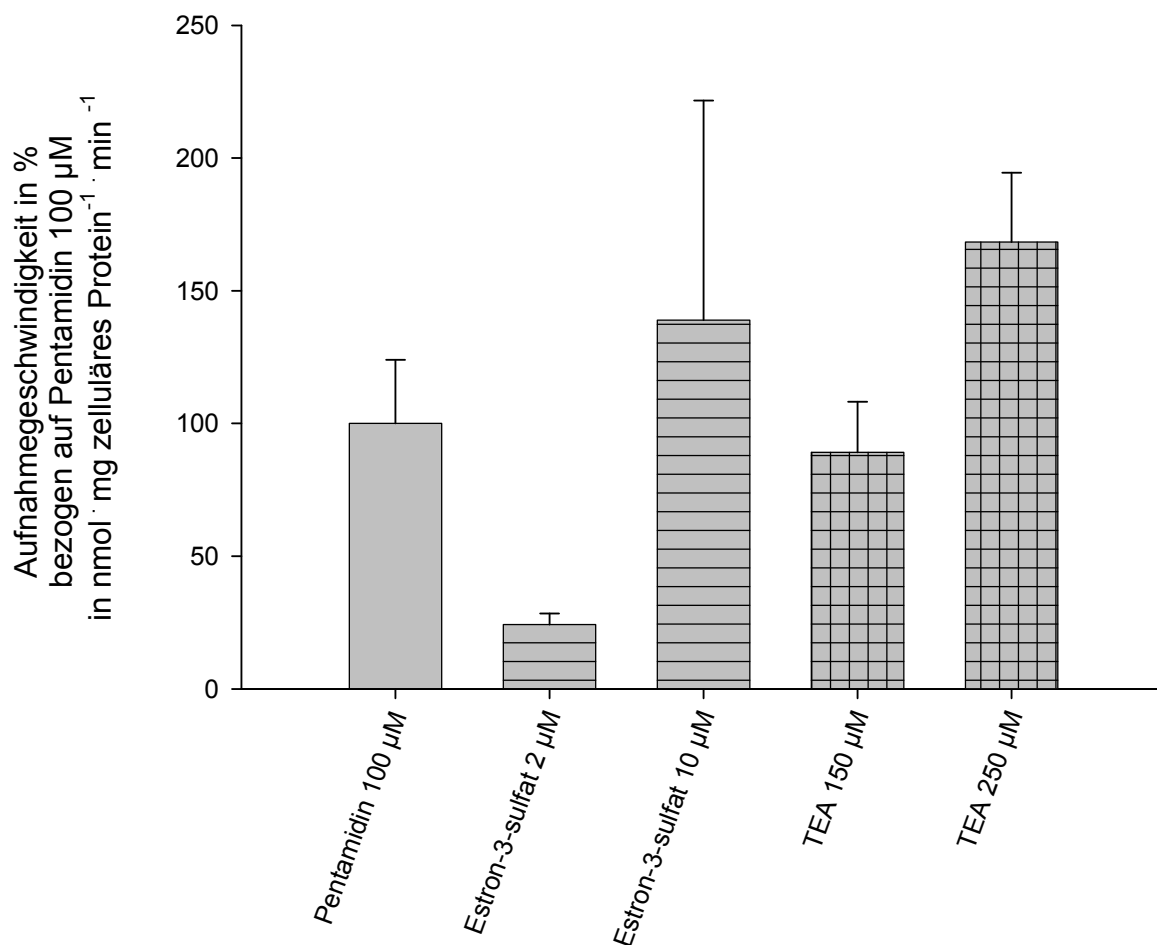
**Abbildung 2-12: Einfluss verschiedener Inhibitoren intestinaler Transporter auf die Pentamidinaufnahme**

Die Zellen wurden mit einer 100 µM Pentamidinlösung zusammen mit der jeweils angegebenen Substanz inkubiert. Die Durchführung ist in Kap. 2.3.1.8.2.1 beschrieben. Die Pentamidinkonzentrationen wurden mittels der in Kap. 2.3.1.10.1 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Konzentrationen sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus zwei parallelen Inkubationen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

Alle der untersuchten Substanzen zeigten einen Einfluss auf den Pentamidintransport (Abbildung 2-12). Cimetidin, Desipramin und Verapamil sind Inhibitoren des OCTN<sub>1</sub>-Transporters (Yabuuchi *et al.*, 1999). Cimetidin ließ die Aufnahme-geschwindigkeit konzentrationsabhängig auf 50-70 % sinken. Desipramin hatte nur als 1 µM Lösung einen Einfluss, dabei sank die Aufnahmegeschwindigkeit auf ca. 60 %. Verapamil, Lidocain, Quinidin und Diphenhydramin sind Inhibitoren des OCTN<sub>2</sub>-Transporters (Diao *et al.*, 2009). Verapamil zeigte den stärksten Effekt auf



die Pentamidinaufnahme, die Geschwindigkeit sank auf ca. 20 % bei einer Inkubation mit einer 50  $\mu\text{M}$  Lösung. Die Interaktion verstärkte sich noch bei der Inkubation mit einer 100  $\mu\text{M}$  Lösung und ließ die Geschwindigkeit auf ca. 10 % sinken. Die Pentamidinaufnahme wurde durch Lidocain auf 30-50 % der Aufnahmegeschwindigkeit reduziert. Durch die Zugabe von Quinidin wurde die Aufnahmegeschwindigkeit von Pentamidin auf 10-20 % reduziert. Diphenhydramin ließ die Geschwindigkeit auf ca. 60 % sinken. Diese Ergebnisse liessen auf die Beteiligung der OCTN<sub>1</sub>- und OCTN<sub>2</sub>- Transporter schließen, wobei der OCTN<sub>2</sub>-Transporter stärker beteiligt zu sein scheint.



**Abbildung 2-13: Einfluss verschiedener Inhibitoren intestinaler Transporter auf die Pentamidinaufnahme**

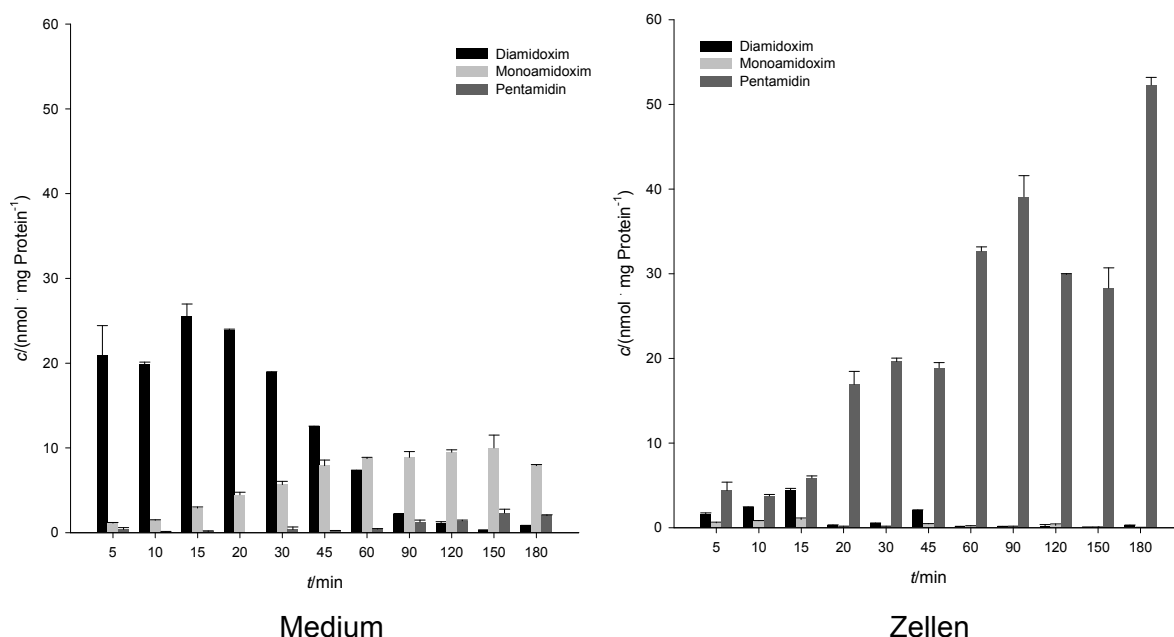
Die Zellen wurden mit einer 100  $\mu\text{M}$  Pentamidinlösung zusammen mit der jeweils angegebenen Substanz inkubiert. Die Durchführung ist in Kap. 2.3.1.8.2.1 beschrieben. Die Pentamidinkonzentrationen wurden mittels der in Kap. 2.3.1.10.1 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Konzentrationen sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus zwei parallelen Inkubationen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

## 2.4 Ergebnisse

Zusammen mit Pentamidin wurden Estron-3-sulfat und TEA inkubiert (Abbildung 2-13). Estrone-3-sulfat ist ein bekanntes Substrat des OATP-B und OATP-C Transporters (Tamai *et al.* 2001). Estron-3-sulfat ließ die Pentamidinaufnahme in geringer Konzentration (2  $\mu\text{M}$ ) stark sinken und in höherer Konzentration (10  $\mu\text{M}$ ) ansteigen. TEA stellt ein Substrat für meherer Tansporter sowohl aus der OCT- als auch aus der OCTN- Gruppe dar (Zhang *et al.*, 1997; Wagner *et al.*, 2000) Die Pentamidinaufnahme verhielt sich bei der Koinkubation mit TEA ähnlich wie bei der Koinkubation mit Estron-3-sulfat, sie sank leicht bei 150  $\mu\text{M}$  und stieg bei 250  $\mu\text{M}$  TEA.

### 2.4.2.2 Diamidoxim

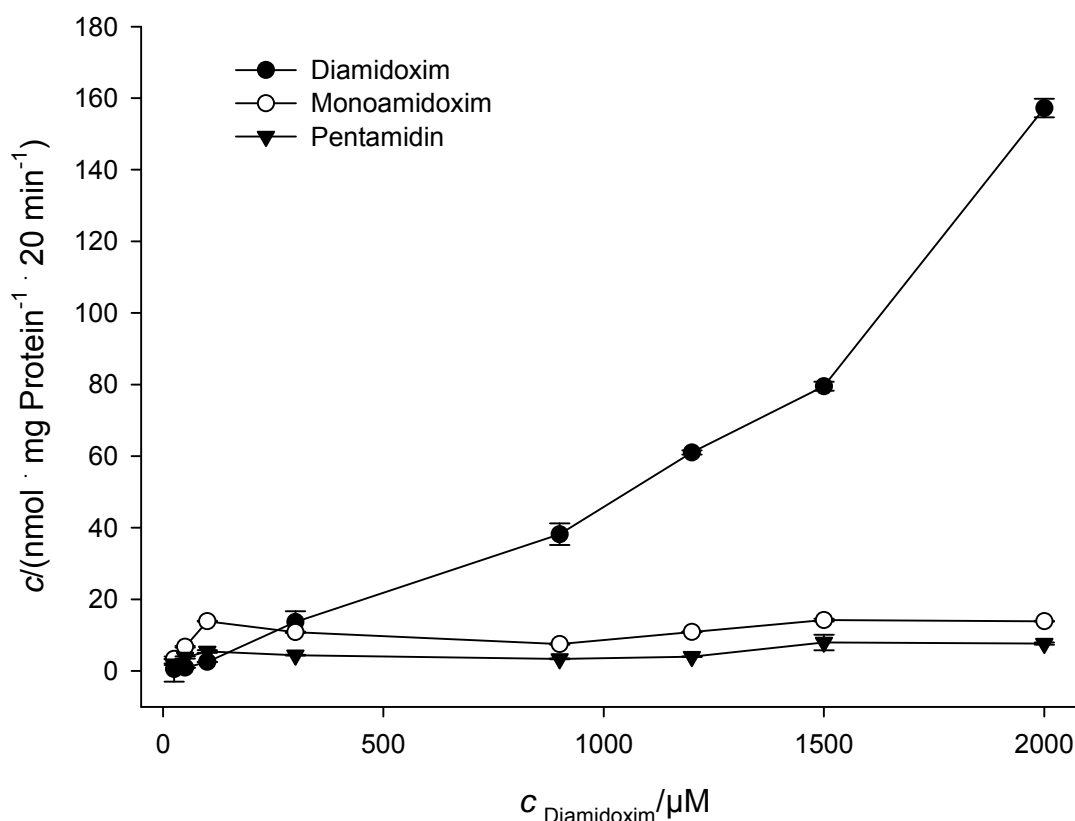
Diamidoxim wurde als 50  $\mu\text{M}$  Lösung über 180 min inkubiert (Abbildung 2-14). Es wurden Proben des Mediums und der Zellen untersucht. Im umliegenden Medium wurde das Diamidoxim rasch zu Monoamidoxim und Pentamidin metabolisiert. Zum Ende der Inkubation waren nur noch geringe Mengen an Diamidoxim detektierbar. Das Monoamidoxim entstand in deutlich größeren Mengen als das Pentamidin.



**Abbildung 2-14: : Zeitabhängigkeit der Diamidoximaufnahme**

Die Zellen wurden mit einer 50  $\mu\text{M}$  Diamidoximlösung inkubiert. Die Durchführung ist in Kap. 2.3.1.8.2.1 beschrieben. Die Konzentrationen wurden mittels der in Kap. 2.3.1.10.1 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Konzentrationen sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus zwei parallelen Inkubationen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

Das Diamidoxim wurde in die Caco-2 Zellen aufgenommen, allerdings waren davon nur geringe Mengen detektierbar. In den Zellen war sowohl das Monoamidoxim als auch die aktive Form Pentamidin zu finden. Monoamidoxim trat nur in sehr geringen Mengen auf, es waren aber große Mengen an Pentamidin zu finden. In den Zellen schien das Diamidoxim bis zum Pentamidin metabolisiert zu werden. Im Folgenden wurde das Diamidoxim konzentrationsabhängig im Bereich von 25 bis 2000  $\mu\text{M}$  inkubiert (Abbildung 2-15). Zur besseren Vergleichbarkeit mit Pentamidin wurden auch für das Prodrug 20 min Inkubationszeit gewählt.



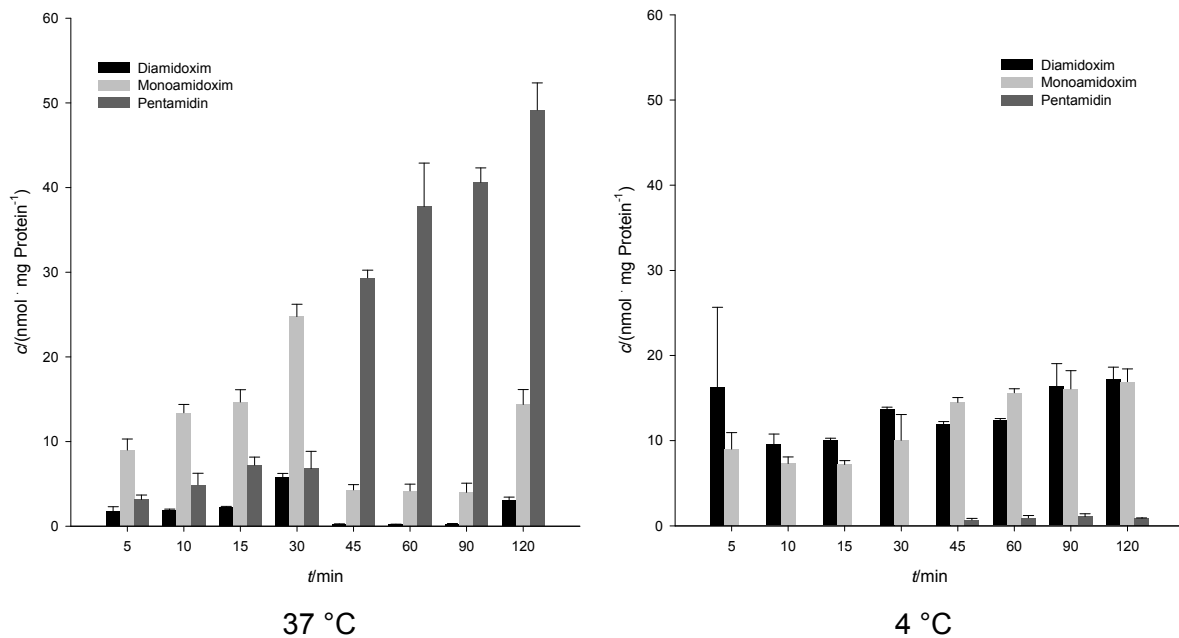
**Abbildung 2-15: Konzentrationsabhängigkeit der Diamidoximaufnahme**

Die Inkubationszeit betrug 20 min. Die Durchführung ist in Kap. 2.3.1.8.2.1 beschrieben. Die Konzentrationen wurden mittels der in Kap. 2.3.1.10.1 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Konzentrationen sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus zwei parallelen Inkubationen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

Die Diamidoximkonzentration stieg intrazellulär bis zu 1500  $\mu\text{M}$  linear an. Dies deutete auf einen passiven Transportvorgang hin. In den Zellen waren neben dem Diamidoxim auch das Monoamidoxim sowie die Wirkform Pentamidin zu detektieren. Die Mengen der entstandenen Metabolite blieben über den gesamten Konzentrationsbereich konstant, wobei das Monoamidoxim in einer doppelt so hohen Konzentration zu finden war wie das Pentamidin.

## 2.4 Ergebnisse

Zur weiteren Charakterisierung des Diamidoximtransports an der apikalen Membran der Caco-2 Zellen wurde eine vergleichende Inkubation bei 37 °C und 4 °C durchgeführt (Abbildung 2-16).



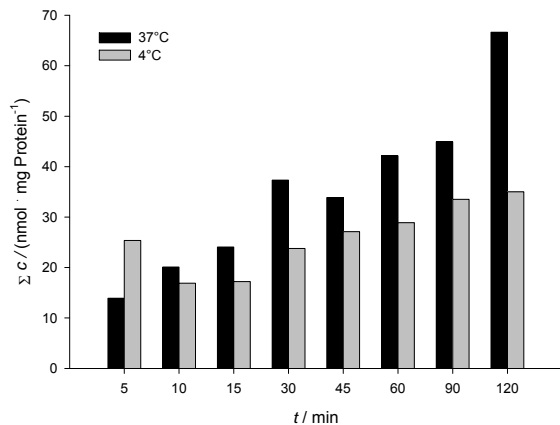
**Abbildung 2-16: Temperaturabhängigkeit der Diamidoximaufnahme**

Die Zellen wurden mit einer 100  $\mu\text{M}$  Diamidoximlösung inkubiert. Die Durchführung ist in Kap. 2.3.1.8.2.1 beschrieben. Die Konzentrationen wurden mittels der in Kap. 2.3.1.10.1 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Konzentrationen sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus drei parallelen Inkubationen.

Bei 37 °C entstand intrazellulär wiederum hauptsächlich Pentamidin, das Diamidoxim war nur in geringen Mengen zu detektieren. Das Monoamidoxim war bis zu 30 min in höheren Konzentrationen zu finden, bei den späteren Zeitpunkten wurde jedoch Pentamidin als Hauptmetabolit gefunden. Im Gegensatz dazu wurde bei 4 °C das Diamidoxim über die gesamte Inkubationszeit in höheren und ähnlichen Konzentrationen wie das Monoamidoxim detektiert. Erst ab 45 min Inkubationszeit entstanden auch geringe Mengen Pentamidin.

Die Auftragung der Summe aller detektierbaren Verbindungen gegen die Zeit zeigte, dass bei 37 °C deutlich mehr in die Zellen aufgenommen wurde als bei 4 °C. Dies könnte in der aktiven Aufnahme des Pentamidins, welches im Medium entstand, in die Zellen begründet sein, die parallel neben dem passiven Transport des Diamidoxims ablief.

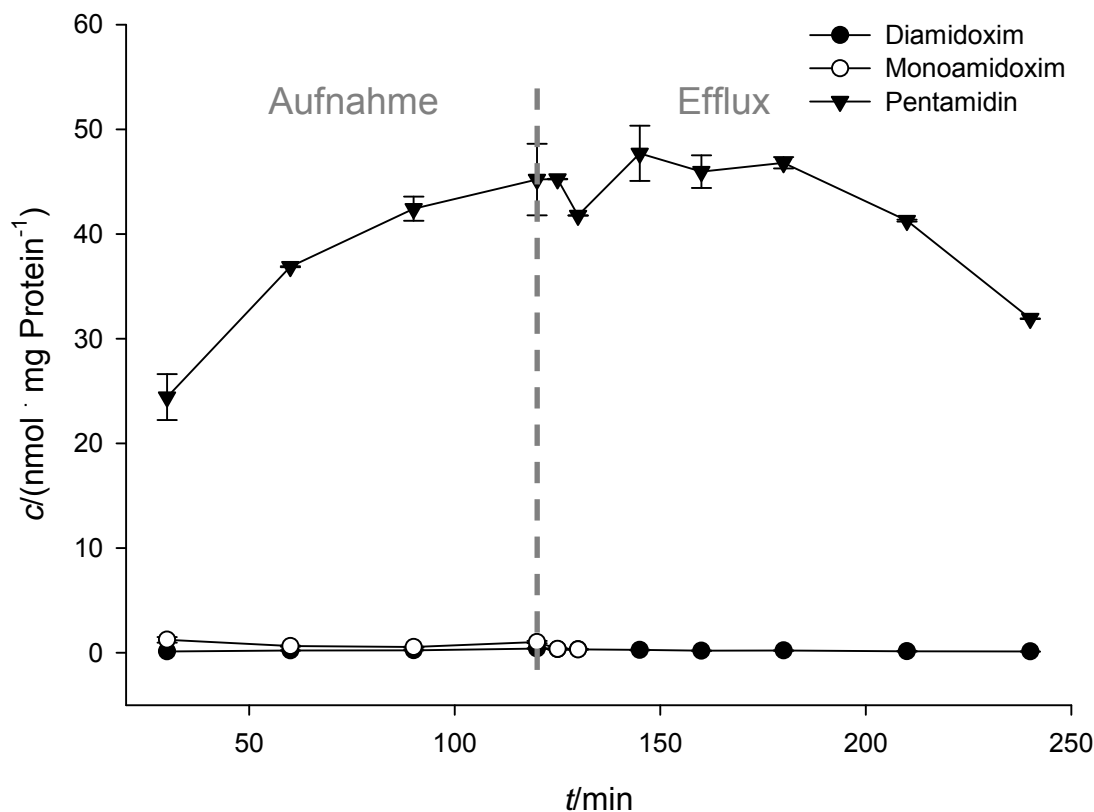
Die folgende Abbildung 2-17 zeigt eine Auftragung der Summe aller detektierbaren Verbindungen für die Inkubationen bei 37°C und 4 °C gegen die Zeit.



**Abbildung 2-17: Temperaturabhängigkeit der Diamidoximaufnahme**

Die Zellen wurden mit einer 100 µM Diamidoximlösung inkubiert. Die Durchführung ist in Kap. 2.3.1.8.2.1 beschrieben. Die Konzentrationen wurden mittels der in Kap. 2.3.1.10.1 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Konzentrationen sind Mittelwerte der Summen aller intrazellulär detektierbaren Verbindungen aus drei parallelen Inkubationen.

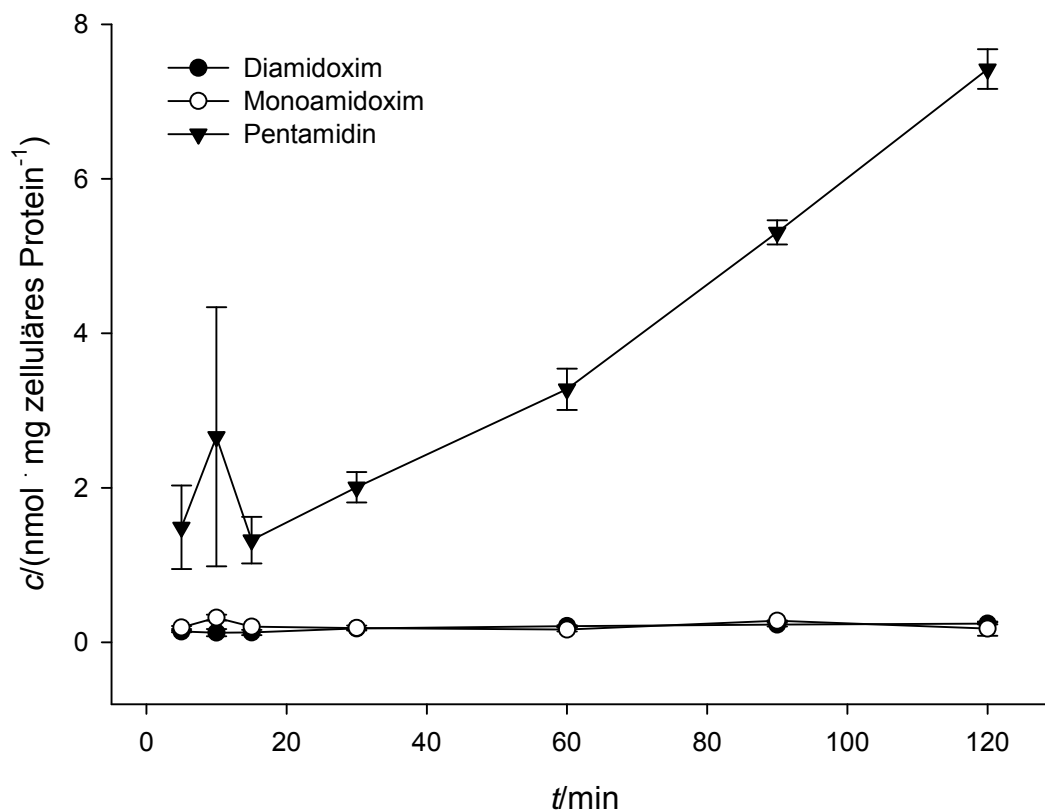
Es wird deutlich, dass bei 37 °C nach 120 min ca. das Doppelte an Substanz in die Zellen aufgenommen wurde. Des Weiteren wurde eine Effluxstudie des Diamidoxims durchgeführt.



**Abbildung 2-18: Diamidoximaufnahme und -efflux der Caco-2 Zellen**

Die Zellen wurden mit einer 100  $\mu\text{M}$  Diamidoximlösung inkubiert. Die Durchführung ist in Kap. 2.3.1.8.2.2 beschrieben. Die Konzentrationen wurden mittels der in Kap. 2.3.1.10.1 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Konzentrationen sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus zwei parallelen Inkubationen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

Die Ergebnisse der Effluxstudie in Abbildung 2-18 zeigte, dass in den Zellen hauptsächlich Pentamidin zu finden war, welches bis zu 120 min anstieg. Aber in den Zellen waren auch geringe Konzentrationen an Diamidoxim und Monoamidoxim zu finden. Während der Inkubation der Zellen in substanzfreiem Medium sank die Pentamidinkonzentration intrazellulär. Diamidoxim war über die gesamte Inkubationszeit im substanzfreien Medium in den Zellen zu finden, Monoamidoxim hingegen nur die ersten 130 min.



**Abbildung 2-19: Diamidoximefflux in das Medium**

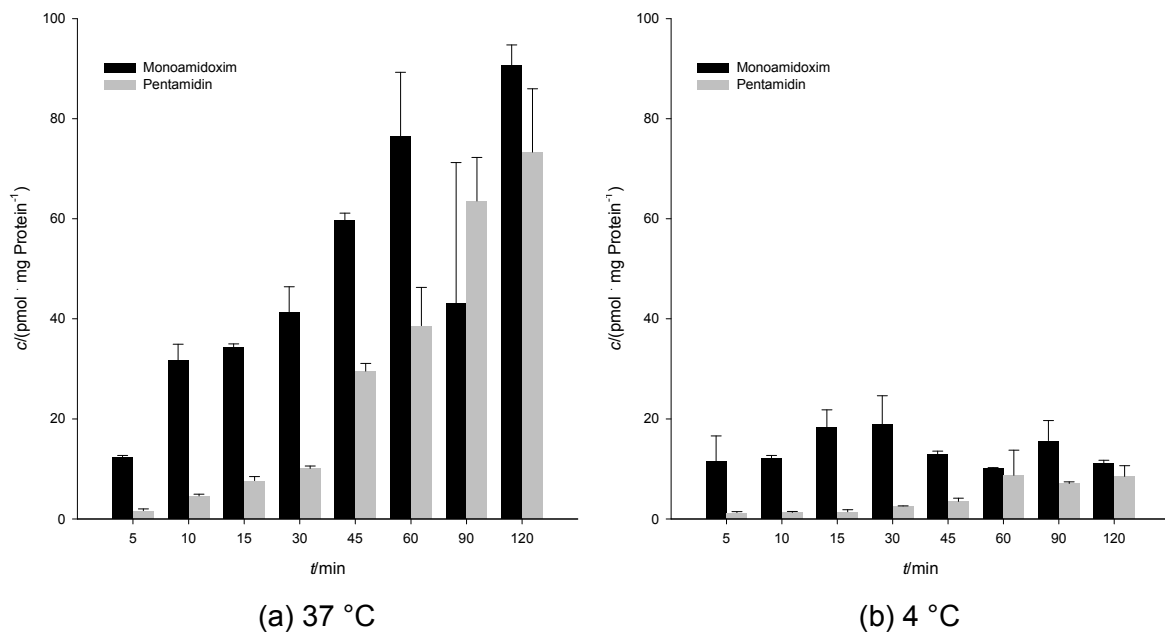
Die Zellen wurden mit einer 100  $\mu\text{M}$  Diamidoximlösung inkubiert. Die Durchführung ist in Kap. 2.3.1.8.2.2 beschrieben. Die Konzentrationen wurden mittels der in Kap. 2.3.1.10.1 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Konzentrationen sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus zwei parallelen Inkubationen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

Nach 120 min Inkubationszeit in einer 100  $\mu\text{M}$  Diamidoximlösung wurden die Zellen gewaschen und in substanzfreiem Puffer über weitere 120 min inkubiert. In dem umliegenden substanzfreien Puffer stieg die Pentamidinkonzentration linear an (Abbildung 2-19). Es wurden aber auch geringe Konzentrationen an Monoamidoxim und Diamidoxim über die gesamten 120 min im Puffer detektiert. Also war das Diamidoxim selber in der Lage, die Zellen wieder zu verlassen.

## 2.4 Ergebnisse

### 2.4.2.3 Diamidoxim mit porcinen Lebermikrosomen

Aufgrund der interessanten Tatsache, dass die Reduktion vom Diamidoxim zum Monoamidoxim bis hin zum Pentamidin in Caco-2 Zellen auch bei 4 °C stattfand, wurde der Metabolismus vom Diamidoxim auch vergleichend bei 37 °C und 4 °C mit porcinen Lebermikrosomen untersucht. Diamidoxim wurde als 1 mM Lösung eingesetzt.



**Abbildung 2-20: Temperaturabhängigkeit der Diamidoximreduktion durch porcine Lebermikrosomen**

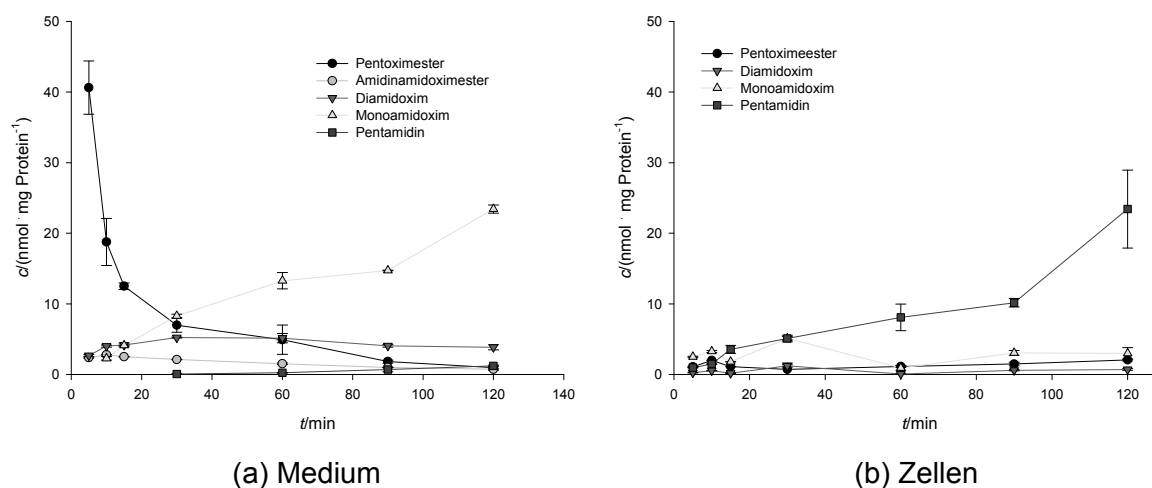
Die Inkubationsansätze setzten sich wie folgt zusammen: 0,1 mg mikrosomales Protein, 1 mM NADH und 1 mM Diamidoxim in 50 mM Phosphatpuffer pH 6,3t. Die Durchführung und Aufarbeitung ist in Kap. 2.3.2.2 beschrieben. Die Konzentrationen wurden mittels der in Kap. 2.3.2.3.1 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Konzentrationen sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus zwei parallelen Inkubationen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

Da das Diamidoxim als 1 mM Lösung eingesetzt wurde, lag die Substanz im Überschuss vor und somit wurde auf die Konzentrationsbestimmung des Diamidoxims verzichtet. Bei den Inkubationen des Diamidoxims mit porcinen Lebermikrosomen entstanden die Metabolite Monoamidoxim und Pentamidin (Abbildung 2-20). Bei 37 °C waren deutlich größere Konzentrationen an Monoamidoxim und Pentamidin zu finden als bei 4 °C. Bei 37 °C stiegen sowohl die Monoamidoxim- als auch die Pentamidinkonzentration über die gesamten 120 min Inkubationszeit an. Bei 4 °C hingegen sank die Monoamidoximkonzentration nach 30 min Inkubationszeit bei ansteigender Pentamidinkonzentration.



### 2.4.2.4 Pentoximester

Der Pentoximester wurde über 120 min in einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  inkubiert. Dabei wurden bei den entsprechenden Zeitpunkten Proben des Mediums gezogen und auch die Zellen analysiert (Abbildung 2-21). Im Medium wurde der Pentoximester rasch abgebaut und es entstanden die Metabolite. Dabei waren konstante Mengen des Amidinamidoximesters sowie des Diamidoxims zu finden, die für beide sehr gering waren. Hauptsächlich entstand Monoamidoxim aus dem Pentoximester. Monoamidoxim weist eine substratabhängige Sättigung der Reduktion zum Pentamidin auf, was bereits aus den Studien von Rieckert (1999) hervorging. Es wurden auch sehr geringe Mengen an Pentamidin gebildet, auch hier kam die Substratsättigung zum Tragen. Außerdem ist an dieser Stelle auch der aktive Transport von Pentamidin über die apikale Membran zu bedenken, wodurch Pentamidin aus dem Medium entfernt wird.



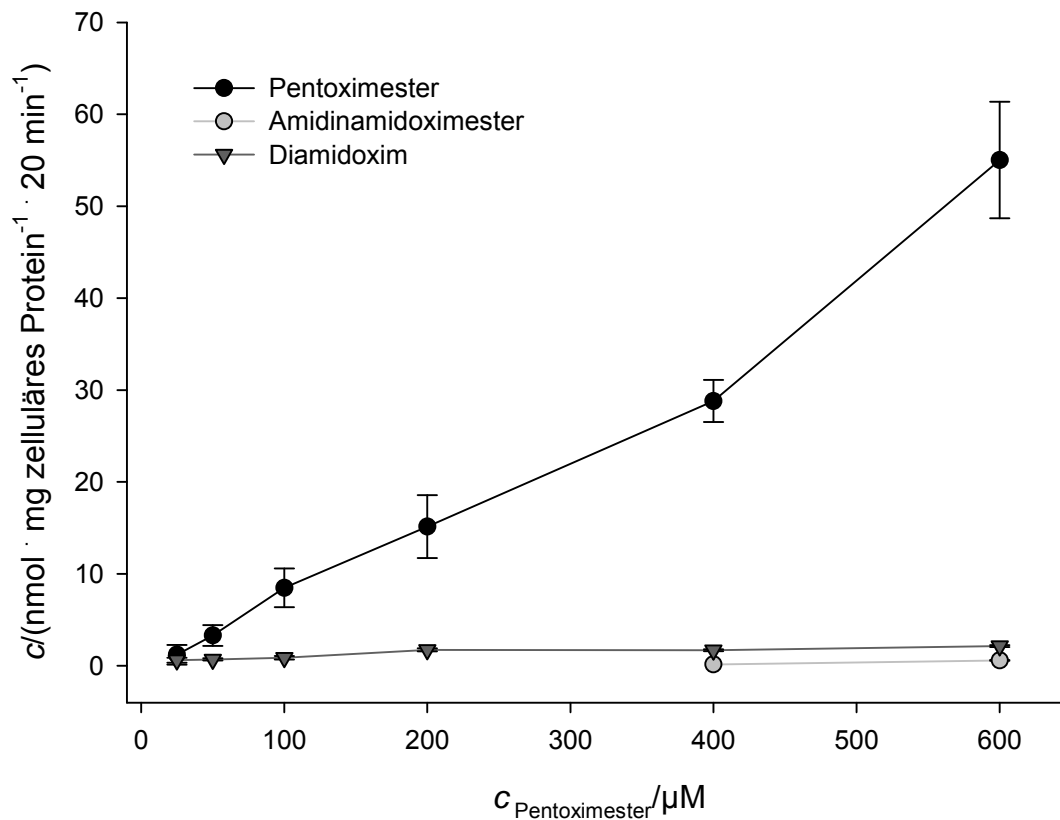
**Abbildung 2-21: Zeitabhängigkeit der Pentoximesteraufnahme**

Die Zellen wurden mit einer 50  $\mu\text{M}$  Pentoximesterlösung inkubiert. Die Durchführung ist in Kap. 2.3.1.8.2.1 beschrieben. Die Konzentrationen wurden mittels der in Kap. 2.3.1.10.1 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Konzentrationen sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus zwei parallelen Inkubationen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

In den Zellen waren über 120 min geringe Mengen an Pentoximester zu finden. Diese wurden allerdings rasch metabolisiert. Weiterhin waren konstante Mengen an Diamidoxim und Monoamidoxim zu beobachten. Das aktive Pentamidin entsteht über Esterhydrolysen und *N*-Reduktionen aus dem Pentoximester, aber auch aus den intermediär entstehenden Metaboliten. Die intrazelluläre Konzentration an Pentamidin stieg bis zu 90 min linear an. Im Folgenden wurde der Pentoximester

## 2.4 Ergebnisse

über 20 min in verschiedenen Konzentrationen inkubiert (Abbildung 2-22). Die Versuchszeit von 20 min ergab sich aus einer konzentrationsabhängigen Inkubation mit der aktiven Wirkform Pentamidin, welches eine Aufnahmekinetik nach Michaelis-Menten zeigte, wobei der lineare Bereich der aktiven Aufnahme bis zu 30 min zu beobachten war. Aufgrund der schlechten Löslichkeit des Pentoximesters in höheren Konzentrationen wurde hierbei insbesondere der Konzentrationsbereich von 25-600  $\mu\text{M}$  berücksichtigt.



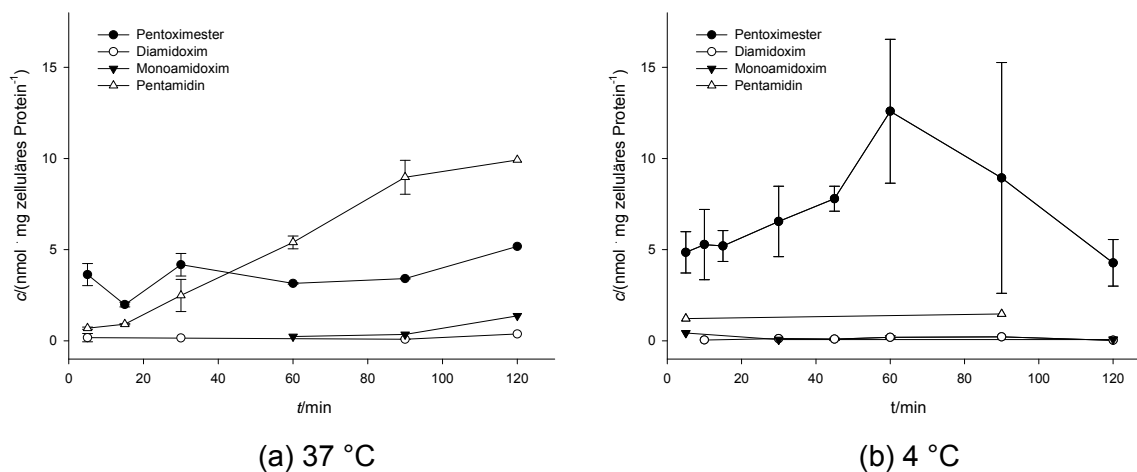
**Abbildung 2-22: Konzentrationsabhängigkeit der Pentoximesteraufnahme**

Die Inkubationszeit betrug 20 min. Die Durchführung ist in Kap. 2.3.1.8.2.1 beschrieben. Die Konzentrationen wurden mittels der in Kap. 2.3.1.10.1 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Konzentrationen sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus zwei parallelen Inkubationen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

Der Pentoximester wurde in die Zellen aufgenommen und intrazellulär entstanden die Metaboliten Amidinamidoximester und Diamidoxim. Da die Aufnahme des Pentoximesters bis 400  $\mu\text{M}$  einem linearen Verlauf folgte, war dies ein Zeichen für eine Aufnahme in die Caco-2 Zellen via passiver Diffusion. Dies war aufgrund der chemischen Struktur auch so zu erwarten, der Pentoximester liegt beim physiologischen pH-Wert von 7,4, bei dem auch der Versuch durchgeführt worden ist, ungeladen vor. Somit ist der Pentoximester in der Lage, eine Membran

wesentlich schneller zu passieren, als das bei pH 7,4 positiv geladene und damit wesentlich hydrophilere Pentamidin.

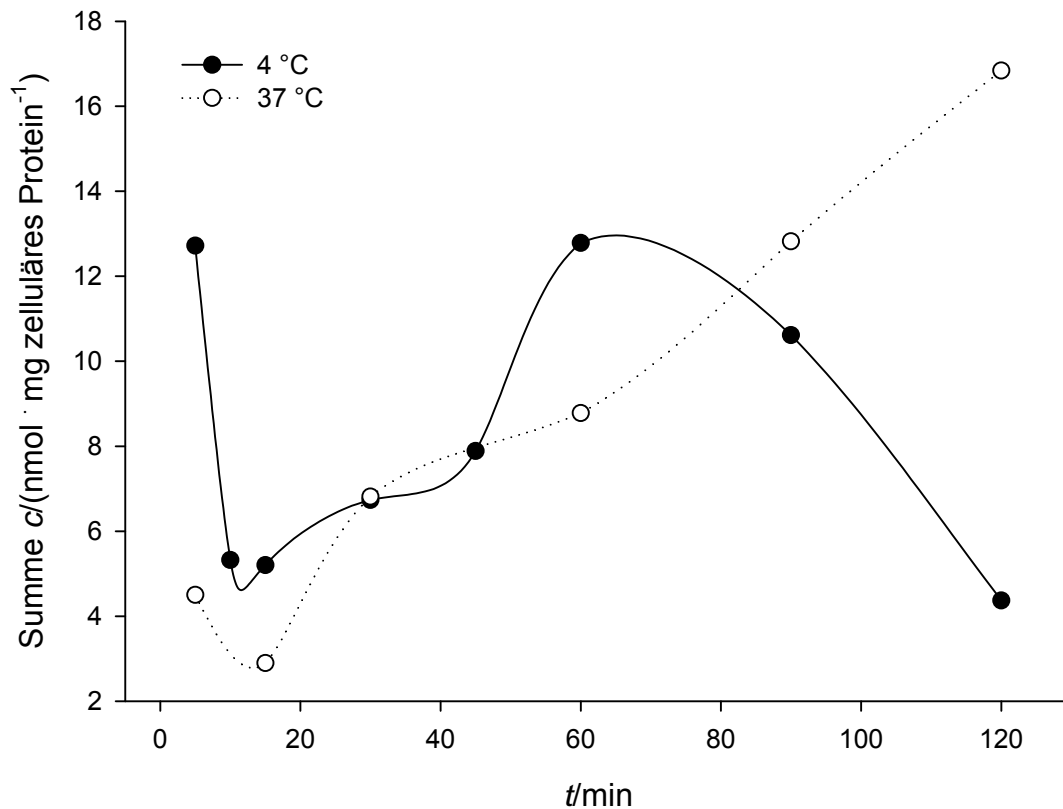
Anschließend wurde der Pentoximester vergleichend bei 37 °C und bei 4 °C inkubiert.



**Abbildung 2-23: Temperaturabhängigkeit der Pentoximesteraufnahme**

Die Zellen wurden mit einer 100  $\mu$ M Pentoximesterlösung inkubiert. Die Durchführung ist in Kap. 2.3.1.8.2.1 beschrieben. Die Konzentrationen wurden mittels der in Kap. 2.3.1.10.1 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Konzentrationen sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus drei parallelen Inkubationen.

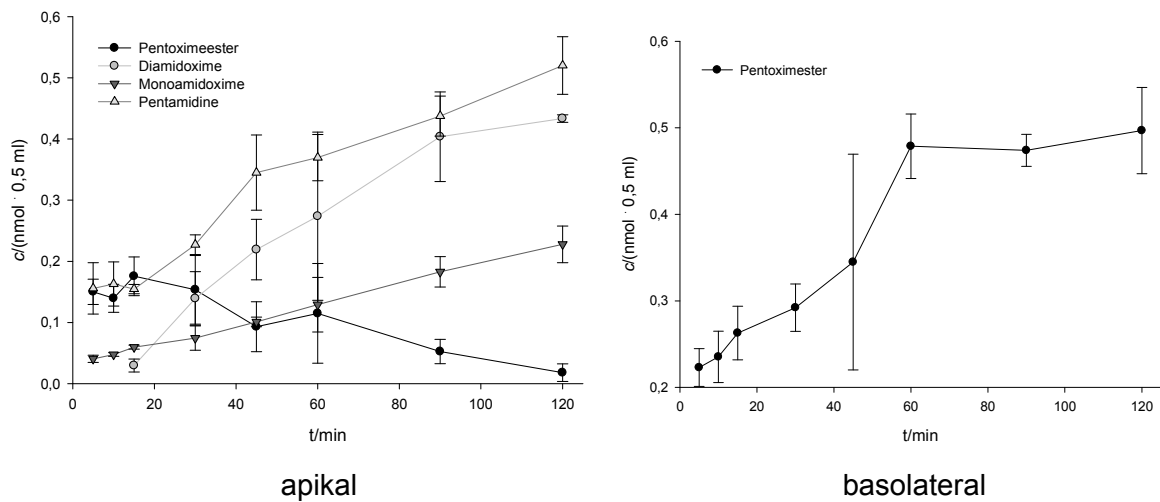
Bei 37 °C findet man in den Zellen hauptsächlich Pentamidin, dessen Konzentration über die Zeit linear anstieg. Die Pentoximesterkonzentration blieb während der Inkubation relativ konstant. Es waren über die gesamte Zeit auch geringe Konzentrationen an Diamidoxim und Monoamidoxim zu detektieren. Bei 4 °C hingegen war hauptsächlich der Pentoximester in den Zellen zu finden. Die Metabolite Diamidoxim, Monoamidoxim und Pentamidin waren nur in sehr geringen Konzentrationen zu detektieren.



**Abbildung 2-24: Temperaturabhängigkeit der Pentoximesteraufnahme**

Die Zellen wurden mit einer 100  $\mu\text{M}$  Pentoximesterlösung inkubiert. Die Durchführung ist in Kap. 2.3.1.8.2.1 beschrieben. Die Konzentrationen wurden mittels der in Kap. 2.3.1.10.1 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Konzentrationen sind Mittelwerte der Summen aller intrazellulär detektierbaren Verbindungen aus drei parallelen Inkubationen.

In der Auftragung der Summe aller detektierbaren Verbindungen wird deutlich, dass die Unterschiede zwischen den beiden Inkubationstemperaturen im späteren Zeitverlauf zum Tragen kommen. Bei 37 °C ist ab 90 min deutlich mehr Substanz in die Zellen aufgenommen worden.



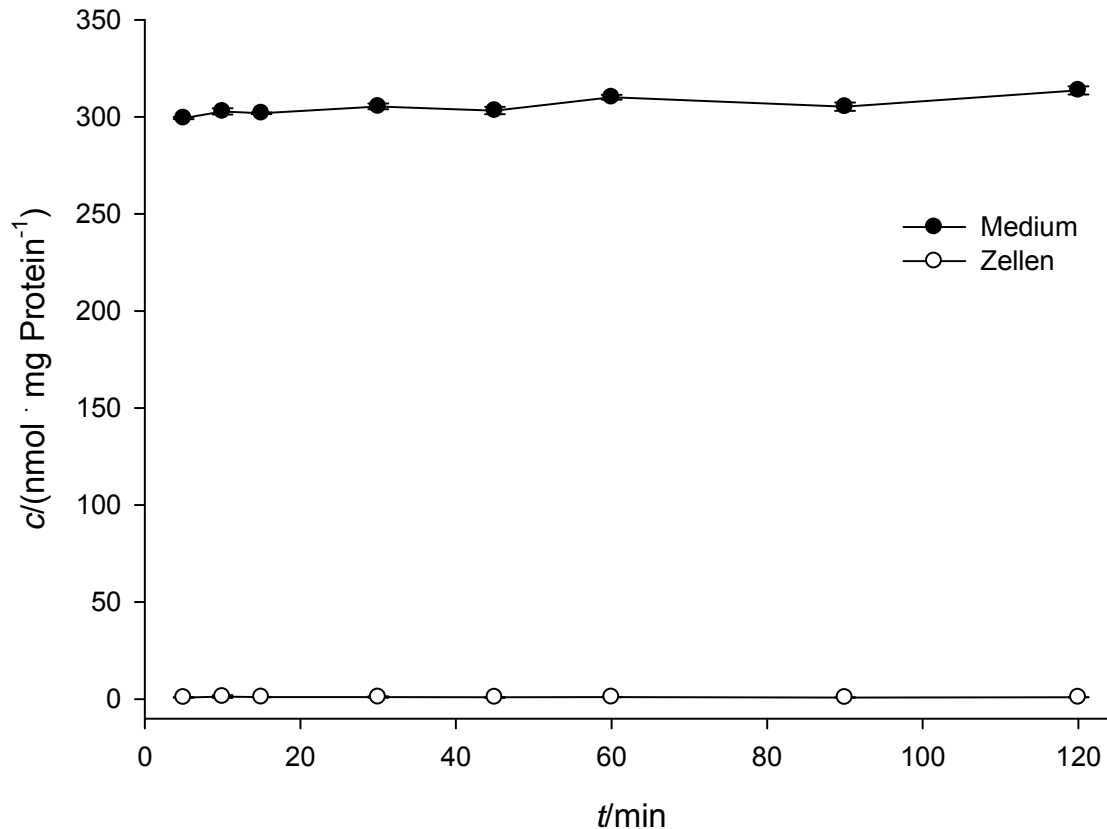
**Abbildung 2-25: Pentoximesterefflux**

Die Zellen wurden apikal und basolateral mit einer  $100 \mu\text{M}$  Pentoximesterlösung inkubiert. Die Durchführung ist in Kap. 2.3.1.8.2.2 beschrieben. Die Konzentrationen wurden mittels der in Kap. 2.3.1.10.1 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Konzentrationen sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus drei parallelen Inkubationen.

Die Ergebnisse der Effluxstudie des Pentoximesters verdeutlichen, dass an der basolateralen Zellmembran ausschließlich der Pentoximester die Caco-2 Zellen verließ. An der apikalen Membran hingegen wurden neben dem Pentoximester auch die Metabolite in das umliegende Medium transportiert. Die größten Konzentrationen wurden für das Diamidoxim und die aktive Wirkform Pentamidin beobachtet.

### 2.4.2.5 O-Carboxymethylpentamidin

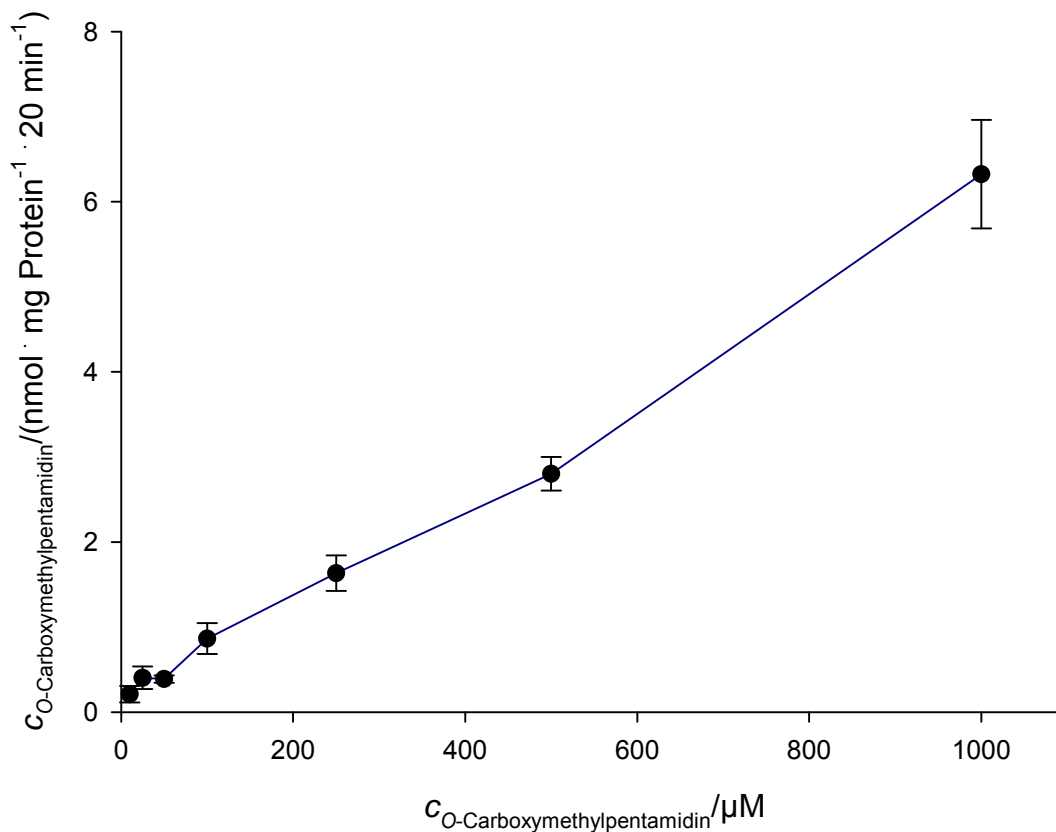
Die Substanz wurde als 50  $\mu\text{M}$  Lösung über 120 min inkubiert. Es wurden Proben des Puffers und der Zellen untersucht.



**Abbildung 2-26: Zeitabhängigkeit der O-Carboxymethylpentamidinaufnahme**

Die Zellen wurden mit einer 50  $\mu\text{M}$  O-Carboxymethylpentamidinlösung inkubiert. Die Durchführung ist in Kap. 2.3.1.8.2.1 beschrieben. Die Konzentrationen wurden mittels der in Kap. 2.3.1.10.3 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Konzentrationen sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus drei parallelen Inkubationen.

Im umliegenden Medium waren konstante Mengen an O-Carboxymethylpentamidin zu finden. In die Zellen wurden nur geringe Mengen der Verbindung aufgenommen, die über 120 min konstant waren. Im Folgenden wurde die Substanz konzentrationsabhängig inkubiert, zur besseren Vergleichbarkeit mit Pentamidin auch über 20 min.

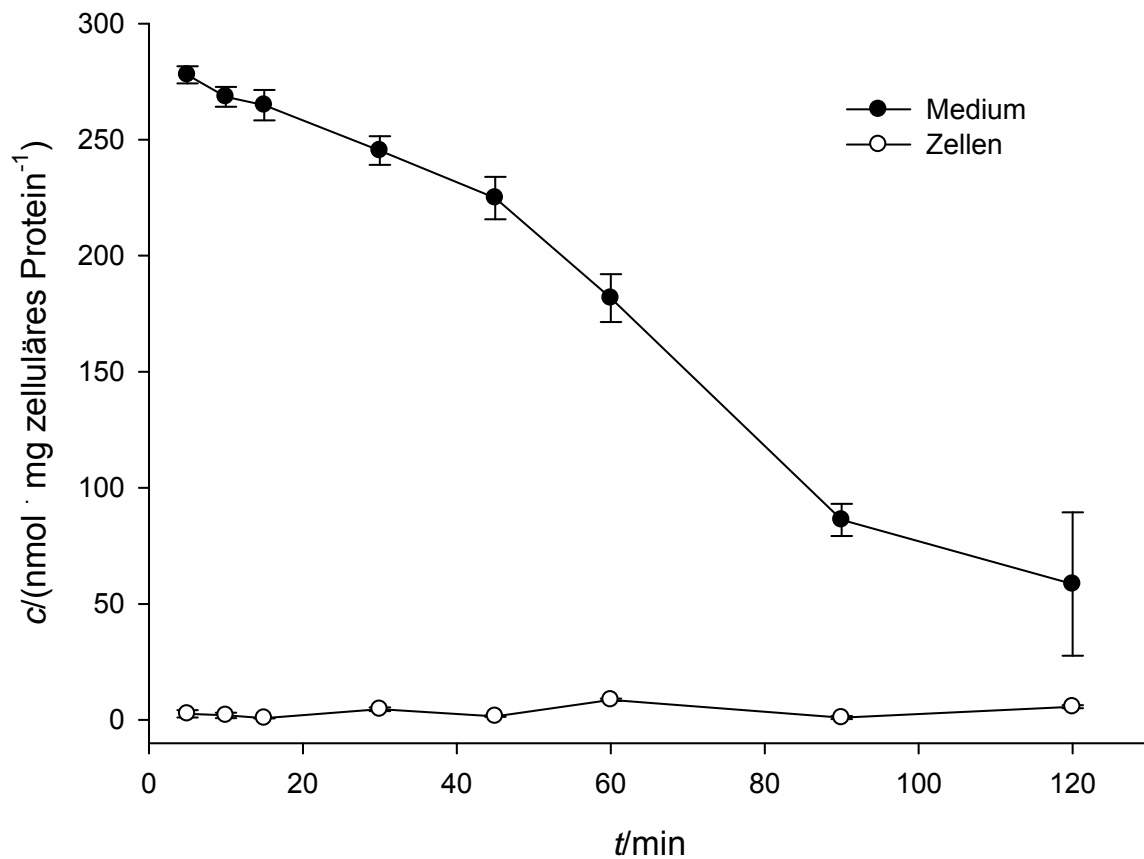


**Abbildung 2-27: Konzentrationsabhängigkeit der O-Carboxymethylpentamidinaufnahme**

Die Inkubationszeit betrug 20 min. Die Durchführung ist in Kap. 2.3.1.8.2.1 beschrieben. Die Konzentrationen wurden mittels der in Kap. 2.3.1.10.3 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Konzentrationen sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus drei parallelen Inkubationen.

Die konzentrationsabhängige Inkubation wies einen linearen Anstieg der O-Carboxymethylpentamidin-Konzentration auf. Auch hier waren die zu detektierenden Konzentrationen in den Zellen recht gering. Es ist auch für diese Verbindung ein linearer Anstieg der Konzentration in den Zellen zu beobachten, was wiederum auf passive Diffusion als Aufnahmeprozess hindeutete.

## 2.4.2.6 O-Succinylpentamidin



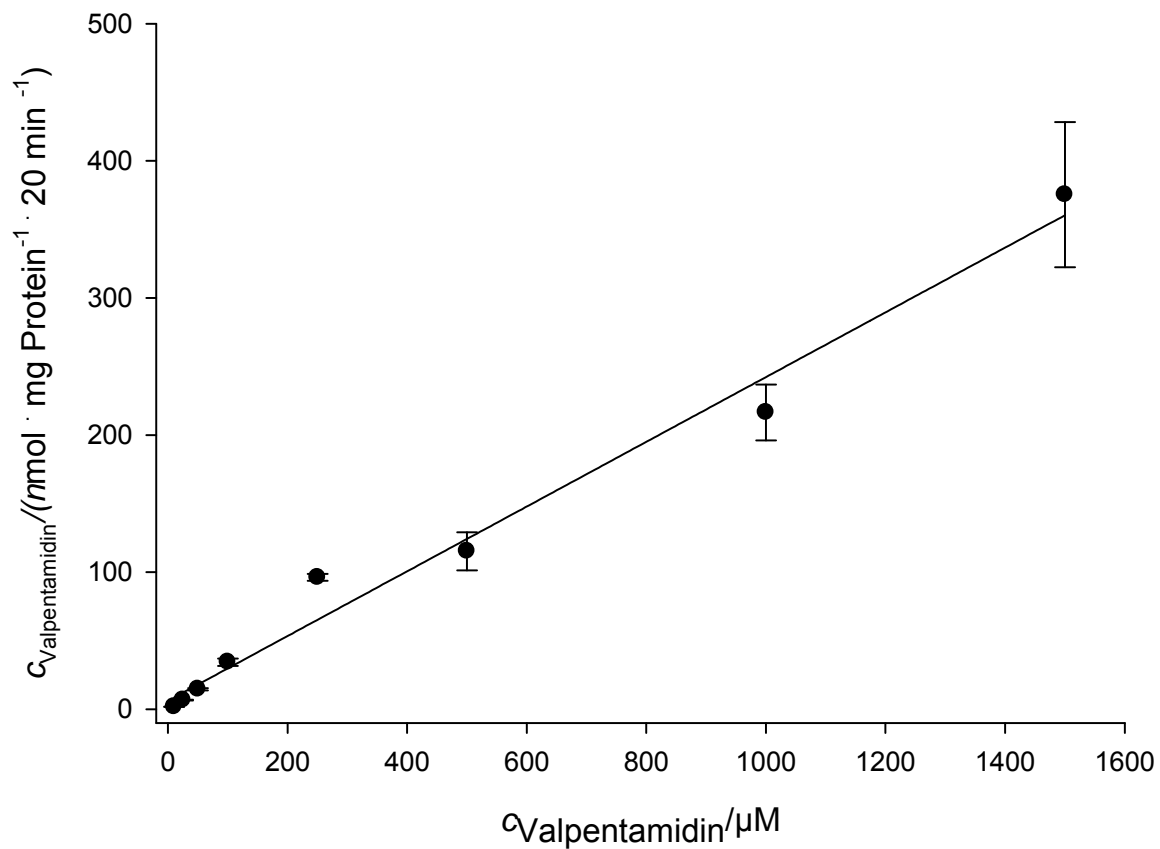
**Abbildung 2-28: Zeitabhängigkeit der O-Succinylpentamidinaufnahme**

Die Zellen wurden mit einer 50  $\mu\text{M}$  O-Succinylpentamidinlösung inkubiert. Die Durchführung ist in Kap. 2.3.1.8.2.1 beschrieben. Die Konzentrationen wurden mittels der in Kap. 2.3.1.10.3 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Konzentrationen sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus drei parallelen Inkubationen.

Bei der zeitabhängigen Inkubation des O-Succinylpentamidins konnte die sinkende Konzentration des Prodrugs im umliegenden Medium und eine leicht steigende Menge an O-Succinylpentamidin in den Zellen beobachtet werden.



### 2.4.2.7 Valpentamidin



**Abbildung 2-29: Konzentrationsabhängigkeit der Valpentamidinaufnahme**

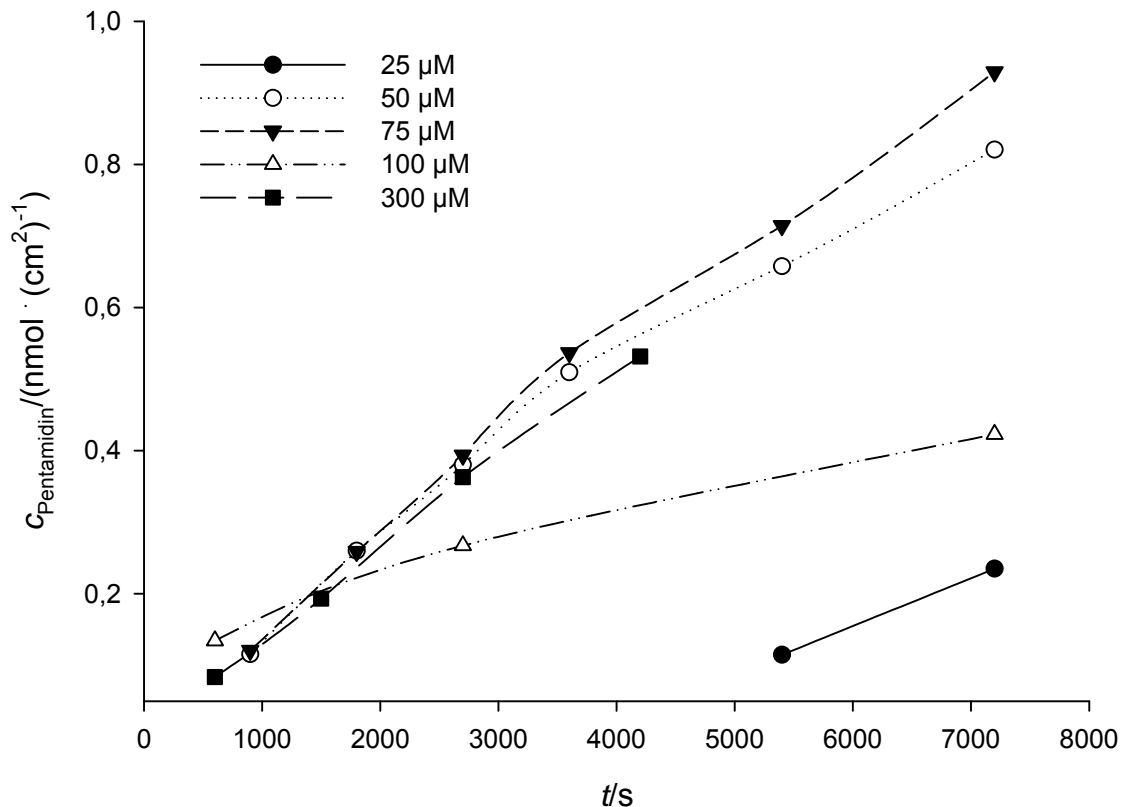
Die Inkubationszeit betrug 20 min. Die Durchführung ist in Kap. 2.3.1.8.2.1 beschrieben. Die Konzentrationen wurden mittels der in Kap. 2.3.1.10.3 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Konzentrationen sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus drei parallelen Inkubationen.

Die konzentrationsabhängige Inkubation wies einen linearen Anstieg der Valpentamidin-Konzentration auf. Es ist auch für diese Verbindung ein linearer Anstieg der Konzentration in den Zellen zu beobachten, was wiederum auf passive Diffusion als Aufnahmeprozess hindeutete.

### 2.4.3 Permeabilitätsstudien

Für die Ermittlung des Permeabilitätskoeffizienten wurden die Zellen über insgesamt 120 min inkubiert.

#### 2.4.3.1 Pentamidin

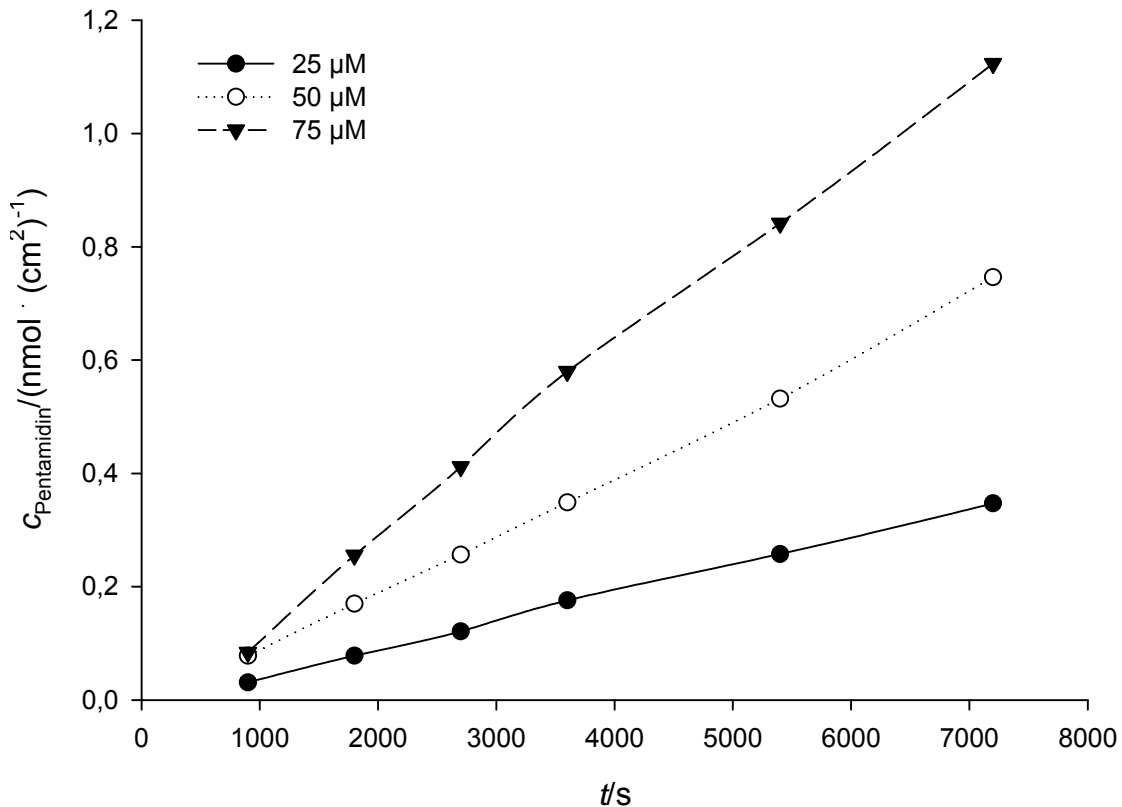


**Abbildung 2-30: Pentamidinpermeabilität in Richtung apikal nach basolateral**

Die Durchführung ist in Kap. 2.3.1.9.2.2 beschrieben. Die Konzentrationen wurden mittels der in Kap. 2.3.1.10.31 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Konzentrationen sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus drei parallelen Inkubationen.

Pentamidinkonzentration	$P_{app} / (\text{cm} \cdot \text{s}^{-1})$
25 $\mu\text{M}$	$2,25 \cdot 10^{-6}$
50 $\mu\text{M}$	$1,47 \cdot 10^{-6}$
75 $\mu\text{M}$	$0,96 \cdot 10^{-6}$
100 $\mu\text{M}$	$0,65 \cdot 10^{-6}$
300 $\mu\text{M}$	$0,22 \cdot 10^{-6}$

Für die aktive Wirkform Pentamidin ergab sich mit steigender Konzentration ein sinkender Permeabilitätskoeffizient für die Transportrichtung apikal nach basolateral. Im Vergleich dazu wurde im Folgenden die Richtung basolateral nach apikal untersucht.



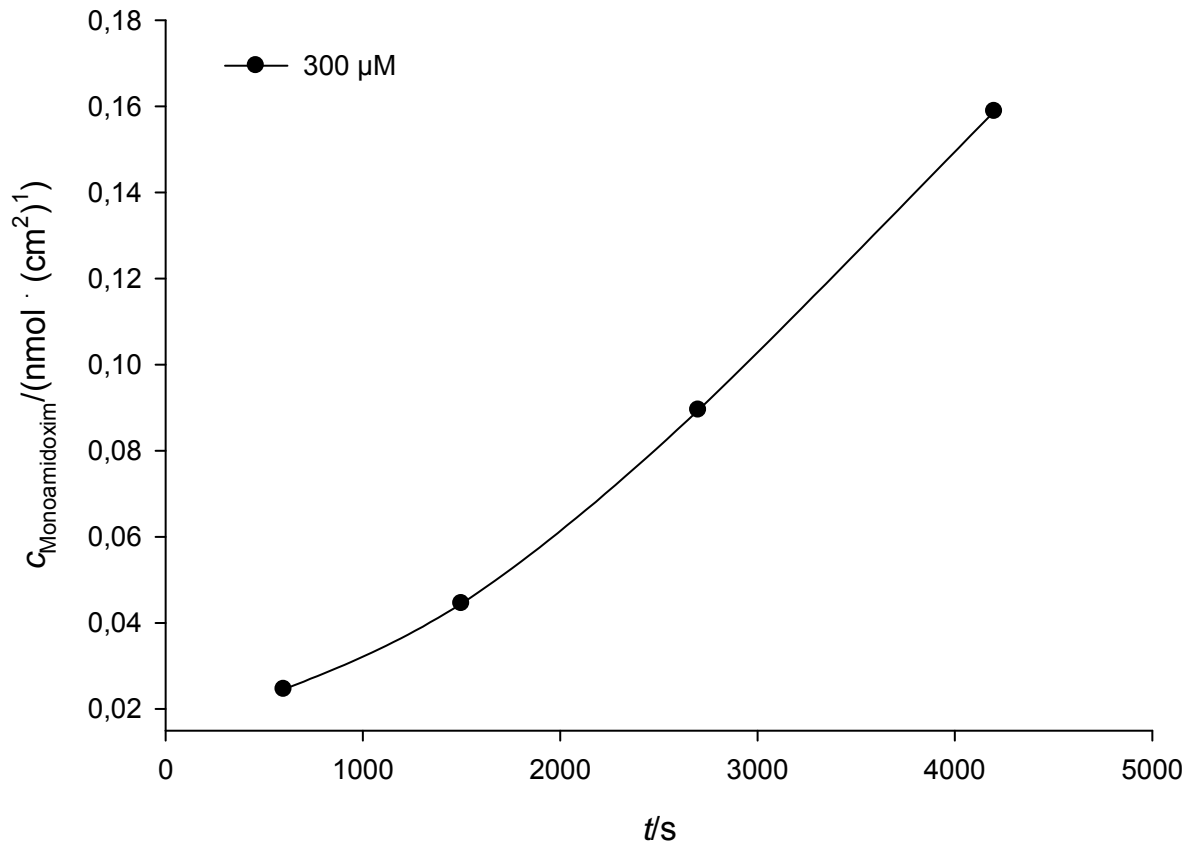
**Abbildung 2-31: Pentamidinpermeabilität: basolateral nach apikal**

Die Durchführung ist in Kap. 2.3.1.9.2.23 beschrieben. Die Konzentrationen wurden mittels der in Kap. 2.3.1.10.31 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Konzentrationen sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus drei parallelen Inkubationen.

Pentamidinkonzentration	$P_{app} / (\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}) \text{ a} \rightarrow \text{b}$	$P_{app} / (\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}) \text{ b} \rightarrow \text{a}$
25 $\mu\text{M}$	$2,25 \cdot 10^{-6}$	$5,37 \cdot 10^{-6}$
50 $\mu\text{M}$	$1,47 \cdot 10^{-6}$	$4,12 \cdot 10^{-6}$
75 $\mu\text{M}$	$0,96 \cdot 10^{-6}$	$5,37 \cdot 10^{-6}$

Für den Efflux ergaben sich deutlich höhere und bei steigender Konzentration konstante Permeabilitätskoeffizienten als für die Aufnahme des Pentamidins.

2.4.3.2 Monoamidoxim



**Abbildung 2-32: Monoamidoximpermeabilität :apikal nach basolateral**

Die Durchführung ist in Kap. 2.3.1.9.2.22 beschrieben. Die Konzentrationen wurden mittels der in Kap. 2.3.1.10.31 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Konzentrationen sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus drei parallelen Inkubationen.

**Monoamidoximkonzentration**

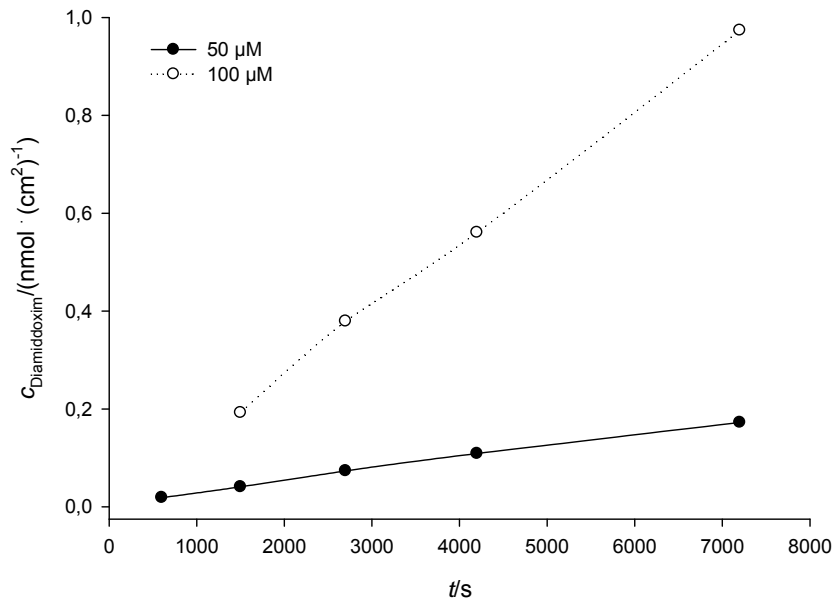
300  $\mu$ M

**P<sub>app</sub> / (cm·s<sup>-1</sup>)**

0,24 · 10<sup>-6</sup>

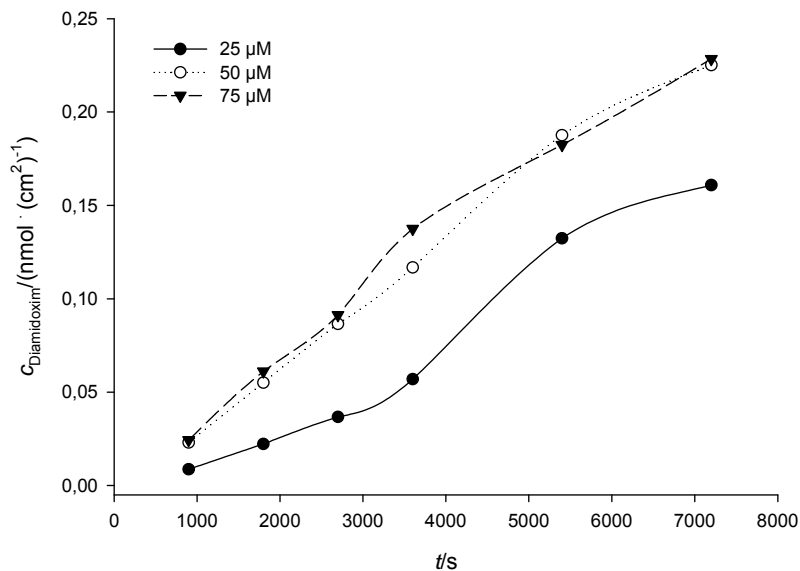
Der ermittelte Permeabilitätswert des Monoamidoxims lag in einem ähnlichen Bereich wie der des Pentamidins bei gleicher Konzentration.

## 2.4.3.3 Diamidoxim



**Abbildung 2-33: Diamidoximpermeabilität: apikal nach basolateral**

Die Durchführung ist in Kap. 2.3.1.9.2.22. beschrieben. Die Konzentrationen wurden mittels der in Kap. 2.3.1.10.31 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Konzentrationen sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus drei parallelen Inkubationen.



**Abbildung 2-34: Diamidoximpermeabilität: basolateral nach apikal**

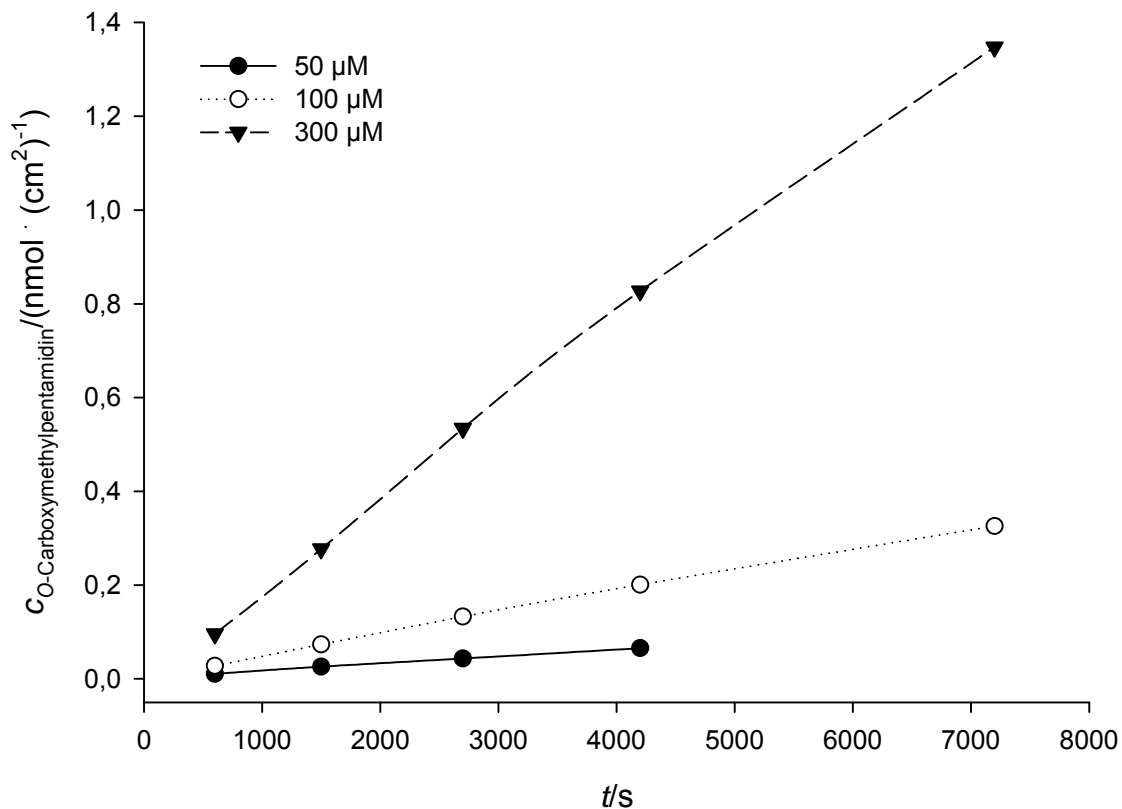
Die Durchführung ist in Kap. 2.3.1.9.2.3 beschrieben. Die Konzentrationen wurden mittels der in Kap. 2.3.1.10.31 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Konzentrationen sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus drei parallelen Inkubationen.

## 2.4 Ergebnisse

Diamidoximkonzentration	$P_{app} / (\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}) \text{ a}\rightarrow\text{b}$	$P_{app} / (\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}) \text{ b}\rightarrow\text{a}$
25 $\mu\text{M}$		$2,12 \cdot 10^{-6}$
50 $\mu\text{M}$	$1,25 \cdot 10^{-6}$	$1,41 \cdot 10^{-6}$
75 $\mu\text{M}$		$0,94 \cdot 10^{-6}$
100 $\mu\text{M}$	$1,18 \cdot 10^{-6}$	

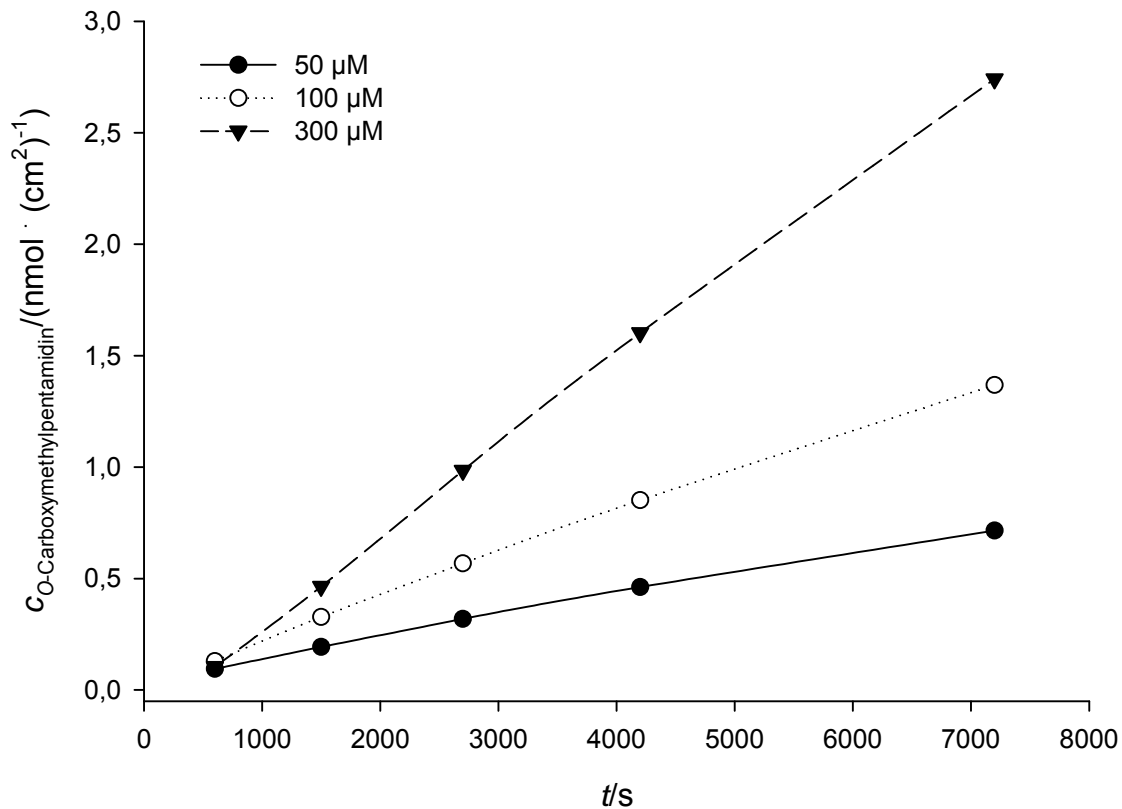
Die für das Diamidoxim bestimmten Permeabilitätskoeffizienten zeigten für die Aufnahme einen konstanten Wert bei steigender Konzentration und sanken dagegen für den Efflux bei steigender Konzentration.

### 2.4.3.4 O-Carboxymethylpentamidin



**Abbildung 2-35: O-Carboxymethylpentamidinpermeabilität: apikal nach basolateral**

Die Durchführung ist in Kap. 2.3.1.9.2.22 beschrieben. Die Konzentrationen wurden mittels der in Kap. 2.3.1.10.33 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Konzentrationen sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus drei parallelen Inkubationen.



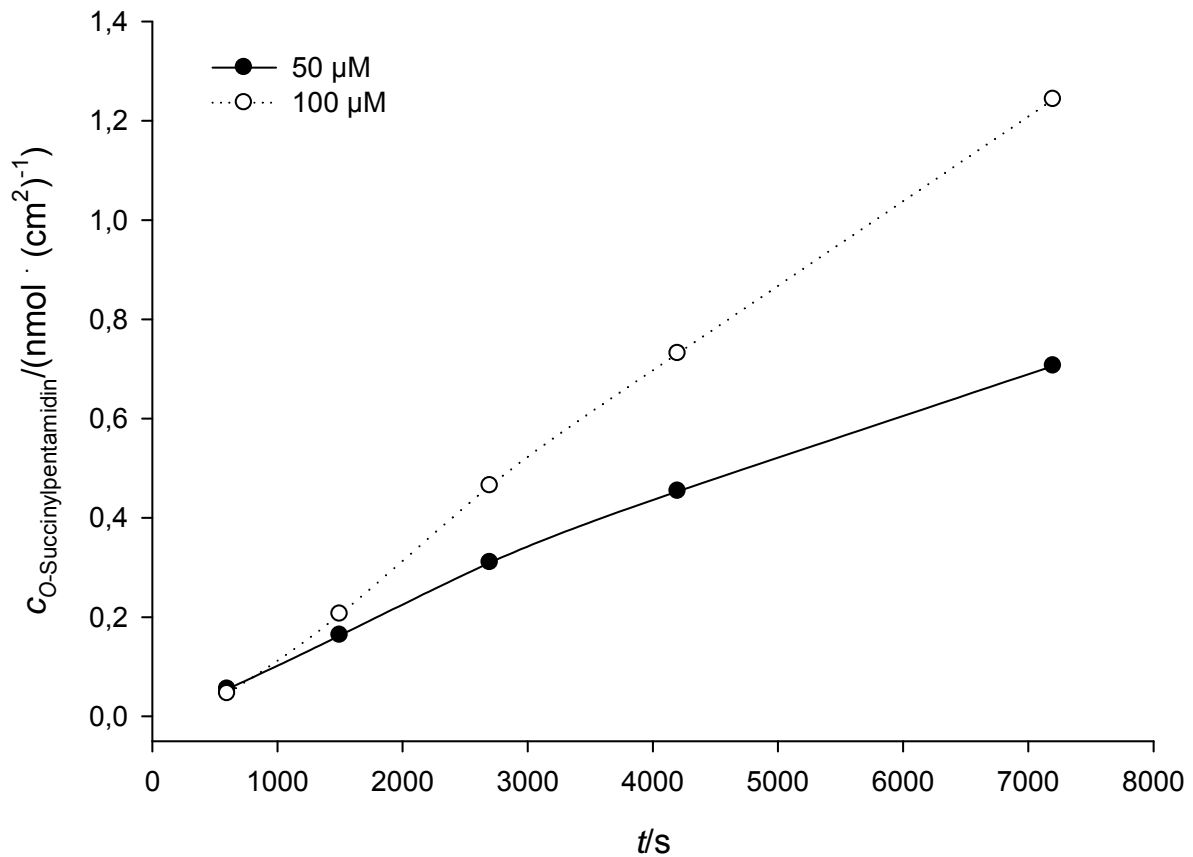
**Abbildung 2-36: O-Carboxymethylpentamidinpermeabilität: basolateral nach apikal**

Die Durchführung ist in Kap. 2.3.1.9.2.23 beschrieben. Die Konzentrationen wurden mittels der in Kap. 2.3.1.10.33 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Konzentrationen sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus drei parallelen Inkubationen.

O-Carboxymethylpentamidin-konzentration	$P_{app} / (\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}) \text{ a} \rightarrow \text{b}$	$P_{app} / (\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}) \text{ b} \rightarrow \text{a}$
50 $\mu\text{M}$	$3,03 \cdot 10^{-7}$	$1,28 \cdot 10^{-6}$
100 $\mu\text{M}$	$3,60 \cdot 10^{-7}$	$1,28 \cdot 10^{-6}$
300 $\mu\text{M}$	$6,23 \cdot 10^{-7}$	$2,08 \cdot 10^{-6}$

Die Permeabilitätskoeffizienten für das O-Carboxymethylpentamidin waren für den Transport von apikal nach basolateral gering, nahmen jedoch mit steigender Konzentration zu. Für den Efflux wurden deutlich höhere Koeffizienten ermittelt als für die Aufnahme, die mit steigender Konzentration auf einem Niveau blieben.

## 2.4.3.5 O-Succinylpentamidin



**Abbildung 2-37: O-Succinylpentamidinpermeabilität: apikal nach basolateral**

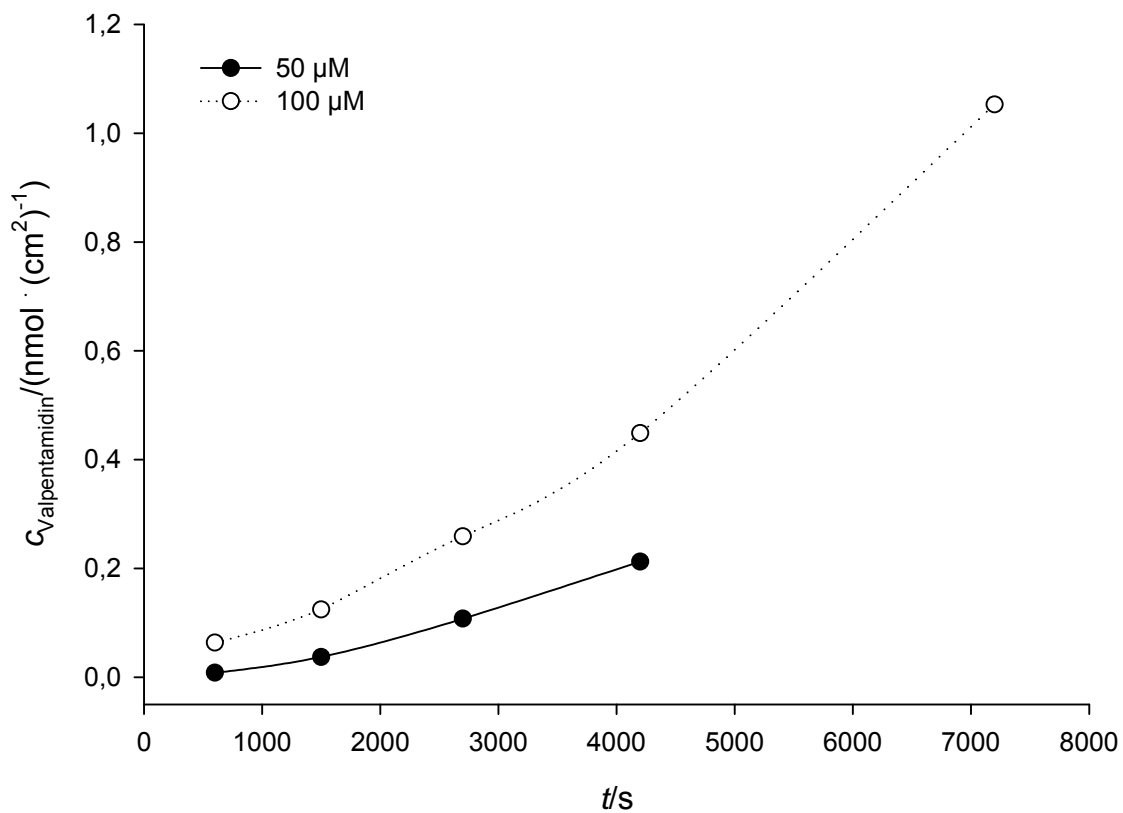
Die Durchführung ist in Kap. 2.3.1.9.2.22 beschrieben. Die Konzentrationen wurden mittels der in Kap. 2.3.1.10.33 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Konzentrationen sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus drei parallelen Inkubationen.

O-Succinylpentamidinkonzentration	$P_{app} / (\text{cm} \cdot \text{s}^{-1})$
50 $\mu\text{M}$	$1,81 \cdot 10^{-6}$
100 $\mu\text{M}$	$1,79 \cdot 10^{-6}$

Für das O-Succinylpentamidin wurden gleiche Permeabilitätskoeffizienten bei steigender Konzentration für den Transportweg apikal nach basolateral bestimmt.



## 2.4.3.6 Valpentamidin



**Abbildung 2-38: Valpentamidinpermeabilität: apikal nach basolateral**

Die Durchführung ist in Kap. 2.3.1.9.2.22 beschrieben. Die Konzentrationen wurden mittels der in Kap. 2.3.1.10.33 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Konzentrationen sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus drei parallelen Inkubationen.

Valpentamidinkonzentration	$P_{\text{app}} / (\text{cm} \cdot \text{s}^{-1})$
50 $\mu\text{M}$	$1,29 \cdot 10^{-6}$
100 $\mu\text{M}$	$8,98 \cdot 10^{-7}$

Beim Valpentamidin konnte eine deutliche Absenkung des Permeabilitätskoeffizienten bei steigender Konzentration beobachtet werden.

### 2.5 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit sollten verschiedene im Arbeitskreis Clement synthetisierte Prodrugs des Pentamidins in Transport- und Permeabilitätsstudien untersucht werden. Hierfür wurde zunächst die Caco-2 Zelllinie im Arbeitskreis etabliert. Im Zuge dessen wurden auch unterschiedliche Methoden der Handhabung der Zellkultur verglichen.

Hinsichtlich des Auftauens von Zellen gibt es verschiedene Möglichkeiten, von denen einige im Rahmen dieser Arbeit getestet wurden. Neben der Methode des direkten Überführens in die Kulturflasche kann man in die Zellsuspension auch unter kontinuierlichem Schütteln in ca. 10 ml kaltes Medium über 2 min eintropfen lassen, um das DMSO ganz langsam zu entfernen, und diese Lösung anschließend 5 min bei 400 g zentrifugieren. Das Medium wird dann abgezogen und die Zellen in 7 ml warmem Medium resuspendiert. Dieses Verfahren verhinderte Zellschädigungen durch DMSO bei höheren Temperaturen, also bei den vorherrschenden 37 °C im Brutschrank. Der Zentrifugationsschritt jedoch führte auch zu Schädigungen der Zellen, was die Folge haben kann, dass die Zellen schlecht anwachsen. Wurde die Zellsuspension zentrifugiert, dauerte es ca. zwei bis drei Tage länger, bis die Zellen konfluent gewachsen waren. Deshalb wurde auf den Zentrifugationsschritt verzichtet und die eventuell auftretenden Schädigungen durch DMSO in Kauf genommen. Eine weitere Methode sieht einen Mediumwechsel am Tag nach dem Aussäen vor. Auch dies schien ein Störfaktor für das Zellwachstum zu sein, somit wurde auch hierauf verzichtet und das DMSO wurde erst bei der ersten Passage der Zellen entfernt.

Die Ergebnisse der Aufnahmestudien können auf die Zellzahl oder auf den Proteingehalt der Zellen in der jeweiligen Vertiefung der well-Platte bezogen werden. Die Zellen wurden über zehn Tage auf den Platten angezüchtet. Der Versuchsaufbau sah auch die Untersuchung des Zellinhalts vor, wozu die Zellen mit Methanol zum Platzen gebracht wurden und gleichzeitig die zu untersuchende Verbindung aus den Zellen herausgelöst wurde. Dann war keine Zellzahlbestimmung mehr möglich. Da die Zellzahlen in den einzelnen Vertiefungen jedoch erheblich schwankten, wurde nach der Behandlung mit Methanol eine Solubilisation der Proteine und eine Proteinbestimmung durchgeführt. Diese Methode war für einen solchen Versuchsaufbau die am besten reproduzierbare.

Die Pentamidinaufnahme in die Caco-2 Zellen wurde durch zwei Prozesse bestimmt. Der erste Teil mit deutlich höheren Aufnahmeraten, bis hin zu 30 min, fand als aktiver Prozess statt. Der zweite Teil mit deutlich langsamerer Aufnahme wurde dann durch passive Diffusion bestimmt. Für diesen Prozess wurden die folgenden kinetischen Parameter bestimmt:

$K_m = 280 \pm 67 \mu\text{M}$  und  $V_{\text{max}} = 0,5 \pm 0,1 \text{ nmol} \cdot \text{mg zelluläres Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ . Diese Parameter stellten einen weiteren Hinweis auf einen aktiven Aufnahmeprozess dar. Die vergleichende Untersuchung der Aufnahmeraten bei 37 °C und 4 °C wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Bei geringen Temperaturen kommen aktive Transportprozesse zum Erliegen und es dominiert die passive Diffusion (Hu und Borchardt, 1990). Die Ergebnisse zeigten, dass bei 4 °C deutlich weniger Pentamidin aufgenommen wurde, als bei 37 °C. Somit muss sich die Differenz aus dem aktiven Prozess herleiten lassen. Die Effluxstudie zeigte, dass das Pentamidin auch in der Lage ist, die Caco-2 Zellen wieder zu verlassen, unklar hierbei war, ob der Efflux auf der apikalen oder der basolateralen Seite stattfand. Die Pentamidinaufnahme wird an der Blut-Hirn-Schranke durch P-gp/MRP eingeschränkt (Sanderson *et al.*, 2009), somit ist davon auszugehen, dass diese Transporter das Pentamidin auch an den Caco-2 Zellen über die apikale Seite ausschleusen.

Da Pentamidin in sehr geringen Mengen über die Darmwand resorbiert wird, ist es von großem Interesse, welche intestinalen Transporter an dem Vorgang beteiligt sind. Dazu wurden Versuche durchgeführt, bei denen Pentamidin zusammen mit verschiedenen Substanzen inkubiert wurde, die Inhibitoren unterschiedlicher intestinaler Transporter darstellen. Die höchste Minderung der Pentamidinaufnahme erzielten Verapamil und Quinidin, aber auch durch Cimetidin, Desipramin, Lidocain und Diphenhydramin wurde die Pentamidinaufnahme dezimiert. Somit kann an dieser Stelle die Aussage getroffen werden, dass Transporter der OCTN-Gruppe an der Aufnahme von Pentamidin beteiligt sind. Aus den Aufnahmestudien zusammen mit Estron-3-sulfat und TEA ging hervor, dass auch OCT-Transporter und OATP-Transporter eine Rolle beim Pentamidintransport spielen.

Der genaue Vorgang müsste jedoch detaillierter untersucht werden. Dies könnte an isolierten Transportern, z.B. mit Hilfe von injizierten *Xenopus laevis* Oozyten studiert werden. Allerdings wäre eine solche Studie nur von sehr geringem klinischen Interesse, da die orale Pentamidinverfügbarkeit verschwindend gering ist.

Die Aufnahmestudien mit Diamidoxim zeigten, dass hauptsächlich Pentamidin in den Zellen zu finden war und der lineare Verlauf der konzentrationsabhängigen Inkubation deutete auf passive Diffusion hin. Weiter unterstützt wird dies durch eine vergleichende Inkubation bei 37 °C und 4 °C. Betrachtete man die Summe der detektierbaren Verbindungen in den Zellen, war zwischen 37 °C und 4 °C nur ein geringer Unterschied zu vermerken. Passive Diffusion fand auch bei niedrigen Temperaturen statt. Die im Weiteren durchgeführte Effluxstudie zeigte, dass sich in den Zellen nach 120 min Inkubation mit Diamidoxim hauptsächlich Pentamidin befand, dass die Zellen auch wieder verlassen konnte. Unklar blieb hierbei, ob die Pentamidinabgabe über die apikale oder die basolaterale Seite geschah. Da Pentamidin über P-gp Transporter direkt wieder in den Darm transportiert wird (Sanderson *et al.*, 2009), kommt der Effekt wahrscheinlich über die apikale Seite zum Tragen. Weiterhin wurde beobachtet, dass auch das Diamidoxim im umliegenden Medium, nach vorherigem Laden der Zellen, über die gesamten 120 min zu finden war. Die Verbindung ist also auch in der Lage, die Zellen zu verlassen, wenn auch in geringem Ausmaß.

Interessant war, dass die Reduktion vom Diamidoxim über das Monoamidoxim zum Pentamidin in den Caco-2 Zellen auch bei 4 °C stattfand. Dies wurde genauer mit Schweinelebermikrosomen untersucht. Auch in diesem Versuchsaufbau fand die Reduktion statt, wenn auch bei 4 °C deutlich weniger Pentamidin zu finden war als bei 37 °C.

Die Studien mit dem Pentoximester zeigten, dass der Pentoximester im umliegenden Medium rasch metabolisiert wurde. Es wurden alle Metabolite im Medium gefunden, wobei aber das Monoamidoxim am stärksten gebildet wurde, was mit vorangegangenen Arbeiten übereinstimmt Bürenheide (2006). In den Zellen wurden geringe Mengen Pentoximester gefunden, es entstanden aber neben dem Diamidoxim und dem Monoamidoxim hauptsächlich die Wirkform Pentamidin. Die konzentrationsabhängige Inkubation zeigte eine lineare Aufnahme des Pentoximesters in die Caco-2 Zellen, was für einen passiven Aufnahmeprozess spricht. Die vergleichende Untersuchung der Pentoximesteraufnahme bei 37 °C und bei 4 °C zeigt, dass die metabolischen Prozesse deutlich langsamer ablaufen als bei 37 °C. Der Vergleich der Summen aller detektierbaren Verbindungen zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Temperaturen, dies ist ein Hinweis auf einen passiven Transportprozess.

Die beiden untersuchten Prodrugs des Pentamidins wurden in die Caco-2 Zellen aufgenommen. In den Zellen fand die Reduktion und für den Pentoximester auch die Esterhydrolyse zum Pentamidin statt. Das Diamidoxim und das Pentamidin konnten die Zellen wieder verlassen und könnten dann unter physiologischen Bedingungen im Körper an den Wirkort gelangen. Der Pentoximester konnte die Caco-2 Zellen über die apikale und die basolaterale Seite verlassen. In einer in vivo Studie konnte nach oraler Applikation des Pentoximesters allerdings nur Pentamidin detektiert werden Bürenheide (2006).

	Pentamidin	Diamidoxim	Pentoximester
	aktiver Transport	passive Diffusion	passive Diffusion
Inkubation von 50 µM, nach 120 min	6,18 pmol Pentamidin / µg Protein	45,04pmol Pentamidin / µg Protein	23,42pmol Pentamidin / µg Protein
Faktor		7,29	3,79

**Tabelle 2-1 Vergleich der intrazellulären Pentamidinkonzentrationen nach Inkubation der Prodrugs**

Aus der obigen Tabelle geht hervor, dass die Prodrugs in der Lage sind, die intrazellulären Pentamidinkonzentrationen deutlich gegenüber dem Pentamidin zu steigern. Das Diamidoxim war dem Ester dabei um Faktor zwei überlegen. In Anbetracht der Tatsache, dass das Diamidoxim die Zellen auch wieder verlassen kann, ist es als das bessere Prodrug anzusehen.

Das O-Carboxymethylpentamidin wurde in geringem Maße in die Zellen aufgenommen, es kommt weder in den Zellen noch im umliegenden Medium zur Entstehung von Metaboliten. Die Konzentrationsabhängigkeit zeigt einen linearen Verlauf, was für einen passiven Aufnahmeprozess spricht.

Die Konzentration des O-Succinylpentamidins nahm im Medium über 120 min ab und stieg sehr leicht in den Caco-2 Zellen an.

Die konzentrationsabhängige Untersuchung des Valpentamidins deutet auf einen passiven Aufnahmeprozess hin. Es sollten in weiterführenden Studien weitere

kinetische Daten erhoben werden, um eine genauere Charakterisierung der jeweiligen Aufnahmeprozesse zu erlauben.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Permeabilitätsstudien sollten Auskünfte der verschiedenen Prodrugs hinsichtlich der möglichen oralen Absorption liefern.

Die Permeabilitätskoeffizienten für die Aufnahme des Pentamidins bewegten sich zwischen  $2,25 \cdot 10^{-6}$  und  $0,22 \cdot 10^{-6}$  cm/s bei eingesetzten Konzentrationen von 25-300  $\mu$ M. Bei einer Konzentrationssteigerung um Faktor zehn sank die Permeabilität um Faktor zehn. Der Transport scheint also bei 25  $\mu$ M bereits gesättigt zu sein. Die Untersuchung der Permeabilitätskoeffizienten des Effluxes vom Pentamidin ergab deutlich höhere Werte, die bei steigender Konzentration konstant blieben. Es ist also ein anderer Transporter für den Efflux verantwortlich als für die Aufnahme, welcher bei den untersuchten Konzentrationen noch nicht gesättigt war.

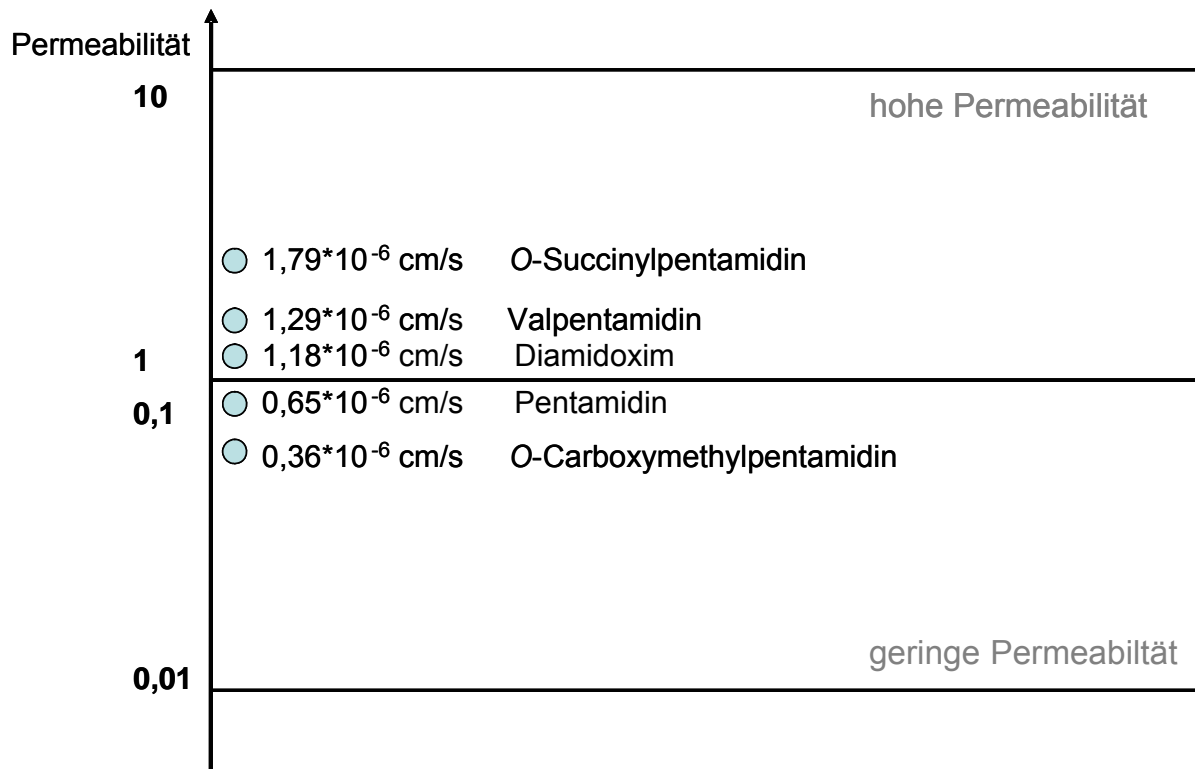
Für das Monoamidioxim wurde nur ein Permeabilitätskoeffizient für die Aufnahme bestimmt, der ähnlich gering wie der bei entsprechender Konzentration des Pentamidins war. Die Permeabilitätswerte des Diamidoxims blieben für die Aufnahme bei steigender Konzentration konstant und waren vergleichbar mit dem Wert vom Pentamidin bei 50  $\mu$ M. Für den Efflux sanken die Permeabilitäten bei steigender Konzentration, was wiederum auf einen aktiven Prozess hindeutete.

Für den Pentoximester konnten aufgrund von Löslichkeitsproblemen der Verbindung keine Permeabilitätsdaten ermittelt werden. Selbst der Zusatz von Lösungsvermittlern (Propylenglykol 20 %; Tween 80 5 %; PEG 400 5 %; HP- $\beta$ -CD 5 %; Tween 80 und PEG 400 je 5 %; BSA 4,5 % (Hovgaard und Brondsted, 1995; Takahashi *et al.*, 2002) ließ keine Permeabilitätswertbestimmung zu.

Die Permeabilitätswerte des O-Carboxymethylpentamidins lagen für die Aufnahme deutlich unter den Werten für den Efflux und lagen auch grundsätzlich deutlich unter denen der anderen Prodrugs.

Das O-Succinylpentamidin zeigte Permeabilitätswerte, die mit dem Diamidoxim vergleichbar waren.

Die Permeabilitätswerte des Valpentamidins lagen bei 50  $\mu$ M auf vergleichbarem Niveau, allerdings sank dieser bei 100  $\mu$ M sehr stark ab.



**Abbildung 2-39: Einteilung der Prodrugs nach dem BCS-System**

Die Einteilung der Prodrugs im Vergleich zum Pentamidin zeigte, dass die Prodrugs eine deutlich höhere Permeabilität aufwiesen als die Wirkform. Die einzige Ausnahme stellt das O-Carboxymethylpentamidin dar, deren Permeabilitätswert bei  $100 \mu\text{M}$  noch unter dem des Pentamidins lag. Für das O-Carboxymethylpentamidin wurden höhere Permeabilitätswerte für den Efflux bestimmt als für die Aufnahme, diese Verbindung scheint wie das Pentamidin zügig wieder aus den Caco-2 Zellen heraustransportiert zu werden. Diese Verbindung wäre, unter dem Gesichtspunkt der Permeabilität, als Prodrug nicht geeignet. Sowohl das Valpentamidin als auch das O-Succinylpentamidin zeigten noch bessere Permeabilitäten als das bislang als bestes Prodrug angenommene Diamidoxim. Das O-Succinylpentamidin kann als das am besten geeignete Prodrug angesehen werden, es zeigt eine dreifach höhere Steigerung gegenüber dem Pentamidin und auch eine deutliche Steigerung den anderen Prodrugs gegenüber.

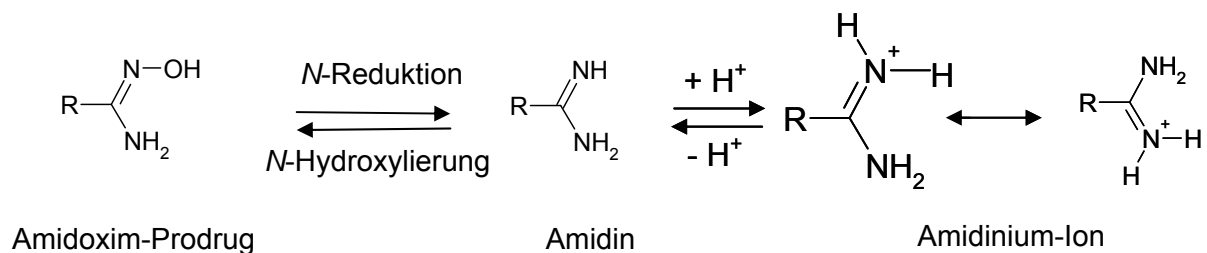
---

## 3. Quantifizierung von mARC

### 3.1 Einleitung

#### 3.1.1 Reduktion *N*-hydroxylierter Verbindungen

Reduktive Biotransformationsprozesse *N*-hydroxylierter Xenobiotika, soweit sie nicht zu den Prodrugs gehören, stellen Entgiftungsreaktionen für den Organismus dar, da die reduzierten Metabolite kein erhöhtes genotoxisches Potential im Vergleich zu den *N*-hydroxylierten Verbindungen aufweisen. (Clement *et al.*, 1988a; Clement *et al.*, 1996). *N*-hydroxylierte Verbindungen können als Prodrugs für Amidin- oder Guanidinfunktionen in Wirkstoffen eingesetzt werden (siehe Kap. 1.3).



**Abbildung 3-1: Aktivierung von Amidoxim-Prodrugs zu Amidinen durch *N*-Reduktion**

Die Beurteilung der Pharmakokinetik sowie die Abschätzung resultierender Arzneimittelinteraktionspotentiale und die Berücksichtigung einer ggf. relevanten genetischen Variabilität bei der Bioaktivierung von *N*-hydroxylierten Prodrugs erfordert genaue Kenntnisse der enzymatischen Grundlagen *N*-reduktiver Metabolisierungsprozesse. Die enzymatische Reduktion *N*-hydroxylierter Verbindungen ist bereits seit über 30 Jahren bekannt, es wurde ein mikrosomales (Kadlubar *et al.*, 1973; Kadlubar und Ziegler, 1974) und ein mitochondriales (Bernheim und Hochstein, 1968; Bernheim, 1969; Bernheim, 1972) System beschrieben, das aus Cytochrom b<sub>5</sub>, NADH Cytochrom b<sub>5</sub> Reduktase und einer dritten nicht identifizierten Komponente besteht, welches am reduktiven Metabolismus *N*-hydroxylierter Strukturen beteiligt ist. Die dritte Komponente des mitochondrialen



Enzymsystems wurde aus porcinen Lebermitochondrien isoliert und als ein bislang unbekanntes Molybdoenzym identifiziert (Havemeyer *et al.*, 2006). Im *in vitro* rekonstituierten Enzymsystem ist das Molybdoenzym zusammen mit Cytochrom  $b_5$  und NADH Cytochrom  $b_5$  Reduktase in der Lage, das Modells substrat Benzamidoxim zu Benzamidin zu reduzieren und wurde entsprechend dieser Eigenschaft als mARC (mitochondrial Amidoxime Reducing Component) bezeichnet. In porcinen Nierenmitochondrien wurde ebenfalls mARC als das für die *N*-Reduktion verantwortliche dritte Protein ermittelt Holtkamp (2007).

### 3.1.2 Molybdoenzyme

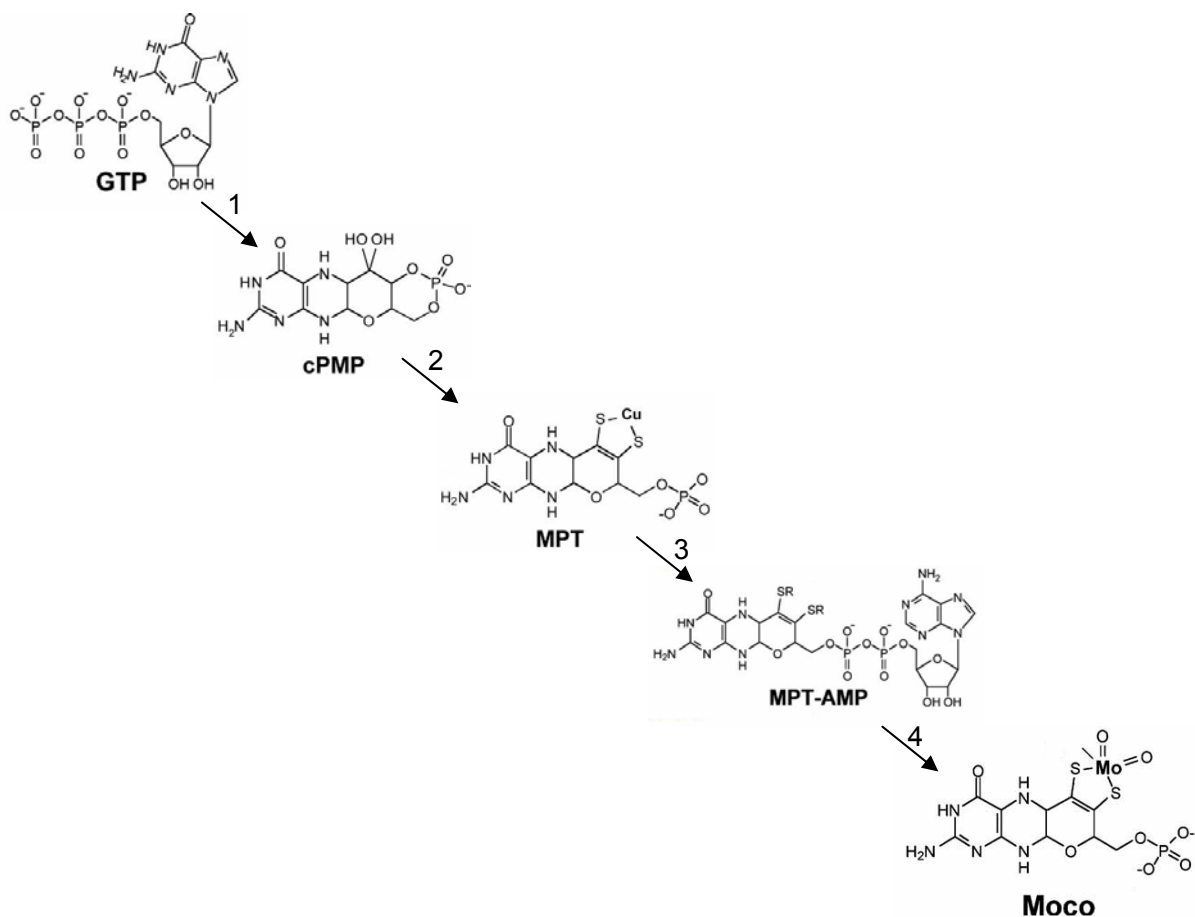
Das Spurenelement Molybdän ist ein Übergangsmetall, welches im Periodensystem der Elemente in der 5. Periode und der 6. Gruppe zu finden ist. Für alle bisher untersuchten Organismen mit Ausnahme von *Saccharomyces cerevisiae* ist Molybdän essentiell. Aus biologischer Sicht ist Molybdän ein Bestandteil des aktiven Zentrums von Molybdoenzymen. Dabei wird Molybdän von Molybdopterin (MPT), einer zuvor inaktiven molybdänfreien Pyranopterin-Verbindung, komplexiert und liegt daher in fast allen Enzymen im sogenannten Molybdänkofaktor (Moco) gebunden vor (Kisker *et al.*, 1997; Hille, 2005). Die Ausnahme bildet nur die bakterielle Nitrogenase, in der Molybdän in einem Eisen-Schwefel-Cluster gebunden ist (Kisker *et al.*, 1997). Molybdänhaltige Enzyme katalysieren eine Reihe von Redoxreaktionen des Kohlenstoff-, Stickstoff- und Schwefel-Metabolismus (Kisker *et al.*, 1997; Hille, 2005).

Der Molybdänkofaktor (Moco) wird in allen bisher untersuchten Organismen über einen konservierten Biosyntheseweg generiert, so dass die Bildung des Molybdänkofaktors in Prokaryonten und Eukaryonten sehr ähnlich abläuft (Schwarz *et al.*, 1997; Schwarz, 2005; Schwarz und Mendel, 2006). Die Biosynthese lässt sich in vier Schritte einteilen (Abb 3-2):

### 3.1 Einleitung

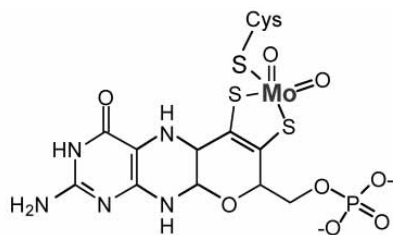
1. Umwandlung des Guanosintriphosphats (GTP) in zyklisches Pyranopterinmonophosphat (cPMP), einer schwefelfreien Pterin-Komponente
2. Bildung des Metall bindenden Pterins (MPT) über einen Sauerstoff-Schwefel-Austausch
3. Adenylierung des Molybdopterin (MPT-AMP)
4. Abspaltung des Adenosinmonophosphats (AMP) und Einbau des Molybdäns.

Der auf diesem Weg synthetisierte Moco wird dann, vermutlich über Moco-Carrier-Proteine, in die entsprechenden Targetenzyme eingebaut. Die Xanthinoxidoreduktase und die Aldehydoxidase, aber nicht die Sulfitoxidase und die Nitratreduktase, benötigen zur Erlangung der Aktivität eine posttranslationale Sulfurierung am Molybdän. Diese finale Maturation wird durch die Moco-Sulfurase katalysiert, die den Schwefel, in einer Pyridoxalphosphat abhängigen Reaktion aus *L*-Cystein herauslöst, wie es üblich ist für Cysteindesulfurasen (Mendel und Bittner, 2006).

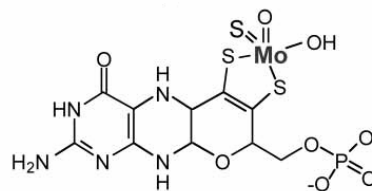


**Abbildung 3-2: Biosyntheseweg des eukaryotischen Molybdänkofaktors (Moco) (Mendel et al., 2007) (Zur Erläuterung siehe Text)**

In Prokaryonten sind bisher mehr als 50 molybdänhaltige Enzyme beschrieben worden, wohingegen bislang nur sechs Molybdoenzyme eukaryontischer Herkunft gefunden wurden (Hille, 1996; Mendel und Bittner, 2006).



Sulfitoxidase-Familie



Xanthinoxidoreduktase-Familie

**Abbildung 3-3: Strukturen der Molybdänkofaktoren in Enzymen der SO/NR- und XOR/AO-Familie**

In Eukaryonten existieren zwei Molybdänkofaktor-Familien, die Xanthinoxidoreduktase- und die Sulfitoxidase-Familie. Zur ersten Gruppe zählen unter anderem die Xanthinoxidoreduktase (XOR) und die Aldehydoxidase (AO), zur zweiten die Sulfitoxidase (SO) und die Nitratreduktase (NR). Letztere findet man nur in autotrophen Organismen, in denen sie eine zentrale Rolle bei der Nitrat-Assimilation einnimmt (Campbell, 1999; Hille, 2005).

### 3.1.2.1 N-reduktiver Metabolismus der Molybdoenzyme

Die Molybdoenzyme sind an einer ganzen Reihe von arzneistoff- und fremdstoffmetabolisierenden Reaktionen beteiligt. Insbesondere für die Aldehydoxidase (AO) und die Xanthinoxidoreduktase (XOR) wird die Katalyse reduktiver Reaktionen beschrieben (Beedham, 1985; Beedham, 1997). Die Reduktion verschiedener stickstoffhaltiger Gruppen, wie sie in vielen Arzneistoffen zu finden sind, wird durch Molybdoenzyme beschrieben. Die Molybdänhydroxylasen sind an einer Vielzahl von Prozessen im N-reduktiven Arzneistoffmetabolismus beteiligt (Kitamura *et al.*, 2006).

### 3.1.2.2 Mitochondriale Amidoxim reduzierende Komponente mARC

Aus der äußeren Membran porciner Lebermitochondrien wurde 2006 ein vorher nicht identifiziertes Protein isoliert, welches zusammen mit Cytochrom  $b_5$  und Cytochrom  $b_5$  Reduktase Benzamidoxim zu Benzamidin reduziert. Die aufgereinigten Fraktionen der äußeren Membran porciner Lebermitochondrien, die das isolierte Protein

### 3.1 Einleitung

---

enthielten, zeichneten sich durch eine besonders hohe Benzamidoximreduktaseaktivität aus. Die Gegenwart von Cytochrom  $b_5$  und NADH Cytochrom  $b_5$  Reduktase hatte auf die Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin einen begünstigenden Effekt, war jedoch nicht zwingend erforderlich (Havemeyer *et al.*, 2006). Die ESI-MS-Analyse führte zu einem putativen Protein, das in den Datenbanken als „Moco sulfurase C-terminal domain containing 2“ (MOSC 2) bezeichnet wird (*GenBank Entry* NP\_060368). Das Protein weist signifikante Homologien zum C-Terminus der Moco-Sulfurasen auf. Gemeinsam mit „MOCO sulfurase C-terminal domain containing 1“ (*GenBank Entry* AAH\_10619) gehört MOSC 2 zu der MOSC-Domänen Superfamilie, die durch rechnergestützte, enzymstrukturbezogene Analyse ermittelt worden ist (Anantharaman und Aravind, 2002). Basierend auf der Benzamidoxim reduzierenden Aktivität wurde das von Havemeyer, (2006) isolierte Protein „Moco sulfurase C-terminal domain containing 2“ in mARC 2 (mitochondrial Amidoxime Reducing Component) umbenannt. Daraus ergeben sich für die in den Datenbanken existierenden „Moco sulfurase C-terminal domain containing“ Proteine 1 und 2 die Bezeichnungen mARC 1 und mARC 2. Die Proteine haben eine Größe von etwa 35 kDa. Die Gene der humanen mARC 1 und 2 Proteine sind auf dem menschlichen Chromosom 1 lokalisiert und liegen, getrennt durch 2.672 bp, in Tandemorientierung vor. Das Gen von mARC 1 ist 26.474 bp und das von mARC 2 ist 35.923 bp groß. Beide Gene weisen jeweils sieben Exons ähnlicher Größe auf, und die Exon-Intron-Strukturen der mARC Proteine 1 und 2 ähneln einander stark (Wahl, 2006).

Die beiden humanen mARC Proteine wurden rekombinant hergestellt und es konnte gezeigt werden, dass die Proteine den Molybdänkofaktor binden (Wahl, B. Dissertation in Vorbereitung).

Die Studien von Grünwald (2008) zeigen, dass die mARC Proteine neben der Modellverbindung Benzamidoxim auch eine Vielzahl anderer *N*-hydroxylierter Verbindungen reduzieren. Dabei wurde eindeutig belegt, dass das Reduktionsvermögen auf den Molybdänkofaktor zurückzuführen ist (Havemeyer, A. unveröffentlichte Daten). Als Konsequenz kann an dieser Stelle festgehalten werden, dass die Proteine mARC 1 und mARC 2 eine Sequenzidentität von 66 % und eine Sequenzähnlichkeit von 80 % aufweisen Grünwald (2008). Die Amidoxim-Prodrugs Pentamidin- und Diminazen-Diamidoxim und das *N*-Hydroxymelagatran werden zu ihrem aktiven Metaboliten reduziert. Diese Prodrugs wurden mit dem Ziel entwickelt, eine geringere Basizität und eine erhöhte Bioverfügbarkeit gegenüber den aktiven

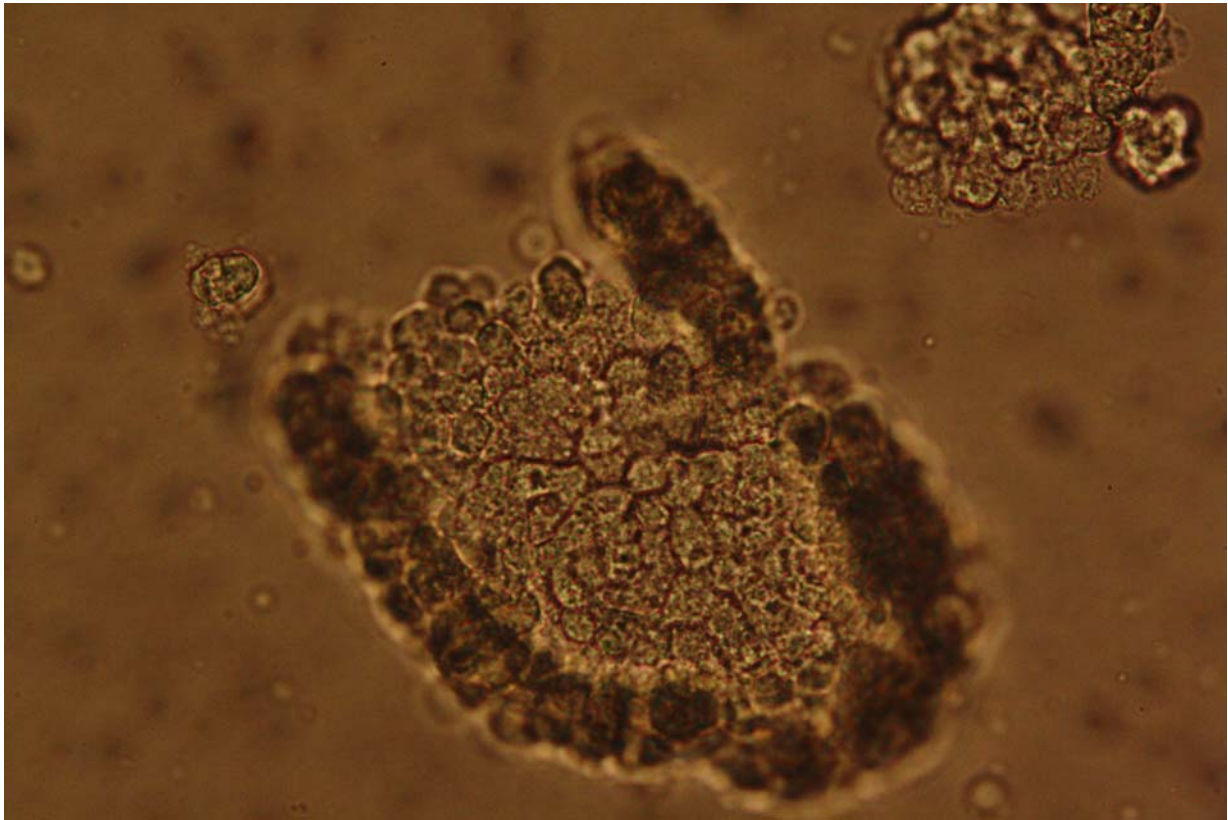
Amidinen zu erreichen. Weiterhin werden die *N*-hydroxylierten Guanidin-Prodrugs Guanoxabenz und *N*-Hydroxydebrisoquin zu ihren aktiven Metaboliten reduziert. Die Reduktion aromatischer Hydroxylamine zu ihren ungiftigen und antimikrobiell wirksamen Aminen wie Sulfamethoxazol und Dapson wird ebenfalls durch mARC katalysiert, was eine wichtige Detoxifizierungsreaktion darstellt. *N*-hydroxylierte Substrate von Sulfhydroxamsäuren, z.B. das *N*-hydroxylierte Valdecoxib, werden zur aktiven Wirkform metabolisiert. Als mögliche physiologische Bedeutung der mARC Proteine kann deren Fähigkeit der Reduktion des mutagenen *N*-hydroxylierten Basenanalogs *N*-Hydroxycytosin angesehen werden Grünewald (2008). Das P450-unabhängige Enzymsystem, bestehend aus Cytochrom  $b_5$ , NADH Cytochrom  $b_5$  Reduktase und mARC, ist an Aktivierungs- und Detoxifizierungsreaktionen beteiligt Grünewald (2008).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Zelllinien und Gewebe auf die mARC Proteine hin untersucht, welche im Folgenden näher beschrieben werden sollen.

### 3.1.3 Schilddrüse

Von der Schilddrüse werden zwei stoffwechselsteuernde Hormone, *Thyroxin* und *Triiodthyronin*, sowie ein den  $Ca^{2+}$ -Haushalt beeinflussendes Hormon *Kalzitonin*, abgegeben. Die Schilddrüse (*Glandula thyreoidea*) umschließt hufeisenförmig die Trachea dicht unterhalb des Schildknorpels und ist von einer Kapsel umgeben. Das Drüsengewebe besteht aus unregelmäßig gestalteten Bläschen, den Follikeln, deren Wandung von einem geschlossenen einschichtigen Epithel gebildet wird. Im Innern befindet sich eine homogene Masse, das Kolloid. An der Bildung und Speicherung von *Thyroxin* und *Triiodthyronin* sind die Epithelzellen und das Kolloid der Follikel beteiligt. Die Schilddrüsenhormone leiten sich von der Aminosäure Tyrosin ab. Für die Biosynthese werden Iodid-Ionen aus dem Blut gegen ein Konzentrationsgefälle im Kotransport mit  $Na^+$  in die Epithelzellen der Schilddrüse transportiert und an der apikalen Membran durch die Peroxidase zu elementarem Iod oxidiert. Im Bereich der Mikrovilli erfolgt der Einbau des Iods in die Tyrosylreste des nichtiodierten Thyreoglobulins. Durch Exozytose gelangt das Thyreoglobulin in das Kolloid und stellt dort die Speicherform der Schilddrüsenhormone dar. Bei Bedarf wird Thyreoglobulin durch Endozytose wieder in die Epithelzellen aufgenommen und durch lysosomale Proteolyse und im Verhältnis von 20:1 zu den Hormonen *Thyroxin*

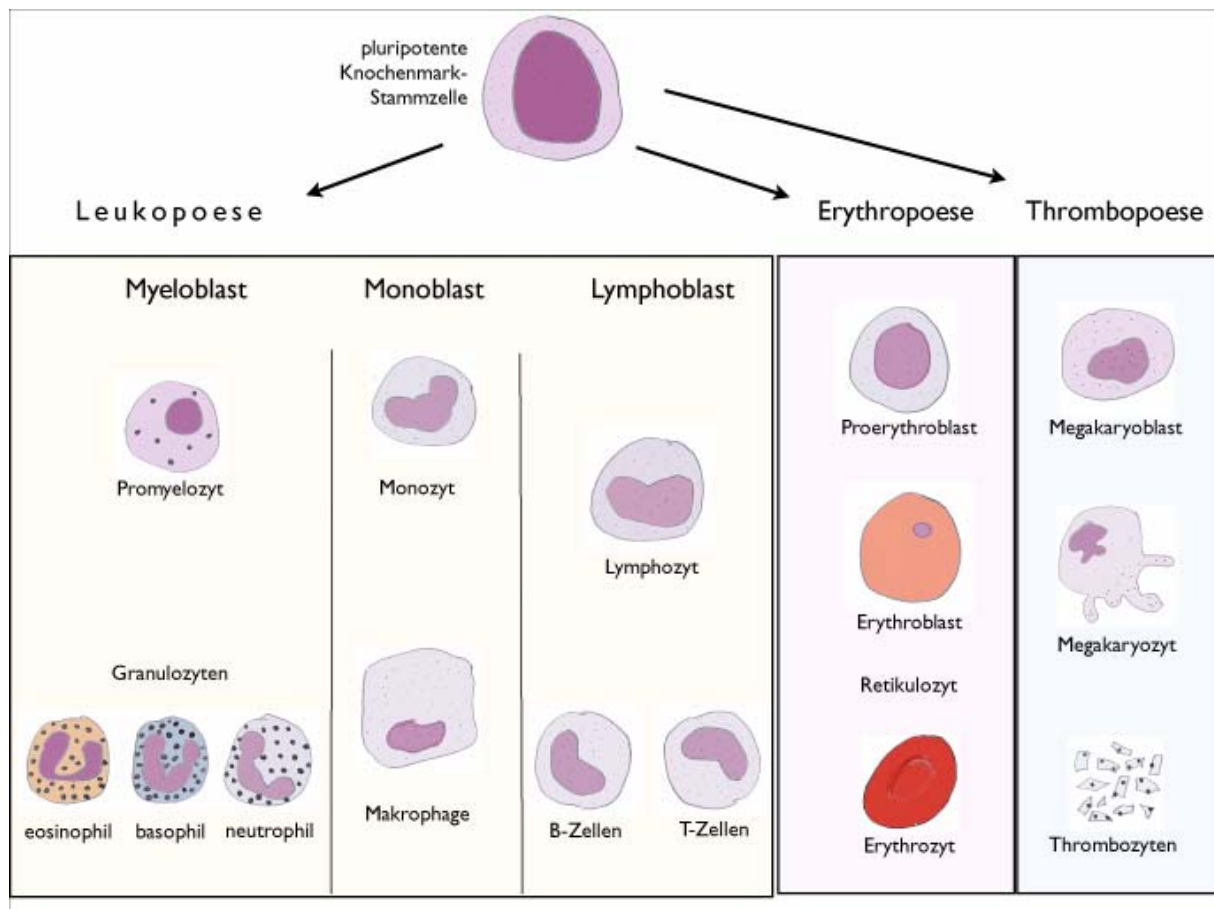
und *Triiodthyronin* abgebaut. Die auf diese Weise freigesetzten Hormone werden dann an das Blut der benachbarten Kapillaren abgegeben (Thews *et al.*, 1999; Köhrle und Brabant, 2010).



**Abbildung 3-4: gewonnene porcine Schilddrüsenfollikel**

#### 3.1.4 Blut

Das Blut stellt ein „flüssiges Körpergewebe“ dar. Es besteht aus Zellen und einer eiweiß- und elektrolythaltigen Lösung, dem Plasma. Die Hauptmasse der zellulären Bestandteile bilden die Erythrozyten, deren Funktionen  $O_2$ -Transport, Mitwirkung beim  $CO_2$ -Transport und die Regulation des pH-Werts an das intraerythrozytäre Hämoglobin gebunden sind. Die kern- und mitochondrienlosen Erythrozyten haben einen von den üblichen Zellen abweichenden, spezialisierten Energiestoffwechsel. Die Leukozyten sind kernhaltige Zellen, die nach morphologischen und funktionellen Gesichtspunkten in Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten unterteilt werden. Die Granulozyten entstehen aus einer allen Blutzellen gemeinsamen pluripotenten Stammzelle, aus der unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren und über verschiedene Differenzierungsstufen die funktionstüchtigen neutrophilen, eosinophilen und basophilen Granulozyten hervorgehen (Thews *et al.*, 1999).



**Abbildung 3-5 Vereinfachte Darstellung der Haematopoese modifiziert nach (Thews et al., 1999)**

Granulozyten, die auch als polymorphkernige Leukozyten (PMN) bezeichnet werden, sind differenzierte, nicht mehr teilungsfähige Blutzellen mit stabförmigem oder segmentiertem Kern und granuliertem Zytoplasma, die Fortbewegungs- und Phagozytosefähigkeit besitzen. Ihre Funktion liegt vor allem in der unspezifischen Abwehr (angeborene Immunantwort). Sie sind die ersten Zellen, die am Ort einer Gewebeschädigung erscheinen, zunächst beseitigen sie unspezifisch den größten Teil eingedrungener Mikroorganismen per Phagozytose und enzymatischen Abbaus. Granulozyten gehen bei ihrer Funktionserfüllung zugrunde und können ihrerseits von Makrophagen phagozytiert werden (Bundschuh et al., 1992).

Monozyten sind große, mononukleäre, definierte Oberflächenrezeptoren tragende, im Blut vorkommende und zur Phagozytose befähigte Zellen, die wesentlich an spezifischen und unspezifischen Abwehrvorgängen beteiligt sind. Monozyten gelangen über das Blut ins Gewebe und nehmen nach mehreren Teilungen und je

nach Ort und Funktion unterschiedliche Morphologien an. Im Gewebe werden sie als Makrophagen bezeichnet. Makrophagen sind erst im Gewebe voll funktionstüchtig und entfernen dort gealterte Zellen, Gewebetrümmer und auch Partikel (Kohle, Eisenoxid usw.) aus dem Organismus durch Phagozytose. Makrophagen spielen eine Rolle im Entzündungsgeschehen. Nach chemotaktischer Migration und unspezifischer Aktivierung erfolgt die Phagozytose von Bakterien und Viren (Bundschuh *et al.*, 1992).

### **3.1.5 HEK-293 Zellen**

HEK-293 Zellen wurden 1977 durch die Transformation von humanen embryonalen Nierenzellen mit dem Adenovirus 5 erhalten. Die Transformation resultierte im Einbau von ca. 4,5 Kilobasen des viralen Genoms in das humane Chromosom 19 der HEK-293 Zellen (Graham *et al.*, 1977). Die Zahl 293 leitet sich von der von Graham vergebenen Experimentnummer ab, der ursprüngliche Klon der Zelllinie ist das Produkt seines 293. Experiments. HEK-293 Zellen sind hypotriploide Epithelzellen, welche adhärent wachsen. Der exakte Zelltyp der HEK-293 Zellen ist nicht bekannt, embryonales Nierengewebe enthält verschiedene Typen von Zellen. Es gibt jedoch Hinweise, dass die Zellen viele Eigenschaften unreifer Neuronen aufweisen. Vermutlich wurde das Adenovirus aufgenommen und die ursprüngliche Nierenkultur wandelte sich in eine neuronale Abstammungszelle um. Als experimentell umgewandelte Zellform sind HEK-293 Zellen kein besonders gutes Modell für normale Zellen. Da die Zellen jedoch extrem einfach zu kultivieren und zu transfizieren sind, wird die HEK-293 Zelllinie häufig bei der Entwicklung von Virenimpfstoffen, Chemotherapeutika sowie zur Produktion von rekombinanten Adenovirus-Vektoren verwendet (Shaw *et al.*, 2002).

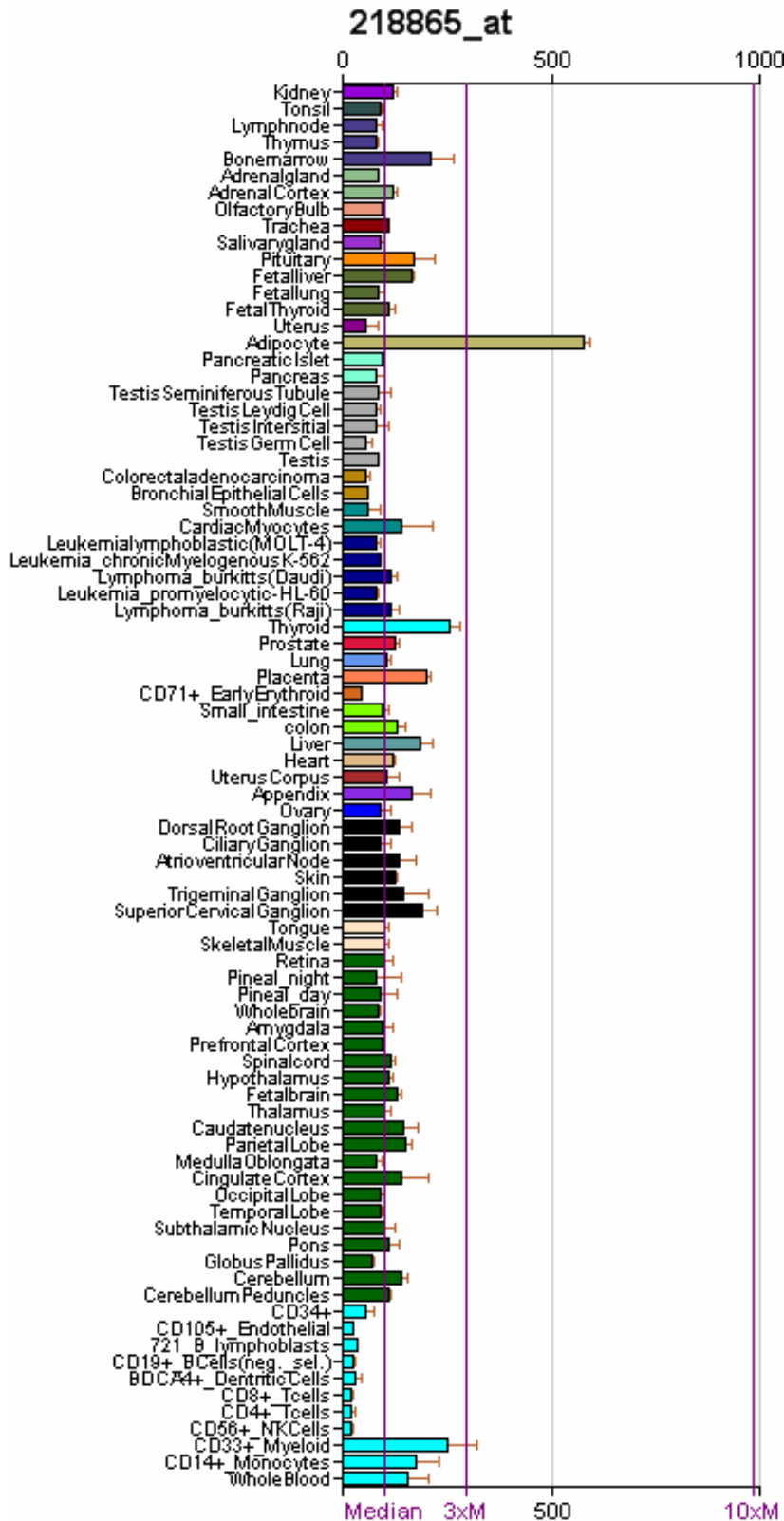


## 3.2 Thema und Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das Enzym mARC in verschiedenen Zelllinien (Caco-2, HEK-293) quantifiziert werden. Dazu sollten die Umsetzungsraten von Benzamidoxim zu Benzamidin herangezogen werden. Prodrugs werden, bevor sie in Tierstudien oder in klinischen Studien untersucht werden, zunächst in Zellkultursystemen getestet. Somit ist es von wissenschaftlichem Interesse, die zu verwendenden Zelllinien auf das Enzym hin zu untersuchen, das an der Reduktion der Prodrugs zur aktiven Wirkform beteiligt ist und die Vergleichbarkeit der Zelllinien zu nativem Gewebe zu kennen.

Im Hinblick auf die bislang unbekannte physiologische Bedeutung von mARC sollten neben der Untersuchung der Zelllinien eine Quantifizierung von mARC in verschiedenen Geweben durchgeführt werden, um an eventuellen Unterschieden in der Lokalisation, Hinweise auf die physiologische Funktion des Enzyms zu erhalten. Eine mRNA-Expressionsanalyse per Microarray lieferte für die beiden mARC Proteine folgende Ergebnisse (Su *et al.*, 2004).

### 3.2 Zielsetzung



**Abbildung 3-6: MOSC 1 Genexpressions- und Aktivitätsübersicht (Su et al., 2004)**

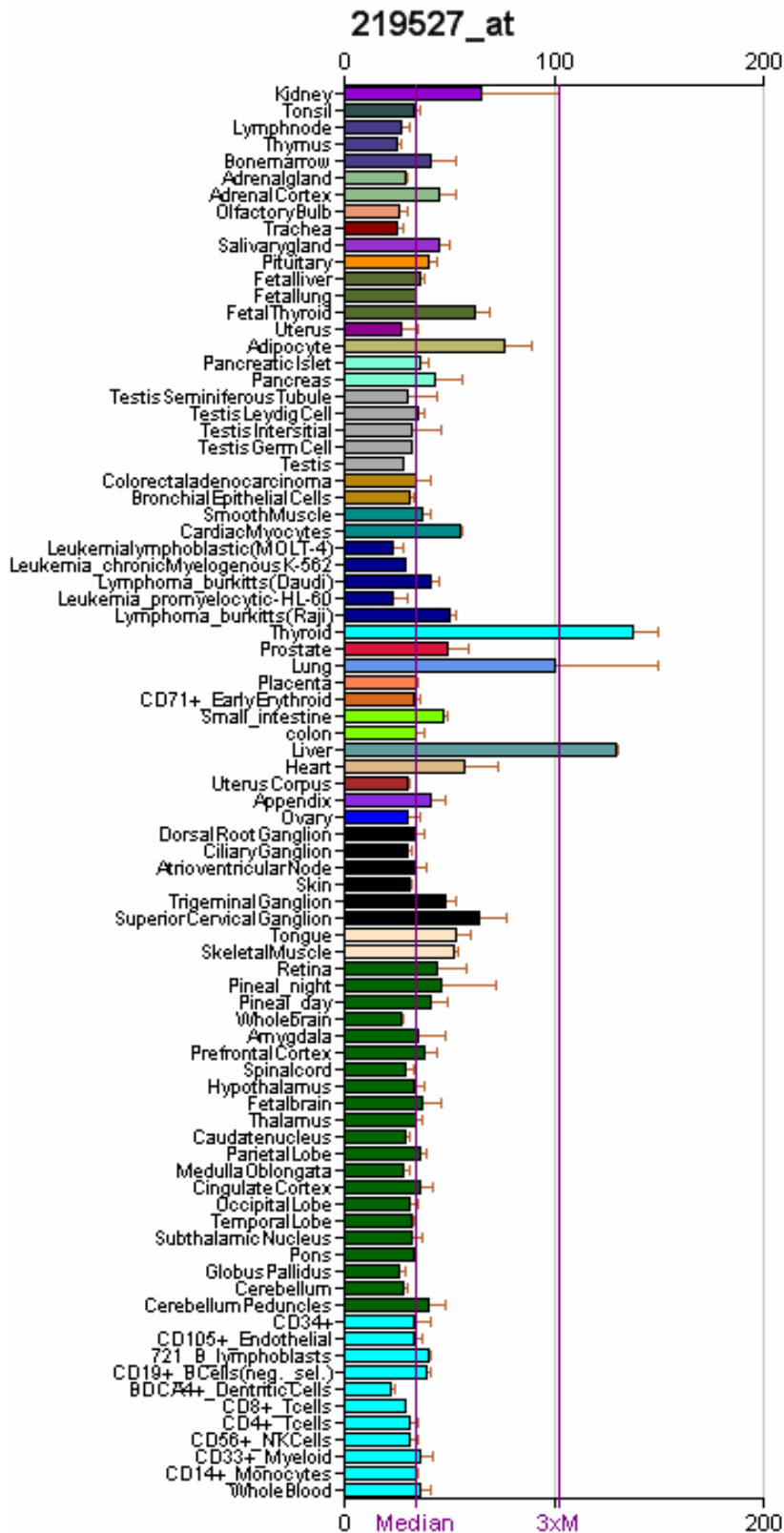


Abbildung 3-7: MOSC 2 Genexpressions- und Aktivitätsübersicht (Su et al., 2004)

Das Enzym mARC ist an der Biotransformation von Xenobiotika beteiligt, eine hohe Expression in Leber und Niere war zu erwarten. Ungewöhnlich ist jedoch die hohe Expression der mRNA von mARC 2 in der Schilddrüse. Im Rahmen dieser Arbeit sollten die mARC Expression in Leber und Schilddrüse verglichen werden. Dazu sollte zunächst die Isolierung primärer porciner Schilddrüsenfollikel etabliert werden. Die mRNA-Expression von mARC 1 zeigt im Vergleich zu anderen untersuchten Geweben eine erhöhte Aktivität in Monozyten. Als weiteres primäres Gewebe wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Blutzellen auf die mARC Proteine hin untersucht.

Die Benzamidoximreduktion wurde bislang als Markerumsetzung für mARC verwendet. Da es jedoch unklar ist, ob auch andere Enzyme an der Benzamidoximreduktion beteiligt sind, sollte im Rahmen dieser Arbeit eine Quantifizierung für mARC auf Proteinebene durchgeführt werden. Dazu sollten Westernblots herangezogen werden. Eine weitere Möglichkeit der direkten Quantifizierung eines Proteins stellt das ELISA-System dar. Ziel dieser Arbeit war es außerdem, für mARC 2 einen ELISA zu entwickeln. Per Westernblot und ELISA kann das Protein direkt und unter Umgehung der Benzamidoximreduktion quantifiziert werden. Diese Daten sollten dann mit denen der Benzamidoxim-Reduktion verglichen werden.

## 3.3 Methoden

### 3.3.1 Kultivierung von HEK-293 Zellen

Die HEK-293 Zellen wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Rose-John (Institut für Biochemie der CAU Kiel) zur Verfügung gestellt. Für die Versuche wurden die Zellen von maximal zehn aufeinanderfolgenden Passagen verwendet. Die Zellen wurden in Dulbecos modified Eagle Medium mit Glutamax-I, 4500 mg/l D-Glucose ohne Natriumpyruvat (DMEM) unter Zusatz von 5 % FCS und 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 1,5 mg Glutamin bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen gezüchtet. Die Zellen wurden zweimal pro Woche passagiert. Dazu wurden die Zellen mit 5 ml PBS ohne Calcium und Magnesium gewaschen und anschließend mit einer Trypsinlösung (0,08 %) abgelöst. Anschließend wurden die Zellen im Verhältnis 1:12 neu ausgesät.

### 3.3.2 Aufnahme- und Metabolismusstudien mit HEK-293 Zellen

Für die Aufnahmestudien wurden die Zellen wie in Kap. 3.3.1 beschrieben abgelöst. Es wurde die Anzahl der Zellen bestimmt und die Zellsuspension auf einen Gehalt von  $2 \cdot 10^5$  Zellen pro ml eingestellt. Die Zellen wurden auf Gewebekulturplatten mit 12 oder 24 Vertiefungen ausgesät, wobei 2 ml bzw. 1 ml der Zellsuspension pro Vertiefung zugegeben wurde. Zwei Tage nach Aussaat der Zellen wurden die Versuche durchgeführt.

Für die Versuche wurden alle Medien auf 37 °C temperiert. Die Zellen wurden zweimal mit je 1 ml Inkubationspuffer gewaschen. Der Inkubationspuffer hatte die folgende Zusammensetzung: 10 mM HEPES, 25 mM D-Glucose in HBSS pH 7,4. Der Versuch wurde mit der Zugabe der zu untersuchenden Substanz gestartet. Die Platten wurden in einem Platteninkubator bei 37 °C und unter Schütteln inkubiert. Nach den entsprechenden Inkubationszeiten wurde das Medium abgenommen, die Zellen zweimal mit je 1 ml eiskaltem Inkubationspuffer gewaschen und anschließend mit Methanol versetzt und für zehn Minuten geschüttelt. Die Proben des Mediums und die Methanolzellextrakte wurden anschließend der HPLC zugeführt.

#### 3.3.3 Isolierung primärer Schilddrüsenfollikel

Die Gewinnung primärer Schilddrüsenfollikel wurde nach dem Verfahren von (Nilsson *et al.*, 1990) durchgeführt. Die Schweineschilddrüsen wurden von der Großschlachterei Thomsen in Kellinghusen bezogen, es handelte sich um weibliche oder kastrierte Schlachtschweine im Alter von sechs Monaten. Folgende Lösungen wurden für die Isolierung verwendet:

##### Tyrodes Salt Solution (TSS)-TRIS ohne Mg<sup>2+</sup>

1,29 M	NaCl
27,0 mM	KCl
4,2 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
0,12 M	NaHCO <sub>3</sub>
55,6 mM	Glucose
0,1 M	TRIS-Base

##### 0,1 M Calciumchlorid-Lösung

##### 0,12 M Magnesiumchlorid-Lösung

##### Transportpuffer (300 ml)

30 ml	Tyrode-TRIS 10x
5,4 ml	CaCl <sub>2</sub> (0,1 M)
pH 7,3	

##### Digestionspuffer (200 ml)

20 ml	Tyrode-TRIS 10x
4 ml	MEM Aminosäure Lösung ohne Glutamin (50x)
6 ml	CaCl <sub>2</sub> (0,1 M)
400 µg	DNase I (2 µg/ml: 2700 U/mg)
40,2 mg	Collagenase 13000 U (66 mg: 196 U/mg)
31,7 mg	Trypsin Inhibitor type I-S
pH 7,3	

**Zentrifugationspuffer (400 ml)**

40 ml	Tyrode-TRIS 10x
8 ml	MEM Aminosäure Lösung ohne Glutamin (50x)
4 ml	Glutamin
7,2 ml	CaCl <sub>2</sub> (0,1 M)
1,6 ml	MgCl <sub>2</sub> (0,12 M)
2 g	Albumin Fraktion V
800 µg	DNase I (2 µg/ml: 2700 U/mg)
63,3 mg	Trypsin Inhibitor type I-S
pH 7,3	

**Kulturmedium**

Eagles MEM (500 ml)	
25 ml	FCS (5 %)
2,5 µg/ml	Amphotericin B
10 ml	200 U/ml Penicillin und 200 U/ml Streptomycin

Schilddrüsen mit intakter Kapsel wurden in eiskaltem Transportpuffer ins Institut transportiert, der Transport dauerte ca. 50 min. Alle weiteren Schritte wurden in der Sterilwerkbank durchgeführt. Etwa 20 intakte Schilddrüsen wurden einzeln in Ethanol getaucht, der Ethanol wurde an einer Ethanollampe entzündet und die Schilddrüse brannte dann ca. 5 s über einer feuerfesten mit Eis gefüllten Schüssel. Die Schilddrüse wurde noch brennend in eine Flasche mit Transportpuffer überführt. Dann wurde mit Schere und Skalpell die Kapsel entfernt und es wurden 1 mm dicke Scheiben geschnitten. Die Scheiben wurden bis zur Konsistenz eines kaviarähnlichen Breis gehackt und der Brei wurde in eine mit 30 ml Transportpuffer gefüllte 100 ml Flasche überführt. Sobald das gehackte Gewebe in der Flasche eine Höhe von 1 cm erreicht hatte, wurde die Flasche geschwenkt. Das Fett- und Bindegewebe schwamm auf und ließ sich durch Dekantieren abtrennen. Dieser Vorgang wurde drei- bis viermal mit je 30 ml Transportpuffer wiederholt. Nach dem letzten Dekantieren wurden 30 ml Digestionspuffer zugegeben, die Flasche verschlossen und 45 min im Wasserbad (37 °C) unter starkem Schütteln inkubiert.

### 3.3 Methoden

---

Dann wurde die Suspension zehnmal in einer 10 ml Falcon-Pipette aufgezogen, zum Sedimentieren stehengelassen, dekantiert und mit frischen 30 ml Digestionspuffer für weitere 60 min inkubiert. Während dieser Zeit wurde die Suspension alle 15 min 15mal in einer 10 ml Pipette aufgezogen. Nach 60 min wurde die Suspension 40mal aufgezogen. Die Suspension wurde in 15 ml Röhrchen aufgeteilt und dem „Professorssnurr“<sup>\*</sup> unterzogen, Dazu wurde die Zentrifuge einmal auf 37 g gebracht und sofort gestoppt. Das Pellet soll sich leicht bewegen und das Sediment der Größe nach übereinander geschichtet sein. Der Überstand wurde in 15 ml Röhrchen auf 3 ml Zentrifugationspuffer gegeben und das Pellet wurde erneut mit 30 ml Digestionspuffer für weitere 45 min inkubiert.

Der Überstand wurde 5 min bei 67 g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet erneut in Zentrifugationspuffer resuspendiert. Dann wurde 5 min bei 37 g zentrifugiert, erneut der Überstand abgezogen, das Pellet in Zentrifugationspuffer resuspendiert und durch einen 375 µM Filter gegeben. Das Filtrat wurde anschließend durch einen 265 µM Filter gegeben und das dann erhaltene Filtrat wurde 5 min bei 19 g zentrifugiert, um die Erythrozyten abzutrennen, und in Kulturmedium resuspendiert. Die Suspension, die dann nur noch einzelne Zellen und Follikelteile enthielt, wurde bei RT aufbewahrt. Nach Ablauf der Inkubationszeit der Gewebesuspension im Digestionspuffer wurden die zuvor genannten Zentrifugations- und Filtrationsschritte wiederholt und das im „Professorssnurr“ erhaltene Pellet eventuell einem weiteren Collagenaseverdau mit anschließender Zentrifugation und Filtration unterzogen.

Die erhaltenen Zell- und Follikelsuspensionen wurden vereinigt und konnten dann zur Aussaat auf Platten für Versuche verwendet werden oder wurden für spätere Versuche eingefroren. Zum Einfrieren wurde die Zellsuspension 5 min bei 400 rpm zentrifugiert und in Fötalem Kälberserum (FCS) mit 10 % Dimethylsulfoxid resuspendiert. Es wurden je 1 ml der Suspension in ein Cryoröhrchen gegeben und diese dann in einer mit Isopropanol gefüllten Cryobox über Nacht bei -80 °C gelagert. Für die Langzeitlagerung wurden die Röhrchen in die Gasphase des Stickstofftanks überführt. Die cryokonservierten Zellen konnten bis zu vier Monaten nach der Isolierung für Versuche verwendet werden.

\* Benennung nach Prof. Ragnar Ekholm, Sahlgrenska, Göteborg, Schweden



### 3.3.4 Kultivierung primärer Schilddrüsenfollikel

Für die weitere Kultivierung wurden die Schilddrüsenzellen 5 min bei 37 g zentrifugiert und Eagles MEM mit 5 % FCS, 2,5 µg/ml Amphotericin B, 2000 U Penicillin und 2000 U Streptomycin resuspendiert. Für die Versuche wurden die Zellen auf 12 bzw. 24-well-Platten ausgesät. Die Platten wurden zunächst mit Collagen beschichtet. Dazu wurden die einzelnen Vertiefungen vollständig mit einer Collagenlösung (0,3 mg/ml) bedeckt, die Lösung verblieb 10 min in den Vertiefungen, wurde abgezogen und die Platten wurden an der Luft getrocknet. Die Zellen wurden so ausgesät, dass die Konfluenz vier bis fünf Tage nach der Aussaat erreicht war. Die Versuche wurden analog zu denen mit HEK-293 Zellen, siehe Kap. 3.3.2, durchgeführt.

### 3.3.5 Kultivierung verschiedener Schilddrüsenzelllinien

Die Anzucht, Kultivierung und Versuchsdurchführung fand im Arbeitskreis von Prof. Köhrle am Institut für Experimentelle Endokrinologie der Charité in Berlin statt. Die Zellen befanden sich seit zwei bis drei Wochen vor dem Versuch in Kultur. Es handelte sich bei allen Zelllinien um Passage sechs nach dem Auftauen.

#### Humane folliculäre Schilddrüsenkarzinomzelllinie FTC 133

	Iscoves Modified Dulbecos Medium	
+	10 %	FCS
+	1 %	Penicillin/ Streptomycin
+	TSH	1 mU/ml

#### Schilddrüsenzelllinie aus der Ratte FRTL 5

Coons Modified Hams F-12 Medium

+	5 %	FCS
+	1 %	Penicillin/Streptomycin
+	Hormonsupplement H5	
	Somatostatin	10 ng/ml
	Hydrocortison	3,3 ng/ml
	Glycyl-Histidyl-Lysin-Acetat	20 ng/ml
	Insulin	10 µg/ml
	Transferrin	5 µg/ml
+	TSH	1 mU/ml

#### **Schilddrüsenzelllinie aus der Ratte PCCL 3**

Coons Modified Hams F-12 Medium

+	5 %	FCS	
+	1 %	Penicillin/Streptomycin	
+ Hormonsupplement H5			
		Somatostatin	10 ng/ml
		Hydrocortison	3,3 ng/ml
		Glycyl-Histidyl-Lysin-Acetat	20 ng/ml
		Insulin	10 µg/ml
		Transferrin	5 µg/ml
+	2 mM	L-Glutamin	
+	TSH	1 mU/ml	

Die 24-well-Platten wurden aus konfluent bewachsenen Stammhaltungsflaschen ausgesät. Dabei wurde das Teilungsverhältnis den Wachstumsraten angepasst.

<b>Zelllinie</b>	<b>Teilungsverhältnis</b>
FTC 133	1:7
FRTL 5	1:2
PCCL 3	1:3

72 h nach der Aussaat und 24 h vor dem Experiment wurde das Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit frischem Stammhaltungsmedium (+/- 1 mU/ml TSH) versorgt. Die Versuchsdurchführung erfolgte wie bereits bei den HEK 293 Zellen beschrieben.

### 3.3.6 Isolierung primärer porciner Hepatozyten

Die Gewinnung primärer Hepatozyten wurde nach dem bei Fröhlich (2004) und Wundt (2008) beschriebenen Verfahren durchgeführt. Die Schweineleber wurde von der Großschlachterei Thomsen in Kellinghusen bezogen, es handelte sich um weibliche oder kastrierte Schlachtschweine im Alter von sechs Monaten. Folgende Lösungen wurden für die Isolierung verwendet:

#### Krebs-Ringer-Puffer ohne $\text{Ca}^{2+}$ und $\text{Mg}^{2+}$

20 mM	HEPES
154 mM	NaCl
5,6 mM	KCl
25 mM	$\text{NaHCO}_3$
5 mM	Glucose
pH 7,4	

#### Präperfusionspuffer: Krebs-Ringer-Puffer ohne $\text{Ca}^{2+}$ und $\text{Mg}^{2+}$ plus

1 mM	EDTA
------	------

#### Perfusionspuffer: Krebs-Ringer-Puffer ohne $\text{Ca}^{2+}$ und $\text{Mg}^{2+}$ plus

4 mM	$\text{CaCl}_2$
------	-----------------

#### Digestionspuffer: Perfusionspuffer plus

190 mg	Kollagenase II in 120 ml Perfusionspuffer
--------	--

#### Zentrifugationspuffer: Perfusionspuffer plus

8 mg	DNase in 200 ml Perfusionspuffer
------	----------------------------------

#### Kulturmedium Williams E Medium (500 ml)

0,014 $\mu\text{g/ml}$	Glucagon
0,16 U/ml	Insulin
150 U/ml	Penicillin
150 $\mu\text{g/ml}$	Streptomycin
2 mM	Glutamin
10 %	FCS

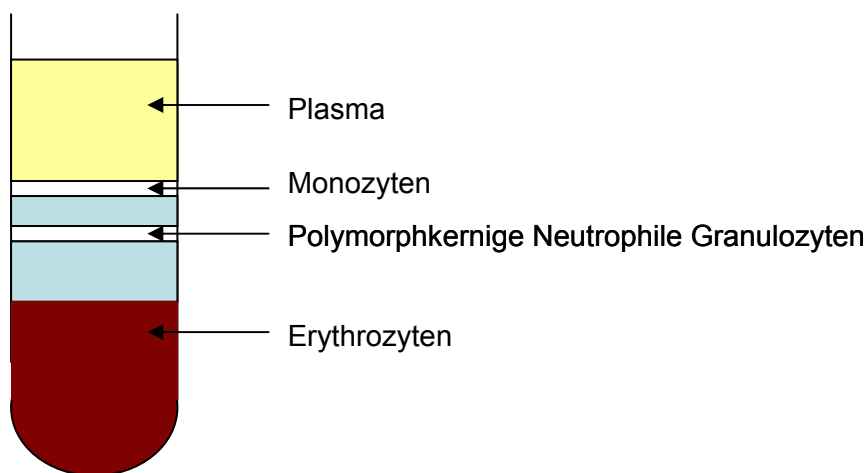
Die Leber wurde in eisgekühltem, calciumfreien Krebs-Ringer-Puffer transportiert, der Transport dauerte ca. 50 min. Es wurden nur unversehrte Leberstücke von ca. 80 g verwendet. Das Gewebe wurde in einer auf 37 °C erwärmten Apparatur über drei Kanülen ca. 20 min mit Präperfusionspuffer möglichst blutleer gespült und dann ca. 10 min mit Perfusionspuffer gespült. Anschließend wurde 10 bis 15 min im zirkulierenden System mit Digestionspuffer gespült. Das Gewebe wurde in eine Glasschale mit 100 µl Zentrifugationspuffer überführt, mit einem Skalpell angeritzt und die Zellen dann durch Zupfen mit der Pinzette herausgelöst. Es wurde durch ein Nylonnetz (150 µm und 80 µm) filtriert. Anschließend wurde die Zellsuspension 3 min bei 15 °C und 50 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgezogen und die Zellen wurden in Zentrifugationspuffer resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde wiederum der Überstand abgezogen und die Zellen in Kulturmedium resuspendiert. Dieser Zentrifugationsschritt wurde nochmals wiederholt und nach erneuter Resuspension wurde die Zellzahl bestimmt und die Suspension auf  $1 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt.

#### **3.3.7 Kultivierung primärer porciner Hepatozyten**

Für die weitere Kultivierung wurden die Hepatozyten auf mit Collagen beschichteten Platten gezüchtet (Collagenbeschichtung siehe Kap 3.3.4). Für die Versuche wurden die Zellen auf 12 bzw. 24-well-Platten ausgesät. Dazu wurden 1 bzw. 0,5 ml der Zellsuspension in die Vertiefungen der Platten gegeben. Die Versuche wurden 24 bis 48 h nach der Aussaat durchgeführt, der Ablauf war analog zu dem mit HEK-293 Zellen, siehe Kap. 3.3.2.

### 3.3.8 Gewinnung verschiedener humaner Blutzellen

Für Versuche mit humanen Blutzellen wurden zwei Probanden (männlich, 32, gesund und weiblich, 28, gesund) 80-100 ml Blut als Citratblut abgenommen und unabhängig voneinander untersucht. Das Blut wurde auf Raumtemperatur abgekühlt. Dann wurden in 15 ml Röhrchen 5 ml Polymorphprep™ vorgelegt und darauf vorsichtig 5 ml des Citratbluts geschichtet. Anschließend wurde für 35 min bei 523 g bei Raumtemperatur ohne Bremse zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde eine Auftrennung der Zellen im Dichtegradienten nach folgendem Schema erhalten:



**Abbildung 3-8 Auftrennung der Blutzellen im Dichtegradienten**

Mit einer langen Pasteurpipette wurden die Monozyten und die Polymorphkernigen Neutrophilen Granulozyten (PMN) einzeln abgesogen und je in ein 50 ml Röhrchen überführt. Die Röhrchen wurden auf 50 ml mit PBS-Puffer ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  und 0,25 % BSA (sterilfiltriert) aufgefüllt. Ebenso wurde auch eine kleine Menge der Erythrozyten behandelt. Anschließend wurde 10 min bei 460 g und RT ohne Bremse zentrifugiert. Dann wurde der Überstand abgesogen, das Pellet erneut mit 50 ml PBS-Puffer ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  und 0,25 % BSA (sterilfiltriert) resuspendiert und nochmals zentrifugiert (10 min, 460 g, RT, ohne Bremse). Anschließend wurde der Überstand abgesogen und die Zellen im Transportmedium für die Versuche resuspendiert.

#### **3.3.9 Substratabhängige Untersuchungen mit humanen Blutzellen**

Die Versuche mit Blutzellen wurden in HBSS-Puffer mit 10 mM HEPES (sterilfiltriert) durchgeführt. Die Zellsuspension wurde auf einen Zellgehalt von  $1 \cdot 10^7$  Zellen/ml eingestellt. Die Versuche wurden auf 24-well-Platten durchgeführt. Dazu wurden die Vertiefungen mit 500  $\mu$ l Transportpuffer gefüllt, der die entsprechende Menge an zu untersuchender Substanz enthielt. Der Versuch wurde mit der Zugabe eines Volumens an Zellsuspension, welches eine Mio. Zellen enthielt, gestartet. Nach den entsprechenden Zeiten wurde die Inkubation mit der Zugabe von 500  $\mu$ l eiskaltem Methanol gestoppt und die Proben in Eppendorfgefäße überführt. Nach 10 min Schütteln wurden die Proben bei  $-80$  °C eingefroren. Nach dem Auftauen wurde 5 min bei 10.000 rpm zentrifugiert und die Überstände der HPLC zugeführt. Die Vollständigkeit der Extraktion wurde überprüft, indem das Pellet nochmals mit Methanol versetzt wurde und der Überstand erneut der HPLC zugeführt worden ist, welcher dann kein detektierbares Signal der zu untersuchenden Verbindung mehr aufwies. Eine Proteinbestimmung wurde von der eingesetzten Zellsuspension wie in Kap. 2.3.1.8.2.3 beschrieben durchgeführt.

#### **3.3.10 Blutzelluntersuchungen hinsichtlich mARC 1**

Die Monozyten wurden homogenisiert und 70 min bei 42.000 rpm und bei  $4$  °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in Zentrifugationspuffer resuspendiert. Der Überstand wurde einkonzentriert und anschließend wurde das Pellet und das Konzentrat des Überstands per Westernblot untersucht.

Der Zentrifugationspuffer hatte die folgende Zusammensetzung: 2,5 mM EDTA, 10 mM MOPS, pH 7,2.

### 3.3.11 HPLC-Analytik zur Trennung von Benzamidoxim und Benzamidin aus Zellkulturproben

Zur Trennung der zu analysierenden Substanzen wurde folgende HPLC-Methode verwendet:

HPLC-Pumpe	Waters 600 E	
Detektor	Waters 486 Tunable Absorbance Detektor	
Autosampler	Waters 717 plus Autosampler	
Integrator	EZChrom™ Elite Client/Server Version 2.8.3 Build 2249	
	Aufnahme- und Auswertsoftware	
Stationäre Phase	Phenomenex GEMINI 5 µm C 18 110 Å 150×4,6 mm; Vorsäule Gemini 4×3 mm	
Mobile Phase	50 mM Ammoniumacetat in Aqua bidest, pH 7,0 eingestellt mit konz. Ammoniaklösung, 5 % Methanol (v/v)	
Flussrate	1,0 ml/min	
Laufzeit	20 min	
Injektionsvolumen	10 µl	
Detektion	UV: 229 nm	
Retentionszeiten	Benzamidin:	8,2 min ± 0,5 min
	Benzamidoxim:	16,1 min ± 0,5 min

Der wässrige Anteil der mobilen Phase wurde mit einem Sartorius® Membranfilter (0,45 µm) filtriert. Nach der Zugabe von Methanol wurde der Eluent 15 min im Ultraschallbad entgast.

### 3.3.12 Kalibrierung

Für das Benzamidin und das Benzamidoxim wurde im Konzentrationsbereich von 0,25 bis 75 µM eine Kalibrierung in Methanol erstellt. In dem ermittelten Konzentrationsbereich verlief sie linear ( $r^2 = 0,998$ ). Die Bestimmungsgrenze betrug 100 nM.

#### 3.3.13 Berechnung der Michaelis-Menten-Parameter

Die  $K_m$  und  $V_{max}$  Werte wurden per Sigmaplot mithilfe der folgenden Formel ermittelt:

$$y = \frac{a \cdot x}{b + x}$$

mit a:  $V_{max}$  maximale Reaktionsgeschwindigkeit  
b:  $K_m$  Michaelis-Menten-Konstante

#### 3.3.14 Inhibitionsstudien mit porcinen Lebermitochondrien

Inhibitionsstudien der mitochondrialen Benzamidoximreduktion wurden mit porcinen Lebermitochondrien durchgeführt. Die Gewinnung der Mitochondrien erfolgte nach der bei Havemeyer (2006) beschriebenen Methode per differentieller Zentrifugation und einem isotonischen Percoll-Gradienten. Die Inkubationen wurden bei 37 °C im Schüttelwasserbad unter aeroben Bedingungen durchgeführt. Die Ansätze enthielten 0,1 mg Protein (porcine Mitochondrien), 1 mM NADH und 10 µM bis 3 mM Inhibitor in 100 mM Phosphatpuffer pH 6,0. Nach 10-minütiger Vorinkubation wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 mM Benzamidoxim gestartet (Ansatzvolumen 150 µl). Nach 20 min Inkubationszeit wurde die Reaktion mit der Zugabe von 150 µl eiskaltem Methanol gestoppt. Die Proben wurden 10 min geschüttelt, 5 min bei 10000 U/min zentrifugiert und die Überstände anschließend der HPLC zugeführt.

Die Berechnung der  $EC_{50}$ -Werte erfolgte per Sigmaplot mithilfe folgender Formel:

$$y = \min + \frac{\max - \min}{1 + (x / EC_{50})^{-Hill\ Slope}}$$



### 3.3.15 HPLC-Analytik zur Trennung von Benzamidoxim und Benzamidin aus NADH-haltigen Proben

Zur Trennung der zu analysierenden Substanzen wurde folgende HPLC-Methode verwendet:

HPLC-Pumpe	Waters 1525	
Detektor	Waters 2487	
Autosampler	Waters 717 plus Autosampler	
Integrator	Waters Breeze Version 3.30	
Stationäre Phase	LiChrocart® 125×4 mm LiChrospher 60, RP-select B Partikelgröße 5 µm, Vorsäule RP-select B 4×4 mm (Merck, Darmstadt )	
Mobile Phase	10 mM 1-Octylsulfonat in Aqua bidest. 17 % Acetonitril (v/v)	
Flussrate	1,0 ml / min	
Laufzeit	30 min	
Injektionsvolumen	40 µl	
Detektion	UV 229 nm	
Retentionszeiten	Benzamidoxim:	6,9 min ± 0,5 min
	Benzamidin:	24,2 min ± 0,5 min

Der wässrige Anteil der mobilen Phase wurde mit einem Sartorius® Membranfilter (0,45 µm) filtriert. Nach der Zugabe von Acetonitril wurde der Eluent 15 min im Ultraschallbad entgast.

#### Kalibrierung

Für das Benzamidin wurde im Konzentrationsbereich von 0,5 bis 250 µM eine Kalibrierung erstellt. In dem ermittelten Konzentrationsbereich verlief sie linear ( $r^2=0,998$ ). Die Bestimmungsgrenze betrug 100 nM.

#### 3.3.16 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page)

Die SDS-Page wurde nach dem von Laemmli (1970) beschriebenen diskontinuierlichen Verfahren durchgeführt.

Folgende Lösungen, Puffer, Gele und Materialien wurden bei der SDS-Page verwendet:

<b>Acrylamidlösung:</b> 37,5:1	Acrylamid : Bisacrylamid
<b>Trenngelpuffer 4x</b>	1,5 M Tris-Base 0,4 %(w/v) SDS pH 8,8
<b>Sammelgelpuffer 4x</b>	1,5 M Tris-Base 0,4 % (w/v) SDS pH 6,8
<b>Trenngel 12,5 %</b>	3 ml Aqua dem. 4 ml Trenngelpuffer 4x 5 ml Acrylamidlösung 10 µl TEMED 80 µl APS 10 %
<b>Sammelgel 4,5 %</b>	2,4 ml Aqua dem. 1,0 ml Sammelgelpuffer 4x 0,6 ml Acrylamidlösung 6 µl TEMED 25 µl APS 10 %
<b>Elektrodenpuffer</b>	25 mM Tris-Base 192 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS pH 8,2

<b>Probenauftragspuffer 4x</b>	250 mM	Tris-HCL pH 6,8
	400 mM	DTT
	40 % (w/v)	Glycerol
	8 % (w/v)	SDS
	0,02 % (w/v)	Bromphenolblau

Die Proteinproben wurden je nach Reinheitsgrad auf eine Proteinmenge von 0,005-100 µg verdünnt und in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen 5 min bei 95 °C erhitzt. Der Molekulargewichtsstandard (SeeBlue® Plus Pre-Stained Standard) hatte die folgende Zusammensetzung: Myosin (250 kDa), Phosphorylase (148 kDa), BSA (98 kDa), Glutamindehydrogenase (64 kDa), Alkoholdehydrogenase (50 kDa), Carbonicanhydrase (36 kDa), Myoglobin Red (22 kDa), Lysozym (16 kDa), Aprotinin (6 kDa) und Insulin B-Kette (4 kDa).

Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 160 V. Nach Durchlauf des Sammelgels wurde die Spannung auf 200 V erhöht und die Proteine innerhalb einer 6 cm langen Laufstrecke aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mit Coomassie-Blau.

#### **Coomassie-Färbung:**

Das Gel wurde unter Schütteln zwei Stunden in Coomassie-Lösung gefärbt und anschließend in Entfärbelösung über Nacht entfärbt.

<b>Färbelösung</b>	2 % (w/v)	Coomassie Brilliant Blue
	10 % (v/v)	Eisessig
	25 % (v/v)	Isopropanol
<b>Entfärbelösung</b>	10 % (v/v)	Eisessig
	30 % (v/v)	Ethanol

#### 3.3.17 Immunoblot-Analyse (Westernblot)

Folgende Pufferlösungen wurden für den Westernblot verwendet:

<b>Transferpuffer:</b>	25 mM	Tris-HCl
	190 mM	Glycin
	10 % (v/v)	Methanol
<b>TBS-Puffer:</b>	1,5 M	Tris-Base
	0,4 % (w/v)	SDS
<b>TBST-Puffer:</b>	1,5 M	Tris-Base
	0,4 % (w/v)	SDS
	0,1 % (v/v)	Tween 20
<b>Blockierungslösung</b>	5 % (w/v)	BSA in TBST

Der Westernblot wurde im Tank-Blot-Verfahren durchgeführt. Dazu wurden vier Lagen Whatman-Papier in Transferpuffer eingelegt und die PVDF-Membran wurde kurz in Methanol aktiviert. Die Membran und das Gel wurden folgendermaßen geschichtet in die Blot-Apparatur eingesetzt: Schwämmchen, zwei Lagen Whatman-Papier, Membran, Gel, zwei Lagen Whatman-Papier, Schwämmchen. Der zu starke Temperaturanstieg im Tank wurde durch die Zugabe eines Kühlpacks verhindert. Die Proteine wurden bei 90 mA für 120 min geblottet. Anschließend wurde die Membran entnommen und für eine Stunde bei Raumtemperatur in Blockierungslösung unter Schütteln inkubiert. Dann wurde die Membran über Nacht bei 4 °C in Blockierungslösung, die den Antikörper (1:2.000-1:10.000) enthielt, geschüttelt. Im Folgenden wurde die Membran dreimal mit TBST-Puffer gewaschen und dreimal mit jeweils frischem TBST-Puffer unter Schütteln für 15 min bei RT gewaschen. Dann folgte die Inkubation in Sekundärantikörper (1:2.000-1:10.000), der in Blockierungslösung suspendiert war, für eine Stunde bei RT unter Schütteln. Anschließend wurde die Membran wiederum dreimal mit TBST-Puffer gewaschen und dreimal in TBST-Puffer für 15 min bei RT geschüttelt. Dann wurde das Enhanced Chemilumineszenz (ECL)-Reagenz auf die Membran pipettiert und für eine Minute immer wieder darüber laufen gelassen. Die Membran wurde dann in eine Klarsichtfolie überführt und in eine lichtdichte Kassette gelegt. Alle weiteren Schritte

wurden in einer Dunkelkammer durchgeführt. Der Film wurde für 1-20 min in der lichtdichten Kassette mit der Membran belichtet und im Anschluß wurde der Film im Cawomat entwickelt.

Der in Abbildung 3-41 gezeigte Westernblot zum Vergleich von Mitochondrien aus verschiedenen porcinen Geweben wurde von Fr. Dr. A. Havemeyer angefertigt.

### 3.3.18 Anti-hmARC 2 Antikörper

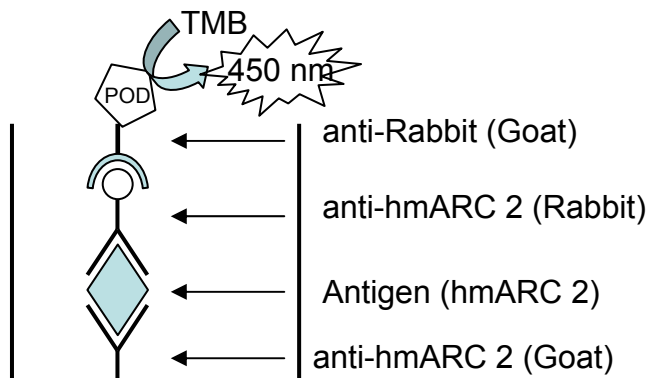
Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein weiterer Antikörper gegen humanes mARC 2 aus einer anderen Spezies als aus dem Kaninchen benötigt. Die Firma Biogenes, Berlin, wurde mit der Herstellung eines polyklonalen Antikörpers aus der Ziege beauftragt. Dazu wurde zunächst ein Peptid synthetisiert. Im Folgenden ist die Sequenz von hmARC 2 gezeigt. Der grau gedruckte Teil fehlt dem rekombinanten humanen Protein und unterstrichen wurde die Sequenz des synthetisierten Peptids.

MGASSSSALARLGLPARPWPRWLGVAALGLAAVALGTVAWRRRAWPRRRRRLQQV  
 GTVAKLWIYPVKSCCKGVPVSEAECTAMGLRSGNLRDRFWLVIKEDGHMVTARQEP  
 RLVLSIIYENNCLIFRAPDMDQLVLPSKQPSSNKLHNCRIFGLDIKGRDCGNEAAKW  
 FTNFLKTEAYRLVQFETNMKGRTSRKLLPTLDQNFQVAYPDYCPLLIMTDASLVDLN  
TRMEKKMKMENFRPNIVVTGCDAFEEDTWEDELLIGSVEVKKVMACPRCILTTPVDPD  
 TGVIDRKQPLDTLKSRYRLCDPSEELYKLSPLFGIYYSVEKIGSLRVGDPVYRMV

Eine Ziege wurde dreimal mit dem Peptid geboostert und nach jeweils vier Wochen wurde Serum gewonnen. Der Antikörper wurde mit Hilfe einer Affinitätssäule, an die das 15 Aminosäuren lange Peptid gebunden war, aufgereinigt.

#### 3.3.19 ELISA

Es wurde ein Sandwich-ELISA durchgeführt, der nach folgendem Schema aufgebaut wurde.



**Abbildung 3-9: Aufbau des Sandwich-ELISA**

Dazu wurden die folgenden Puffer verwendet:

**Phosphatpuffer (PBS) (1000 ml):**

80,0 g	NaCl
2,0 g	KCl
14,4 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
14,4 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
pH 7,4	

**Blockierungslösung:** 3 % (m/v) BSA in PBS

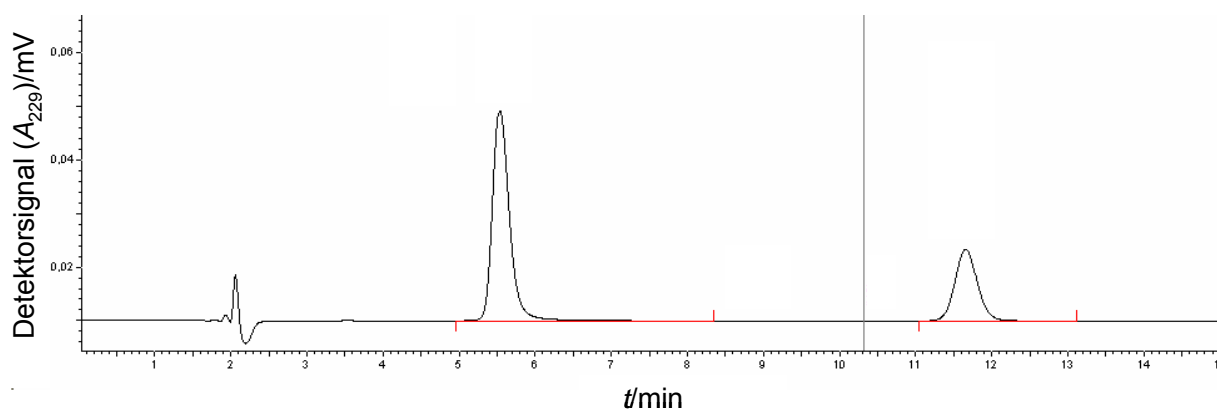
Zunächst wurde eine 96-well-Platte (Maxisorp® von Nunc) mit 60 µl Antikörperlösung (anti-hmARC 2 aus der Ziege 20 ng/ml) beschichtet und über Nacht bei 4 °C unter Schütteln gelagert. Am folgenden Tag wurde die Antikörperlösung abgesogen und für weitere Anwendungen bei -20 °C aufbewahrt. Die Vertiefungen wurden zweimal mit je 200 µl PBS gewaschen. Dann wurden 200 µl Blockierungslösung je Vertiefung dazugegeben und die Platte wurde für zwei Stunden bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Lösung abgesogen und die Vertiefungen zweimal mit je 200 µl PBS gewaschen. Dann wurden je 50 µl Antigenlösung (5 pg-50 µg) in verschiedenen Konzentrationen, je nach Reinheitsgrad der Proteine, zugegeben. Es wurde wieder zwei Stunden bei RT unter Schütteln inkubiert und anschließend viermal mit je 200 µl PBS gewaschen. Dann wurde die Platte mit je

50 µl Antikörperlösung (anti-hmARC 2 aus dem Kaninchen 1:2.000) beschichtet und erneut über Nacht bei 4 °C und unter Schütteln inkubiert. Am folgenden Morgen wurde dreimal mit je 200 µl PBS gewaschen und anschließend wurde für zwei Stunden mit 50 µl Antikörperlösung (Goat Anti Rabbit 1:2.000) bei RT unter Schütteln inkubiert. Dann wurde erneut zweimal mit je 200 µl PBS gewaschen und im Folgenden wurden je 100 µl TMB zugegeben. Die Platte wurde dann für 15 min unter Lichtausschluss inkubiert. Positive Vertiefungen färbten sich türkisblau. Nach Zugabe von 90 µl 1 N HCl kam es zu einer Farbverschiebung nach gelb. Es wurde die Absorption bei 450 nm gemessen.

## 3.4 Ergebnisse

### 3.4.1 Bestimmung der *N*-reduktiven Aktivität

Um die *N*-reduktive Aktivität in verschiedenen Zelllinien und primären Gewebekulturen zu untersuchen, wurden diese mit dem Modellsubstrat Benzamidoxim inkubiert. Gemessen wurden dann die durch enzymatische Reduktion entstandenen Benzamidinkonzentrationen mit Hilfe einer neu entwickelten HPLC-Methode, die in Kap. 3.3.11 beschrieben worden ist. Die Abbildung 3-10 zeigt exemplarisch die chromatographische Trennung des Prodrugs Benzamidoxim und der reduzierten Verbindung Benzamidin.



**Abbildung 3-10: Repräsentatives HPLC Chromatogramm zur Trennung von Benzamidin und Benzamidoxim**

R<sub>t</sub> Benzamidin: 5,6 min; R<sub>t</sub> Benzamidoxim: 11,8 min

Diese HPLC-Methode wurde zur Vermessung aller Proben verwendet, die mit Hilfe von Zellsystemen gewonnen wurden.

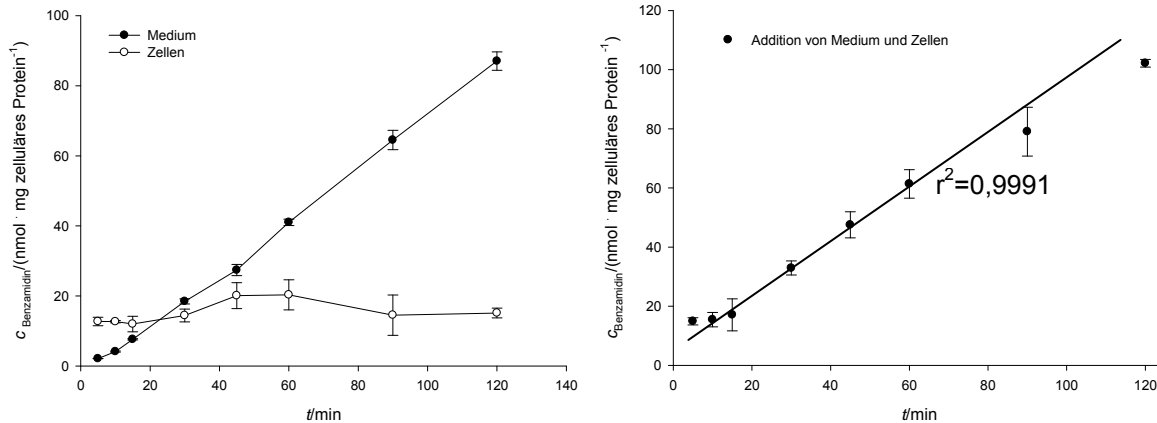
Zur genauen Charakterisierung der *N*-Reduktion wurde nach dem folgenden Ablauf vorgegangen:

1. Bestimmung des linearen Bereichs der Zeitabhängigkeit
2. Charakterisierung der *N*-reduktiven Aktivität anhand kinetischer Untersuchungen
3. Untersuchung der Temperaturabhängigkeit der Reduktion
4. Durchführung einer Effluxstudie.



### 3.4.1.1 Caco-2 Zellen

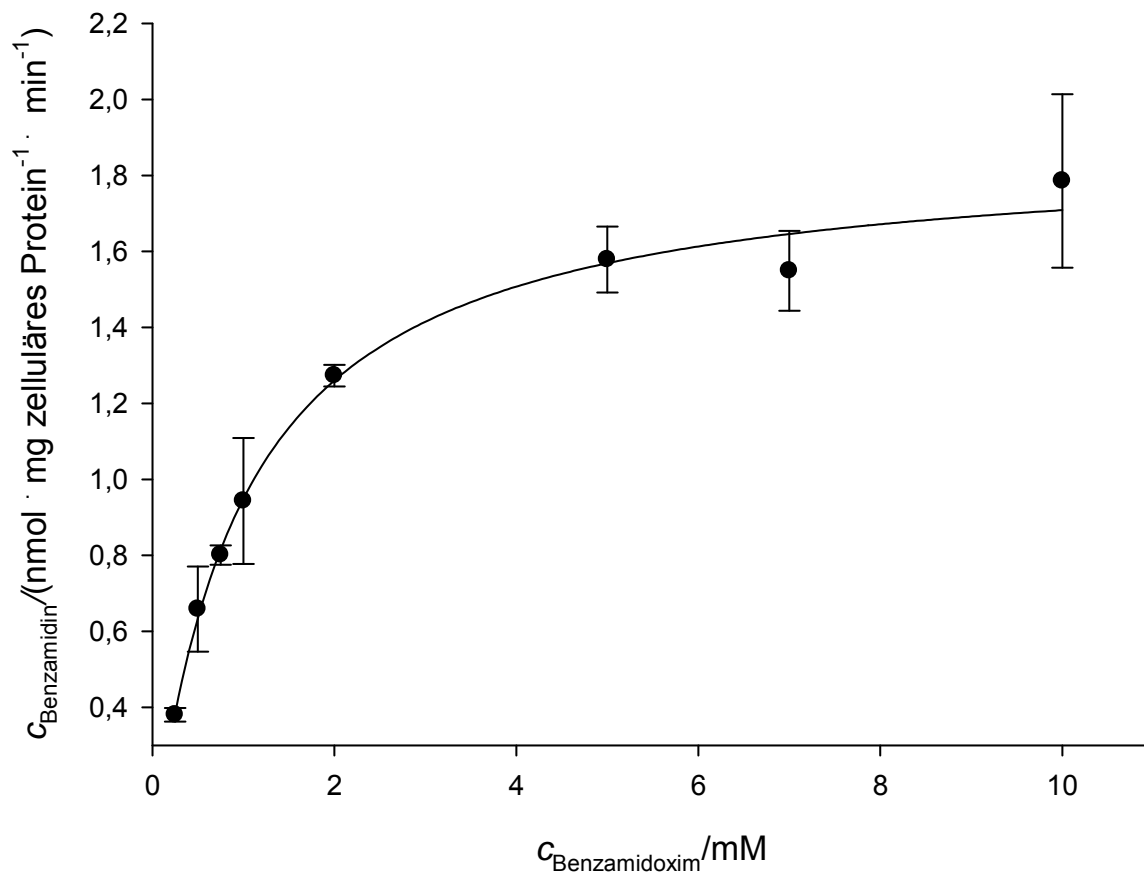
Zunächst wurde der lineare Umsetzungsbereich von Benzamidoxim zu Benzamidin ermittelt.



**Abbildung 3-11: Zeitabhängigkeit der Benzamidoximreduktion**

Die Zellen wurden mit einer 1 mM Benzamidoximlösung inkubiert. Die Durchführung ist in Kap. 2.3.1.8.2.1 beschrieben. Die Konzentrationen wurden mittels der in Kap. 3.3.11 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Konzentrationen sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus drei parallelen Inkubationen.

Benzamidoxim wurde wie in Abbildung 3-11 gezeigt, in den Caco-2 Zellen zu Benzamidin reduziert. Im Medium stieg die Benzamidinkonzentration linear über 120 min an. In den Zellen waren deutlich geringere Konzentrationen an Benzamidin als im Medium zu finden. Nach ca. 50 min war die Konzentration an Benzamidin in den Zellen am höchsten und fiel dann bis hin zu 120 min wieder auf das Anfangsniveau ab. Um Aussagen zur Benzamidoximreduktaseaktivität zu treffen, musste die gesamte im Inkubationsansatz entstandene Menge Benzamidin betrachtet werden. Die Addition der Benzamidinkonzentrationen in Medium und Zellen zeigte einen linearen Verlauf von 15 bis 60 min. Die im Folgenden bestimmten enzymkinetischen Parameter wurden zur Einhaltung des linearen Bereichs über 45 min inkubiert. Da für die Konzentrationsabhängigkeit ebenfalls die Summen an entstandenem Benzamidin aus Medium und Zellen betrachtet wurden, wurden für alle weiteren untersuchten Zelllinien und primären Gewebekulturen nur die Zeitabhängigkeiten als Summen gezeigt.



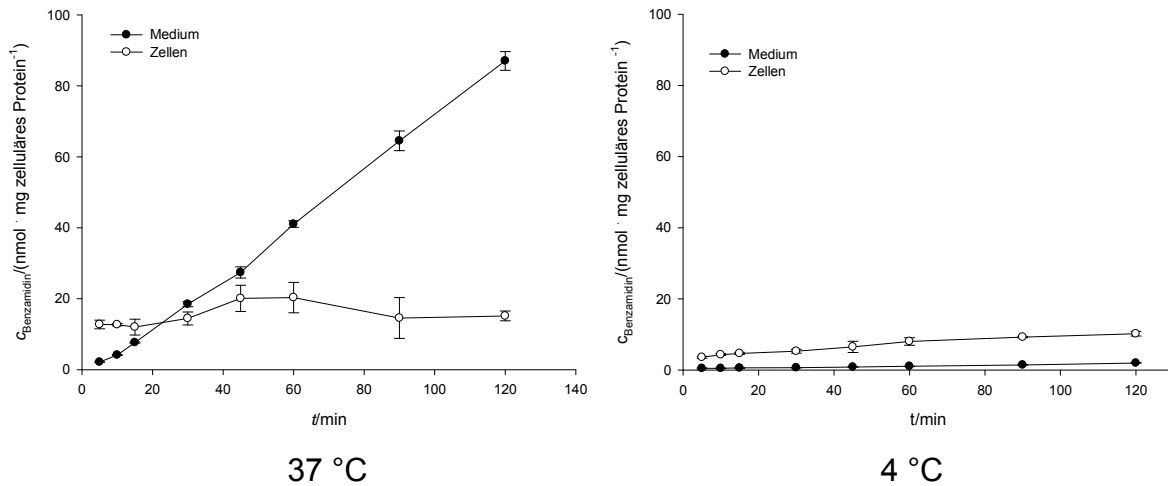
**Abbildung 3-12: Konzentrationsabhängigkeit der Benzamidoximreduktion in Caco-2 Zellen**

Die Zellen wurden über 45 min mit Benzamidoximlösung (0,25–10,0 mM) inkubiert. Die Durchführung ist in Kap. 2.3.1.8.2.1 beschrieben. Die Konzentrationen wurden mittels der in Kap. 3.3.11 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Konzentrationen sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen der Summen von analysierten Zellen und Medium aus drei parallelen Inkubationen.

Die Konzentrationsabhängigkeit (Abbildung 3-12) der Benzamidoximreduktion zum Benzamidin folgte der Michaelis-Menten-Kinetik. Folgenden Parameter wurden berechnet:

$$K_m = 0,98 \pm 0,083 \text{ mM und } V_{\text{max}} = 1,88 \pm 0,046 \text{ nmol} \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}.$$

Zur weiteren Charakterisierung der Reduktion und möglicher Transportprozesse in Caco-2 Zellen wurde eine vergleichende Zeitabhängigkeit bei 37 °C und bei 4 °C durchgeführt.

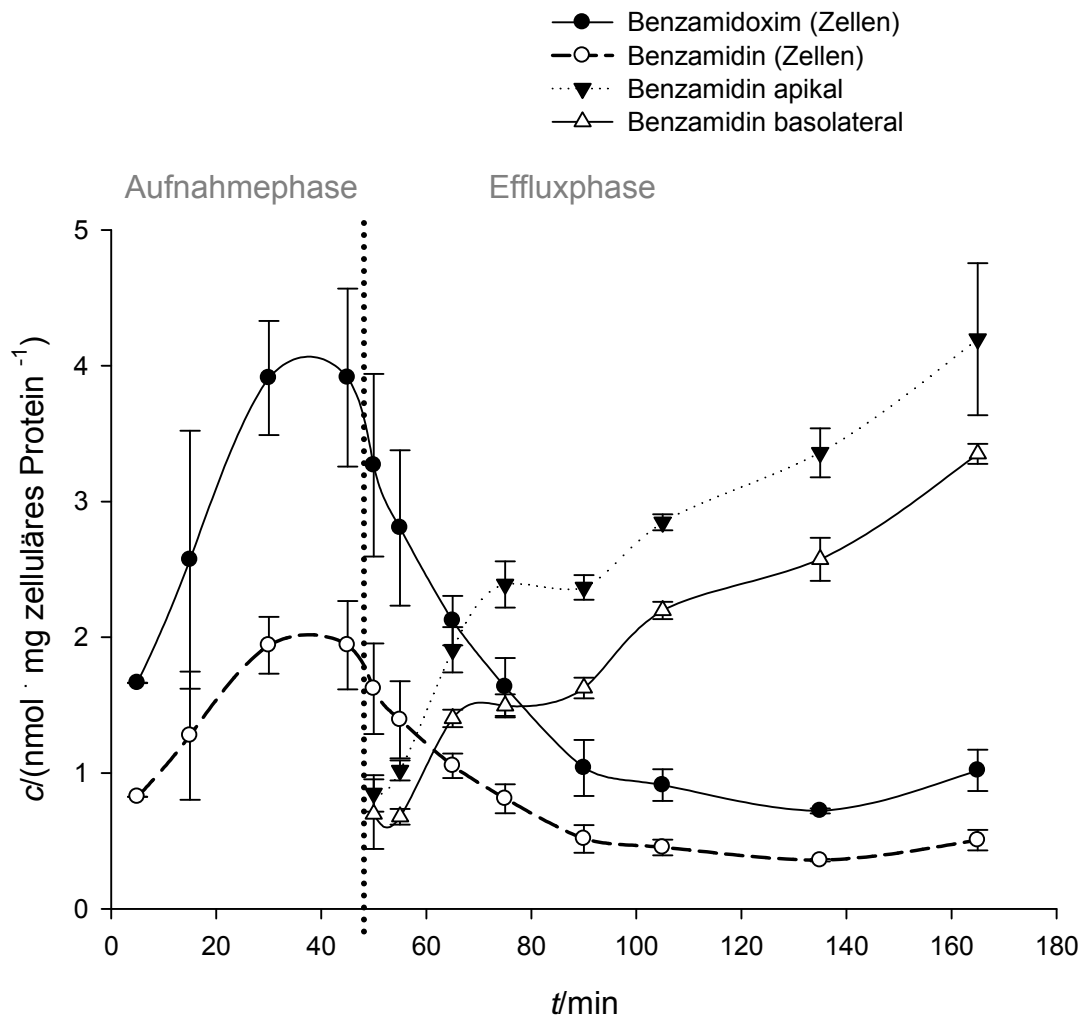


**Abbildung 3-13: Temperaturabhängigkeit der Benzamidoximreduktion**

Die Zellen wurden mit einer 1 mM Benzamidoximlösung inkubiert. Die Durchführung ist in Kap. 2.3.1.8.2.1 beschrieben. Die Konzentrationen wurden mittels der in Kap. 3.3.11 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Konzentrationen sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus drei parallelen Inkubationen.

In Abbildung 3-13 ist die temperaturabhängige Benzamidoximreduktion in Caco-2 Zellen gezeigt. Die Benzamidinkonzentration stieg bei 4 °C in Abhängigkeit von der Zeit in den untersuchten Kompartimenten Medium und Zellen linear über den untersuchten Zeitraum von 120 min an. Bei 37 °C veränderte sich die Konzentration des Metaboliten in den Zellen nach 45 min nicht mehr. Bei 37 °C waren im Medium ca. vierfach höhere Benzamidinkonzentrationen zu finden als in den Zellen, allerdings kehrten sich bei 4 °C die Verhältnisse um, so dass in den Zellen mehr Benzamidin gemessen wurde.

Des Weiteren wurde eine Effluxstudie durchgeführt.



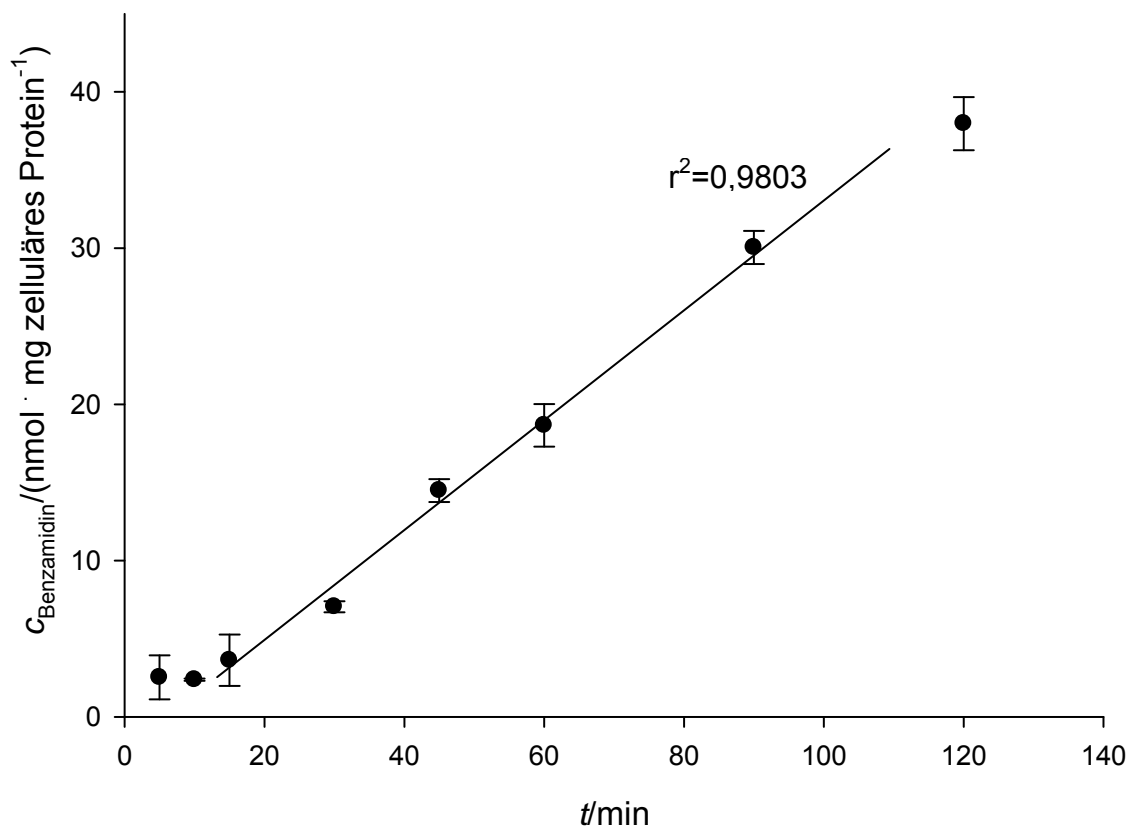
**Abbildung 3-14: Benzamidoximaufnahme und -efflux**

Die Zellen wurden mit einer 1 mM Benzamidoximlösung auf Transwellplatten über 45 min inkubiert, nach anschließendem Waschen wurde die Zellen in substanzfreiem Medium über weitere 120 min inkubiert. Die Durchführung ist in Kap. 2.3.1.8.2.2 beschrieben. Die Konzentrationen wurden mittels der in Kap. 3.3.11 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Konzentrationen sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus drei parallelen Inkubationen.

Benzamidoxim- und Benzamidinkonzentrationen stiegen während der Aufnahmephase in Benzamidoxim-haltigem Medium wie in Abbildung 3-14 gezeigt, in den Zellen während der ersten 40 min linear an. Nach dem Waschen und der nachfolgenden Inkubation in substratfreiem Medium, sanken die Benzamidoxim- und Benzamidinkonzentrationen intrazellulär ab. Im umliegenden Medium stiegen die Benzamidinkonzentrationen sowohl apikal als auch basolateral in einem zweiphasigen Verlauf an. Auf der apikalen Seite der Zellen waren jedoch höhere Konzentrationen an Benzamidin zu finden.

Die Caco-2 Zelllinie findet breite Anwendung für Transport- und Permeabilitätsstudien (Artursson, 1991). Die Transportvorgänge der Modellverbindung Benzamidoxim und dessen Metabolit das Benzamidin wurden im Rahmen dieser Arbeit genauer am Caco-2 Modell untersucht. Für die im Folgenden charakterisierten Zellkulturen (von untergeordneter Bedeutung für Transportstudien) wurde für die Effluxexperimente ein vereinfachter Versuchsaufbau gewählt und nur noch das Benzamidin quantitativ bestimmt.

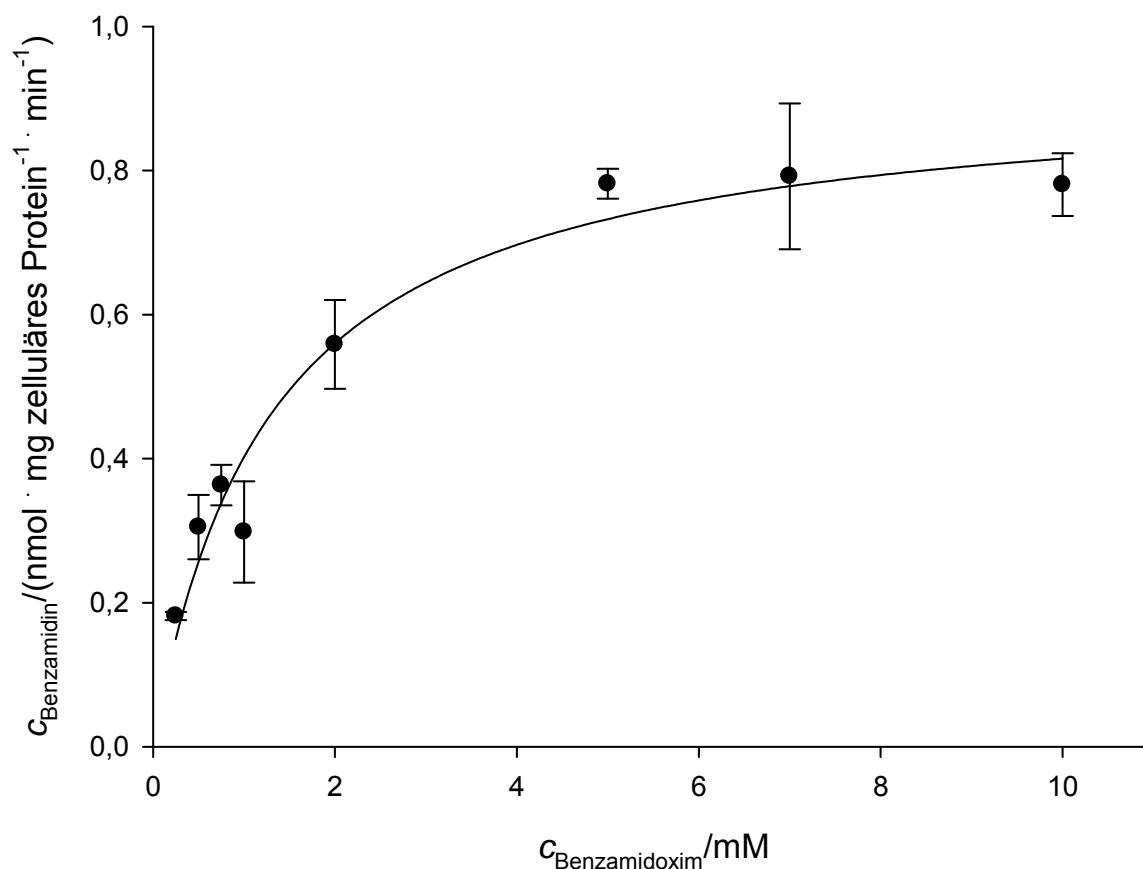
### 3.4.1.2 HEK-293 Zellen



**Abbildung 3-15: Zeitabhängigkeit der Benzamidoximreduktion**

Die Zellen wurden mit einer 1 mM Benzamidoximlösung inkubiert. Die Durchführung ist in Kap. 3.3.2 beschrieben. Die Konzentrationen wurden mittels der in Kap. 3.3.11 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Konzentrationen sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen der Summe aus drei parallelen Inkubationen.

Abbildung 3-15 verdeutlicht, dass die Benzamidinkonzentration im Inkubationsansatz von 10 bis 90 min linear anstieg. Somit wurden die kinetischen Parameter der Benzamidoximreduktion in HEK-293 Zellen auch bei 45 min Inkubationszeit bestimmt.



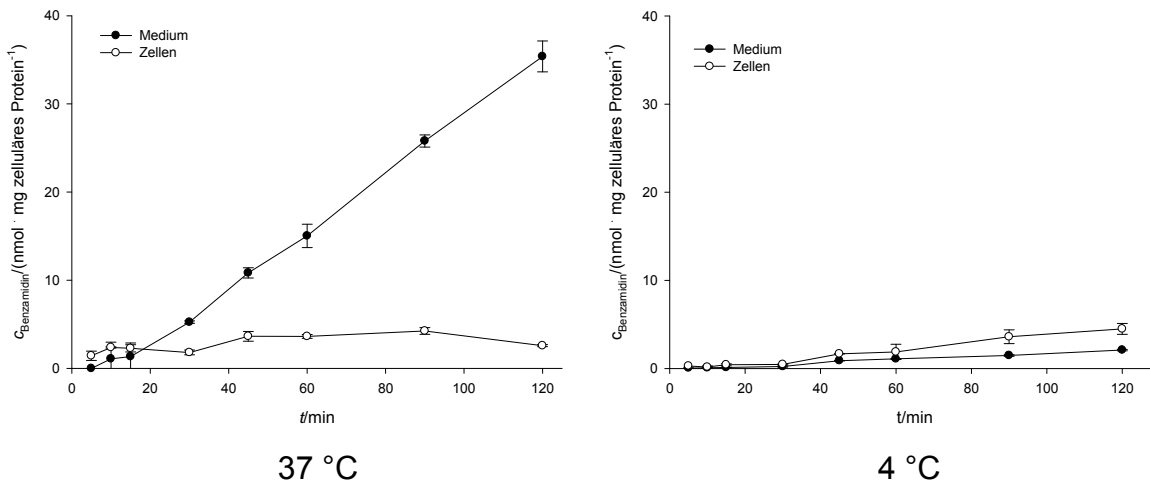
**Abbildung 3-16: Konzentrationsabhängigkeit der Benzamidoximreduktion in HEK-293 Zellen**

Die Zellen wurden über 45 min mit Benzamidoximlösungen (0,25–10,0 mM) inkubiert. Die Durchführung ist in Kap. 3.3.2 beschrieben. Die Konzentrationen wurden mittels der in Kap. 3.3.11 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Konzentrationen sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen der Summen von analysierten Zellen und Medium aus drei parallelen Inkubationen.

Die konzentrationsabhängige Untersuchung der Benzamidoximreduktion in HEK-293 Zellen (Abbildung 3-16) folgte der Michaelis-Menten-Kinetik. Es wurden die folgenden Parameter berechnet:

$$K_m = 1,29 \pm 0,25 \text{ mM und } V_{\text{max}} = 0,92 \pm 0,06 \text{ nmol} \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}.$$

Zur weiteren Charakterisierung der Reduktion und möglicher Transportprozesse in HEK-293 Zellen wurde eine vergleichende Zeitabhängigkeit bei 37 °C und bei 4 °C durchgeführt.

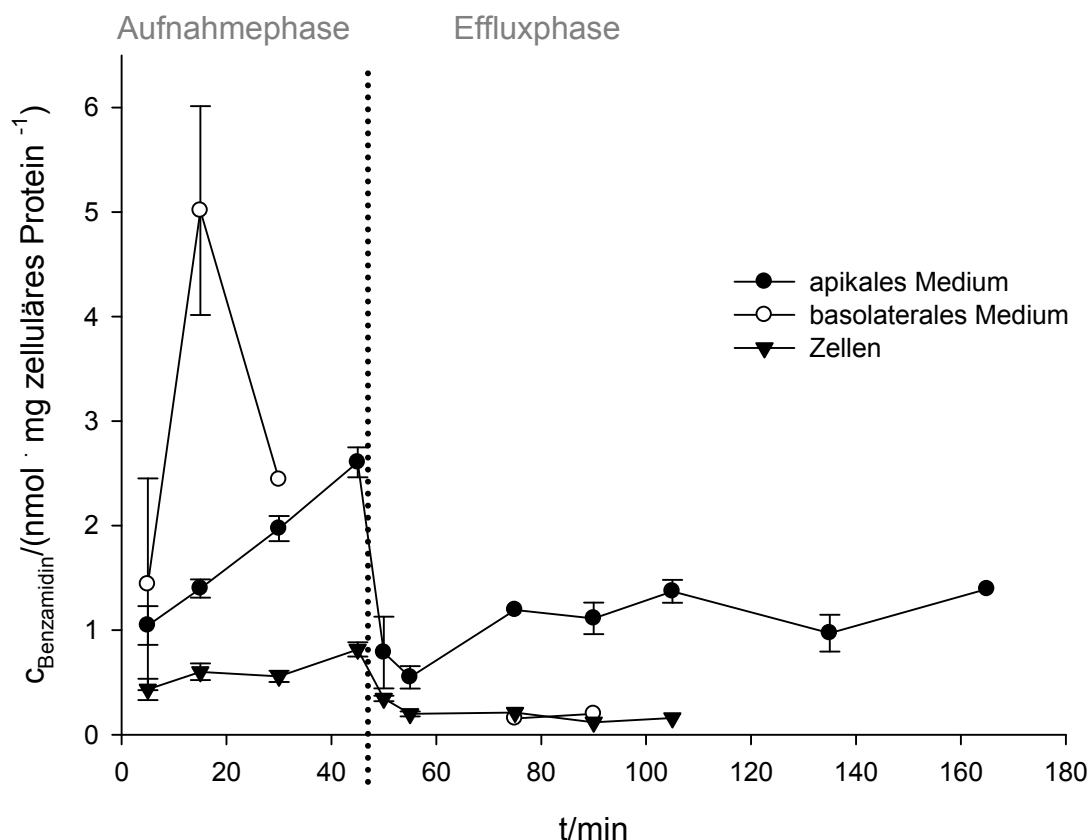


**Abbildung 3-17: Temperaturabhängigkeit der Benzamidoximreduktion**

Die Zellen wurden mit einer 1 mM Benzamidoximlösung inkubiert. Die Durchführung ist in Kap. 3.3.2 beschrieben. Die Konzentrationen wurden mittels der in Kap. 3.3.11 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Konzentrationen sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus drei parallelen Inkubationen.

Wie in Abbildung 3-17 gezeigt, folgten die Reduktionen des Benzamidoxims sowohl bei 37 °C als auch bei 4 °C einem linearen Verlauf sowohl in den Zellen als auch im umliegenden Medium. Bei 4 °C verlief die Reduktion in deutlich geringerem Ausmaß als bei 37 °C. Im Vergleich zu der Inkubation bei 37 °C wurden bei 4 °C intrazellulär höhere Konzentrationen an Benzamidin gemessen als im umliegenden Medium. Bei 37 °C hingegen lag mehr Benzamidin im Medium vor als in den Zellen.

Im Folgenden wurde eine Effluxstudie durchgeführt.



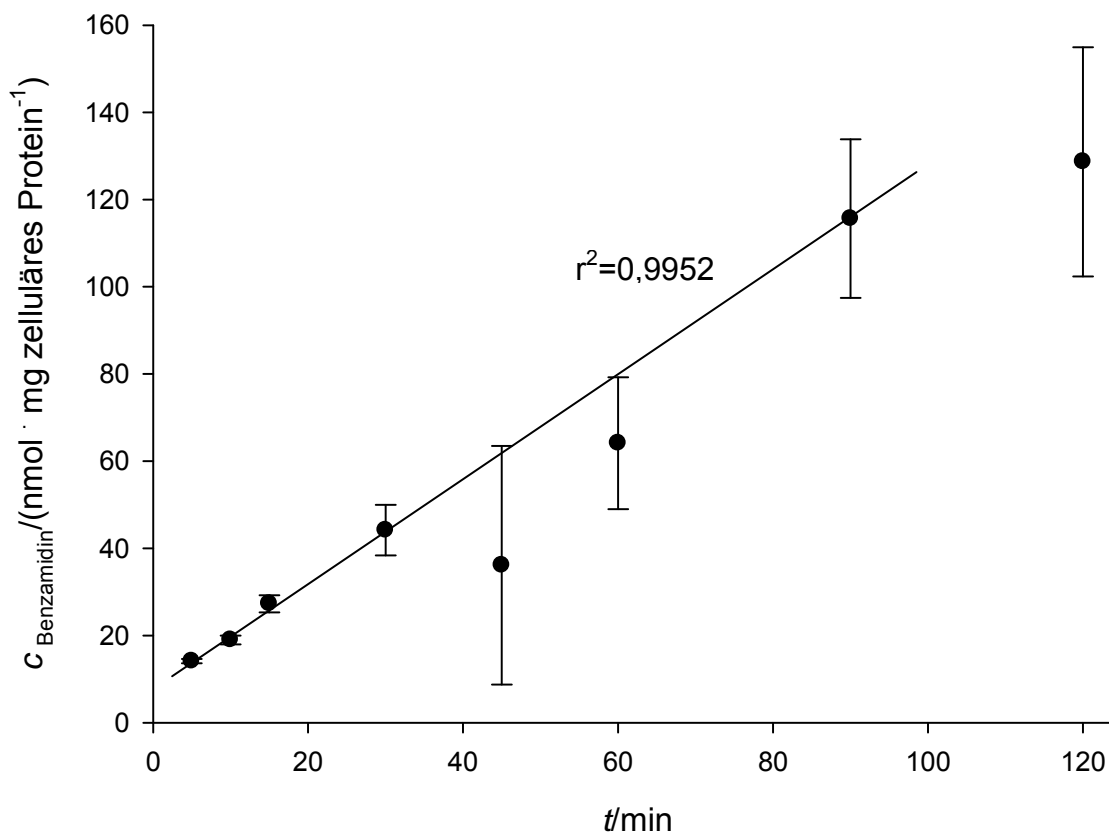
**Abbildung 3-18: Benzamidoximaufnahme und Benzamidinefflux**

Die Zellen wurden mit einer 1 mM Benzamidoximlösung inkubiert. Die Durchführung ist in Kap. 2.3.1.8.2.2 beschrieben. Die Konzentrationen wurden mittels der in Kap. 3.3.11 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Konzentrationen sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus drei parallelen Inkubationen.

Die Ergebnisse der Studien zur Benzamidoximaufnahme und zum Benzamidinefflux verdeutlichen in Abbildung 3-18, dass die Benzamidinkonzentration in den Zellen während der Aufnahmephase bis hin zu 45 min linear anstieg. Nach dem Waschen und der Inkubation in Benzamidoxim freiem Medium sank die Benzamidinmenge in den Zellen zunächst ab, blieb dann jedoch annähernd konstant. Im Medium wurden während der Aufnahmephase bis hin zu 45 min im basolateralen Kompartiment deutlich höhere Konzentrationen an Benzamidin gemessen als im apikalen Kompartiment. Nach dem Waschen waren die Benzamidinmengen im apikalen Kompartiment höher als im basolateralen. Apikal stiegen die Benzamidinmengen in einem zweiphasigen Verlauf an.



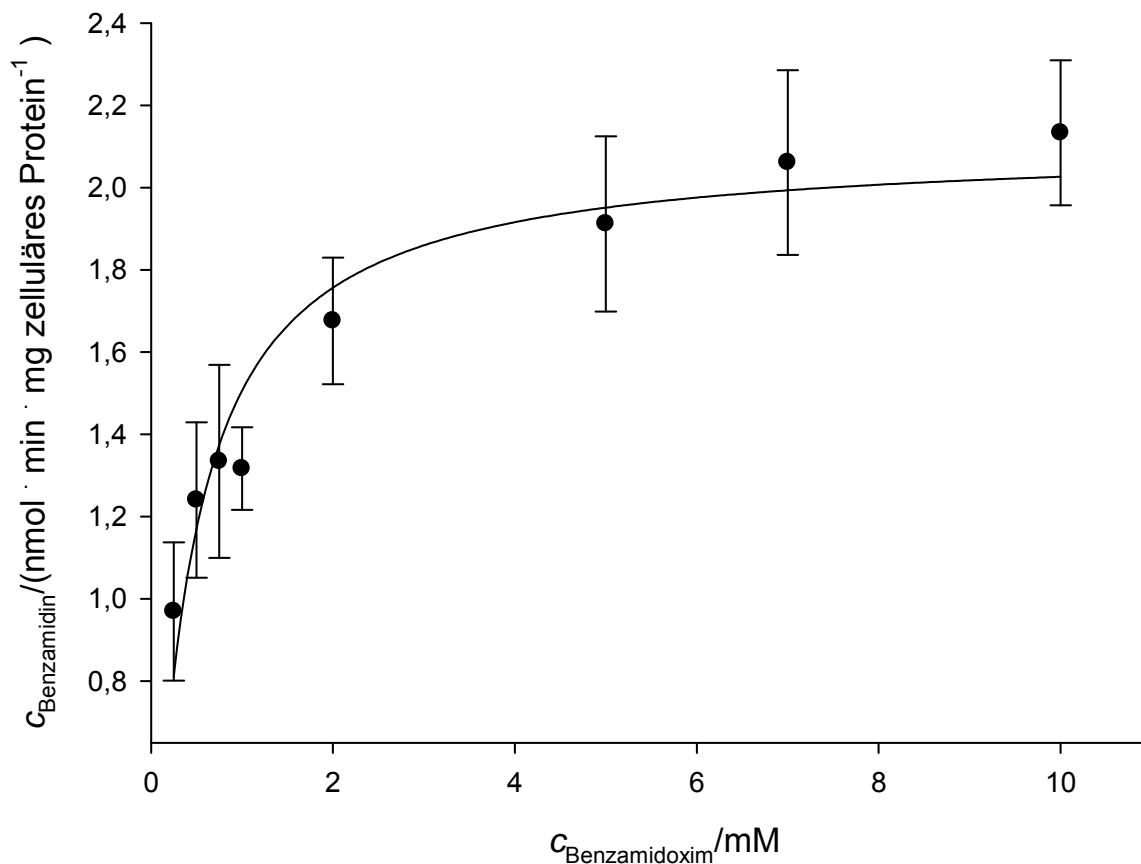
### 3.4.1.3 Porcine Hepatozyten



**Abbildung 3-19: Zeitabhängigkeit der Benzamidoximreduktion**

Die Zellen wurden mit einer 1 mM Benzamidoximlösung inkubiert. Die Durchführung ist in Kap. 3.3.7 beschrieben. Die Konzentrationen wurden mittels der in Kap. 3.3.11 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Konzentrationen sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen der Summe aus drei parallelen Inkubationen.

Abbildung 3-19 verdeutlicht, dass die Benzamidinkonzentration im Inkubationsansatz von 5 bis 30 min linear anstieg, vernachlässigt man die beiden Ausreißer bei 45 und 60 min, folgte die Umsetzung bis zu 90 min einem linearen Verlauf. Die im Folgenden durchgeführte Bestimmung der kinetischen Parameter der Benzamidoximreduktion wurde zur besseren Vergleichbarkeit mit den untersuchten Zelllinien ebenfalls über 45 min inkubiert.



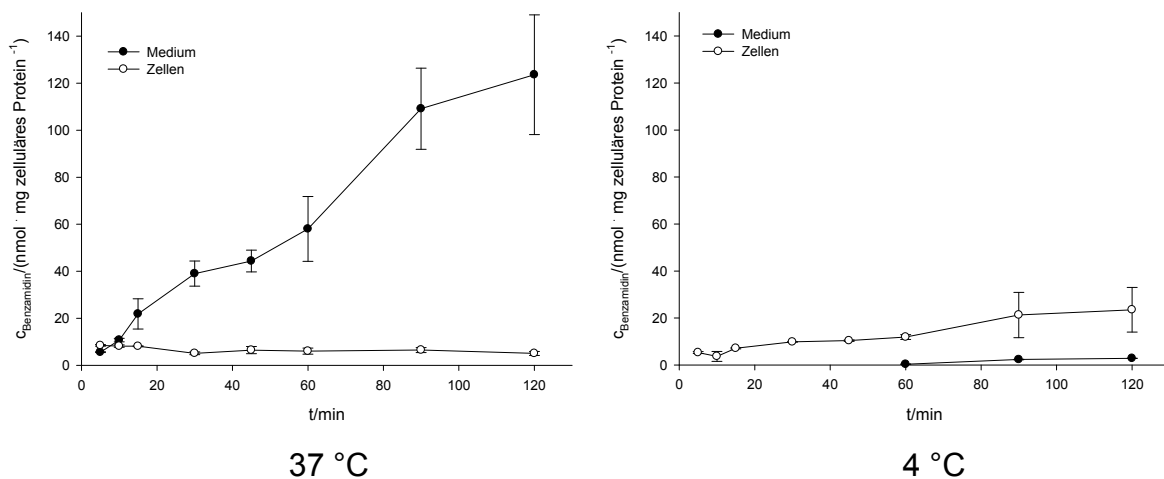
**Abbildung 3-20: Konzentrationsabhängigkeit der Benzamidoximreduktion in Hepatozyten**

Die Zellen wurden über 45 min mit Benzamidoximlösungen (0,25–10,0 mM) inkubiert. Die Durchführung ist in Kap. 3.3.7 beschrieben. Die Konzentrationen wurden mittels der in Kap. 3.3.11 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Konzentrationen sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen der Summen von analysierten Zellen und Medium aus drei parallelen Inkubationen.

Die Konzentrationsabhängigkeit der Benzamidoximreduktion zum Benzamidin folgte dem Verlauf der Michaelis-Menten-Kinetik (Abbildung 3-20). Es ließen sich die folgenden Parameter berechnen:

$$K_m = 0,4 \pm 0,07 \text{ mM und } V_{\text{max}} = 2,11 \pm 0,08 \text{ nmol} \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}.$$

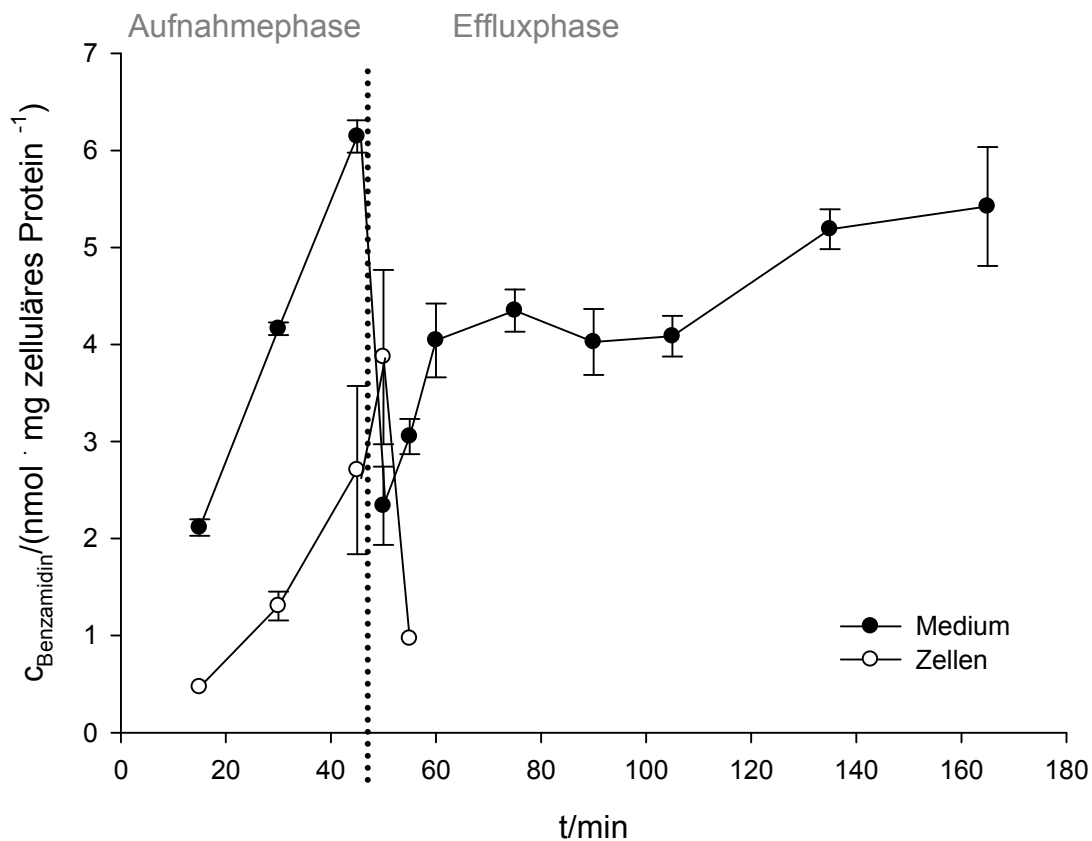
Zur weiteren Charakterisierung der Reduktion in Hepatozyten wurde eine vergleichende Zeitabhängigkeit bei 37 °C und bei 4 °C durchgeführt.



**Abbildung 3-21: Temperaturabhängigkeit der Benzamidoximreduktion**

Die Zellen wurden mit einer 1 mM Benzamidoximlösung inkubiert. Die Durchführung ist in Kap. 3.3.7 beschrieben. Die Konzentrationen wurden mittels der in Kap. 3.3.11 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Konzentrationen sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus drei parallelen Inkubationen.

Die temperaturabhängige Benzamidoximreduktion in Abbildung 3-21 zeigte, dass bei 4 °C das Benzamidoxim deutlich langsamer zum Benzamidin metabolisiert wurde. Die Benzamidinkonzentration stieg bei beiden Temperaturen in den Zellen und im Medium linear bis zu 120 min an. Im Vergleich zu der Inkubation bei 37 °C wurden bei 4 °C intrazellulär deutlich höhere Konzentrationen an Benzamidin gemessen. Im umliegenden Medium hingegen lag bei 37 °C mehr Benzamidin im Medium vor als in den Zellen. Bei 4 °C kehrten sich die Verhältnisse um, im Medium war das Benzamidin erst nach 60 min Inkubationszeit zu detektieren und auch nur in sehr geringen Mengen, die deutlich unter den bei 37 °C detektierten lagen. In den Hepatocytten wurde bei 4 °C dagegen deutlich höher konzentriertes und über den gesamten Inkubationsraum angereichertes Benzamidin gemessen.

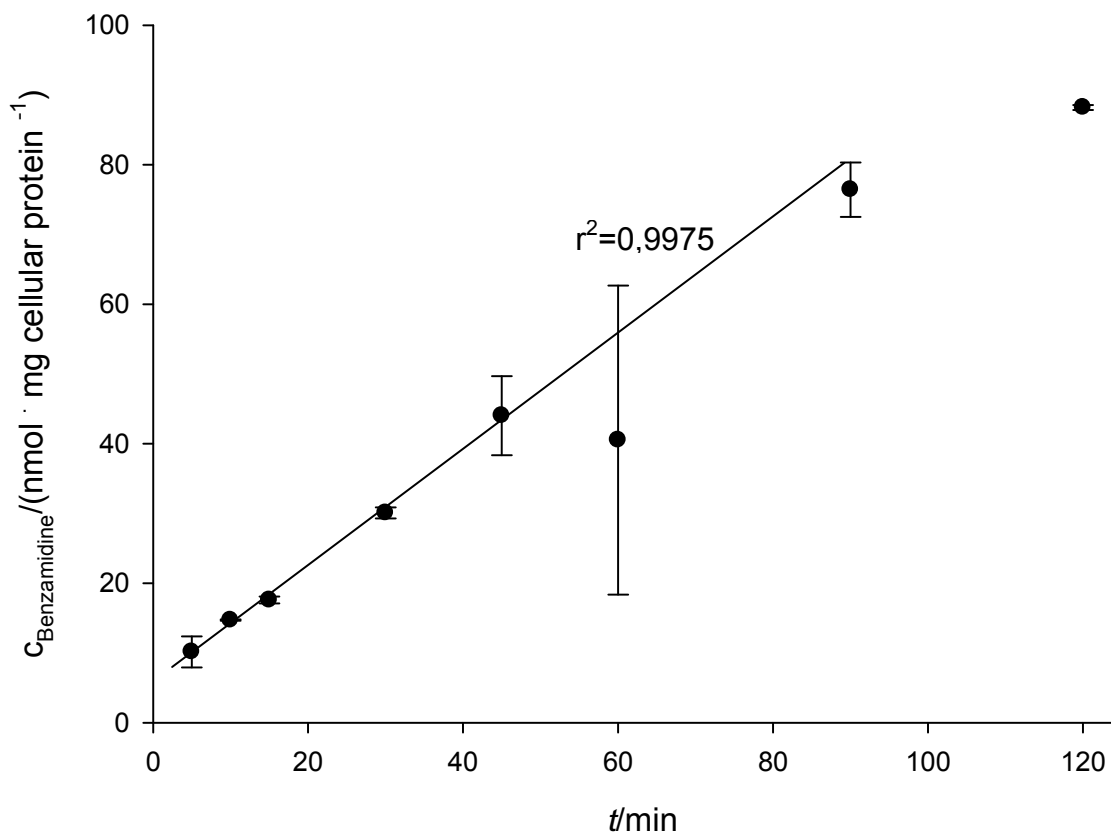


**Abbildung 3-22: Benzamidoximaufnahme und Benzamidinefflux**

Die Zellen wurden mit einer 1 mM Benzamidoximlösung inkubiert. Die Durchführung ist in Kap. 2.3.1.8.2.2 beschrieben. Die Konzentrationen wurden mittels der in Kap. 3.3.11 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Konzentrationen sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus drei parallelen Inkubationen.

Abbildung 3-22 zeigt die in porcinen Hepatozyten durchgeführte vereinfachte Effluxstudie. Während der Aufnahmephase entstand in den Zellen Benzamidin, das in das Medium sezerniert wurde. Nach dem Waschen und der Inkubation in Substanz freiem Medium sank die Konzentration an intrazellulär vorhandenem Benzamidin rasch ab. Im Medium stieg die Benzamidinkonzentration über die weiteren 120 min Inkubationszeit an, wobei auch in den Hepatozyten ein biphasischer Verlauf des Benzamidinanstiegs im Medium zu erkennen war.

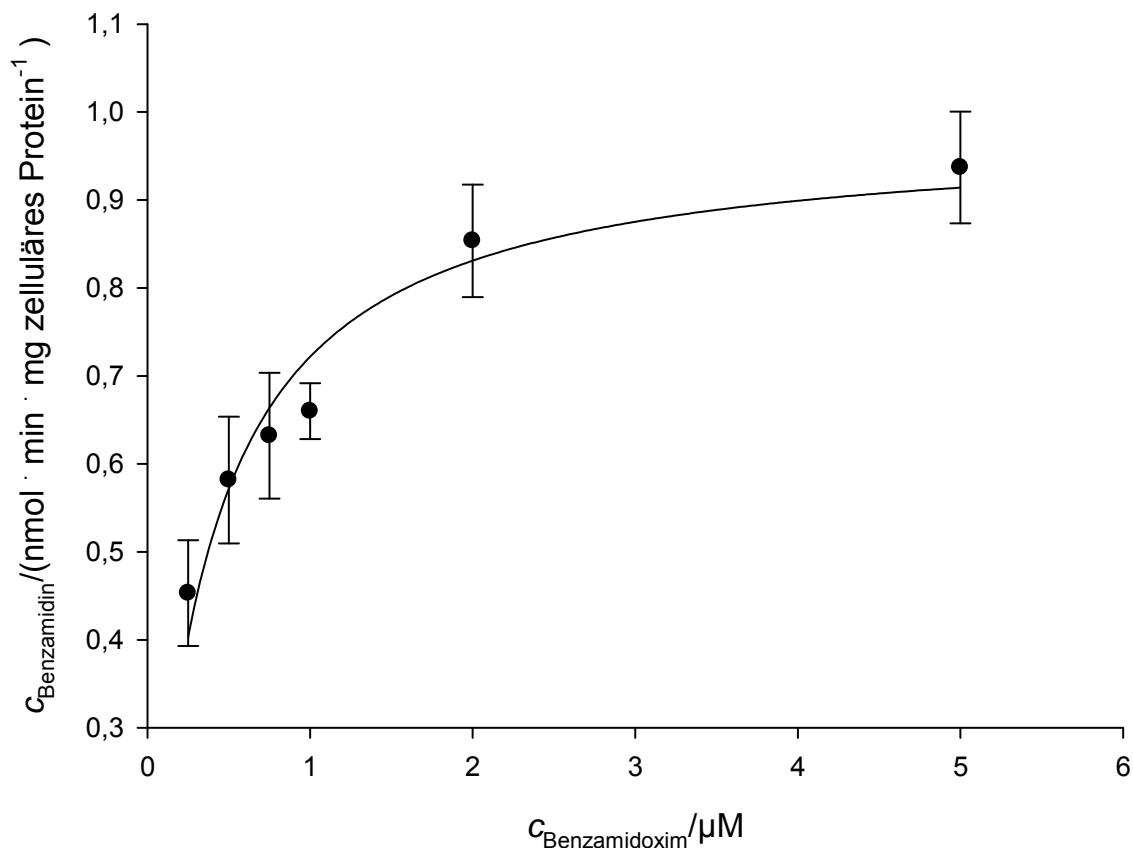
### 3.4.1.4 Porcine Schilddrüsenfollikel



**Abbildung 3-23: Zeitabhängigkeit der Benzamidoximreduktion**

Die Zellen wurden mit einer 1 mM Benzamidoximlösung inkubiert. Die Durchführung ist in Kap. 3.3.4 beschrieben. Die Konzentrationen wurden mittels der in Kap. 3.3.11 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Konzentrationen sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus drei parallelen Inkubationen.

Abbildung 3-23 verdeutlicht, dass die Benzamidinkonzentration im Inkubationsansatz von 10 bis 45 min linear anstieg. Somit wurden die kinetischen Parameter der Benzamidoximreduktion in porcinen Schilddrüsenfollikeln bei 45 min Inkubationszeit bestimmt.



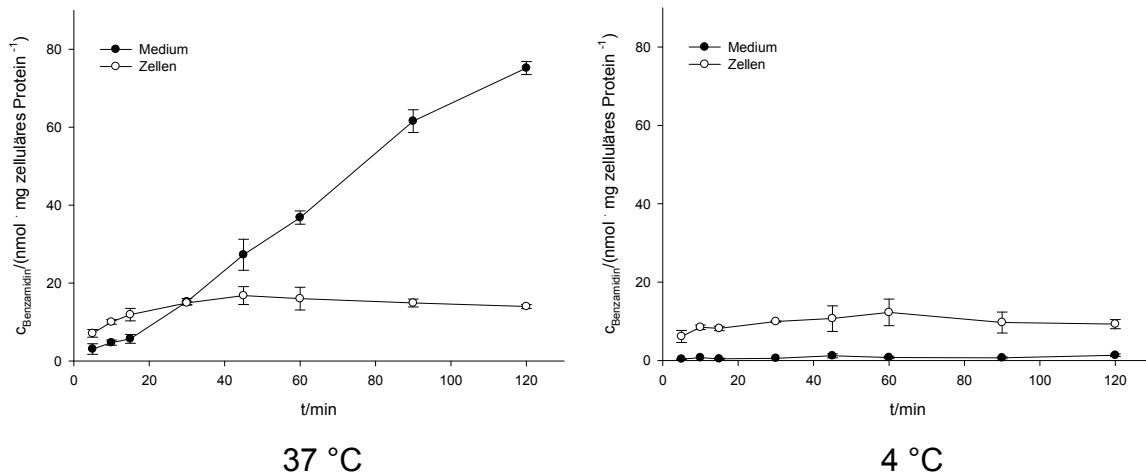
**Abbildung 3-24: Konzentrationsabhängigkeit der Benzamidoximreduktion in porcinen Schilddrüsenzellen**

Die Zellen wurden über 45 min mit Benzamidoximlösungen (0,25–10,0 mM) inkubiert. Die Durchführung ist in Kap. 3.3.4 beschrieben. Die Konzentrationen wurden mittels der in Kap. 3.3.11 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Konzentrationen sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen der Summen von analysierten Zellen und Medium aus drei parallelen Inkubationen.

Auch in den porcinen Schilddrüsenfollikeln folgte die konzentrationsabhängige Entstehung von Benzamidin (Abbildung 3-24) der Michaelis-Menten-Kinetik. Es wurden die folgenden Parameter berechnet:

$$K_m = 0,35 \pm 0,06 \text{ mM und } V_{\text{max}} = 0,97 \pm 0,04 \text{ nmol} \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}.$$

Zur weiteren Charakterisierung der Reduktion und möglicher Transportprozesse in den porcinen Schilddrüsenfollikeln wurde eine vergleichende Zeitabhängigkeit bei 37 °C und bei 4 °C durchgeführt



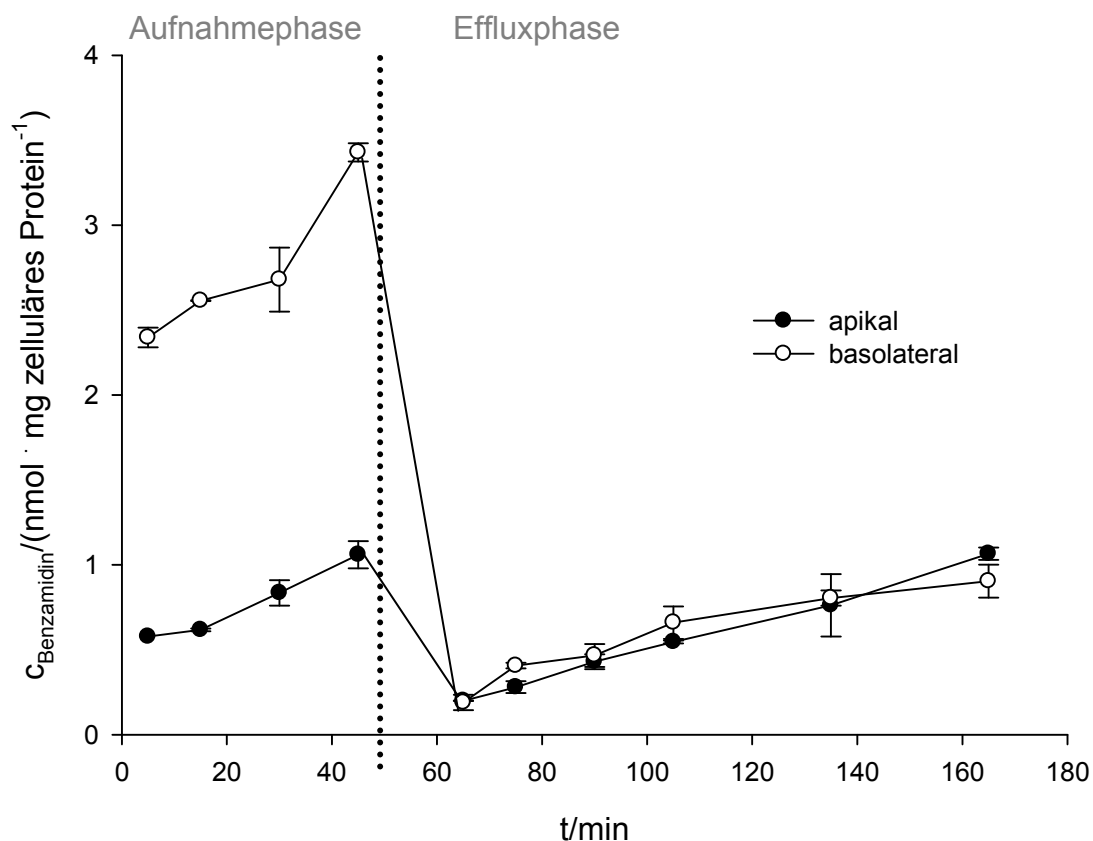
**Abbildung 3-25: Temperaturabhängigkeit der Benzamidoximreduktion**

Die Zellen wurden mit einer 1 mM Benzamidoximlösung inkubiert. Die Durchführung ist in Kap. 3.3.4 beschrieben. Die Konzentrationen wurden mittels der in Kap. 3.3.11 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Konzentrationen sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus drei parallelen Inkubationen.

In Abbildung 3-25 ist die temperaturabhängige Benzamidoximreduktion von porcinen Schilddrüsenfollikeln gezeigt. Die Benzamidinmenge im Medium stieg bei 37 °C linear über den gesamten Inkubationszeitraum an. In den Zellen war die Benzamidinanreicherung bis zu 45 min linear und blieb dann konstant bis hin zu 120 min. Bei 37 °C wurde im Medium deutlich mehr Benzamidin gefunden als in den Zellen. Bei 4 °C entstand deutlich weniger Benzamidin als bei 37 °C, wobei die Entstehung bis zu 60 min in Medium und Zellen einem linearen Verlauf folgte und anschließend in den Zellen sank und im Medium konstant blieb.

Bei 4 °C kehrten sich im Vergleich zu 37 °C die Verhältnisse um, in den Zellen wurden ca. fünffach höhere Konzentrationen an Benzamidin gemessen im Vergleich zum umliegenden Medium.

Im Folgenden wurde eine Effluxstudie durchgeführt.



**Abbildung 3-26: Benzamidoximaufnahme und Benzamidinefflux**

Die Zellen wurden mit einer 1 mM Benzamidoximlösung inkubiert. Die Durchführung ist in Kap. 2.3.1.8.2.2 beschrieben. Die Konzentrationen wurden mittels der in Kap. 3.3.11 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Konzentrationen sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus drei parallelen Inkubationen.

Während der Aufnahmephase wurde Benzamidin sowohl apikal als auch basolateral von den porcinen Schilddrüsenfollikeln in das Medium abgegeben (Abbildung 3-26). Die Konzentrationen auf der basolateralen Seite waren deutlich höher als auf der apikalen Zellseite. Nach dem Waschen und während der Inkubation in Benzamidoxim freiem Medium stiegen die Konzentrationen an Benzamidin sowohl apikal als auch basolateral linear an und die Mengen befanden sich in sehr ähnlichen Konzentrationsbereichen.

Im Folgenden wurde die konzentrationsabhängige Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin von verschiedenen humanen und murinen Schilddrüsenzelllinien untersucht.



### 3.4.2 Studien mit Schilddrüsenzelllinien

Die verschiedenen Zelllinien wurden alle mit und ohne TSH-Stimulation angezüchtet. Die konzentrationsabhängige Reduktion des Benzamidoxims zum Benzamidin folgte in allen untersuchten Zelllinien ohne TSH-Stimulation dem Verlauf der Michaelis-Menten-Kinetik (Abbildung 3-27). Die folgende Tabelle zeigt die berechneten Parameter.

	$K_m$	$V_{max}$
PCCL3	$1,66 \pm 0,57$	$0,27 \pm 0,03$
FRTL5	$1,93 \pm 0,90$	$0,35 \pm 0,06$
FTC133	$1,35 \pm 0,73$	$0,11 \pm 0,02$

**Tabelle 3-1: Michaelis-Menten-Parameter der Benzamidoximreduktion in verschiedenen Schilddrüsenzelllinien**

$K_m$  in mM und  $V_{max}$  in  $\text{nmol} \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$   
TSH: Thyreoidea-stimulierendes Hormon

Die kinetischen Parameter der Benzamidoximreduktion der Zellen, die ohne TSH-Stimulation gezüchtet worden sind, folgten nicht der Michaelis-Menten-Kinetik. Für einen Vergleich der Ergebnisse wurden die Umsetzungsraten im substratgesättigten Konzentrationsbereich der Zellen mit und ohne TSH-Stimulation betrachtet.

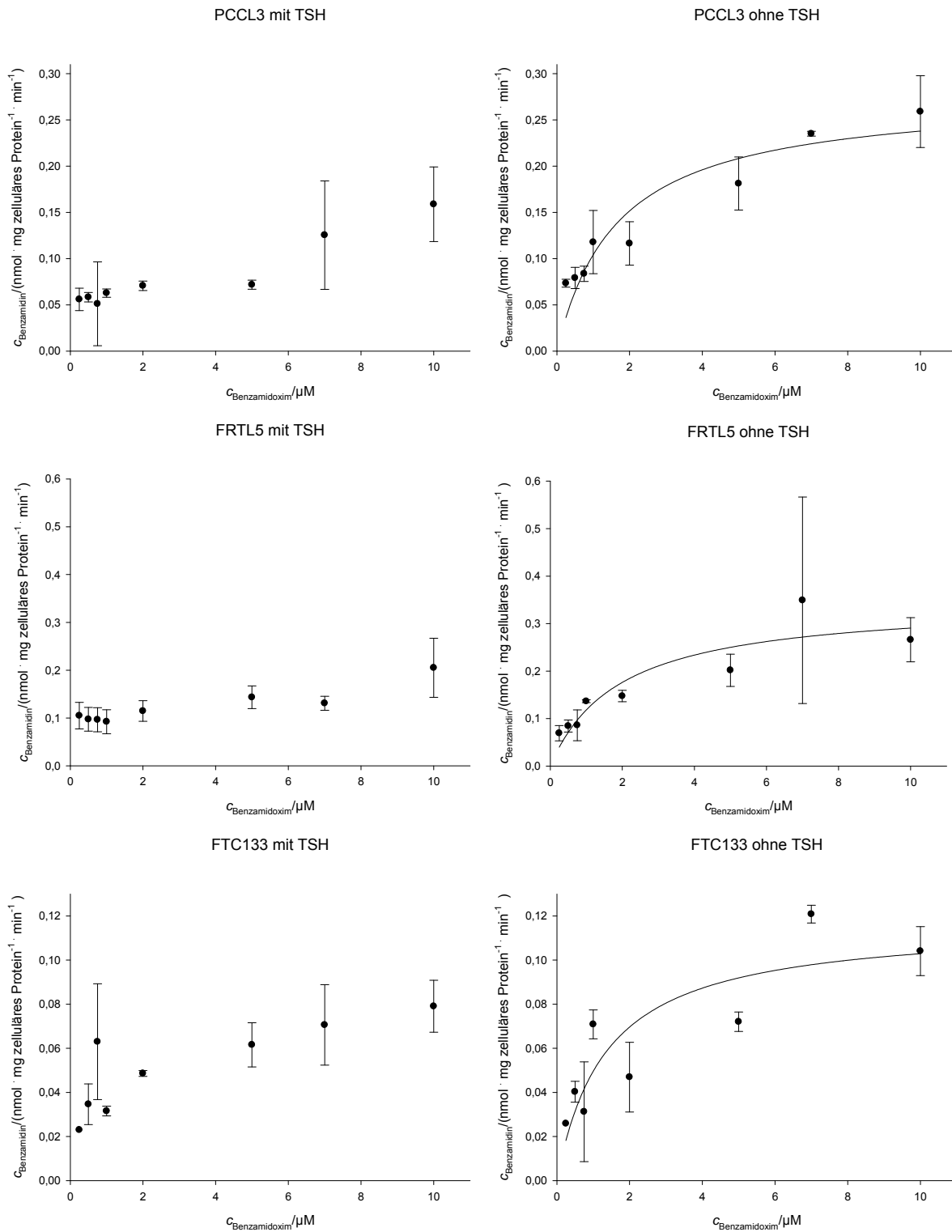
	mit TSH	ohne TSH
PCCL3	$0,13 \pm 0,06$	$0,24 \pm 0,01$
FRTL5	$0,13 \pm 0,01$	$0,35 \pm 0,22$
FTC133	$0,07 \pm 0,01$	$0,12 \pm 0,01$

**Tabelle 3-2: Umsetzungsraten der Benzamidoximreduktion in verschiedenen Schilddrüsenzelllinien**

Benzamidinkonzentrationen in  $\text{nmol} \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  bei 7 mM eingesetztem Benzamidoxim

Ohne die vorherige TSH-Stimulation der Zellen während der Anzucht konnten um den Faktor zwei bis drei erhöhte Benzamidinkonzentrationen im Vergleich zur TSH-Stimulation der Zellen bestimmt werden. Die höchste Steigerung wurde bei der Rattenzelllinie FRTL 5 beobachtet.

### 3.4 Ergebnisse

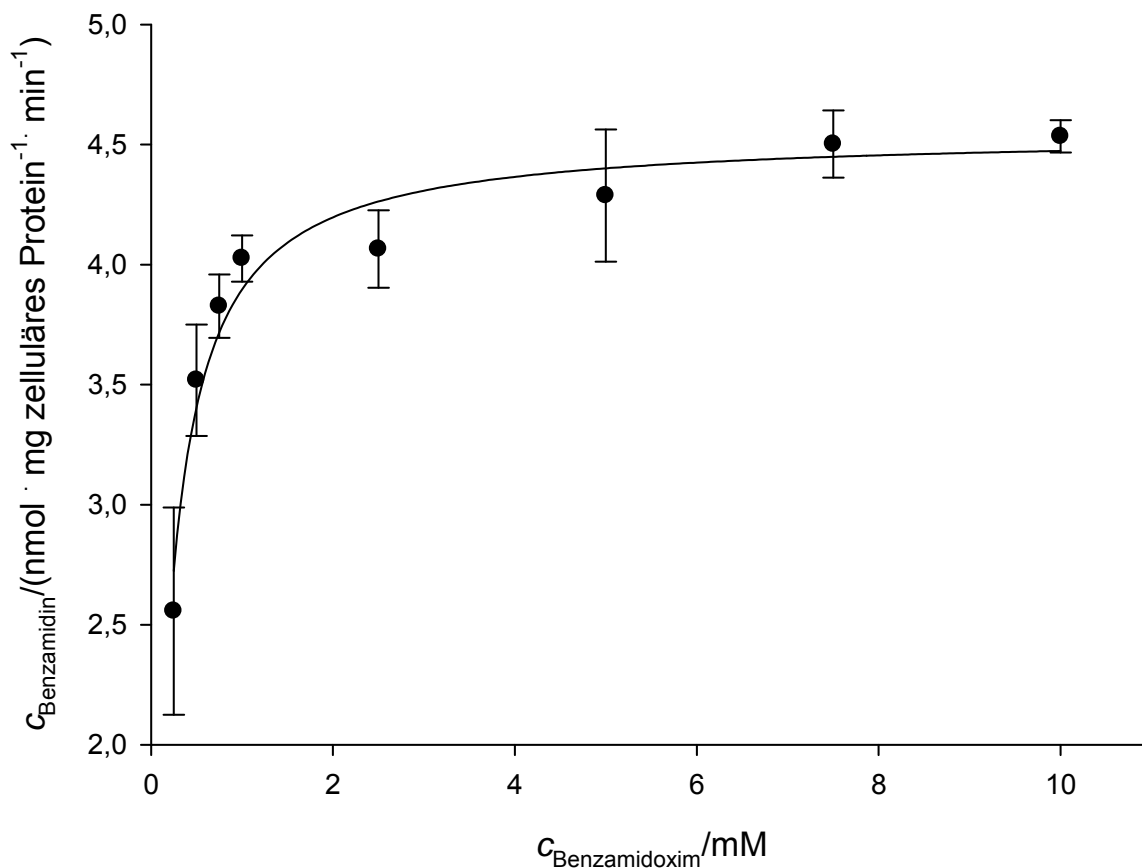


**Abbildung 3-27: Konzentrationsabhängigkeit der Benzamidoximreduktion**

Die Zellen wurden über 45 min mit Benzamidoximlösungen (0,25–10,0 mM) inkubiert. Die Durchführung ist in Kap. 3.3.5 beschrieben. Die Konzentrationen wurden mittels der in Kap. 3.3.11 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Konzentrationen sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen der Summen von analysierten Zellen und Medium aus drei parallelen Inkubationen.

### 3.4.3 Studien mit humanen Blutzellen

Humanes Blut ist entnommen und im Dichtegradienten zentrifugiert worden. Die so erhaltenen Blutzellfraktionen wurden dann separat untersucht und die enzymkinetischen Parameter der Benzamidoximreduktion wurden bestimmt.



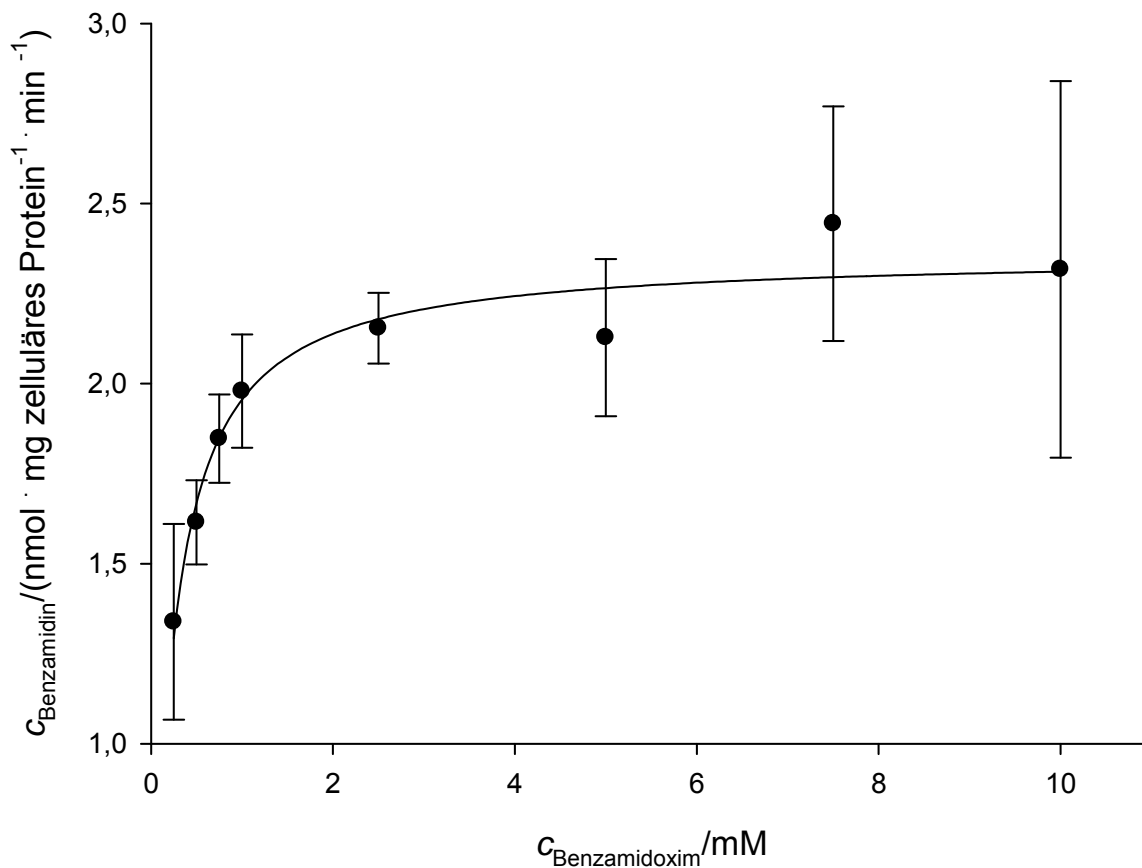
**Abbildung 3-28: Konzentrationsabhängigkeit der Benzamidoximreduktion in Polymorphkernigen Neutrophilen Granulozyten**

Die Zellen wurden über 45 min mit Benzamidoximlösungen (0,25–10,0 mM) inkubiert. Die Durchführung ist in Kap. 3.3.10 beschrieben. Die Konzentrationen wurden mittels der in Kap. 3.3.11 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Konzentrationen sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus drei parallelen Inkubationen.

In den Polymorphkernigen Neutrophilen Granulozyten (PMN) folgte die konzentrationsabhängige Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin der Michaelis-Menten-Kinetik.

Die folgenden Parameter wurden berechnet:

$K_m = 0,17 \pm 0,02 \text{ mM}$  und  $V_{\text{max}} = 4,5 \pm 0,08 \text{ nmol} \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ .



**Abbildung 3-29: Konzentrationsabhängigkeit der Benzamidoximreduktion in Erythrozyten**

Die Zellen wurden über 45 min mit Benzamidoximlösungen (0,25–10,0 mM) inkubiert. Die Durchführung ist in Kap. 3.3.10 beschrieben. Die Konzentrationen wurden mittels der in Kap. 3.3.11 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Konzentrationen sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus drei parallelen Inkubationen.

In den Erythrozyten folgte die konzentrationsabhängige Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin der Michaelis-Menten-Kinetik.

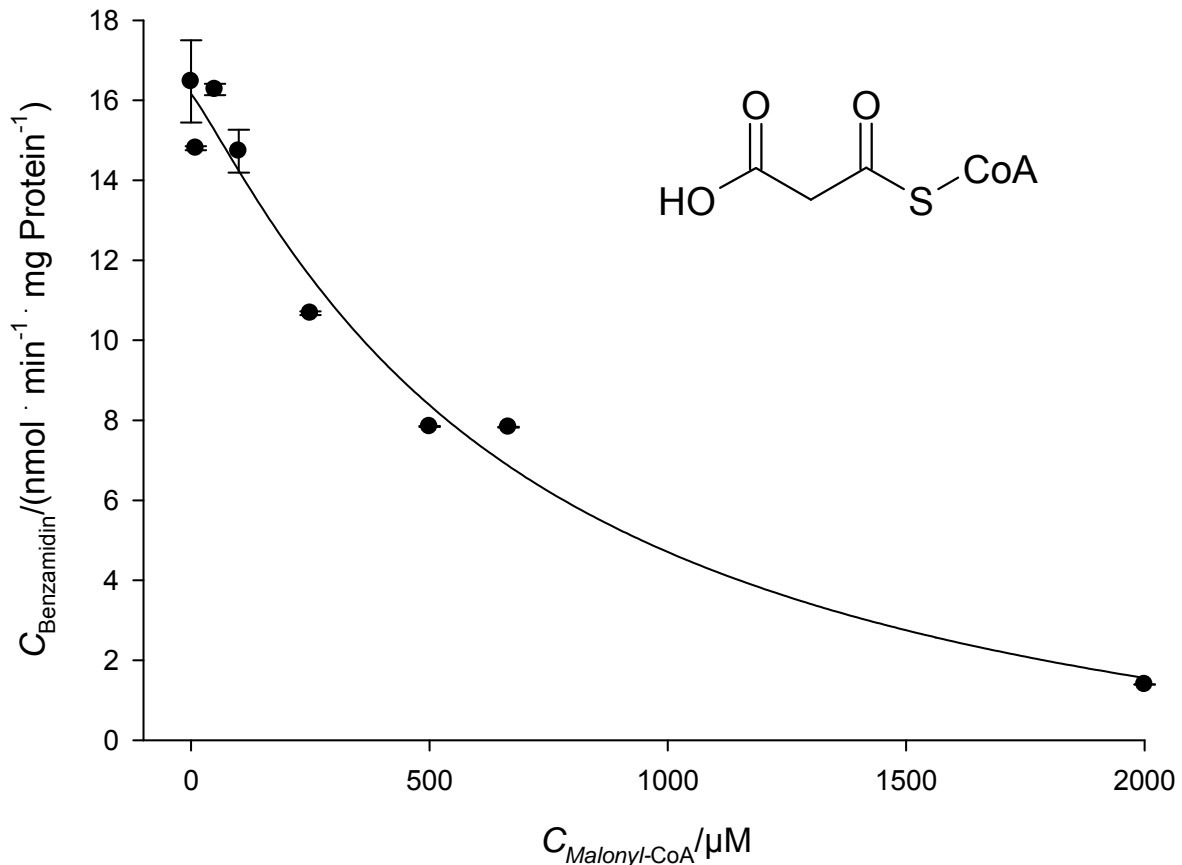
Die folgenden Parameter wurden berechnet:

$$K_m = 0,21 \pm 0,02 \text{ mM und } V_{\text{max}} = 2,35 \pm 0,05 \text{ nmol} \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}.$$

Die Monozyten wurden ebenfalls mehrfach konzentrationsabhängig untersucht, es war jedoch bei keinem der unabhängig voneinander durchgeführten Experimente Benzamidin zu detektieren.

### 3.4.4 Inhibitionsstudien der Benzamidoximreduktion

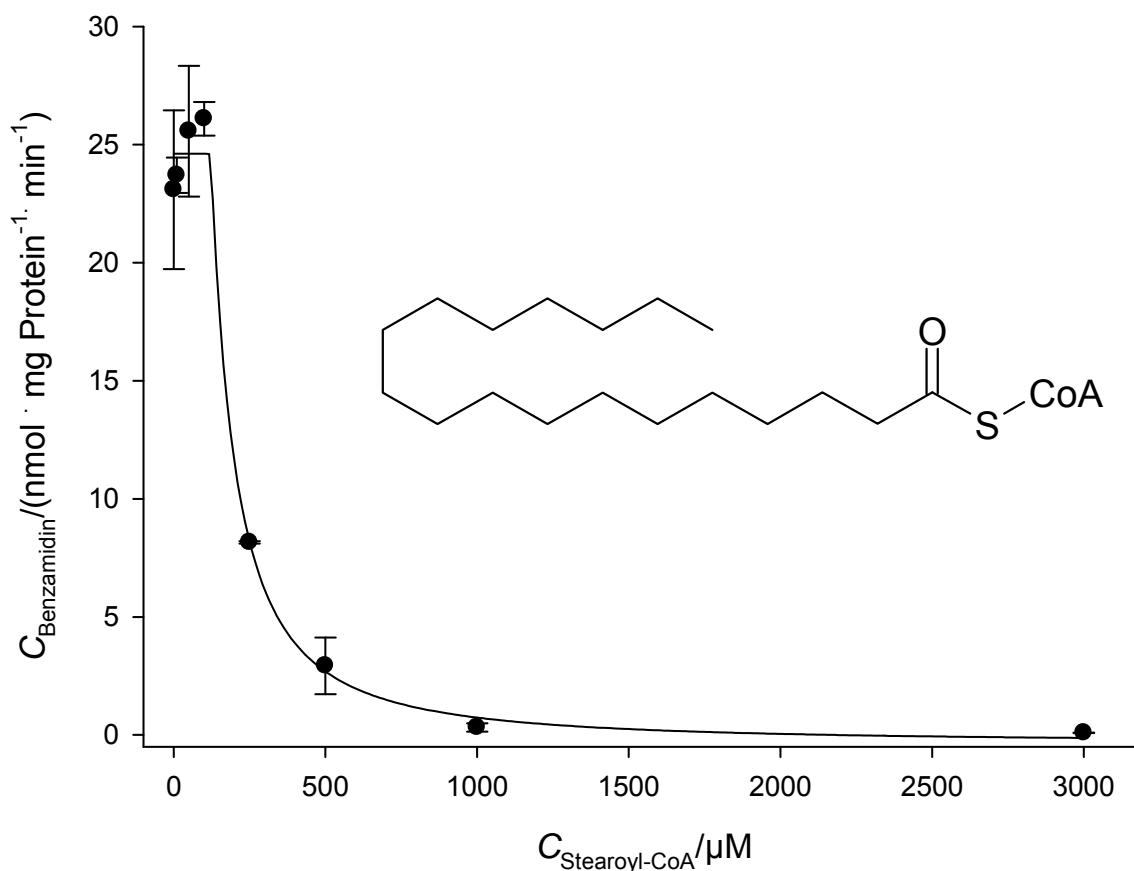
Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Benzamidoximreduktion mit porcinen Lebermitochondrien in Anwesenheit verschiedener Fettsäure-CoAs untersucht.



**Abbildung 3-30: Inhibition der Benzamidoximreduktion durch Malonyl-CoA**

Es wurde für 20 min mit einer 1 mM Benzamidoximlösung und Malonyl-CoA (0,1–3,0 mM) inkubiert. Die Durchführung ist in Kap. 3.3.14 beschrieben. Die Konzentrationen wurden mittels der in Kap. 3.3.15 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Konzentrationen sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus vier parallelen Inkubationen.

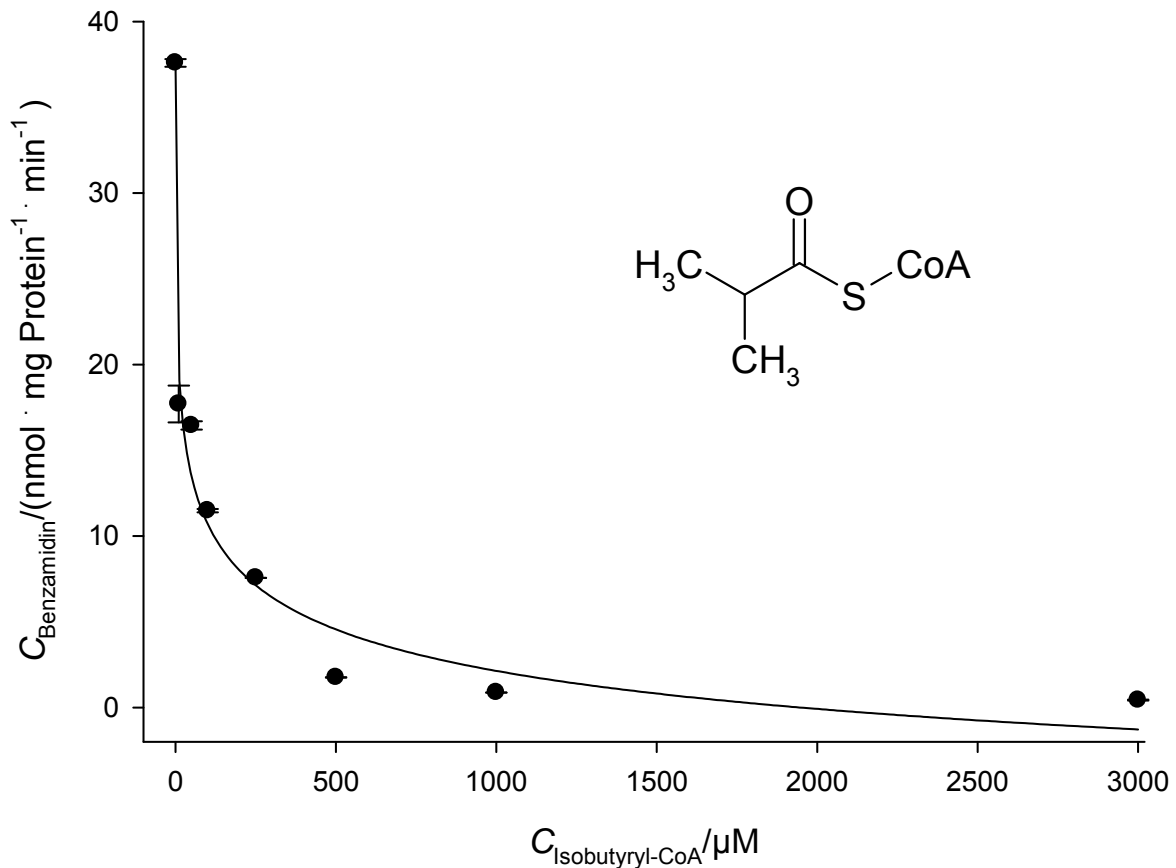
Der Zusatz von Malonyl-CoA führte zur Inhibition der Benzamidoxim-Reduktaseaktivität. Es konnte ein  $EC_{50}$ -Wert von  $690,2 \pm 432,9 \mu\text{M}$  ermittelt werden.



**Abbildung 3-31: Inhibition der Benzamidoximreduktion durch Stearoyl-CoA**

Es wurde für 20 min mit einer 1 mM Benzamidoximlösung und Stearoyl-CoA (0,1–3,0 mM) inkubiert. Die Durchführung ist in Kap. 3.3.14 beschrieben. Die Konzentrationen wurden mittels der in Kap. 3.3.15 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Konzentrationen sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus vier parallelen Inkubationen.

Der Zusatz von Stearoyl-CoA führte ebenfalls zur Inhibition der Benzamidoxim-Reduktaseaktivität. Es wurde ein  $EC_{50}$ -Wert von  $193,9 \pm 36,5 \mu\text{M}$  bestimmt.

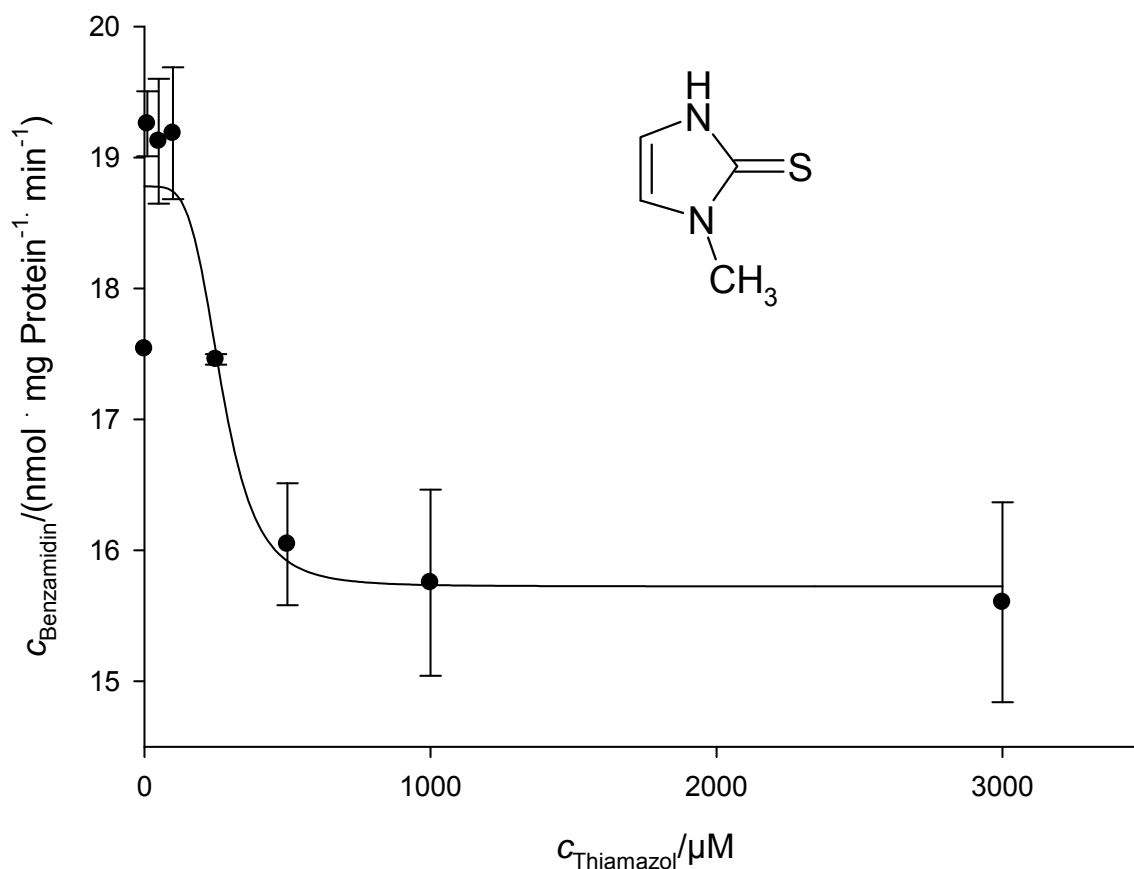


**Abbildung 3-32: Inhibition der Benzamidoximreduktion durch Isobutyryl-CoA**

Es wurde für 20 min mit einer 1 mM Benzamidoximlösung und Isobutyryl-CoA (0,1–3,0 mM) inkubiert. Die Durchführung ist in Kap. 3.3.14 beschrieben. Die Konzentrationen wurden mittels der in Kap. 3.3.15 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Konzentrationen sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus vier parallelen Inkubationen.

Die stärkste Inhibition der Benzamidoximreduktaseaktivität der untersuchten Fettsäure-CoAs wurde bei der Inkubation von Isobutyryl-CoA beobachtet. Es wurde ein  $EC_{50}$ -Wert von  $69,0 \pm 182,3 \mu\text{M}$  bestimmt.

Neben den Fettsäure-CoAs wurde weiterhin der Einfluss eines schilddrüsenaktiven Arzneistoffs auf die Benzamidoximreduktion untersucht. Im Folgenden sind die Ergebnisse des Thyreostatikums Thiamazol vom Typ der Thioharnstoffderivate gezeigt.



**Abbildung 3-33: Inhibition der Benzamidoximreduktion durch Thiamazol**

Es wurde für 20 min mit einer 1 mM Benzamidoximlösung und Thiamazol (0,1 – 3,0 mM) inkubiert. Die Durchführung ist in Kap. 3.3.14 beschrieben. Die Konzentrationen wurden mittels der in Kap. 3.3.15 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Konzentrationen sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus vier parallelen Inkubationen.

Es konnte eine Inhibition der Benzamidoximreduktaseaktivität bei gemeinsamer Inkubation von Benzamidoxim und Thiamazol beobachtet werden. Es wurde ein  $\text{EC}_{50}$ -Wert von  $270 \pm 72 \mu\text{M}$  bestimmt.



### 3.4.5 Charakterisierung der Proteinexpression

Transkriptions- und Translationsanalysen der mARC-Gene sollten in verschiedenen Geweben unter begleitender Bestimmung der Proteinexpression und der enzymatischen Aktivität durchgeführt werden.

Zur Transkriptionsanalyse wurde eine Datenbankrecherche vorgenommen. Die Genexpressions- und Aktivitätsübersichten (Su et al., 2004) von mARC 1 in Abbildung 3-6: MOSC 1 Genexpressions- und Aktivitätsübersicht (Su et al., 2004) veranschaulichen die hohen mRNA-Expressionsraten von mARC 1 im Fettgewebe und in der Schilddrüse sowie von mARC 2 in Schilddrüse, Leber und Lunge.

Translationsanalysen wurden im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe von Westernblots und einem ELISA durchgeführt, deren Ergebnisse im Folgenden dargestellt sind.

#### 3.4.5.1 Westernblots

##### 3.4.5.1.1 Testung kommerzieller Antikörper

Die Aminosäuresequenzen der beiden mARC-Proteine wurden im Weiteren aufgeführt. Hervorgehoben wurde jeweils die Sequenzen, gegen die die kommerziell erhältlichen Antikörper gerichtet sind.

##### mARC 1:

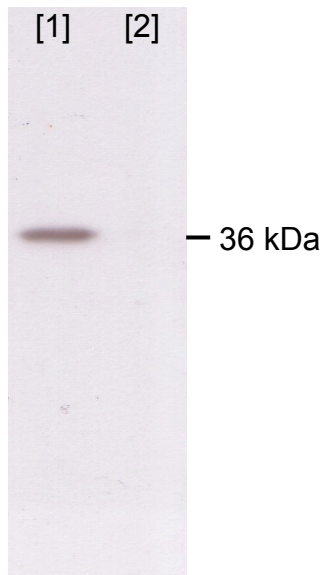
MGAAGSSALARFVLLAQSRLPGWLGVAALGLTAVALGAVAWRRRAWPTRRRRLLQQ  
 VGTVAQLWIYPVKSCCKGVPVSEAECTAMGLRSGNLRDRFWLVINQEGNMVTARQE  
 PRLVLISLTCDGDTLTLAAYTKDLLPIKTPTTNAVHKCRVHGLEIEGRDCGEATAQ  
 WITSFLKSQPYRLVHFEPHMRPRRPHQIADLFRPKDQIAYSSTSPFLILSEASLADLN  
 SRLEKKVKATNFRPNIVISGCDVYAED**DSWDELLIGDVELKRVMACSRCILTTVDPDT**  
**GVMSRKEPLETLKSYRQC**DPSEKLYGKSPLFGQYFVLENPGTIKVGDPVYLLGQ

##### mARC 2:

MGASSSSALARLGLPARPWPRWLGVAALGLAAVALGTVAWRRRAWPRRRRRLQQV  
 GTVAKLWIYPVKSCCKGVPVSEAECTAMGLRSGNLRDRFWLVIKEDGHMVTARQEP  
 RLVLISIIYENNCLIFRAPDMDQLVLPSKQPSSNKLHNCRIFGLDIKGRDCGNEAAKW  
 FTNFKTEAYRLVQFETNMKGRTSRKLLPTLDQNFQVAYPDY**CPLLIMTDASLVDL**  
**NTRMEKKMKMENFRPNIVVTGCDAFEEDT**WDELLIGSVEVKKVMACPRCILTVD  
**PDTGVIDRKQPLDTLKS**YRLCDPSEKLYKLSPLFGIYYSVEKIGSLRVGDPVYRMV

### 3.4 Ergebnisse

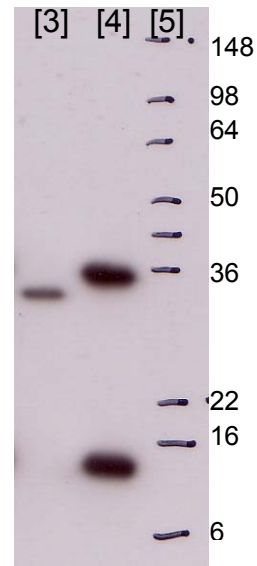
Bevor ein Antikörper zur Untersuchung verschiedener Zelllinien und Gewebe eingesetzt werden kann, muß überprüft werden, ob der Antikörper überhaupt die richtige Bande des zu untersuchenden Proteins erkennt und wie selektiv der Antikörper reagiert. Dazu wurden zunächst die beiden mARC-Proteine aufgetragen und verschiedene Antikörperverdünnungen eingesetzt.



**Abbildung 3-34: anti-mARC 1**

[1] 5 µg rekombinantes mARC 1  
[2] 5 µg rekombinantes mARC 2

Primärantikörper: anti-hmARC 1 (1:500.000)  
Sekundärantikörper: 1:10.000  
Membran: PVDF  
Detektion: ECL (15 min Belichtung)  
Probenauftragspuffer jeweils mit Mercaptoethanol



**Abbildung 3-35: anti-mARC 2**

[3] 5 ng rekombinantes mARC 1  
[4] 5 ng rekombinantes mARC 2  
[5] Molekulargewichtsmarker (kDa)

Primärantikörper: anti-hmARC 2 (1:5.000)  
Sekundärantikörper: 1:10.000  
Membran: PVDF  
Detektion: ECL (10 s Belichtung)

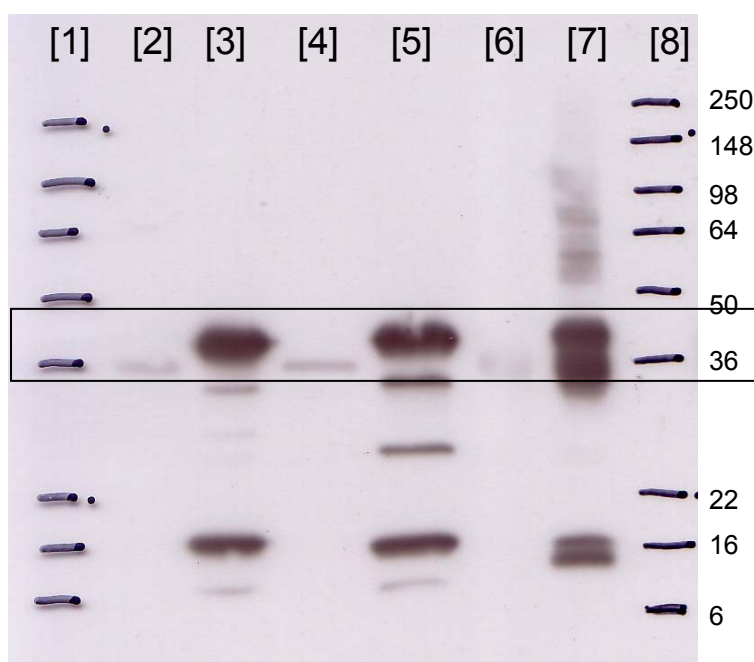
Im Verdünnungsverhältnis 1:500.000 detektierte der anti-mARC 1 Antikörper selektiv mARC 1, ohne mARC 2 anzuzeigen (Abbildung 3-34). Bei der 36 kDa Bande handelte es sich um die zu erwartende Bande des mARC 1 Proteins. Um die einzusetzende Menge an rekombinatem Protein zu reduzieren, wurden für die Untersuchungen von Geweben 50 ng rekombinantes mARC 1-Protein eingesetzt und die Antikörperkonzentration dementsprechend auf 1:10.000 angepasst.

Der anti-mARC 2 Antikörper zeigte die gewünschte Bande bei ca. 36 kDa für mARC 2 an (Abbildung 3-35). Allerdings wurde auch eine weitere Bande bei ca.

16 kDa erkannt. Es ist an dieser Stelle unklar, ob es sich dabei um ein Fragment des Proteins oder um eine unspezifische Reaktion des Antikörpers handelt. Neben dem mARC 2-Protein wurde von dem anti-mARC 2 Antikörper auch bei einer eingesetzten Proteinmenge von nur 5 ng das mARC 1 Protein angezeigt. Der anti-mARC 1 Antikörper reagierte selektiver auf rekombinantes Protein, der anti-mARC 2 Antikörper reagierte allerdings deutlich sensitiver auf das entsprechende rekombinante Protein.

Im Rahmen der SDS-Gelelektrophorese werden niedermolekulare Thiole wie  $\beta$ -Mercaptoethanol (ME) und Dithiothreitol (DTT) im Probenauftragspuffer eingesetzt, um Disulfidbrücken in den Polypeptidketten zu reduzieren (Jansohn, 2007).

Im Folgenden wurde die Zusammensetzung des Probenauftragspuffers variiert. Es wurde die Verwendung von  $\beta$ -Mercaptoethanol, Dithiothreitol und Probenauftragspuffer ohne reduzierendes Agens verglichen.



**Abbildung 3-36: Variation des Probenauftragspuffers**

[1] Molekulargewichtsmarker [kDa]	[5] 1 $\mu$ g rekombinantes mARC 2 ME
[2] 1 $\mu$ g rekombinantes mARC 1 DTT	[6] 1 $\mu$ g rekombinantes mARC 1 $\emptyset$
[3] 1 $\mu$ g rekombinantes mARC 2 DTT	[7] 1 $\mu$ g rekombinantes mARC 2 $\emptyset$
[4] 1 $\mu$ g rekombinantes mARC 1 ME	[8] Molekulargewichtsmarker (kDa)
Primärantikörper: anti-hmARC2 (1:50.000)	Membran: PVDF
Sekundärantikörper: (1:10.000)	Detektion: ECL (10 s Belichtung)

Der Probenauftragspuffer ohne reduzierendes Agens lieferte sehr unscharfe Banden und eine sehr starkes Aufspaltungsmuster. Dithiothreitol und Mercaptoethanol zeigten ähnliche Aufspaltungsmuster des Proteins, jedoch waren die Banden bei der Verwendung von Mercaptoethanol schärfer. Somit wurde im Folgenden der Probenauftragspuffer mit  $\beta$ -Mercaptoethanol als reduzierendes Agens verwendet.

Nachdem gezeigt worden ist, dass die kommerziellen Antikörper die rekombinanten Proteine erkennen, wurden Zelllinien und Gewebe, für die *N*-reduktive Aktivität gezeigt werden konnte, auf die Expression von mARC 1 und mARC 2 untersucht.

## 3.4.5.1.2 Testung humaner Zelllinien auf mARC Expression

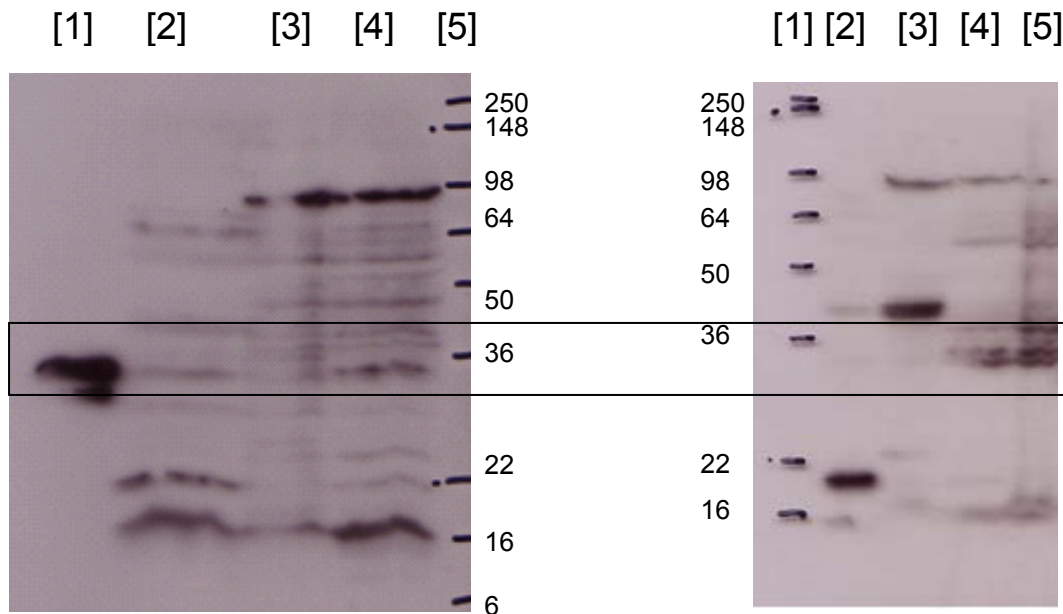
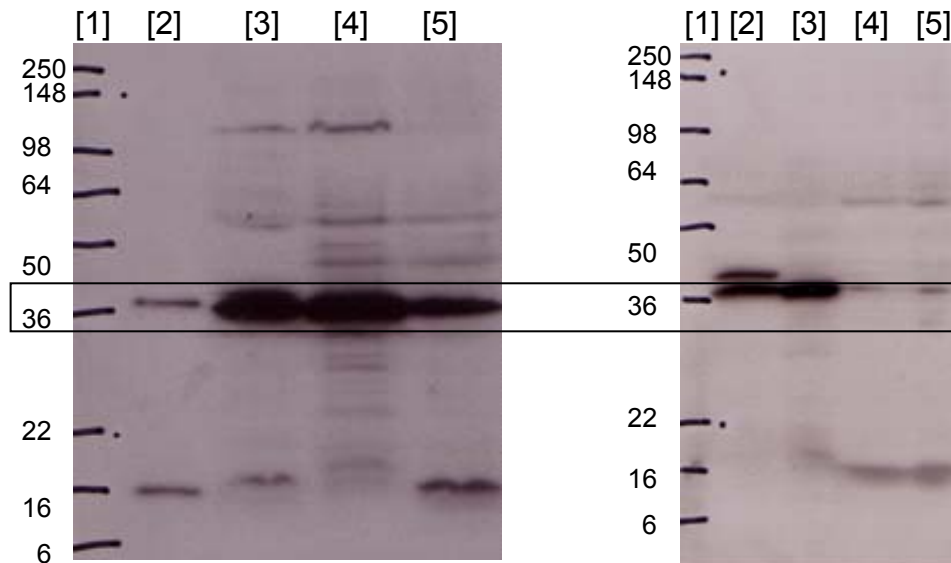


Abbildung 3-37: Untersuchung von mARC 1 in:

Caco-2 Zellen	HEK-293 Zellen
[1] 50 ng rekombinantes mARC 1	[1] Molekulargewichtsmarker (kDa)
[2] 100 µg Mitochondrien 6.300 g	[2] 50 µg rekombinantes mARC 1
[3] 100 µg Mikrosomen	[3] 100 µg Mitochondrien 6.300 g
[4] 100 µg Homogenat	[4] 100 µg Mikrosomen
[5] Molekulargewichtsmarker (kDa)	[5] 100 µg Homogenat
Primärantikörper: (1:10 000)	Primärantikörper: (1:10.000)
Sekundärantikörper: (1:10 000)	Sekundärantikörper: (1:10.000)
Membran: PVDF	Membran: PVDF
Detektion: ECL (6 min Belichtung)	Detektion: ECL (6 min Belichtung)

Die vergleichende Untersuchung der Caco-2 Zellen und der HEK-293 Zellen auf mARC 1 zeigte, dass in beiden untersuchten Zelllinien für keine der untersuchten subzellulären Fraktionen eine klare mARC 1-Bande bei dem zu erwartenden Molekulargewicht von ca. 35 kDa detektiert wurde. Es wurde jedoch eine hochmolekulare Bande bei ca. 98 kDa detektiert.

### 3.4 Ergebnisse



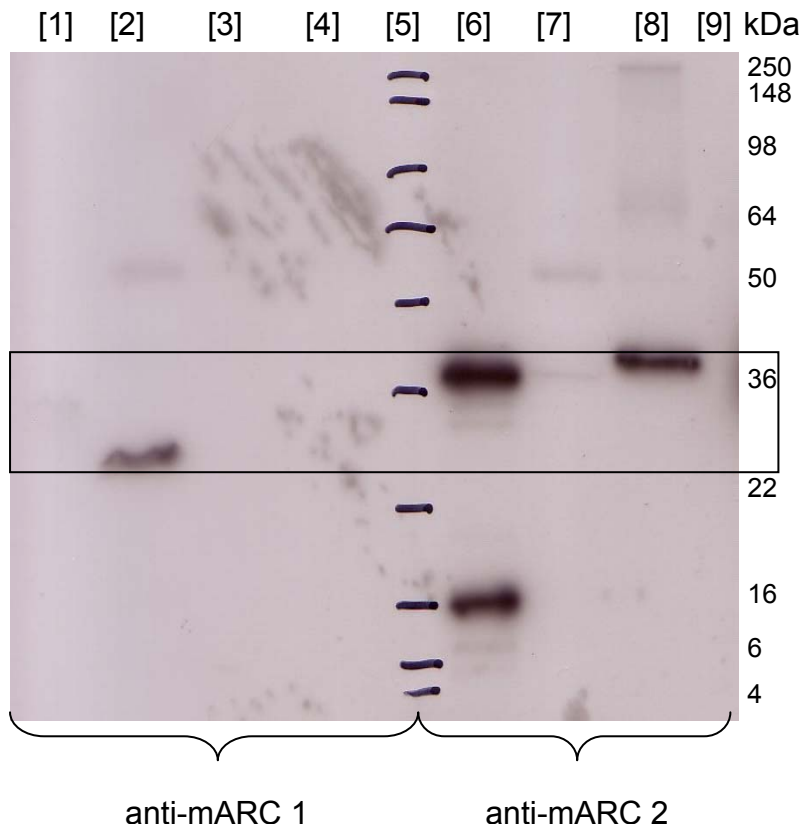
**Abbildung 3-38: Untersuchung von mARC 2 in:**

Caco-2 Zellen	HEK-293 Zellen
[1] Molekulargewichtsmarker (kDa)	[1] Molekulargewichtsmarker (kDa)
[2] 5 ng rekombinantes mARC 2	[2] 5 ng rekombinantes mARC 2
[3] 100 µg Mitochondrien 6.300 g	[3] 50 µg Mitochondrien 6.300 g
[4] 100 µg Mikrosomen	[5] 100 µg Mikrosomen
[5] 100 µg Homogenat	[5] 100 µg Homogenat
Primärantikörper: (1:10.000)	Primärantikörper: (1:10.000)
Sekundärantikörper: (1:10.000)	Sekundärantikörper: (1:10.000)
Membran: PVDF	Membran: PVDF
Detektion: ECL (6 min Belichtung)	Detektion: ECL (6 min Belichtung)

Die Caco-2 Zellen zeigten ebenso wie die HEK-293 Zellen eindeutige Proteinbanden bei ca. 35 kDa für mARC 2. Es war bei beiden untersuchten Zelllinien eine ganz klare Anreicherung des mARC 2-Proteins in den Mitochondrien im Vergleich zu den Mikrosomen und dem Homogenat zu verzeichnen. Die Anreicherung war bei den HEK-293 Zellen noch deutlicher als bei den Caco-2 Zellen, insbesondere weil bei den HEK-293 Zellen nur die Hälfte an mitochondrialem Protein aufgetragen worden ist im Vergleich zu mikrosomalem Protein und zu Homogenat.

### 3.4.5.1.3 Testung humaner Blutzellen auf mARC-Expression

Humanes Blut wurde entnommen und im Dichtegradienten zentrifugiert. Die so erhaltenen isolierten Blutzellfraktionen wurden per Westernblot untersucht.



**Abbildung 3-39: humanes Blut**

[1] 50 ng rekombinantes mARC 1	[6] 5 ng rekombinantes mARC 2
[2] 100 µg Homogenat humaner Monozyten	[7] 100 µg Homogenat humaner Monozyten
[3] 100 µg Homogenat humaner Erythrozyten	[8] 100 µg Homogenat humaner Erythrozyten
[4] 100 µg Homogenat humaner PMN	[9] 100 µg Homogenat humaner PMN
[5] Molekulargewichtsmarker (kDa)	

Primärantikörper: (1:10.000)

Sekundärantikörper: (1:10.000)

Membran: PVDF

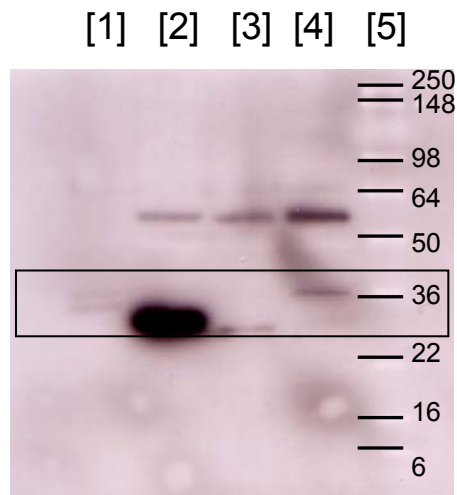
Detektion: ECL (4 min Belichtung)

Es wurden drei Blutzellfraktionen untersucht, davon zeigten die Monozyten eine Bande für mARC 1 bei etwas weniger als 35 kDa. Die Bande für das rekombinante mARC 1-Protein ist hier nur sehr schwach zu erkennen. Das mARC 2-Protein konnte in sehr geringen Konzentrationen in Monozyten und deutlich stärker konzentriert in Erythrozyten detektiert werden, nicht jedoch für die PMN. Da von allen untersuchten Zelllinien und Geweben nur in den humanen Monozyten eine klare Bande für

### 3.4 Ergebnisse

---

mARC 1 detektiert werden konnte, wurde hierfür eine weitere Aufreinigung vorgenommen. Das Monozytenhomogenat wurde bei 140.000 g für 70 min zentrifugiert. Anschließend wurde das gewonnene Pellet und der einkonzentrierte Überstand per Westernblot analysiert.



**Abbildung 3-40: humane Monozyten**

[1] 50 ng rekombinantes mARC 1

[4] 140.000 g Monozytenüberstand

[2] 100 µg Homogenat humaner Monozyten

[5] Molekulargewichtsmarker (kDa)

[3] 140000 g Monozytenpellet

---

Primärantikörper: anti-hmARC 1(1:10.000)

Membran: PVDF

Sekundärantikörper: (1:10.000)

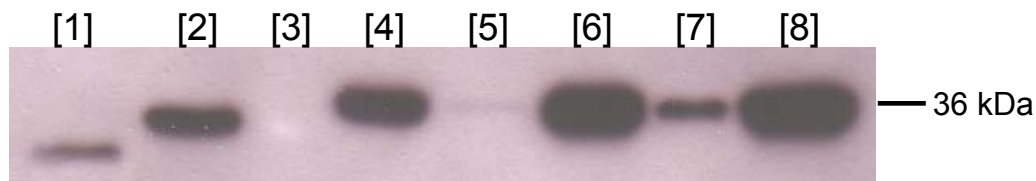
Detektion: ECL (5 min Belichtung)

Das Homogenat zeigte wie zuvor eine sehr deutliche Bande bei ca. 35 kDa. Eine Bande von ähnlichem Molekulargewicht wie die des Homogenats zeigte das Pellet. Im einkonzentrierten Überstand der 140.000 g Zentrifugation wurde jedoch eine eindeutige Bande für mARC 1 bei 36 kDa erhalten. Nach der Zentrifugation bei 140.000 g und der anschließenden Einkonzentrierung des Überstands wurde eine so geringe Proteinmenge erhalten, dass auf eine Proteingehaltsbestimmung verzichtet worden ist und stattdessen das gesamte erhaltene Protein für den Westernblot verwendet wurde.



#### 3.4.5.1.4 Testung von Mitochondrien porciner Gewebe

Die Benzamidoximreduktion wurde im Rahmen dieser Arbeit auch für primäre porcine Gewebekulturen aus Leber und Schilddrüse untersucht. Im Folgenden sind die Ergebnisse der Charakterisierung von Mitochondrienfraktionen verschiedener porciner Gewebe dargestellt.



**Abbildung 3-41: Vergleich porciner Mitochondrien verschiedener Gewebe**

[1] 0,5 µg rekombinantes mARC 1	[5] 5 µg porciner Herzmitochondrien
[2] 0,5 µg rekombinantes mARC 2	[6] 5 µg porciner Lebermitochondrien
[3] Molekulargewichtsmarker	[7] 5 µg porciner Darmmitochondrien
[4] 5 µg porcine Schilddrüsenmitochondrien	[8] 5 µg porciner Nierenmitochondrien

Primärantikörper: anti-mARC2(1:10.000)

Membran: PVDF

Sekundärantikörper: (1:10.000)

Detektion: ECL (3 min Belichtung)

Der anti-mARC 2-Antikörper erkennt auch die porcinen mARC-Proteine. Der vergleichende Westernblot von Mitochondrien, die aus unterschiedlichen porcinen Geweben gewonnen wurden, zeigte, dass mARC 2 sehr stark in Leber und Niere exprimiert wird. In ähnlicher Größenordnung kann man die Exprimierung in der Schilddrüse einordnen. Deutlich schwächer kommt das mARC 2 Protein im Darm vor. Die Expression im Herzen ist von den hier untersuchten Geweben am geringsten.

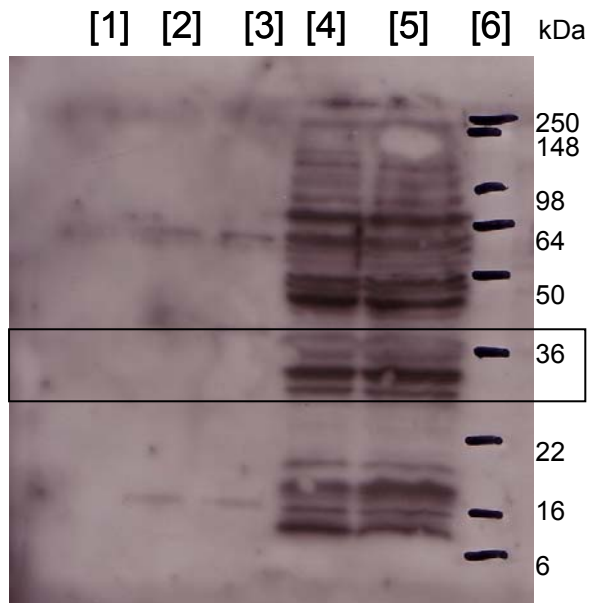
### 3.4.5.2 ELISA

Als weitere Quantifizierungsmethode für die mARC Proteine sollte im Rahmen dieser Arbeit ein ELISA entwickelt werden. Dazu wurde von der Firma Biogenes (Berlin) in der Ziege ein polyklonaler Antikörper gegen das humane mARC 2 hergestellt. In der Aminosäuresequenz des humanen mARC 2-Proteins wurde die Sequenz markiert, gegen die der neu hergestellte Antikörper gerichtet ist. Es wurde eine Sequenz gewählt, deren Proteine nicht im Intermembranraum liegen, die also frei zugänglich sind. Außerdem sollte das FRPN-Motiv (das Moco-Bindemotiv) beachtet werden, da diese Proteinsequenz einen erheblichen Anteil an der Funktionalität des Proteins trägt.

MGASSSSALARLGLPARPWPRWLGVAALGLAAVALGTVAWRRRAWPRRRRRRLQQVGTVAK  
LWIYPVKSCCKGVPVSEAECTAMGLRSGNLRDRFWLVIKEDGHMVTARQEPRLVLISIIYENN  
CLIFRAPDMDQLVLPSKQPSSNKLHNCRIFGLDIKGRDCGNEAAKWFTNFLKTEAYRLVQFE  
TNMKGRTSRKLLPTLDQNFQVAYPDYCPLLIMTDASLVDLNTRMEKKMKMENFRPNIIVVTG  
CDAFEEDTWDELLIGSVEVKKVMACPRCILTTVDPDTGVIDRKQPLDTLKSRYRLCDPSEREL  
YKLSPLFGIYYSVEKIGSLRVGDPVYRMV

hmARC 2 mit unterstrichener Sequenz des anti-hmARC 2 Antikörpers aus der Ziege und fettgedruckt das FRPN-Motiv

Der Erfolg der Immunisierung wurde durch Testung der Reaktivität gegen die humanen rekombinanten Proteine als auch gegen das humane Protein aus Caco-2 Zellen verfolgt. Zunächst wurde das Serum der Ziege untersucht.



**Abbildung 3-42: anti-hmARC 2 aus der Ziege (Serumtestung nach dem 1. Boost)**

[1] 50 ng rekombinantes mARC 1

[2] 50 ng rekombinantes mARC 2

[3] 100 ng rekombinantes mARC 2

[4] 50  $\mu$ g Mitochondrien aus Caco-2 Zellen

[5] 100  $\mu$ g Mitochondrien aus Caco-2 Zellen

[6] Molekulargewichtsmarker (kDa)

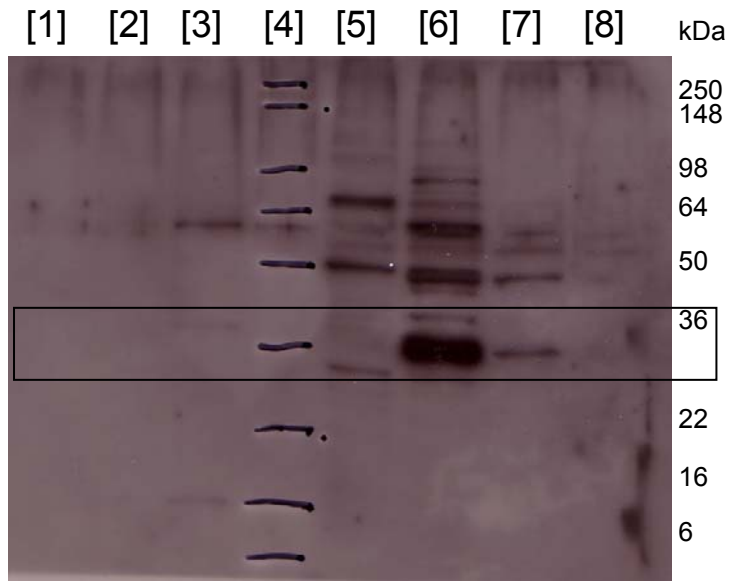
Primärantikörper: (1:2.000)

Membran: PVDF

Sekundärantikörper: (1:5.000)

Detektion: ECL (5 min Belichtung)

Für das rekombinante mARC 2 wurde erst in höheren Proteinkonzentrationen eine Bande bei ca. 35 kDa erhalten. Daher wurde ein weiterer Boost der Ziege mit synthetisiertem Peptid durchgeführt.



**Abbildung 3-43: anti-hmARC 2 aus der Ziege (Serumtestung nach dem 2. Boost)**

[1] 50 ng rekombinantes mARC 1

[2] 5 ng rekombinantes mARC 2

[3] 50 ng rekombinantes mARC 2

[4] Molekulargewichtsmarker (kDa)

Primärantikörper: (1:10.000)

Sekundärantikörper: (1:5.000)

[5] 500 ng rekombinantes mARC 2

[6] 10 µg Mitochondrien aus Caco-2 Zellen

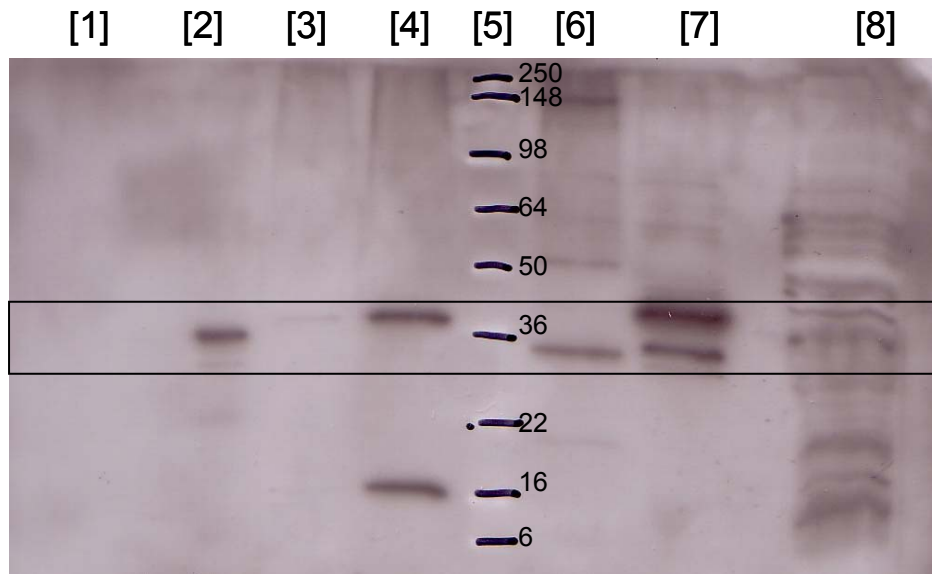
[7] 5 µg Mitochondrien aus porciner Niere

[8] 10 µg Mitochondrien aus porciner Leber

Membran: PVDF

Detektion: ECL (5 min Belichtung)

Bei der Testung des Serums nach dem zweiten Boost mit Peptid konnte bereits eine um den Faktor fünf geringere Verdünnung des Serums eingesetzt werden, die noch eine akzeptable Bande für das rekombinante mARC 2-Protein bei ca. 35 kDa lieferte. Die Mitochondrien der Caco-2 Zellen zeigten eine sehr deutliche Bande für mARC 2. Daher konnte nun das Serum, das nach dem zweiten Boost erhalten wurde, aufgereinigt werden. Dazu wurde das zuvor der Ziege applizierte Peptid an eine Affinitätssäule gebunden und so der Antikörper isoliert.



**Abbildung 3-44: anti-hmARC 2 aus der Ziege (aufgereinigter Antikörper)**

[1] 50 ng rekombinantes mARC 1	[5] Molekulargewichtsmarker (kDa)
[2] 500 ng rekombinantes mARC 1	[6] 100 µg Homogenat humaner Erythrozyten
[3] 5 ng rekombinantes mARC 2	[7] 10 ng Mitochondrien porciner Niere
[4] 50 ng rekombinantes mARC 2	[8] 100 µg Homogenat muriner Niere

Primärantikörper: (1:1.000)

Membran: PVDF

Sekundärantikörper: (1:2.000)

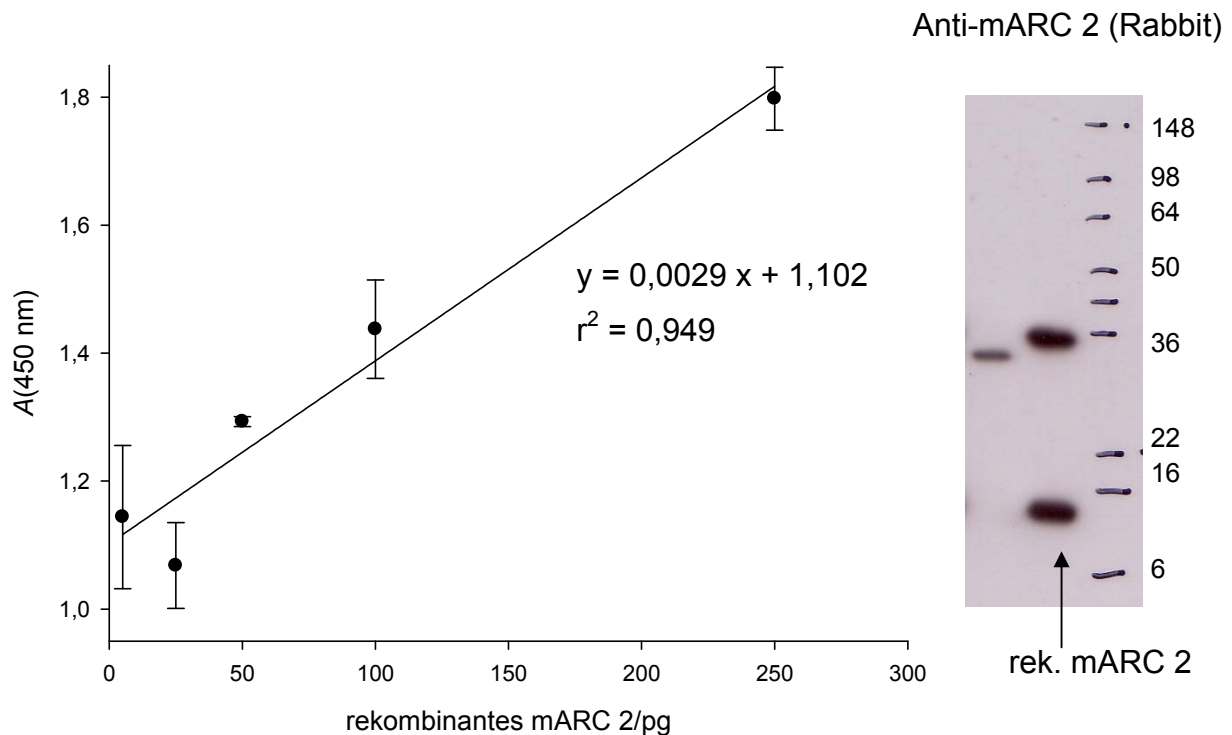
Detektion: ECL (4 min Belichtung)

Der aus der Ziege erhaltene polyklonale Antikörper erkannte bei dem richtigen Molekulargewicht rekombinantes mARC 2 bei einer niedrigsten getesteten Proteinkonzentration von 50 ng. Das mARC 1 Protein wurde bei gleicher Konzentration des Antikörpers nicht erkannt, jedoch in zehnfach höherer Konzentration. Gegen rekombinantes Enzym war der anti-hmARC 2 Antikörper aus der Ziege weniger immunogen als der kommerziell erhältliche, aber selektiver für mARC 2.

Der Antikörper detektierte sehr gut das mARC 2 aus humanen Erythrozyten. Bei der porcinen Nierenprobe wurden zwei Proteinbanden bei ca. 35 kDa von dem Antikörper angezeigt. Das Homogenat der Rattenniere zeigte keine eindeutige Bande für mARC 2. Für humane Proben war der Antikörper sehr gut geeignet, für porcine bedingt und für Rattenproben lieferte der Antikörper keine zufrieden stellenden Ergebnisse.

### 3.4.6 ELISA

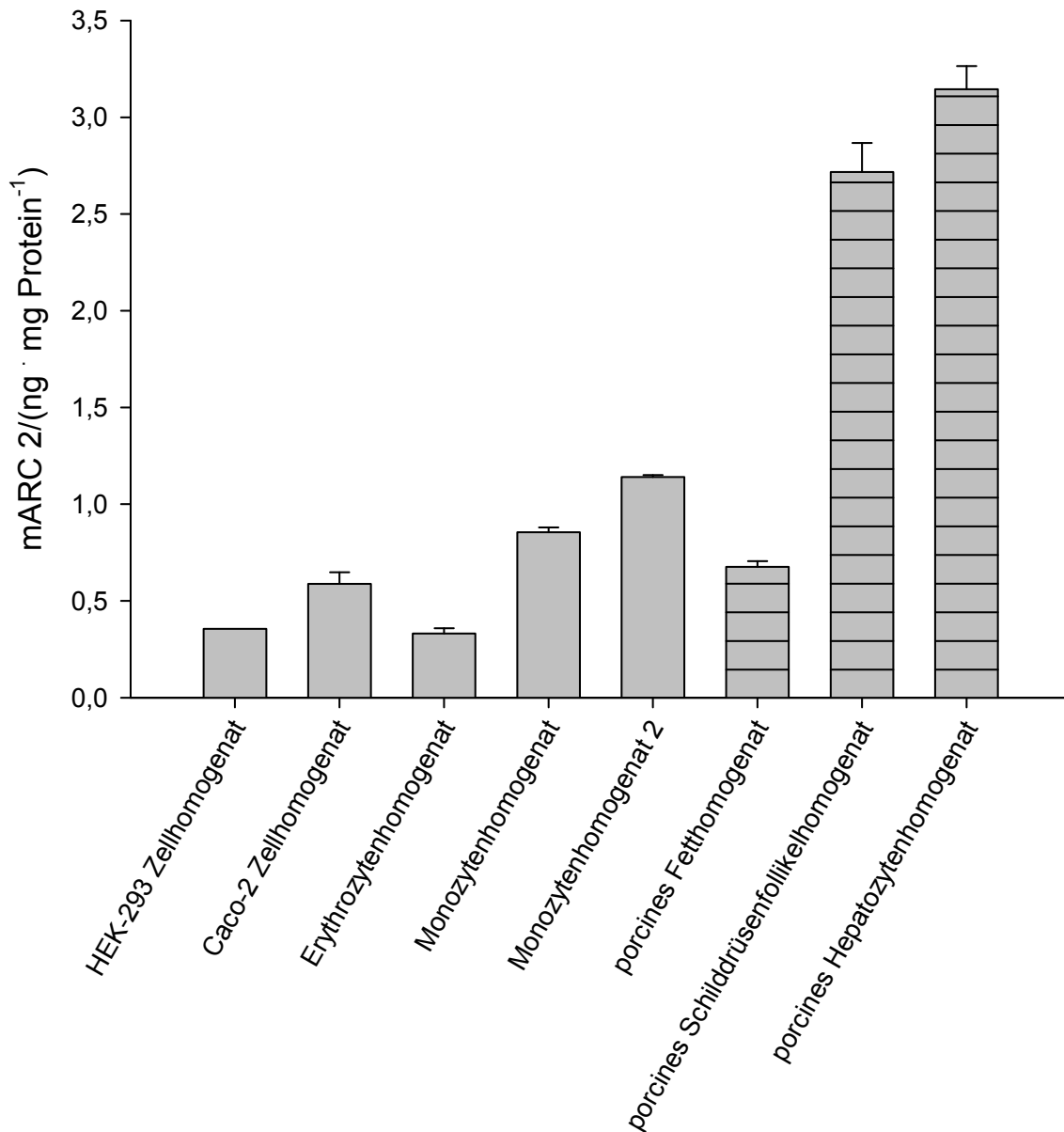
Im Rahmen dieser Arbeit wurde für mARC 2 ein ELISA entwickelt. Es wurde bei jedem durchgeführten Versuch eine Kalibriergerade mit rekombinantem mARC 2 erstellt. Ein Beispiel ist im Folgenden abgebildet.



**Abbildung 3-45: Kalibrierung des ELISA für mARC 2**

Die Durchführung ist in Kap. 3.3.19 beschrieben. Die ermittelten Konzentrationen sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus drei parallel inkubierten Wells einer 96-well-Platte. Abgebildet wurde weiterhin ein Westernblot des zur Kalibrierung verwendeten rekombinanten mARC 2-Proteins.

Im ELISA wurden dann die zuvor untersuchten Zelllinien und Gewebe getestet. Im folgenden Diagramm (Abbildung 3-46) wurden die Ergebnisse des ELISA dargestellt.



**Abbildung 3-46: ELISA für mARC 2**

Die Durchführung ist in Kap. 3.3.19 beschrieben. Die ermittelten Konzentrationen sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Versuchen. Monozytenhomogenat: Zentrifugation bei 460 g; Monozytenhomogenat 2: Zentrifugation bei 920 g. Mit gestreiften Balken wurden die Proteinproben porciner Herkunft gekennzeichnet.

HEK-293 Zellen, Caco-2 Zellen, Erythrozyten und Monozyten exprimierten mARC 2 in ähnlichen Mengen von ca. 0,75 ng/mg eingesetztem Homogenat. Der Vergleich der porcinen Gewebe veranschaulicht, dass im Fettgewebe deutlich weniger an mARC 2 (Faktor drei bis zehn) exprimiert worden ist als in porcinen Schilddrüsenfollikeln und in porcinen Hepatozyten.

### 3.5 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die konzentrationsabhängige Benzamidoximreduktaseaktivität von den beiden Zelllinien Caco-2 und HEK-293 sowie von verschiedenen primären Zellkulturen untersucht. Im Folgenden sind die ermittelten  $K_m$ - und  $V_{max}$ -Werte aufgeführt.

	$K_m$ in mM	$V_{max}$ in $\text{nmol} \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$
Caco-2 Zellen	$0,98 \pm 0,08$	$1,88 \pm 0,05$
HEK-293 Zellen	$1,29 \pm 0,25$	$0,92 \pm 0,06$
porcine Hepatozyten	$0,40 \pm 0,07$	$2,11 \pm 0,08$
porcine Schilddrüsenfollikel	$0,35 \pm 0,06$	$0,97 \pm 0,04$
humane PMN	$0,17 \pm 0,02$	$4,50 \pm 0,08$
humane Erythrozyten	$0,21 \pm 0,02$	$2,25 \pm 0,05$

**Tabelle 3-3: Kinetische Parameter der Benzamidoximreduktion in den untersuchten Zelllinien und Geweben**

Die  $K_m$ -Werte liegen für alle im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen auf einem ähnlichen Niveau von ca. 1 mM Benzamidoxim. Die  $V_{max}$ -Werte bewegen sich abhängig von der Zelllinie bzw. der primären Gewebekultur im Bereich von 0,9 bis 4,5  $\text{nmol} \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ . Den mit Abstand höchsten  $V_{max}$ -Wert lieferten die humanen PMNs. Die PMNs reagieren extrem empfindlich auf äußere Einflüsse, um die PMNs während der Isolation aus Vollblut nicht zu aktivieren, müssen konstante Bedingungen eingehalten werden, vor allem muss bei konstanter Temperatur gearbeitet werden (Oh *et al.*, 2008). Um die Signifikanz des im Rahmen dieser Arbeit ermittelten  $V_{max}$ -Werts zu steigern, könnten in weiterführenden Studien PMNs verschiedener Spender und eventuell auch PMNs aus gepooltem Blut auf die *N*-Reduktaseaktivität untersucht werden.

Neben der Untersuchung der Benzamidoximreduktion wurden auch temperaturabhängige Versuche derselben durchgeführt. Die Temperaturabhängigkeit der Benzamidoximreduktion zeigte in allen untersuchten Zelllinien und Geweben einen ähnlichen Verlauf. Bei 4 °C wurde deutlich weniger Benzamidoxim zu Benzamidin reduziert und es wurde im Vergleich zu 37 °C deutlich mehr Benzamidin in den Zellen angereichert, was dagegen bei 37 °C in das Medium abgegeben wurde. Diese



Daten deuten auf einen temperaturabhängigen Transport des Benzamidins aus den Zellen in das umliegende Medium hin, der offensichtlich bei geringer Temperatur deutlich dezimiert wurde und somit scheinbar aktiv stattfand. Der Benzamidoxim-einstrom in die Zellen scheint ungehindert abzulaufen und die Reduktion zum Benzamidin fand schneller statt, als das Benzamidoxim aus den Zellen herausströmte. Wie schon im ersten Teil dieser Arbeit gezeigt wurde, werden Amidine (Pentamidin) aktiv in die Caco-2 Zellen transportiert, es könnte sich also auch hier um den gleichen aktiven Transporter handeln, der an diesem Transportvorgang beteiligt ist.

Die Effluxstudien verdeutlichten, dass das intrazellulär entstandene Benzamidin während der Inkubation in Benzamidoxim freiem Medium über den gesamten Inkubationszeitraum aus den Zellen transportiert wurde. In den Zellen sank die Benzamidinkonzentration fast auf Null ab. In allen untersuchten Zelllinien und primären Gewebekulturen wurde ein ähnliches Effluxverhalten des Benzamidins beobachtet. Der Kurvenverlauf war biphasisch mit einer ersten kurzen Phase über 20 min, die eine hohe Steigung aufwies und einer zweiten Phase mit geringer Steigung über die späteren 100 min. Amidine werden an der Blut-Hirn-Schranke über P-gp Transporter aktiv an der apikalen Zellmembran ausgeschleust (Sanderson *et al.*, 2009). Es könnte sich auch in den Caco-2 Zellen und den Hepatocyten um einen durch P-gp-vermittelten Effluxprozess handeln. Die Caco-2 Zellen und die primären Hepatocyten hatten nach 120 min Inkubation in substanzfreiem Medium ca.  $5 \text{ nmol} \cdot \text{mg Protein}^{-1}$  in das Medium sezerniert. Gegenüber den HEK-293 Zellen und den porcinen Schilddrüsenfollikeln waren das um den Faktor zwei erhöhte Werte. Eine mögliche Erklärung wäre der P-gp-Transporter, der am Efflux beteiligt ist und stark in Leber, Niere und Darm exprimiert wird (Chan *et al.*, 2004).

Um der in der Literatur beschriebenen hohen mRNA-Expression von mARC 2 in der Schilddrüse (Su *et al.*, 2004) nachzugehen, wurde die konzentrationsabhängige Benzamidoximreduktion in verschiedenen humanen und murinen Schilddrüsenzelllinien unter dem Gesichtspunkt der TSH-Stimulation untersucht. Die kinetischen Untersuchungen der Zellen, die ohne TSH-Stimulation gezüchtet worden sind, folgten alle dem Michaelis-Menten-Verlauf. Die ermittelten  $K_m$ -Werte lagen alle im ähnlichen Bereich wie die der primären Schilddrüsenfollikelkultur. Die  $V_{\max}$ -Werte lagen deutlich unter dem  $V_{\max}$ -Wert der primären Kultur. Diese Unterschiede können

mit dem zellulären Ursprung der Zelllinien des Krebsgewebes zusammenhängen. Auffällig war jedoch, dass die Zellen ohne vorherige TSH-Stimulation keine Michaelis-Menten-Abhängigkeit der *N*-Reduktaseaktivität aufwiesen. Verglich man jedoch die Umsetzungsraten im substratgesättigten Konzentrationsbereich, so waren die Werte der Zellen, die ohne TSH-Stimulation gezüchtet worden sind, um den Faktor zwei bis drei erhöht gegenüber den Zellen, welche mit TSH-Stimulation gezüchtet worden sind.

Dies stellt einen Hinweis auf eine Beteiligung der mARC Enzyme im Rahmen der Schilddrüsenfunktion dar. Man könnte an dieser Stelle auf einen Einfluss von mARC an der Stelle der Thyreoperoxidase spekulieren. Als weiterführende Studien sollten vergleichende Westernblots und/oder ein ELISA von Zellhomogenaten mit und ohne TSH-Stimulation durchgeführt werden. Daran könnte man Erkenntnisse erhalten, ob die mARC Proteine ohne TSH-Stimulation stärker exprimiert werden oder ob sie mit TSH-Stimulation an anderen metabolischen Vorgängen beteiligt sind und somit nicht für die Reduktion des Benzamidoxims zur Verfügung stehen. Eine theoretisch mögliche Erklärung des beobachteten Effekts wäre eine Aktivierung des mARC-Enzyms durch eine Phosphorylierung über den cAMP/Proteinkinase-A-Pathway. Ein Experiment, um diesem Effekt nachzugehen, wäre die Stimulation der Zellen mit Forskolin, das den cAMP-Level erhöht und die Proteinkinase A aktiviert (Bubolz *et al.*, 2005). Dieses sollte also eine TSH-analoge Wirkung entfalten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Auswirkung verschiedener Fettsäure-CoAs auf die Benzamidoximreduktaseaktivität in porcinen Lebermitochondrien untersucht. Eine schwedische Arbeitsgruppe hatte bereits die Hemmung der Benzamidoximreduktion mit Fettsäure-CoAs beobachtet (Neve *et al.*, 2009). Die Fettsäure-CoAs zeigten alle einen inhibitorischen Effekt, wobei die stärkste Inhibition durch das Isobutyryl-CoA ( $EC_{50}$ -Wert von 69,0  $\mu$ M) hervorgerufen wurde. In vorangegangenen Arbeiten wurde bereits die Inhibition der Benzamidoximreduktion durch Stearoyl-CoA in porcinen Lebermikrosomen beschrieben Reh (2007). Neben den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Verbindungen sollten in zukünftigen Studien weitere Fettsäure-CoAs, auch mit rekombinanten mARC-Enzymen, auf die Inhibition der Benzamidoximreduktion getestet werden. Weiterhin sollte in weiterführenden Untersuchungen überprüft werden, ob es sich um eine kompetitive oder eine nichtkompetitive Hemmung handelt.

Im Hinblick auf die bislang unbekannte physiologische Bedeutung der mARC-Proteine wurde die *N*-Reduktaseaktivität in porcinen Lebermitochondrien in Anwesenheit eines Thyreostatikums vom Typ der Thioharnstoffe untersucht. Mit Hilfe dieses Versuchs sollten Hinweise auf eventuell durch mARC bedingte Interaktionen und/oder Nebenwirkungen im Rahmen der in der Schilddrüse ablaufenden Prozesse erhalten werden. Die Inkubation von Benzamidoxim mit steigenden Konzentrationen an Thiamazol führte zu einer Hemmung der Reduktaseaktivität mit einem  $EC_{50}$ -Wert von  $270 \pm 72 \mu\text{M}$ . In diesem Zusammenhang sollte in weiterführenden Studien die Art der Hemmung untersucht werden. Mit einer entsprechenden HPLC-Methode und den Metaboliten des Thiamazols könnte geklärt werden, ob Thiamazol ein Substrat für mARC darstellt. Die Interaktion dieser Verbindungen kann von klinischem Interesse sein und sie stellt einen weiteren Hinweis auf die mögliche physiologische Bedeutung der mARC Enzyme im Rahmen der in der Schilddrüse ablaufenden Prozesse dar.

Die Untersuchung von Proteinen mit Hilfe von Westernblots bietet eine Möglichkeit, den Gehalt von Proteinen semiquantitativ zu bestimmen. Dazu wurden zunächst die zur Verfügung stehenden Antikörper mit Hilfe der rekombinanten mARC Proteine überprüft, ob die Antikörper die gewünschte Bande der mARC-Proteine detektieren. Anschließend wurden die Antikörper auf die entsprechenden Konzentrationen eingestellt, die ein akzeptables Signal für das entsprechende Protein lieferten.

Für das rekombinante mARC 2 wurde bei mehreren getesteten Chargen im Westernblot nach Antikörperdetektion eine Aufspaltung in mehrere Banden beobachtet. Der Zusatz reduzierender niedermolekularer Thiole bedingt eine Spaltung der Disulfidbrücken innerhalb der Polypeptidketten. Es wurden verschiedene Probenauftragspuffer getestet, die reduzierende Bedingungen und nichtreduzierende Bedingungen verglichen haben. Das Aufspaltungsmuster wurde für alle untersuchten Probenauftragspuffer beobachtet. Der Probenauftragspuffer mit  $\beta$ -Mercaptoethanol lieferte die besten Ergebnisse. Das rekombinante mARC 2 zeigte eine Aufspaltung in zwei Banden im SDS-Gel, die beide von den Antikörpern erkannt wurden. Die Bande bei ca. 36 kDa war die gewünschte und zu erwartende mARC 2 Bande und die zusätzliche Bande bei ca. 16 kDa könnte ein unvollständig translatiertes Proteinprodukt oder ein Degradationsprodukt darstellen, das neben

dem 35 kDa Protein im *E. coli* entstanden ist. Es wurden jedoch keine Di- und Multimere detektiert. Für die Anwendung der rekombinanten Proteine für die Kalibrierung im ELISA System stellt das zusätzlich vom Antikörper detektierte 16 kDa Protein ein Problem dar. Der Antikörper erkannte beide Proteine. Die mit Hilfe einer solchen Kalibrierung quantifizierten mARC-Proteingehalte aus Gewebeproben wären falsch negativ. Da es allerdings hauptsächlich auf das Verhältnis des mARC Gehalts in den einzelnen Geweben ankommt, sollte dieser eventuell zu bedenkende Faktor kein allzu starkes Gewicht haben. Die 16 kDa Bande sollte für zukünftige Arbeiten genauer untersucht werden, denn sie wurde auch bei einigen Gewebeproben beobachtet. In den Caco-2 Zellen wurde hauptsächlich mARC 2 detektiert, das in Mitochondrien und Mikrosomen gefunden wurde. In den HEK-293 Zellen wurde ebenfalls hauptsächlich mARC 2 detektiert, das hier sehr stark in den Mitochondrien angereichert war.

Die Ergebnisse der Benzamidoximreduktion und die der Westernblots stimmen für die Caco-2 Zellen, die HEK-293 Zellen und die porcinen Schilddrüsenfollikel gut überein. Die Untersuchung der Blutzellhomogenate per Westernblot lieferte erstmals ein Signal für mARC 1, bei dem für das mARC 1-Protein zu erwartende Molekulargewicht von ca. 35 kDa, und zwar in den Monozyten, das im Folgenden genauer untersucht werden sollte. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Erythrozyten mARC 2 exprimieren. Für die Monozyten wurde ein sehr schwaches mARC 2 Signal erhalten, wohingegen die PMNs für keines der mARC Proteine ein Signal lieferten. Im Vergleich der Ergebnisse von Westernblot und Benzamidoximreduktion wurde deutlich, dass die PMNs die stärkste Reduktaseaktivität der untersuchten Blutzellen aufgewiesen haben, allerdings im Westernblot kein Signal lieferten. In den Monozyten hingegen wurde ein Signal für beide mARC Proteine detektiert, es konnte allerdings keine Reduktaseaktivität bestimmt werden.

Das Monozytenhomogenat wurde einer Zentrifugation unterzogen, mit der die löslichen Proteine von den membranständigen getrennt wurden. Der erhaltene Überstand wurde aufkonzentriert und im Vergleich zum Homogenat und dem erhaltenen Pellet per Westernblot untersucht. Im aus dem Cytosol erhaltenen Überstand wurde ein Protein detektiert, das ca. 36 kDa groß war und eindeutig vom mARC 1 Antikörper detektiert wurde. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mARC 1 als ein lösliches Protein detektiert. Dieses Protein sollte in weiterführenden Arbeiten

genauer untersucht werden. Das könnte mit Hilfe der zweidimensionalen SDS-Gelelektrophorese geschehen, um dann eine bessere Trennung als im eindimensionalen Gel zu erhalten. Der so erhaltene Spot sollte dann per ESI-MS analysiert werden.

Für den im Rahmen dieser Arbeit entwickelten ELISA für mARC 2 wurde zunächst ein Peptid synthetisiert und damit ein polyklonaler Antikörper in der Ziege hergestellt. Das Sandwich-ELISA-System wurde mit rekombinantem mARC 2 und auch mit dem für die Immunisierung der Ziege synthetisierten Peptid kalibriert. Die Kalibrierung mit dem Peptid lieferte keine zufrieden stellenden Ergebnisse, also musste mit dem rekombinanten Protein kalibriert werden. Ein Antikörper, der zur Kalibrierung eines ELISA verwendet wird, muss spezifisch gegen das zu quantifizierende Protein sein, der Antikörper sollte sowohl für das Kalibrierungsprotein als auch für das zu untersuchende Homogenat nur eine Bande im Westernblot anzeigen. Da das für die Kalibrierung verwendete rekombinante Protein zwei Banden von dem Antikörper im Westernblot detektiert wurden, könnte man versuchen, das rekombinante Protein per Größenausschlusschromatographie zu reinigen, um dann wirklich nur mit dem 35 kDa Protein zu kalibrieren.

Die Ergebnisse der ELISA-Untersuchungen verdeutlichten, dass signifikante Unterschiede des mARC 2 Gehalts innerhalb der untersuchten Zelllinien und Gewebe zu verzeichnen sind. Die beiden untersuchten Zelllinien, Caco-2 und HEK-293 und die Blutzellhomogenate enthalten ähnliche und geringe Mengen an mARC 2.

Der Vergleich der porcinen Gewebe veranschaulichte, dass gegenüber dem porcinen Fettthomogenat mARC 2 in deutlich höheren Raten in den porcinen Hepatozyten und den porcinen Schilddrüsenfollikeln exprimiert wurde. In diesen beiden Geweben wurde drei bis sechsmal mehr mARC 2 detektiert als im Fettgewebe. Die aus den ELISA Untersuchungen erhaltenen Ergebnisse sind konform mit denen der Westernblots. Auch hier wurden die höchsten Expressionsraten in Leber, Schilddrüse und Niere erhalten. Die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen ELISA Daten bestätigen das mRNA-Expressionsschema für mARC 2. Demnach wurden die höchsten mRNA Mengen in Schilddrüse, Leber, Lunge und Niere gefunden. Im Blut wurde hingegen eine nur, wie auch für die meisten anderen Gewebe, durchschnittliche Konzentration an mARC 2 detektiert (Su *et al.*, 2004). Die per ELISA erhaltenen Daten stehen ebenso wie die Westernblot Ergebnisse in deutlicher Diskrepanz zu den Ergebnissen

der Benzamidoximreduktionsstudien. Die Benzamidoximreduktion fand in allen untersuchten Zelllinien und Geweben in ähnlichem Ausmaß ( $V_{\max}$  etwa  $1,5 \text{ nmol} \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ) statt, die Reduktion in den PMN und Erythrozyten war höher als in den anderen Zelllinien und Geweben. Im ELISA waren grundsätzlich deutlichere Unterschiede an mARC 2-Gehalten zu erkennen (Faktor sechs von porcinem Fettgewebe gegenüber porcinen Hepatozyten). Die Blutzellhomogenate, die die höchsten Umsatzraten für Benzamidoxim lieferten, zeigten im ELISA eine durchschnittliche Expressionsrate von ca.  $0,5 \text{ ng mARC} \cdot \text{mg Protein}^{-1}$  für Erythrozyten und in den PMNs konnte per ELISA kein mARC 2 detektiert werden. Diese Ergebnisse bestätigte der Westernblot.

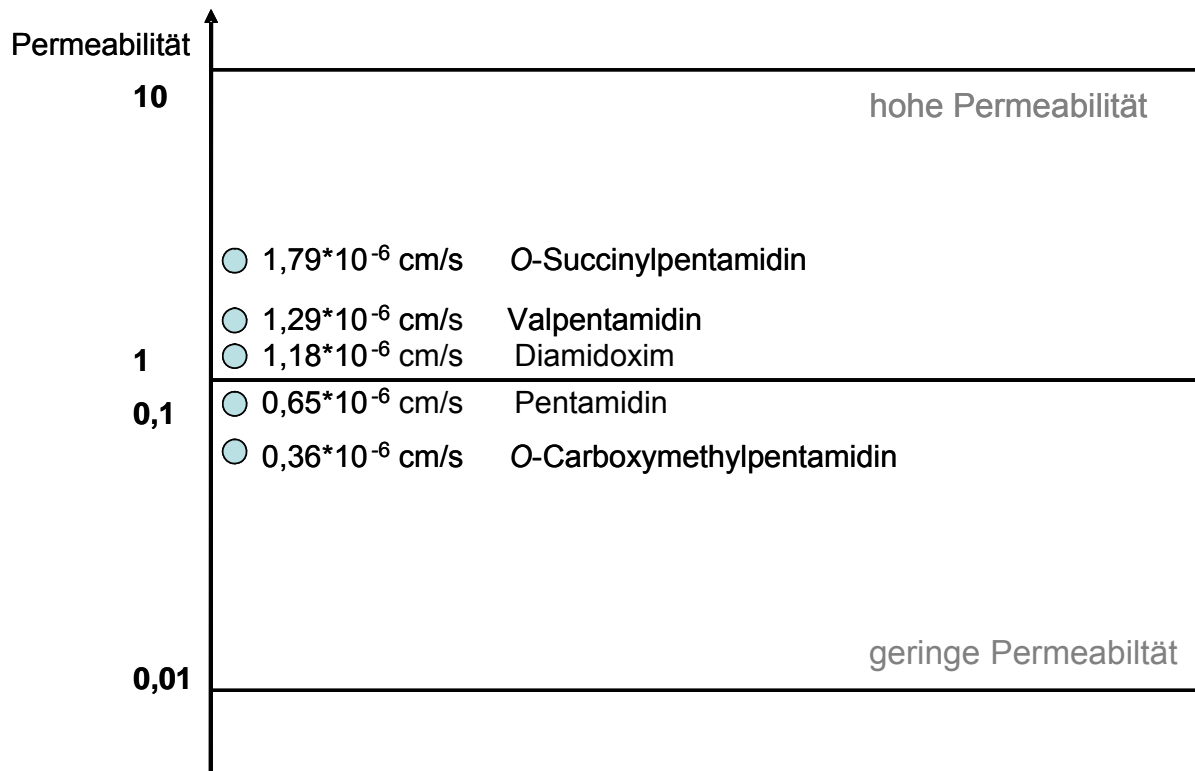
Die Benzamidoximreduktion wurde als Markerreaktion für mARC 2 verwendet. Um Aussagen über die katalytische Aktivität verschiedener Chargen von Mitochondrien aus einem Gewebe zu treffen, ist diese Reaktion sicherlich verwendbar. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen jedoch deutlich, dass die Benzamidoximreduktion für die Quantifizierung und die Herausstellung verschiedener mARC 2 Expressionsraten in unterschiedlichen Geweben keinesfalls geeignet ist. Die Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin wird von Cytochrom  $b_5$ , Cytochrom  $b_5$  Reduktase und mARC zusammen katalysiert. Da die Anwesenheit von mARC für die Reduktion nicht zwingend erforderlich ist, kann mit Hilfe der Benzamidoximreduktion keine Aussage zu mARC 2 allein, ohne Beachtung der beiden anderen Enzyme der Elektronentransportkette, getätigt werden. Weiterhin muß beachtet werden, dass Cytochrom  $b_5$  und Cytochrom  $b_5$  Reduktase ebenso wie die mARC-Proteine unterschiedliche Expressionsraten innerhalb der verschiedenen Gewebe aufweisen (Su *et al.*, 2004). Es muss nicht immer ein bestimmtes der drei Proteine, die am Elektronentransport beteiligt sind, limitierend für die Gesamtreaktion sein.

Das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte ELISA System jedoch ermöglicht die separate Untersuchung hinsichtlich der Quantität von mARC 2. Somit steht ein methodisches Instrument zur Verfügung, das die Erstellung eines mARC 2 Expressionsschematas auf Proteinebene aller Gewebe zulässt.

---

## 4. Zusammenfassung und Ausblick

Die vorliegende Arbeit befasste sich mit der Untersuchung verschiedener Amidinprodrugs. Amidine stellen das wirksame Prinzip vieler Arzneistoffe dar und liegen aufgrund ihrer Basizität in physiologischen Medien protoniert vor. Daher können sie die Membranen des Gastrointestinaltrakts nicht durch passive Diffusion überwinden und werden auf diesem Weg nicht resorbiert. Die Überführung der Amidine in Amidoxime stellt neben den weiteren Prodrug-Prinzipien eine erfolgreiche Methode zur Erhöhung der Bioverfügbarkeit dar. Die Hydroxylierung der Amidin-Funktion führt zu einem Anstieg der Lipophilie und einem Verlust der Basizität, so dass Amidoxime unter physiologischen Bedingungen nicht protoniert werden und somit besser durch die Membranen des Gastrointestinaltrakts diffundieren können (Clement, 2002). Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Prodrugs des Pentamidins im Caco-2 Modell untersucht. Pentamidin wird zur Therapie und Prophylaxe der Afrikanischen Schlafkrankheit eingesetzt. Auf der Suche nach oral verfügbaren Arzneistoffen für den Einsatz bei der Afrikanischen Schlafkrankheit wurden verschiedene Prodrugs des Pentamidins entwickelt. Mit Hilfe von Caco-2 Studien und den daraus resultierenden Ergebnissen zu Transport und Permeabilität der entsprechenden Verbindungen können ohne aufwendige, teure und ethisch kritische Tierstudien Aussagen zur oralen Bioverfügbarkeit getroffen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Permeabilitätswerte für das Pentamidin und die Prodrugs des Pentamidins: Diamidoxim, Valpentamidin, O-Succinylpentamidin und O-Carboxymethylpentamidin bestimmt. Nach dem BCS-System lassen sich Verbindungen anhand ihrer Permeabilitätswerte einteilen. Im Folgenden sind die Ergebnisse der Einteilung dargestellt.



**Abbildung 4-1: Einteilung der Prodrugs nach dem BCS-System**

Pentamidin weist eine geringe Permeabilität auf, der Arzneistoff muss i.v. verabreicht werden. Das Diamidoxim zeigt bereits eine deutlich gesteigerte Permeabilität gegenüber dem Pentamidin. Auf einem ähnlichen Niveau wie das Diamidoxim befand sich hinsichtlich der Permeabilität das Valpentamidin. Das O-Succinylpentamidin konnte von den untersuchten Prodrugs am besten durch die Caco-2 Membran diffundieren und wies den höchsten Permeabilitätswert auf. Gegenüber dem Pentamidin konnte eine Permeabilitätserhöhung um Faktor drei erreicht werden. Somit steht mit dem O-Succinylpentamidin eine Verbindung zur Verfügung, die als potentieller oral verfügbarer Arzneistoff für die Afrikanische Schlafkrankheit angesehen werden kann. Mit den im Rahmen dieser Arbeit etablierten Caco-2 Permeabilitätsuntersuchungen können auch weitere im Arbeitskreis synthetisierte Prodrugs auf die Eignung als oral verfügbarer Arzneistoff getestet werden.

An der Reduktion *N*-hydroxylierter Prodrugs wie z.B. dem zuvor untersuchten Diamidoxim des Pentamidins ist neben Cytochrom  $b_5$  und Cytochrom  $b_5$  Reduktase das 2006 entdeckte mARC-Enzym beteiligt (Havemeyer *et al.*, 2006). In vorangegangenen Studien wurden mit Hilfe verschiedener rekombinanter mARC Proteine die Reduktion unterschiedlicher *N*-hydroxylierter Verbindungen untersucht Grünwald (2008). Prodrugs werden häufig zunächst in Zellkultursystemen hinsichtlich



Transport, Permeabilität und Biotransformation getestet. Somit ist es von großem Interesse, diese Zellkultursysteme auf das neu entdeckte Enzym zu untersuchen, um damit sicherzustellen, dass die zu untersuchende Reduktion theoretisch stattfinden kann. Da die physiologische Bedeutung des mARC Enzyms bislang ungeklärt ist, sollte eine Quantifizierung von mARC mit Hilfe der Markerreduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin durchgeführt werden. Die mRNA-Expressionslevel für humanes Gewebe weisen auf hohe Expressionsraten von mARC 2 in Schilddrüse, Leber, Niere und Lunge hin, wohingegen die anderen untersuchten Gewebe ähnliche und geringe Expressionsraten zeigen (Su *et al.*, 2004). Untersuchungen sollten mit Leber, Schilddrüse und verschiedenen Blutzellenfraktionen durchgeführt werden. Neben der Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin wurden im Rahmen dieser Arbeit Untersuchungen mit Hilfe von Westernblots durchgeführt. Als ein weiteres Instrument der Quantifizierung von Enzymen auf der Proteinebene wurde ein ELISA für mARC 2 entwickelt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Caco-2 Zellen und HEK-293 Zellen auf mARC untersucht. In beiden Zelllinien konnte das Enzym nachgewiesen werden. Die Benzamidoximreduktion lief im Vergleich zu den anderen untersuchten Geweben in ähnlichem Ausmaß ab. Laut Westernblot lag in beiden Zelllinien hauptsächlich mARC 2 vor. Die ELISA-Ergebnisse zeigten, dass in beiden Zelllinien mARC 2 exprimiert wurde. Die Raten lagen auf einem ähnlichen Niveau wie die der humanen Blutzellen, aber deutlich unter denen der porcinen Leber- und Schilddrüsenproben. Als Ergebnis kann an dieser Stelle festgehalten werden, dass die untersuchten Zelllinien das Enzym mARC 2 exprimierten und somit für Untersuchungen zur Reduktion *N*-hydroxylierter Verbindungen, an denen mARC beteiligt ist, herangezogen werden können.

Neben den zwei Zelllinien wurden als humanes Gewebe verschiedene Blutzellfraktionen und primäre, porcine Leber- und Schilddrüsenzellen untersucht.

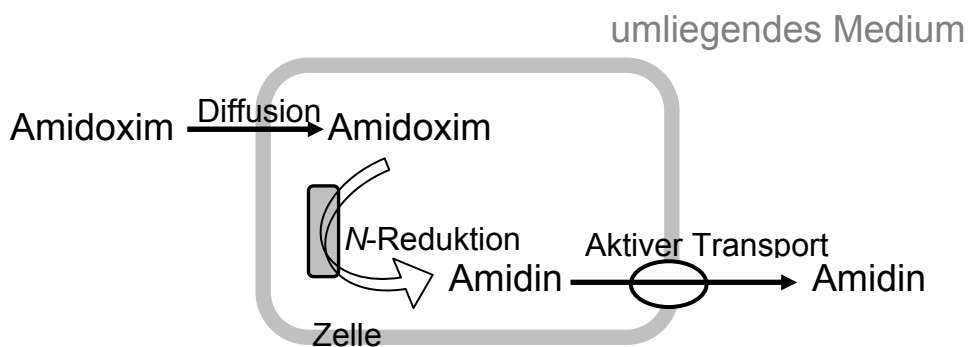
Die Benzamidoximreduktion lief in allen untersuchten Geweben ähnlich stark ab. Die Zeitabhängigkeiten zeigten immer, dass das intrazellulär gebildete Benzamidin in großem Ausmaß aus den Zellen in das umliegende Medium transportiert wurde. Die kinetischen Untersuchungen folgten dem Verlauf nach Michaelis-Menten, die Parameter lagen alle im ähnlichen Konzentrationsbereich. Die durchgeführten Temperaturabhängigkeiten verdeutlichten, dass der Benzamidintransport aus den Zellen heraus stark temperaturabhängig stattfand, da sich das Benzamidin bei 4 °C

#### 4. Zusammenfassung und Ausblick

---

im Gegensatz zu 37 °C intrazellulär anreichterte. Es handelte sich vermutlich um einen aktiven Transport des Amidins aus der Zelle hinaus in das umliegende Medium.

In der folgenden Abbildung sind die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse zu den Transportprozessen von Amidin und Amidinprodrug Amidoxim schematisch dargestellt worden.



**Abbildung 4-2: Transportprozesse von Amidoxim und Amidin**

Dieser Sachverhalt könnte in separaten Transportstudien genauer beleuchtet werden, wird aber nur für methodische Grundlagenforschung von Interesse sein.

Eine leicht erhöhte Reduktaseaktivität gegenüber Leber und Schilddrüse konnte für Erythrozyten und PMNs verzeichnet werden. Die Untersuchungen per Westernblot ergaben, dass in Erythrozyten und Monozyten mARC 2 exprimiert wurde. Weiterhin konnte in den humanen Monozyten per Westernblot mARC 1 detektiert werden. Die Zentrifugation und damit die Auftrennung in lösliche und membranständige Proteine ergab, dass mARC 1 löslich im Cytosol der humanen Monozyten vorkommt. Hiermit sollten weitere Studien in zukünftigen Arbeiten durchgeführt werden. Eine Untersuchung unter Einbeziehung von Geschlecht, Alter und Gesundheitszustand der Probanden wäre von Interesse.

Die Studien mit porcinen Schilddrüsenfollikeln verdeutlichten, dass mARC in hohem Ausmaß in der Schilddrüse exprimiert wurde. Weiterhin konnte an verschiedenen humanen und murinen Schilddrüsenzelllinien gezeigt werden, dass die TSH-Stimulation der Zellen die Reduktaseaktivität um den Faktor zwei bis drei gegenüber Zellen, die nicht mit TSH stimuliert wurden, reduziert. Einen weiteren Hinweis auf eine Beteiligung von mARC an den metabolischen Vorgängen in der Schilddrüse stellt die Hemmung der Reduktaseaktivität durch das Thyreostatikum Thiamazol dar. In zukünftigen Studien sollten weitere Thyreostatika an rekombinanten mARC Enzymen untersucht werden.

Der im Rahmen dieser Arbeit entwickelte ELISA bestätigte für die hier untersuchten Gewebe das mRNA Expressionsschema für mARC 2 (Su *et al.*, 2004) auf der Proteinebene. Für porcine Schilddrüse und Leber wurden deutlich erhöhte mARC 2-Gehalte gegenüber dem Fettgewebe und den Blutzellen Monozyten und Erythrozyten gefunden. Die Ergebnisse wurden durch die aus den Westernblots erhaltenen Ergebnisse bestätigt. Die Diskrepanz der ELISA Daten und der Ergebnisse der Benzamidoximreduktasestudien zeigten, dass die Quantifizierung der mARC Proteine aus Gewebehomogenaten nicht per Benzamidoximreduktion durchgeführt werden sollte, sondern mit Hilfe von spezifischen Antikörpern im ELISA. Dieses ELISA System stellt ein methodisches Instrument zur Verfügung, mit dem in zukünftigen Arbeiten ein Expressionsschema von mARC 2 für humane Gewebe erstellt werden kann. Eine Erweiterung für mARC 1 wäre für dieses Forschungsgebiet von Interesse.

---

## 5. Materialien und Geräte

### 5.1 Substanzen

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemikalien stammten, wenn nicht anders in der Tabelle aufgeführt, von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen. Alle Chemikalien wurden in höchster verfügbarer Reinheit bezogen.

Substanz	Hersteller/Lieferant
Amersham ECL Plus™ Western Blotting Reagent	GE Healthcare, UK
Anti-MOSC 1	LifeSpan, Seattle, (USA)
Bacillol Plus®	Bode Chemie GmbH, Hamburg
BCA-Kit zur Proteinbestimmung	Pierce, Rockford, USA
Dulbecos modified Eagle Medium mit Glutamax-I, 4500 mg/l D-Glucose ohne Natriumpyruvat (DMEM)	Invitrogen GmbH, Darmstadt
Dimethylsulfoxid	Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe
Donkey-anti-Goat (gekoppelt an POD)	Jackson Research, Suffolk, (UK)
Eagles MEM	Invitrogen GmbH, Darmstadt
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt
Fötale Kälberserum (südamerikanischer Herkunft mit EU-Zulassung, Virus- und Mycoplasmen getestet, 3x filtriert)	Invitrogen GmbH, Darmstadt
Fungizone Antimykotika (0,25-2,5 µg/ml Amphotericin B)	Invitrogen GmbH, Darmstadt
Goat-anti-Rabbit (gekoppelt an POD)	Jackson Research, Suffolk, (UK)
HBSS (Hanks Balanced Salt Solution) mit Natrium Bicarbonat, steril	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

<b>Substanz</b>	<b>Hersteller/Lieferant</b>
HEPES(4-(2-Hydroxyethylpiperazin-1-ethansulfonsäure)	Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt
Methanol HPLC Grade	J.T. Baker, Deventer, NL
MES (Morpholinoethylsulfonsäure)	Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe
MOSC1 Antibody	Lifespan, Seattle, USA
Penicillin-Streptomycin-Glutamin-Lösung (100x)	Invitrogen GmbH, Darmstadt
Pentamidinisethionat (Pentacrinat®)	Aventis, Frankfurt
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) ohne $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$	PAA Laboratories GmbH, Colbe
Polymorhprep™	AXIS-SHIELD PoC AS , Oslo (N)
Collagen R	Serva, Heidelberg
RPMI 1640 Medium mit 20 mM HEPES, 0,85 g/l Natrium Bicarbonat, ohne Glutamin	Invitrogen GmbH, Darmstadt
Trypanblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Trypsin-EDTA-Lösung (10x) 0,5 % Trypsin, 5,3 mM EDTA•4Na	Invitrogen GmbH, Darmstadt
Williams Medium E	Biochrom, Berlin

### 5.2 Materialien

<b>Materialien</b>	<b>Hersteller/Lieferant</b>
Amersham Hyperfilm™ ECL	GE Healthcare, München
Cryoröhrchen (1,8 ml)	Greiner, Frickenhausen
Einfriercontainer Nalgene Cryo 1 °C Freezing Container „Mr. Frosty“	Nunc GmbH, Wiesbaden
Fluoreszenzplatten, F-Plate, 96 well, flacher Boden, unsteril, ohne Oberflächenbehandlung	Nunc GmbH, Wiesbaden
Gewebekulturflaschen (25, 75 cm <sup>2</sup> mit Filter im Deckel für adherent wachsende Zellen)	Greiner, Frickenhausen
Gewebekulturplatten, ohne Oberflächenbehandlung (6, 12, 24 wells)	Greiner, Frickenhausen
Multifly® - Set	Sarstedt, Nümbrecht
PP-Röhrchen, steril (15, 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Greiner, Frickenhausen
Serologische Pipetten, steril (2, 5, 10, 25 ml)	Greiner, Frickenhausen
S-Monovette®	Sarstedt, Nümbrecht
ThinCerts ( PET, 113,1 mm <sup>2</sup> , 0,4 µm Porengröße)	Greiner, Frickenhausen

### 5.3 Geräte

<b>Geräte</b>	<b>Hersteller</b>
Begasungsbrutschrank, Typ HS12	Heraeus, Hanau
Cawomat 2000 IR	CAWO, Schrobenhausen
Fluoreszenzplattenleser	Polarstar Optima BMG Labtech, Jena
Inverses Mikroskop IX 50	Olympus, Hamburg
Mikroplate Reader Varian Cary 50 MPR	VarianGmbH, Darmstadt
Mikroliterzentrifuge Hettich	Hettich Zentrifuge, Tuttlingen
Mini-PROTEAN Tetra Electrophoresis System	Biorad, München
Multipipette Multipette®	Eppendorf AG, Hamburg
Neubauer Zählkammer	Brand GmbH, Wertheim
Platteninkubator DTS-4	LTF, Wasserburg
pH-Messgerät inoLab® pH level 1	Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weinheim
Pipetten Reference® Eppendorf	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettiergerät „accu jet“	Brand GmbH, Wertheim
Schüttelwasserbad GFL 1087	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Spektralphotometer Varian Cary ® 50 Bio mit Water Peltier system PCB 150	Varian GmbH Darmstadt
Sterilbank Klasse 2 Herasafe, Typ HS 12	Heraeus, Hanau
TEER-Messgerät EVOM	World Precision Instruments, Berlin
Tischzentrifuge Hettich Mikro 200	Hettich Zentrifuge, Tuttlingen
Ultraschallbad, Sonorex, Super RK 510H	Bandelin, Berlin
Ultrazentrifuge L7-65, Rotor 45 Ti	Beckmann, München
Vortexer IKA-Vibrax-VXR	IKA Werke, Staufen
Waage MC1, Laboratory LC 620S	Sartorius, Göttingen
Waage MC1, Research RC 210P	Sartorius, Göttingen
Vakuum-Sicherheits-Absaugsystem	HCL Bio Tech, Bovenden

---

## 6. Literaturverzeichnis

ABDA DATENBANK. (2004). Pentacrinat. *Fa. Aventis*.

ADSON, A., RAUB, T. J., BURTON, P. S., BARSHUN, C. L., HILGERS, A. R., AUDUS, K. L. & HO, N. F. H. (1994). Quantitative Approaches To Delieate Paracellular Diffusion in Cultured Epithelial Cell Monolayers. *J Pharm Sci*, 83:1529-1536.

ALBERT, A. (1958). Chemical aspects of selective toxicity. *Nature*, 182:421-2.

ALBERT, A., GOLDACRE, R. & PHILLIPS, J. (1948). The strength of heterocyclic bases. *J Chem Soc*, 2240-2249.

AMIDON, G. L., LENNERNAS, H., SHAH, V. P. & CRISON, J. R. (1995). A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharm Res*, 12:413-20.

ANANTHARAMAN, V. & ARAVIND, L. (2002). MOSC domains: ancient, predicted sulfur-carrier domains, present in diverse metal-sulfur cluster biosynthesis proteins including Molybdenum cofactor sulfurases. *FEMS Microbiol Lett*, 207:55-61.

ARTURSSON, P. (1989). Epithelial Transport of Drugs in Cell Culture. I: A Model for Studying the Passive Diffusion of Drugs over Intestinal Absorptive (Caco-2)cells. *J Pharm Sci*, 79:476-482.

ARTURSSON, P. (1991). Cell cultures as models for drug absorption across the intestinal mucosa. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 8:305-30.

BARRETT, M. P., BOYKIN, D. W., BRUN, R. & TIDWELL, R. R. (2007). Human African trypanosomiasis: pharmacological re-engagement with a neglected disease. *Br J Pharmacol*, 152:1155-71.

BARRETT, M. P., BURCHMORE, R. J. S., STICH, A., LAZZARI, J. O., FRASCH, A. C., CAZZULO, J. J. & KRISHNA, S. (2003). The trypanosomiasis. *Lancet*, 362:1469-1480.

BARRETT, M. P. & GILBERT, I. H. (2006). Targeting of toxic compounds to the trypanosome's interior. *Adv Parasitol*, 63:125-83.

BARTHE, L., WOODLEY, J. F., KENWORTHY, S. & HOUIN, G. (1998). An improved everted gut sac as a simple and accurate technique to measure paracellular transport across the small intestine. *Eur J Drug Metab and Pharmacokin*, 23:313-323.



- BASSELIN, M., DENISE, H., COOMBS, G. H. & BARRETT, M. P. (2002). Resistance to Pentamidine in *Leishmania mexicana* Involves Exclusion of the Drug from the Mitochondrion, *Antimicrob Agents Chemother*, 43(12): 3731-3738.
- BEEDHAM, C. (1985). Molybdenum hydroxylases as drug-metabolizing enzymes. *Drug Metab Rev*, 16:119-56.
- BEEDHAM, C. (1997). The role of non-P450 enzymes in drug oxidation. *Pharm World Sci*, 19:255-63.
- BERGER, B. J., HALL, J. E. & TIDWELL, R. R. (1990). The distribution of multiple doses of pentamidine in rats. *Pharmacol Toxicol*, 66:234-6.
- BERNHEIM, M. L. (1969). The hydroxylamine reductase of mitochondria. *Arch Biochem Biophys*, 134:408-13.
- BERNHEIM, M. L. (1972). The reduction of hydroxylamine and some aryl hydroxamates by liver mitochondria from mammals and birds. *Enzymologia*, 43:167-76.
- BERNHEIM, M. L. & HOCHSTEIN, P. (1968). Reduction of hydroxylamine by rat liver mitochondria. *Arch Biochem Biophys*, 124:436-42.
- BITONTI, A. J., DUMONT, J. A. & McCANN, P. P. (1986). Characterization of *Trypanosoma brucei brucei* S-adenosyl-L-methionine decarboxylase and its inhibition by berenil, pentamidine and methylglyoxal bis(guanyldiazide). *Biochem J*, 237:685-689.
- BRAY, P. G., BARRETT, M. P., WARD, S. A. & DE KONING, H. P. (2003). Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: past, present and future. *Trends Parasitol*, 19:232-239.
- BUBOLZ, A. H., LI, H., WU, Q. & LIU, Y. (2005). Enhanced oxidative stress impairs cAMP-mediated dilation by reducing Kv channel function in small coronary arteries of diabetic rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 289:H1873-80.
- BUNDSCHUH, G., SCHNEEWEISS, B. & BRÄUER, H. (1992). Lexikon der Immunologie. *Medical Service München*.
- BÜRENHEIDE, A. (2006). Pharmakokinetik des Pentoximesters. *Dissertation Kiel*.
- CAMPBELL, W. H. (1999). Nitrate Reductase Structure, Function and Regulation: Bridging the Gap between Biochemistry and Physiology. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 50:277-303.
- CARTER, N. S., BERGER, B. J. & FAIRLAMB, A. H. (1995). Uptake of Diamidine Drugs by the P2 Nucleoside Transporter in Melarsen-sensitive and -resistant *Trypanosoma brucei brucei*, 1995, *J Biol Chem*, 270 (47): 28153-28157.
- CHAN, L. M., LOWES, S. & HIRST, B. H. (2004). The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability. *Eur J Pharm Sci*, 21:25-51.

## 6. Literaturverzeichnis

---

- CHAPPUIS, F., LOUTAN, L., SIMARRO, P., LEJON, V. & BUSCHER, P. (2005). Options for Field Diagnosis of Human African Trypanosomiasis, *Clin Microbiol Rev*, 18 (1):133-146.
- CLEMENT, B. (2002). Reduction of N-hydroxylated compounds: amidoximes (N-hydroxyamidines) as pro-drugs of amidines. *Drug Metab Rev*, 34:565-79.
- CLEMENT, B., DEMESMAEKER, M. & LINNE, S. (1996). Microsomal Catalyzed N-Hydroxylation of Guanabenz and Reduction of the N-Hydroxylated Metabolite: Characterization of the Two Reactions and Genotoxic Potential of Guanoxabenz, *Chem Res Toxicol*, 9: 682-688.
- CLEMENT, B., SCHMEZER, P., WEBER, H., SCHLEHOFER, J. R., SCHMITT, S. & POOL, B. L. (1988a). Genotoxic activities of benzamidine and its N-hydroxylated metabolite benzamidoxime in *Salmonella typhimurium* and mammalian cells. *J Cancer Res Clin Oncol*, 114:363-8.
- CLEMENT, B., SCHMITT, S. & ZIMMERMANN, M. (1988b). Enzymatic reduction of benzamidoxime to benzamidine. *Arch Pharm (Weinheim)*, 321:955-6.
- CLEMENT, B. & ZIMMERMANN, M. (1988). Mechanism of the Microsomal N-Hydroxylation of Para-Substituted Benzamidines. *Biochem Pharmacol*, 37:4747-4752.
- DE KONING, H. P. (2001). Uptake of Pentamidine in *Trypanosoma brucei brucei* is Mediated by Three Distinct Transporters: Implications for Cross-Resistance with Arsenicals. *Mol Pharmacol*, 59:586-592.
- DIAO, L., EKINS, S. & POLLI, J. E. (2009). Novel inhibitors of human organic cation/carnitine transporter (hOCTN2) via computational modeling and in vitro testing. *Pharm Res*, 26:1890-900.
- EDWARDS, K. J., JENKINS, T. C. & NEIDLE, S. (1992). Crystal structure of a pentamidine-oligonucleotide complex: implications for DNA-binding properties. *Biochemistry*, 31:7104-9.
- ETTMAYER, P., AMIDON, G. L., CLEMENT, B. & TESTA, B. (2004). Lessons learned from marketed and investigational prodrugs. *J Med Chem*, 47:2393-404.
- FAIRLAMB, A. H. (2003). Chemotherapy of human African Trypanosomiasis: current and future prospects. *Trends Parasitol*, 19:488-494.
- FOGH, J., FOGH, J. M. & ORFEO, T. (1977). One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J Natl Cancer Inst*, 59:221-6.
- FRANCIS, S. E., SULLIVAN, D. J. J. & GOLDBERG, D. E. (1997). Hemoglobin metabolism in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Annu Rev Microbiol*, 51:97-123.

- FRAYHA, G. J., SMYTH, J. D., GOBERT, J. G. & SAVEL, J. (1997). The mechanisms of action of antiprotozoal and anthelmintic drugs in man. *Gen Pharmacol*, 28:273-299.
- FRÖHLICH, A. K. (2004). Studium neuer Phase-II-Reduktionen von ausgewählten Arzneistoffen mithilfe von Hepatozytenkulturen und UDP-Glucuronyltransferasen. *Dissertation*, Kiel.
- GAN, L.-S. L. & THAKKER, D. R. (1997). Applications of the Caco-2 model in the design and development of orally active drugs: elucidation of biochemical and physical barriers posed by the intestinal epithelium. *Adv Drug Del Rev*, 23:77-98.
- GLAHN, R. P., LEE, O. A., YEUNG, A., GOLDMAN, M. I. & MILLER, D. D. (1998). Caco-2 Cell Ferritin Formation Predicts Nonradiolabeled Food Iron Availability in an In Vitro Digestion/Caco-2 Cell Culture Model. *J Nutr.*, 128:1555-1561.
- GRAHAM, F. L., SMILEY, J., RUSSELL, W. C. & NAIRN, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*, 36:59-74.
- GRÜNEWALD, S. (2008). Studien zur Biotransformation *N*-hydroxylierter Verbindungen durch molybdänkofaktorabhängige Enzymsysteme. *Dissertation*, Kiel.
- GUTTERIDGE, W. E. (1969). Some effects of pentamidine di-isethionate on *Crithidia fasciculata*. *J Protozool*, 16:306-11.
- HAUPTMANN, J., PAINTZ, M., KAISER, B. & RICHTER, M. (1988). Reduction of a benzamidoxime derivative to the corresponding benzamide in vivo and in vitro. *Pharmazie*, 43:559-60.
- HAVEMEYER, A. (2006). Mitochondriale Benzamidoximreduktion: Identifizierung eines Molybdänkofaktorabhängigen Enzymsystems. *Dissertation Kiel*.
- HAVEMEYER, A., BITTNER, F., WOLLERS, S., MENDEL, R., KUNZE, T. & CLEMENT, B. (2006). Identification of the Missing Component in the Mitochondrial Benzamidoxime Prodrug-converting System as a Novel Molybdenum Enzyme, *J Biol Chem*: 281 (46): 34796-34802.
- HIDALGO, I. J., RAUB, T. J. & BORCHARDT, R. T. (1989). Characterization of the Human Colon Carcinoma Cell Line (Caco-2) as a Model System for Intestinal Epithelial Permeability. *Gastroenterology*, 96:736-49.
- HILLE, R. (1996). The Mononuclear Molybdenum Enzymes. *Chem Rev*, 96:2757-2816.
- HILLE, R. (2005). Molybdenum-containing hydroxylases. *Arch Biochem Biophys*, 433:107-16.
- HOFFMANN, C., ROCKSTROH, J. & KAMPS, B. S. (2007). HIV.NET 2007. *Steinhäuser Verlag*, 15. Auflage.

- HOLTKAMP, D. (2007). Isolierung eines Prodrug-Reduzierenden Enzymsystems aus der Schweineniere. *Dissertation Kiel*.
- HOVGAARD, L. & BRONDSTED, H. (1995). Drug delivery studies in Caco-2 monolayers. IV. Absorption enhancer effects of cyclodextrins. *Pharm Res*, 12:1328-32.
- JANSOHN, M. (2007). Gentechnische Methoden. *Spektrum Akademischer Verlag, München*.
- KADLUBAR, F. F., MCKEE, E. M. & ZIEGLER, D. M. (1973). Reduced pyridine nucleotide-dependent N-hydroxy amine oxidase and reductase activities of hepatic microsomes. *Arch Biochem Biophys*, 156:46-57.
- KADLUBAR, F. F. & ZIEGLER, D. M. (1974). Properties of a NADH-dependent N-hydroxy amine reductase isolated from pig liver microsomes. *Arch Biochem Biophys*, 162:83-92.
- KISKER, C., SCHINDELIN, H. & REES, D. C. (1997). Molybdenum-cofactor-containing enzymes: structure and mechanism. *Annu Rev Biochem*, 66:233-67.
- KITAMURA, S., SUGIHARA, K. & OHTA, S. (2006). Drug-metabolizing ability of molybdenum hydroxylases. *Drug Metab Pharmacokinet*, 21:83-98.
- KÖHRLE, J. & BRABANT, G. (2010). Synthesis, metabolism and diagnostics of thyroid hormones. *Internist (Berl)*.
- KULLAK-UBLICK, G. A. & BECKER, M.-B. (2003). Regulation of Drug and Bile Salt Transporters in Liver and Intestine. *Drug Metab Rev.*, 35:305-317.
- LENAERTS, K., MARIMAN, E., BOUWMAN, F. & RENES, J. (2005). Differentiation stage-dependent preferred uptake of basolateral (systemic) glutamine into Caco-2 cells results in its accumulation in proteins with a role in cell-cell interaction *FEBS Journal*, 272:3350-3364.
- LOURIE, E. M. & YORKE, W. (1939). Studies in chemotherapy. XXI. The trypanocidal action of certain aromatic diamidines. *Ann Trop Med Parasitol*, 33:289-304.
- MAKULU, D. R. & WAALKES, T. P. (1975). Interaction between aromatic diamidines and nucleic acids: possible implications for chemotherapy. *J Natl Cancer Inst*, 52:305-9.
- MÄSER, P., LÜSCHER, A. & KAMINSKY, R. (2003). Drug transport and drug resistance in African trypanosomes. *Drug Resist Updat*, 6:281-290.
- MEHLHORN, H. (2001). Encyclopedic Reference of Parasitology. *Springer Verlag Berlin Heidelberg New York*:618-638.
- MENDEL, R. R. & BITTNER, F. (2006). Cell biology of molybdenum. *Biochim Biophys Acta*, 1763:621-35.

- MENDEL, R. R., SMITH, A. G., MARQUET, A. & WARREN, M. J. (2007). Metal and cofactor insertion. *Nat Prod Rep*, 24:963-71.
- MICHAEL, S. (2000). Verbesserung der Intestinalen Resorption von Peptidwirkstoffen mit Hilfe von Gallensäuren, insbesondere Cholylsarcosin. *Dissertation Heidelberg*.
- MUTSCHLER, E., GEISLINGER, G., KRÖEMER, H. K. & SCHÄFER-KORTING, M. (2001). Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart*:5-41.
- NEUHOFF, S., UGELL, A.-L., ZAMORA, I. & ARTURSSON, P. (2005). pH-Dependent passive and active transport of acidic drugs across Caco-2 cell monolayers. *Europ J Pharm Sci*, 25:211-220.
- NEVE, E. P., ANDERSSON, T. B., NORDLING, Å. & INGELMAN-SUNDBERG, M. (2009). Metabolism of Drugs and other Xenobiotics by Enzyme Systems Present in the Mitochondrial Outer Membrane. *Poster ISSX, Nizza*.
- NILSSON, M., BJORKMAN, U., EKHOLM, R. & ERICSON, L. E. (1990). Iodide transport in primary cultured thyroid follicle cells: evidence of a TSH-regulated channel mediating iodide efflux selectively across the apical domain of the plasma membrane. *Eur J Cell Biol*, 52:270-81.
- OH, H., SIANO, B. & DIAMOND, S. (2008). Neutrophil isolation protocol. *J Vis Exp*, 17: 745.
- REH, R. (2007). Untersuchungen zur Beteiligung verschiedener Reduktasen an der Aktivierung von N- und S-oxygenierten prodrugs. *Dissertation Kiel*.
- RIECKERT, W. (1999). *In vivo* und *in vitro* Biotransformation von Pentamidinderivaten. *Dissertation Kiel*.
- SAÏ, P., BOILLOT, D., BOITARD, C., DEBRAY-SACHS, M., REACH, G. & ASSAN, R. (1983). Pentamidine, a new diabetogenic drug in laboratory rodents. *Diabetologia*, 25:418-423.
- SANDERSON, L., DOGRUEL, M., RODGERS, J., DE KONING, H. P. & THOMAS, S. A. (2009). Pentamidine movement across the murine blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers: effect of trypanosome infection, combination therapy, P-glycoprotein, and multidrug resistance-associated protein. *J Pharmacol Exp Ther*, 329:967-77.
- SANDS, M., KRON, M. & BROWN, R. (1985). Pentamidine: a review. *Rev Infect Dis*, 7:625-34.
- SCHNAUFER, A., DOMINGO, G. J. & STUART, K. (2002). Natural and induced dyskinetoplastic trypanosomatids: how to live without mitochondrial DNA. *Int J Parasitol*, 32:1071-1084.

## 6. Literaturverzeichnis

---

- SCHWARZ, G. (2005). Molybdenum cofactor biosynthesis and deficiency. *Cell Mol Life Sci*, 62:2792-810.
- SCHWARZ, G., BOXER, D. H. & MENDEL, R. R. (1997). Molybdenum cofactor biosynthesis. The plant protein Cnx1 binds molybdopterin with high affinity. *J Biol Chem*, 272:26811-4.
- SCHWARZ, G. & MENDEL, R. R. (2006). Molybdenum cofactor biosynthesis and molybdenum enzymes. *Annu Rev Plant Biol*, 57:623-47.
- SCHWARZ, J. (1996). Untersuchungen zur Pharmakokinetik von Derivaten des Pentamidins. *Dissertation Kiel*.
- SHAPIRO, T. A. & ENGLUND, P. T. (1995). The Structure and Replication of Kinetoplast DNA, *Annu Rev Microbiol*, 49: 117-143.
- SHAW, G., MORSE, S., ARARAT, M. & GRAHAM, F. L. (2002). Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. *Faseb J*, 16:869-71.
- SHIMIZU, R., SUKEGAWA, T., TSUDA, Y. & ITOH, T. (2008). Quantitative prediction of oral absorption of PEPT1 substrates based on in vitro uptake into Caco-2 cells. *Int J Pharm*, 354:104-110.
- SIMKÓ, J., CSILEK, A., KARÁSZI, J. & LŐRINCZ, I. (2008). Proarrhythmic Potential of Antimicrobial Agents. *Infection*, 36:194-206.
- SIMPSON, L. (1986). Kinetoplast DNA in trypanosomid flagellates. *Int Rev Cytol*, 99:119-79.
- SMITH, P. K., KROHN, R. I., HERMANSON, G. T., MALLIA, A. K., GARTNER, F. H., PROVENZANO, M. D., FUJIMOTO, E. K., GOEKE, N. M., OLSON, B. J. & KLENK, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, 150:76-85.
- SOEIRO, M. N., DE SOUZA, E. M., STEPHENS, C. E. & BOYKIN, D. W. (2005). Aromatic diamidines as antiparasitic agents, *Expert Opin Investig Drugs*, 14:957-72.
- STEAD, A. M. W., BRAY, P. G., EDWARDS, I. G., DEKONING, H. P., ELFORD, B. C., STOCKS, P. A. & WARD, S. A. (2001). Diamidine Compounds: Selective Uptake and Targeting in Plasmodium falciparum, *Mol Pharmacol*, 59: 1298-1306.
- STICH, A. & STEVERDING, D. (2002). Die Rückkehr einer Seuche: Trypanosomen. *Biologie in unserer Zeit*, 32:294-302.
- STRINGER, J. R. (2002). Pneumocystis. *Int J Med Microbiol*, 292:391-404.
- STRINGER, J. R., BEARD, C. B., MILLER, R. F. & WAKEFIELD, A. E. (2002). A New Name (Pneumocystis jiroveci) for Pneumocystis from Humans. *Emerg Infect Di.*, 8:891-6.

- SU, A. I., WILTSHIRE, T., BATALOV, S., LAPP, H., CHING, K. A., BLOCK, D., ZHANG, J., SODEN, R., HAYAKAWA, M., KREIMAN, G., COOKE, M. P., WALKER, J. R. & HOGENESCH, J. B. (2004). A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101:6062-7.
- TAKAHASHI, Y., KONDO, H., YASUDA, T., WATANABE, T., KOBAYASHI, S. & YOKOHAMA, S. (2002). Common solubilizers to estimate the Caco-2 transport of poorly water-soluble drugs. *Int J Pharm*, 246:85-94.
- TESTA, B. (1995). Biochemistry of redox reactions. *Academic Press, London*, (Hrsg. Testa, B. und Caldwell, J.):1-22.
- TESTA, B. & JENNER, P. (1976). Drug metabolism. *Marcel Dekker: New York*:271-312.
- THEWS, G., MUTSCHLER, E. & VAUPEL, P. (1999). Anatomie Physiologie und Pathophysiologie des Menschen, *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart*.
- TSUJI, A. & TAMAI, I. (1996). Carrier-Mediated Intestinal Transport of Drugs. *Pharm Res*, 13:963-977.
- USSING, H. H. & ZERAHN, K. (1951). Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. *Acta Physiol Scand*, 23:110-27.
- WAALKES, T. P. & MAKULU, D. R. (1976). Pharmacologic aspects of pentamidine. *Natl Cancer Inst Monogr*, 43:171-7.
- WAGNER, C. A., LUKEWILLE, U., KALTENBACH, S., MOSCHEN, I., BROER, A., RISLER, T., BROER, S. & LANG, F. (2000). Functional and pharmacological characterization of human Na(+)-carnitine cotransporter hOCTN2. *Am J Physiol Renal Physiol*, 279:F584-91.
- WAGNER, U. & HOHMANN, C. (2004). Reise- und Infektionskrankheiten. *Govi-Verlag Pharmazeutischer Verlag GmbH, Eschborn, PZ-Schriftenreihe*.
- WAHL, B. (2006). Biochemische Charakterisierung der c-terminalen Domäne der humanen Molybdäncofaktor-Sulfurase HMCS. *Braunschweig, Diplomarbeit*.
- WANG, Z. & ENGLUND, P. T. (2001). RNA interference of a trypanosome topoisomerase II causes progressive loss of mitochondrial DNA. *EMBO J*, 20:4674-83.
- WENZLER, T., BOYKIN, D. W., ISMAIL, M. A., HALL, J. E., TIDWELL, R. R. & BRUN, R. (2009). New treatment option for second-stage African sleeping sickness: in vitro and in vivo efficacy of aza analogs of DB289. *Antimicrob Agents Chemother*, 53:4185-92.
- WUNDT, J. (2008). Charakterisierung von NeoHepatozyten als Ersatz für humane Hepatozyten und Induktionsuntersuchungen. *Dissertation, Kiel*.

## 6. Literaturverzeichnis

---

- YABUUCHI, H., TAMAI, I., NEZU, J., SAKAMOTO, K., OKU, A., SHIMANE, M., SAI, Y. & TSUJI, A. (1999). Novel membrane transporter OCTN1 mediates multispecific, bidirectional, and pH-dependent transport of organic cations. *J Pharmacol Exp Ther*, 289:768-73.
- YUASA, H., MATSUDA, K. & WATANABE, J. (1993). Influence of Anesthetic Regimens on Intestinal Absorption in Rats. *Pharm Res*, 10:884-888.
- ZHANG, L., DRESSER, M. J., GRAY, A. T., YOST, S. C., TERASHITA, S. & GIACOMINI, K. M. (1997). Cloning and functional expression of a human liver organic cation transporter. *Mol Pharmacol*, 51:913-21.



---

## 7. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AO	Aldehydoxidase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
<i>Aqua bidest.</i>	zweifach destilliertes Wasser
<i>Aqua dem.</i>	demineralisiertes Wasser
BA	Benzamidin
BAO	Benzamidoxim
BCA	Bicinchonic acid (2,2'-Bischinolin-4,4'-dicarbonsäure)
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
BCS	Biochemisches Klassifizierungs System (Biochemical Classification System)
Caco-2	humane Kolonkarzinomzelllinie ( <u>C</u> olon <u>C</u> arcinoma Cell Line)
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECACC	European Collection of Cell Cultures
ECL	Enhanced Chemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESI	Elektrospray-Ionisation
FCS	Fetal Calf Serum
FDA	Food and Drug Administration
FPIX	Ferriprotoporphyrin
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
<i>h</i>	Stunde
HAT-29	humane Kolonkarzinomzelllinie
hmARC	humanes mARC Protein ( <i>H. sapiens</i> )
HBSS	Hanks Balanced Salt Solution
HEK-293	Humane Nierenzelllinie ( <u>H</u> uman <u>E</u> mryonic <u>K</u> idney Cell Line)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie

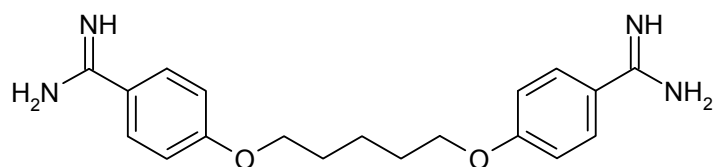
## 7. Abkürzungsverzeichnis

---

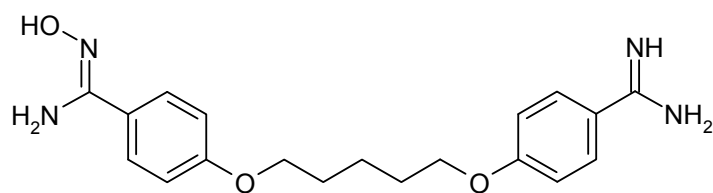
i.v.	intravenös
Kap.	Kapitel
kDa	Kilodalton
$K_m$	Michaelis-Menten-Konstante
mARC	mitochondrial Amidoxim Reducing Component
MeOH	Methanol
MES	Morpholinoethansulfonsäure
MOPS	4-Morpholinopropansulfonsäure
min	Minute
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid (reduzierte Form)
NR	Nitratreduktase
$P_{app}$	apparenter Permeabilitätskoeffizient
PBS	Phosphate Buffered Saline
PET	Polyethylenterephthalat
P-gp	P-Glykoprotein
PMN	Polymorphkernige Neutrophile Granulozyten
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RP	Umkehrphase (Reversed Phase)
rpm	Rotationen pro Minute
RPMI	Medium entwickelt am Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SO	Sulfitoxidase
Tab.	Tabelle
TEA	Tetraethyllessigsäure
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TSH	Thyreoidea-stimulierendes Hormon
UV	ultraviolett
Val	Valin
$V_{max}$	maximale Umsetzungsgeschwindigkeit
XOR	Xanthinoxidoreduktase
ZNS	Zentralnervensystem

---

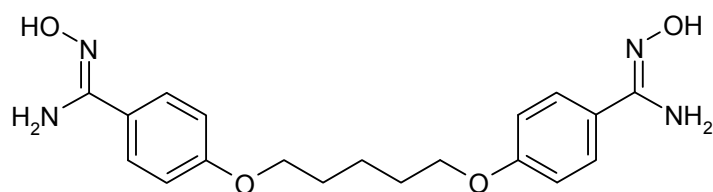
## 8. Strukturformelverzeichnis



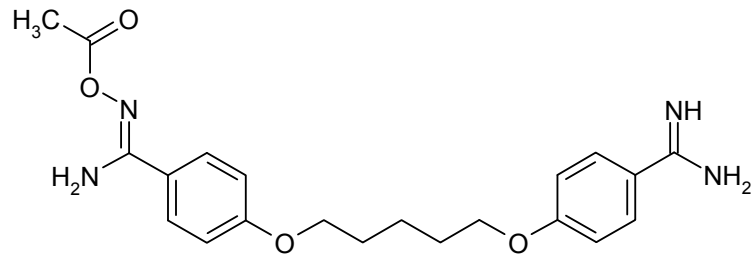
1,5-Bis(4'-amidinophenoxy)pentan  
= Pentamidin



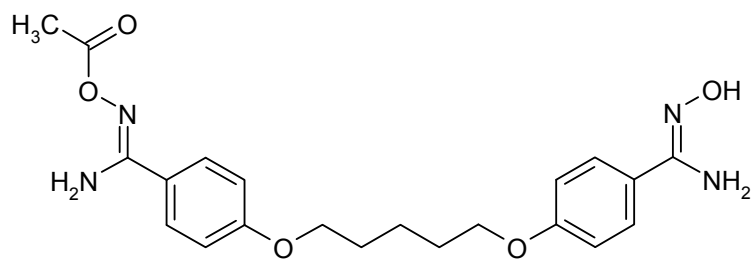
1-(4'-Hydroxyamidinophenoxy)-5-(4'-amidinophenoxy)pentan  
= Monoamidoxim (= *N*-Hydroxypentamidin)



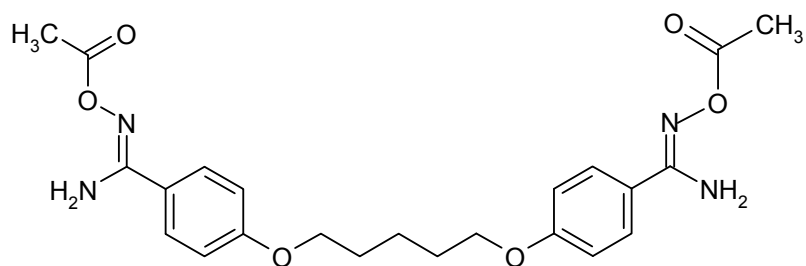
1,5-Bis(4'-hydroxyamidinophenoxy)pentan  
= Diamidoxim (= *N,N'*-Dihydroxypentamidin)



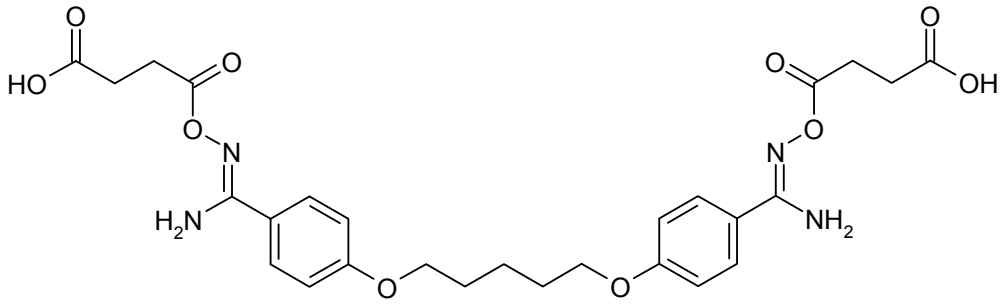
1-(4'-Acetoxyamidinophenoxy)-5-(4'-amidinophenoxy)pentan  
= Amidinamidoximester



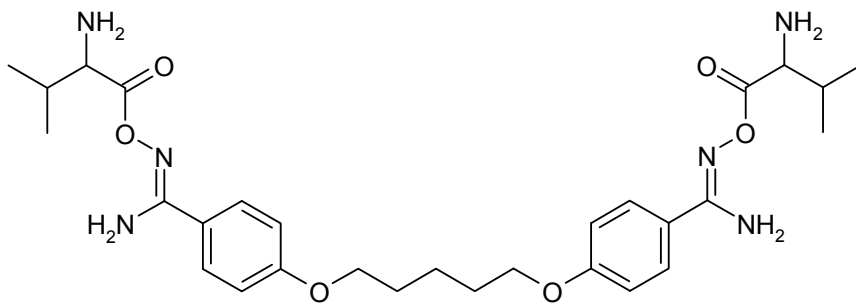
1-(4'-Acetoxyamidinophenoxy)-5-(4'-hydroxyamidinophenoxy)pentan  
= Monoester



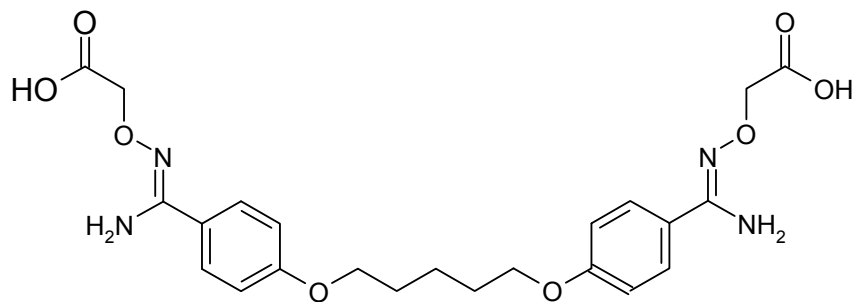
1,5-Bis(4'-acetoxyamidinophenoxy)pentan  
= Pentoximester



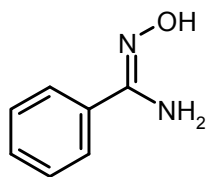
1,5-Bis[4'-(*N*-succinyloxy)amidinophenoxy]pentan  
= *O*-Succinylpentamidin



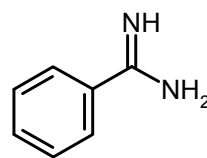
(*S*) 1,5-Bis[4'-(*N*-(2''-amino-3''-methylbutanoyloxy)amidino)phenoxy]pentan  
= Valpentamidin



1,5-Bis[4'-(*N*-carboxymethoxy)amidinophenoxy]pentan  
= *O*-Carboxymethylpentamidin



Benzamidoxim



Benzamidin



Die vorliegende Arbeit entstand am Pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel auf Anregung und unter der Leitung von

**Herrn Prof. Dr. Bernd Clement.**

Für die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis, die Überlassung des interessanten Promotionsthemas und die mir gewährte Unterstützung möchte ich mich bei meinem Doktorvater herzlich bedanken.

Herrn Prof. Thomas Kunze danke ich herzlich für seine immerwährende Diskussionsbereitschaft und für etliche wertvolle Ratschläge.

Frau Dr. Antje Havemeyer danke ich von Herzen für ihre Unterstützung in allen wissenschaftlichen Bereichen, aber vor allem für ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft und ihre grenzenlose Begeisterungsfähigkeit.

Herrn Dr. Florian Bittner (TU Braunschweig) danke ich für die wissenschaftlich anregende Zusammenarbeit und für die Bereitstellung der rekombinanten mARC-Proteine.

Herr Prof. Mikael Nilsson (Sahlgrenska, Göteborg, Schweden) gab mir die Möglichkeit, die Isolierung und Kultivierung primärer Schilddrüsenfollikel zu erlernen, dafür danke ich ihm herzlich.

Herrn Prof. Josef Köhrle (Institut für Experimentelle Endokrinologie & Endokrinologisches Forschungs-Centrum der Charité EnForCé, Berlin) und Herrn Dr. Kostja Renko danke ich für die Ermöglichung der Untersuchung verschiedener Schilddrüsenzelllinien in seinem Labor und ihr großes Interesse an dieser Arbeit.

Herrn Prof. Eric Beitz und seinem Arbeitskreis danke ich für die Ermöglichung der Zellkultivierung und die Durchführung von Westernblots in seinen Laboratorien aber auch für viele hilfreiche Anregungen. Frau Prof. Alban und ihrem Arbeitskreis gilt ein Dankeschön für die Aufnahme im Zellkulturlabor und die Hilfsbereitschaft bei Fragen zu ELISAs und der Blutzellisolierung.

## Danksagung

---

Sven danke ich für seine Hilfe und Unterstützung bei HPLC-Fragen und -problemen. Bei Lena möchte ich mich für die Assistenz in der Zellkultur bedanken. Petra danke ich für die Gewinnung der Mitochondrien. Bei Melissa möchte ich mich für die vielen durchgeführten Synthesen bedanken. Ein Dankeschön geht an Arne und Detlef für die kompetente Hilfe in EDV-Fragen und an Moni und Susanne für die Erledigung des „Papierkrams“. Allen Professoren, Mitarbeitern und Kollegen danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre am Institut.

Für die unkomplizierte Zusammenarbeit bei der Betreuung des dritten Semesters möchte ich mich bei Silke, Joscha, Martin, Alrun, Dennis, Gudrun, Meike, Lukas und Laura bedanken.

Sanja danke ich für die schönen gemeinsamen Jahre am Institut, für unsere Büroehre und für viele kurzweilige Stunden außerhalb des Instituts.

Für das kritische und konstruktive Korrekturlesen bedanke ich mich herzlich bei, Antje, Dorothea, Meike, Ulrike und meinen Eltern.

Meinen Großeltern danke ich für ihre Unterstützung und das unermüdliche Daumendrücken zu Zeiten des Studiums und der Promotion. Meinen Eltern gebührt ein inniger und besonders herzlicher Dank für die Unterstützung in allen Bereichen, der ich mir immer gewiss sein konnte.

Meinem Sohn Johann danke ich für unzählige wunderschöne Stunden voller Fröhlichkeit und Unbeschwertheit. Du hast diese Arbeit „rund“ gemacht!

Mein letzter, innigster und größter Dank gebührt meinem Mann Marc. Ich danke ihm für sein Interesse an meiner Arbeit, seine Hilfe und seine Unterstützung. Ohne Dich an meiner Seite hätte ich diese Arbeit nicht beenden können.



**Persönliche Daten**

Vor- und Familienname Ulrike Schwering, geb. Bacher  
Geburtsdatum 29.12.1979  
Geburtsort Hagenow  
Staatsangehörigkeit deutsch

**Schulbildung**

1986-1991 41. Polytechnische Oberschule, Rostock  
1991-1994 Musisches Gymnasium, Rostock  
1994-1999 Christian-Ludwig-Liscow Gymnasium, Wittenburg  
1996-1997 Cheslyn Hay High School, Staffordshire, England, UK  
Juni 1999 Allgemeine Hochschulreife

**Studium und Ausbildung**

1999-2004 Studium der Pharmazie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel  
Juli-Dezember 2004 Pharmaziepraktikum bei AstraZeneca, R&D Mölndal, Schweden, unter Anfertigung der Diplomarbeit: Ximelagatran Efflux by Fresh Rat Hepatocytes and Uptake by Injected Xenopus laevis Oocytes  
Januar-Juni 2005 Pharmaziepraktikum in der Merkurapotheke in Lübeck  
Juni 2005 Diplomprüfung  
August 2005 Erteilung der Approbation

**Promotion und Weiterbildung**

Seit Oktober 2005 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel und Anfertigung der vorliegenden Dissertation unter der Leitung von Prof. Dr. B. Clement  
Weiterbildung zum Fachapotheker für pharmazeutische Analytik  
Juni 2008-August 2009 Mutterschutz und Elternzeit



---

## **Erklärung zu § 9 Abs. 2 Nr. 2 der Promotionsordnung**

Der Inhalt dieser Arbeit wurde - abgesehen von der Beratung durch meinen Betreuer - selbstständig von mir erarbeitet und in dieser Form zusammengestellt. Die Arbeit hat an keiner anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen. Teilergebnisse dieser Arbeit wurden in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### **Publikation**

Gruenewald S, Wahl B, Bittner F, Hungeling H, Kanzow S, Kotthaus J, Schwering U, Mendel RR, Clement B.

The fourth molybdenum containing enzyme mARC: cloning and involvement in the activation of N-hydroxylated prodrugs. *J Med Chem.* (2008), 51(24),8173-7.

### **Tagungsbeiträge**

Poster

Ulrike Schwering, Anja Bürenheide, Bernd Clement

Diacetyldiamidoximeester of Pentamidine, a Prodrug for Treatment of Second Stage African Sleeping Sickness? *Frontiers in Medicinal Chemistry*, Berlin (2007)

Vortrag

Antje Havemeyer / Ulrike Schwering

The fourth human molybdenum containing enzyme mARC - active in the thyroid gland? 25. *Arbeitstagung Experimenteller Schilddrüsen-Forschung*, Bremen (2009)

Die Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden.

Kiel, im Juli 2010

Ulrike Schwering



In der Entwicklung oral verfügbarer Arzneistoffe werden Prodrug-Prinzipien angewendet, um hydrophile Verbindungen in eine lipophile Transportform zu überführen, welche dann eine verbesserte orale Bioverfügbarkeit aufweisen. Pentamidin wird zur Prophylaxe und Therapie der Afrikanischen Schlafkrankheit eingesetzt. Die hohe Basizität und die damit einhergehende Protonierung unter physiologischen Bedingungen verhindern die Diffusion durch die Membranen des Gastrointestinaltrakts. Auf der Suche nach einem oral verfügbaren Prodrug des Pentamidins wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene dieser Verbindungen im Caco-2 Modell untersucht. Das Diamidoxim des Pentamidins und das Val-pentamidin waren bereits in der Lage, die Caco-2 Monolayer doppelt so schnell zu überwinden wie das Pentamidin. Nach dem Kriterium der Permeabilität ist jedoch das *O*-Succinylpentamidin als das am besten geeignete Prodrug des Pentamidins anzusehen. Diese Verbindung zeigte einen um den Faktor drei erhöhten Permeabilitätswert gegenüber dem Pentamidin und weist damit nach dem BCS-System eine hohe Permeabilität auf.

Prodrugs müssen nach der Absorption durch körpereigene Enzymsysteme in die eigentliche Wirkform überführt werden. *N*-hydroxylierte Verbindungen werden als Prodrugs für Amidine, wie beispielsweise dem Diamidoxim des Pentamidins, eingesetzt. An der Reduktion zum entsprechenden Amidin ist das 2006 entdeckte Enzym mARC beteiligt. Um die Tauglichkeit von Zellkultursystemen für Prodrugstudien zu belegen, wurden im Rahmen dieser Arbeit Caco-2 und HEK-293 Zellen auf die Expression von mARC untersucht. Beide Zellkulturmodelle zeigten eine mit primären, porcinen Hepatozyten vergleichbare Reduktaseaktivität der Modellverbindung Benzamidoxim zum Benzamidin. Außerdem konnte mARC 2 mit Hilfe von Westernblot und ELISA in den beiden Zelllinien nachgewiesen werden.

Neben den Zelllinien wurde eine Quantifizierung von mARC in weiteren primären Zellkulturen (Hepatozyten, Schilddrüsenfollikeln, Blut) vorgenommen, dabei wurde eine ungewöhnlich hohe Expression von mARC 2 in der Schilddrüse gefunden. Hinweise auf eine Beteiligung von mARC an den metabolischen Prozessen der Schilddrüse lieferten die Studien an verschiedenen humanen und murinen Schilddrüsenzelllinien, die unter TSH-Stimulation eine um den Faktor drei dezimierte Reduktaseaktivität aufwiesen. Weiterhin konnte an porcinen Lebermitochondrien gezeigt werden, dass das Thyreostatikum Thiamazol vom Typ der Thioharnstoffe die Benzamidoximreduktaseaktivität mit einem  $EC_{50}$ -Wert von 270  $\mu$ M inhibiert.



Prodrug principles are widely used in the development of oral drugs, especially when a hydrophilic compound needs to be converted to a lipophilic transportform. The oral bioavailability of the prodrug should be highly increased in comparison to the parent drug. Pentamidine is used for the prophylaxis and therapy of the African Trypanosomiasis. Due to the  $pK_a$  of 11.4, pentamidine is protonated under physiological conditions and cannot be absorbed by diffusion in the gastrointestinal tract. In this study, the permeability of several prodrugs of pentamidine was determined by using the Caco-2 cell model. The diamidoxime of pentamidine and valpentamidine passed the Caco-2 monolayer twice as fast as pentamidine. The highest permeability was observed for *O*-succinylpentamidine, which proved to be the best candidate for an oral prodrug of pentamidine of the all compounds investigated. The *O*-succinylpentamidine permeability of the Caco-2 monolayer was increased by factor three in comparison to pentamidine. In the BCS-system *O*-succinylpentamidine can be classified as a highly permeable compound.

After absorption, prodrugs need to be converted to the active principle. This conversion is mainly catalysed by enzyme systems. *N*-hydroxylated compounds are used as prodrugs for amidines (e.g. diamidoxime is used as prodrug for pentamidine). The recently identified enzyme mARC participates in the *N*-reduction of amidoximes. To prove the suitability of widely used cell lines for *in vitro* amidoxime prodrug studies, the expression of mARC was studied in Caco-2 cells and HEK-293 cells. Both cell lines showed similar benzamidoxime reductase activity as primary cultured porcine hepatocytes. Furthermore, the expression of mARC 2 was shown by westernblot and ELISA analysis.

Among the cell lines, mARC was quantified in different primary cultured tissues. An unexpectedly high mARC 2 expression was found in the thyroid gland. A participation of mARC at the metabolic processes within the thyroid was suggested by the decrease in reduction of benzamidoxime reductase activity under TSH stimulation by factor three, which was investigated in different human and rodent thyroid cell lines, each cultured with and without TSH stimulation. Additionally, studies with the thyroid therapeutic agent thiamazol carried out with porcine liver mitochondria showed a decrease in benzamidoxime reductase activity with an estimated  $EC_{50}$  of 270  $\mu$ M.

