



Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Hamburg University of Applied Sciences



Fakultät Life Sciences

Charakterisierung zweier Caco-2-Klone auf ihre Verwendbarkeit zum Nachweis von Transporteraktivitäten

**Bachelorarbeit im Studiengang
Biotechnologie**

Verena Joerger

Matrikelnummer: [REDACTED]

6. August 2017

1. Gutachter: Prof. Dr. Oliver Ullrich

HAW-Hamburg
Ulmenliet 20
21033 Hamburg

2. Gutachter: Dr. Alexander Loa

acCELLerate GmbH
[REDACTED]



Inhalt

Abbildungen	III
Tabellen	V
Abkürzungen	VI
1 Einführung	1
1.1 Der Dünndarm	3
1.1.1 Dünndarmepithel	5
1.1.2 Caco-2 als Zellkulturmodell für Enterozyten	6
1.2 Multi Drug Resistance Transporter	8
1.2.1 Permeabilitätsglykoprotein	10
1.2.2 Multidrug Resistance Protein	11
1.2.3 Breast Cancer Resistance Protein	13
1.3 Modulatoren	15
1.3.1 Inhibitoren für MDR-Transporter	16
1.3.2 Aktivatoren für P-gp	18
1.4 Funktionstestung von MDR-Transportern	19
1.5 Zielsetzung	20
2 Material	21
2.1 Eingesetzte Zelllinien	21
2.2 Medien, Lösungen und Chemikalien	21
2.3 Verbrauchsmaterial und Geräte	24
3 Methoden	26
3.1 Zellkultur	26
3.1.1 Inkulturnahme von Caco-2-Zellen	26
3.1.2 Expansion und Passagierung	28
3.1.3 Kryokonservierung eines fertiges Batches	29
3.2 Durchflusszytometrie	31
3.3 Nachweis der MDR-Transporter über Immunfluoreszenz	35
3.3.1 Indirekter Nachweis am Immunfluoreszenzmikroskop	36



3.3.2	Direkter Nachweis am Durchflusszytometer	37
3.4	Nachweis der MDR-Transporter im Calcein-AM-Assay	39
3.4.1	Transporterspezifische Inhibitoren	39
3.4.2	Aktivatoren für P-gp	41
4	Ergebnisse	42
4.1	Nachweis der MDR-Transporter über spezifische Antikörper	42
4.1.1	Immunfluoreszenz	42
4.1.2	Durchflusszytometrische Analyse	46
4.2	Nachweis der MDR-Transporter über Inhibition	49
4.3	Passagenabhängige Expression der MDR-Transporter	54
4.4	Aktivierung von P-gp	57
5	Diskussion	59
5.1	Caco-2 (D5) 92-170324HB01	61
5.2	Caco-2 (F9) 92-170418VJ01 (Batch 1) und 92-170505VJ01 (Batch 2) .	63
6	Zusammenfassung	65
	Anhang	XI



Abbildungen

1	Verdauungsorgane im Abdomen	3
2	Aufbau der Dünndarmwand	4
3	Schematische Darstellung eines Caco-2-Monolayers	6
4	Schematische Darstellung von P-gp	10
5	Schematische Darstellung von MRP1 und MRP2	12
6	Schematische Darstellung von BCRP	13
7	Strukturformeln der P-gp-Aktivatoren	18
8	Spaltung des Calcein-Acetoxymethyls zu Calcein	19
9	80 % Konfluenz in einer Caco-2-Kultur	27
10	Genereller Aufbau eines Durchflusszytometers	31
11	Dotplot: Seitwärtslichtstreuung gegen Vorwärtslichtstreuung	32
12	Spektrum von Calcein und Propidiumjodid	34
13	Immunfluoreszenzmikroskopie Caco-2 (D5)	43
14	Immunfluoreszenzmikroskopie Caco-2 (F9) Batch 1	44
15	Immunfluoreszenzmikroskopie Caco-2 (F9) Batch 2	45
16	Histogramme der Antikörperfärbung NIH-3T3	46
17	Histogramme der Antikörperfärbung Subklon D5	47
18	Histogramme der Antikörperfärbung Subklon F9	48
19	Inhibition des Subklons D5	49
20	Inhibition des Subklons F9 Batch 1	50
21	Inhibition des Subklons F9 Batch 2	52
22	Passagenabhängigkeit der MDR-Expression im Subklon D5	55
23	Passagenabhängigkeit der MDR-Expression im Subklon F9	56
24	Aktivierung der P-gp-Expression im Subklon D5	57
25	Aktivierung der P-gp-Expression im Subklon F9	58
26	Inhibition Subklon D5, frisch aufgetaute Zellen, Passage 14	XI
27	Inhibition Subklon D5, Zellen aus laufender Kultur, Passage 16	XII
28	Inhibition Subklon D5, Zellen aus laufender Kultur, Passage 19	XIII
29	Inhibition Subklon D5, Zellen aus laufender Kultur, Passage 21	XIV
30	Inhibition Subklon F9 Batch 1, frisch aufgetaute Zellen, Passage 11	XV
31	Inhibition Subklon F9 Batch 1, Zellen aus laufender Kultur, Passage 13	XVI



32	Inhibition Subklon F9 Batch 1, Zellen aus laufender Kultur, Passage 16	XVII
33	Inhibition Subklon F9 Batch 1, Zellen aus laufender Kultur, Passage 18	XVIII
34	Inhibition Subklon F9 Batch 2, frisch aufgetaute Zellen , Passage 12 . .	XIX
35	Inhibition Subklon F9 Batch 2, Zellen aus laufender Kultur, Passage 14	XX
36	Inhibition Subklon F9 Batch 2, Zellen aus laufender Kultur, Passage 17	XXI
37	Inhibition Subklon F9 Batch 2, Zellen aus laufender Kultur, Passage 19	XXII



Tabellen

1	Übersicht über die humanen ABC-Transporter	8
2	Inhibitoren der in Caco-2 vorkommenden MDR-Transporter	17
3	Eingesetzte Zelllinien	21
4	Zellkulturmedium für Caco-2-Zellen	21
5	Einfriermedium für Caco-2-Zellen	21
6	Lösungen	22
7	Chemikalien	22
8	Immunfluoreszenzreagenzien	22
9	Eingesetzte Antikörper	23
10	Verbrauchsmaterial	24
11	Geräte	25
12	Software	25
13	Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe und zugehörige FL-Kanäle	33
14	Antikörperkonzentrationen indirekter Immunfluoreszenznachweis	36
15	Antikörperkonzentrationen direkter Immunfluoreszenznachweis	38
16	Konzentration der eingesetzten Inhibitoren	40
17	Aktivatoren für P-gp-Expression	41
18	Getestete Passagen der Caco-2 Subklone	54



Abkürzungen

ABC	ATP-binding Cassette, ATP-bindende Kasette
ABCP	ABC-Transporter in der Plazenta
ADME	Absorption, Distribution, Metabolisierung, Exkretion
Alpha-MEM	Minimum Essential Medium Eagle Alpha Modification
ATP	Adenosintriphosphat
BCRP	Breast Cancer Resistance Protein
Caco-2	Zelllinie aus einem Adenokarzinom des Colons
Calcein-AM	Calcein-Acetoxymethyl
CHO	Chinese Hamster Ovary, Ovarien des Chinesischen Hamsters
Cy3	Indocarbocyanin, Fluoreszenzfarbstoff
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid, Fluoreszenzfarbstoff
DMSO	Dimethylsulfoxid
FBS	Fetal Bovine Serum, fötales Kälberserum
FL	Fluorescencelight, Fluoreszenzlicht
FSC	Forwardscatter
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
IF	Immunfluoreszenz
Ko143	Ko143 Hydrat, BCRP-Inhibitor
LY335979	Zosuquidar Hydrochlorid, P-gp-Inhibitor
NBD	Nucleotide Binding Domain, Nukleotidbindungsstelle
MDR	Multi Drug Resistance, multiple Wirkstoffresistenz



MK-571	MK-571 Natriumsalzhydrat, MRP-Inhibitor
MRP1	Multi Drug Resistance Protein 1
MRP2	Multi Drug Resistance Protein 2
MXR	Mitoxantrone Resistance Protein
NEAA	Non-essential Aminoacids, nichtessentielle Aminosäuren
PBS	Phosphate Buffered Saline, phosphatgepufferte Salzlösung
PE	R-Phycoerythrin, Fluoreszenzfarbstoff
PFA	Paraformaldehyd
P-gp	Permeability Glycoprotein, Permeabilitätsglykoprotein
PI	Propidiumjodid, Fluoreszenzfarbstoff
RFU	Relative Fluorescence Units, Relative Fluoreszenzeinheit
TC	Tissue Culture, Gewebekultur
TMD	Transmembrane Domain, Transmembrandomäne
SSC	Sidescatter, Seitwärtslichtstreuung
VPA	Valproic Acid, Valproat



1 Einführung

Der menschliche Körper mit all seinen Zellen verfügt über ein breites Spektrum an Schutzmechanismen gegen schädliche Einflüsse von außen. Dies gilt auch für verabreichte Medikamente. Gelangen Stoffe peroral in den Körper, so werden sie zunächst im Gastrointestinaltrakt weitergeleitet, können über die Darmwand absorbiert werden und in die Blutbahn gelangen (Absorption). Von dort aus werden sie an ihren Bestimmungsort transportiert (Distribution) und können verstoffwechselt werden (Metabolisierung). Abfallprodukte werden wieder in die Blutbahn geschleust und über den Darm oder die Nieren ausgeschieden (Exkretion) [1, 2]. Diese Vorgänge werden in der Pharmakologie und Toxikologie als ADME (Absorption, Distribution, Metabolisierung und Exkretion) bezeichnet und sind bei der Entwicklung neuer Arzneistoffe von großer Bedeutung.

An den Übergängen zwischen Blutbahn und Gewebe bilden die Zellmembranen eine Barriere, die von potentiell toxischen, körperfremden Stoffen (Xenobiotika) zunächst überwunden werden muss. Um die Absorption in den Blutkreislauf zu verhindern und die Exkretion von Abfallstoffen zu beschleunigen, werden in den Zellen Transportproteine exprimiert und in deren Zellmembran integriert. Diese sind in der Lage Xenobiotika zu erkennen und wieder aus der Zelle heraus zu transportieren [1, 3, 4]. Diese Eigenschaft macht die Transportproteine zu Effluxtransportern [5]. Diese kommen in Darm, Nieren, Nebennieren, Leber, Plazenta, den männlichen Hoden, der Blut-Hirn Schranke sowie in vielen anderen Geweben vor [5, 6, 7, 8].

Vor allem Tumore, die von den genannten Geweben abstammen, weisen oft eine Überexpression von Effluxtransportern auf. Dies kann sowohl intrinsisch bedingt sein als auch durch die Behandlung mit Chemotherapeutika induziert werden [6]. Als Folge entwickeln sich Resistenzen, die sich sowohl gegen den verabreichten Wirkstoff als auch gegen andere Substanzen richten, wobei sich die verschiedenen Stoffe strukturell stark voneinander unterscheiden können [9, 10]. Dies wird in der Onkologie als multiple Wirkstoffresistenz (Multi Drug Resistance, MDR) bezeichnet und folglich wird von MDR-Transportern gesprochen.



Bei der medikamentösen Behandlung nicht kanzeröser Erkrankungen spielen die Effluxtransporter ebenfalls eine wichtige Rolle. Bei gleichzeitiger Verabreichung von verschiedenen Arzneistoffen können Wechselwirkungen mit den MDR-Transportern auftreten. Zum einen können manche Substanzen die Transporter inhibieren, wodurch der Efflux von anderen Wirkstoffen verhindert wird. Zum anderen kann die Expression der Transporter verstärkt werden, wodurch Wirkstoffe vermehrt zurück in den Darm ausgestoßen werden und so deren Blutserumspiegel beträchtlich sinkt [9]. Die Folge ist, dass die gewünschte Wirkung des Arzneistoffes ausbleibt.

Für die Entwicklung neuer Wirkstoffe gegen die unterschiedlichsten Krankheiten ist es folglich von sehr großer Bedeutung, die Wechselwirkungen von Arzneistoffen und MDR-Transportern genau zu kennen und zu verstehen, um einen Therapieerfolg zu ermöglichen und Nebenwirkungen zu minimieren. Um physiologische und pathophysiologische Vorgänge untersuchen zu können, bietet die Molekularbiologie gute Alternativen zum Tierversuch. Auch wenn Tierversuche nie ganz vermieden werden können, besteht immerhin die Möglichkeit sie durch ein geeignetes Zellkulturmodell auf ein Minimum zu reduzieren.



1.1 Der Dünndarm

Die Hauptaufgabe des Dünndarms liegt in der Aufspaltung und Resorption von Bestandteilen der Nahrung. Außerdem ist er für die Resorption von Wasser aus der Nahrung verantwortlich. Der Dünndarm schließt sich dem Magen an und umfasst etwa 3 m. Er wird vom Dickdarm umrahmt und ist durch einen Teil des Bauchfells an der hinteren Bauchwand befestigt. Die Lokalisation des Dünndarms kann Abbildung 1 entnommen werden. Hier sind die für die Verdauung wichtigen Organe im Bauchraum des Menschen dargestellt. Der Dünndarm wird in drei Abschnitte unterteilt. Diese sind das Duodenum, Jejunum und Ileum [11, 12].

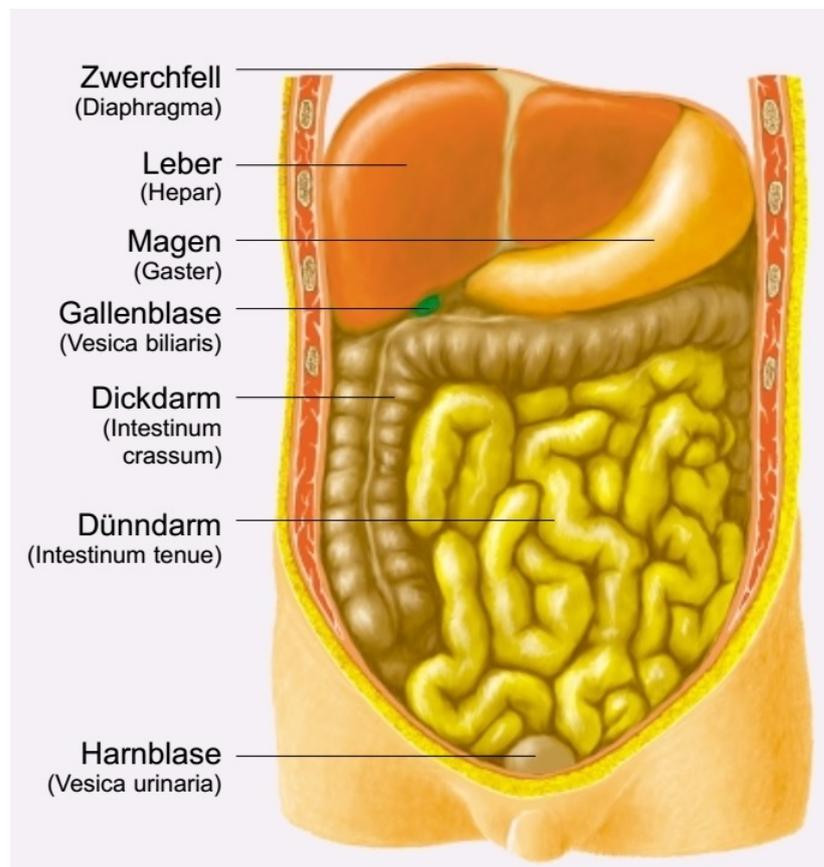


Abb. 1: Darstellung der menschlichen Verdauungsorgane im Abdomen: Der Dünndarm nimmt im Bauchraum den größten Platz ein und wird von dem sich anschließenden Dickdarm umrandet. Unter den Rippenbögen befinden sich die Leber, die Gallenblase (rechts) und der Magen (links). Nicht dargestellt ist die retroperitoneal liegende Bauchspeicheldrüse, die dem Duodenum anliegt. (Trebsdorf; Biologie, Anatomie, Physiologie: Lehrbuch und Atlas [12]).



In Abbildung 2 ist die Schichtung der Dünndarmwand dargestellt. Diese beginnt im Darmlumen mit der Schleimhaut aus einschichtigem Epithel welches einer Bindegewebschicht aufliegt. Diese Bindegewebschicht ist von Blut- und Lymphgefäßen durchzogen, ist innerviert und beherbergt zahlreiche Leukozyten. Sie wird von einer Schicht aus glatter Muskulatur umschlossen. Die Schleimhaut aus Epithel, Bindegewebe und Muskulatur liegt einer weiteren Bindegewebschicht auf. Diese erlaubt der Dünndarmschleimhaut sich flexibel verschieben zu können. Zuletzt folgt eine Schicht aus glatter Muskulatur, welche längs- und ringförmig angeordnet für die Peristaltik des Darms verantwortlich ist. So kann der Darminhalt aktiv weitertransportiert werden.

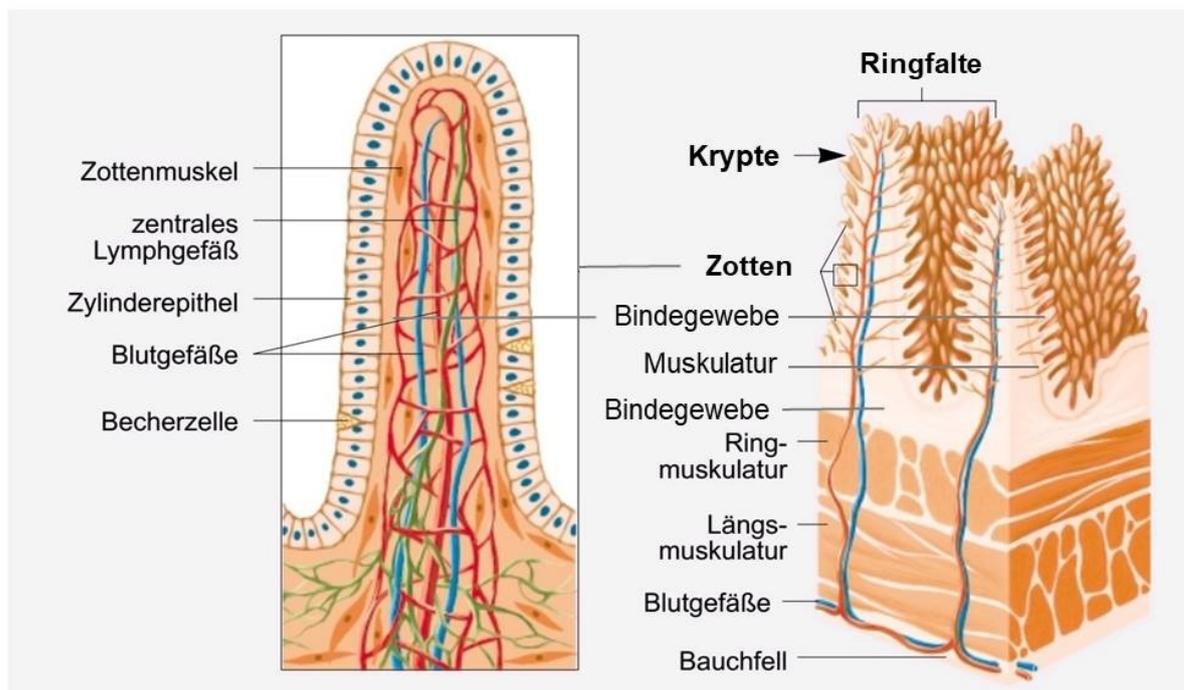


Abb. 2: Aufbau der Dünndarmwand: **Rechts** im Bild ist die Schichtung der Dünndarmwand abgebildet. Krypten und Zotten vergrößern ebenso wie faltige Ausstülpungen des Bindegewebes die Oberfläche des Dünndarms. Ring- und Längsmuskulatur sorgen bei Kontraktion für die Peristaltik im Dünndarm. **Links:** Blut- und Lymphgefäße führen bis zum einschichtigen Epithel, welches mit Enterozyten und sezernierenden Zellen wie den Becherzellen ein einschichtiges hochprismatisches Zylinderepithel bildet. Dieses ist hier ohne den apikalen Bürstensaum aus Mikrovilli abgebildet. Die Darstellung ist abgewandelt nach Trebsdorf [12].



Zur Maximierung der Resorptionsfläche weist der Dünndarm Ringfalten, Zotten, Krypten und Mikrovilli auf (siehe Abbildung 2, rechts [12]). Die Ringfalten werden durch Vorwölbungen der Schleimhaut und der darunter liegenden Bindegewebsschicht gebildet. Ausstülpungen von Epithel und Bindegewebe sowie kanalartige Einsenkungen bilden zusammen Zotten und Krypten. Fingerförmige Ausstülpungen der Zellmembran auf der apikalen Seite der Epithelzellen bilden schlussendlich einen Bürstensaum [11]. Die Resorptionsoberfläche des Dünndarms vergrößert sich so auf etwa 100 m^2 .

1.1.1 Dünndarmepithel

Die Epithelschicht des Dünndarms besteht neben den einschichtigen hochprismatischen Epithelzellen, den Enterozyten auch noch aus sezernierenden Drüsenzellen. Diese produzieren sowohl eine schützende Schleimschicht (Becherzellen) auf der Epitheloberfläche als auch antibakteriell wirkende Enzyme wie zum Beispiel Lysozym (Paneth-Zellen, nicht dargestellt) [11]. Somit wird der Transport des Darminhaltes durch den Darm erleichtert und bakterielle Krankheitserreger werden inaktiviert. Die Epithelschicht ist in Abbildung 2 links dargestellt [12].

Für die Resorption von Nährstoffen sind die Enterozyten verantwortlich. Sie sind untereinander mit Tight Junctions verbunden und bilden so einen festen Zellverband aus. Der Bürstensaum aus Mikrovilli ist mit Effluxtransportern ausgestattet. Diese sorgen dafür, dass potentiell schädliche Substanzen nicht in die Blutbahn gelangen [13]. Die Enterozyten bilden mit ihren Eigenschaften die Barrierschicht zwischen dem Darmlumen und der Blutbahn die sogenannte Darmschranke.



1.1.2 Caco-2 als Zellkulturmodell für Enterozyten

Für die Untersuchungen von Transportvorgängen im Dünndarm hat sich als Enterozytenmodell die Caco-2-Zelllinie etabliert. Diese Zellen entstammen einem Colon-Adenokarzinom eines 72 Jahre alten kaukasischen Mannes [14]. Obwohl sie aus einem Dickdarmkarzinom stammen, besitzen sie die Eigenschaften der oben beschriebenen Dünndarmenterozyten [15].

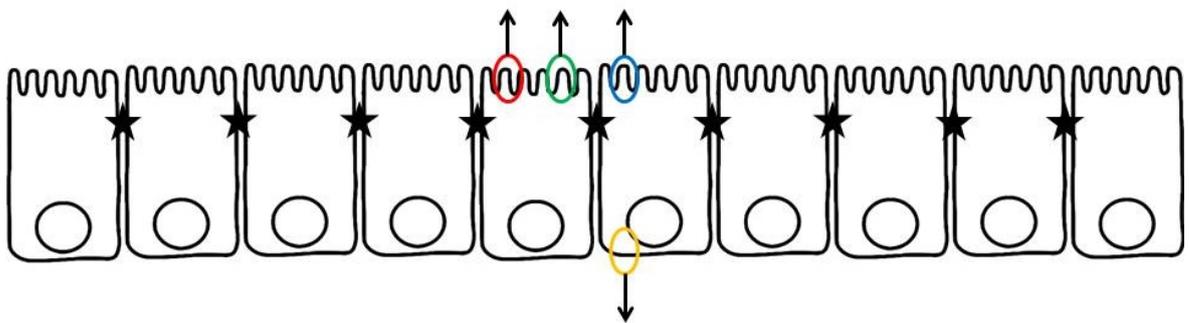


Abb. 3: Schematische Darstellung eines Caco-2-Monolayers mit polarisierten Enterozyten, die apikal einen Bürstensaum ausbilden. Basal liegt der Zellkern im Zytoplasma. Zwischen den Zellen befinden sich die Tight Junctions (schwarze Sterne), die den Zellverband stabilisieren. Apikal sind die MDR-Transporter P-gp (rot), MRP2 (blau) und BCRP (grün) dargestellt. Außerdem ist basolateral der MRP1-Transporter (gelb) eingezeichnet. Die Abbildung basiert auf den Beschreibungen von Ulfig und Leslie *et al.* [11, 13]

Die adhärent wachsenden Caco-2-Zellen differenzieren bei erreichter Konfluenz zu polarisierten Enterozyten. Sie bilden, wie in Abbildung 3 dargestellt, einen dichten Monolayer. Die Zellen bilden untereinander Tight Junctions aus, was den Zellverband festigt. Sie besitzen auf apikaler Seite einen Bürstensaum aus Mikrovilli, der reichlich mit MDR-Transportern ausgestattet ist [16]. Dadurch ist eine große Ähnlichkeit zum physiologischen Dünndarmepithel gegeben. Im Gegensatz zum Dünndarmepithel fehlen dem Zellkulturmodell aus Caco-2-Zellen jedoch sezernierende Drüsenzellen.

Caco-2-Zellen können auf Grund ihrer Ähnlichkeit zu den Enterozyten beispielsweise für Permeabilitätstests eingesetzt werden. Dabei werden Substanzen auf ihre Wechselwirkungen mit der Darmschranke getestet, um zu erfahren, ob peroral verabreichte



Wirkstoffe über den Darm in die Blutbahn gelangen können. Für die Entwicklung eines zellbasierten Permeabilitätsassays muss die verwendete Zelllinie vorher charakterisiert werden. Auch wenn sich Caco-2-Zellen bei ihrer Aussaat wie oben beschrieben verhalten, können sich Caco-2-Zelllinien verschiedener Labore stark unterscheiden. Dabei spielt die Zusammensetzung des verwendeten Kulturmediums eine ebenso wichtige Rolle wie etwa die einzelnen Arbeitsschritte, die bei einer Passagierung vorgenommen werden. Faktoren wie das verwendete Ablösereagens (zum Beispiel Accutase[®], TrypLE[™] Express, Trypsin) und dessen Einwirkzeit, die Temperatur, die beim Ablösen vorherrscht, das Resuspendieren der Zellen (durch Invertieren oder durch auf- und abpipettieren) oder die Zentrifugalbeschleunigung, welche zum Abtrennen der Zellen vom Zellkulturmedium verwendet wird, können das Verhalten der Zellen beeinflussen und verändern.



1.2 Multi Drug Resistance Transporter

Alle Multi Drug Resistance-Transporter (MDR-Transporter) gehören zur ABC-Transporter Superfamilie. ABC steht für die gemeinsame funktionelle Einheit aller Transporter dieser Familie, der ATP-bindenden Kasette (ATP-binding Cassette, ABC). ABC-Transporter kommen vom Prokaryonten bis zum Säugetier in allen Lebewesen vor [17, 18]. Sie sind große, membranständige Proteine, die aktiv unter ATP-Verbrauch ihre Substrate durch eine Membran transportieren können. Die Einteilung der menschlichen ABC-Transporter erfolgt alphabetisch in die sieben Subfamilien ABCA bis ABCG, je nach Ähnlichkeit in der Genstruktur und der Organisation ihrer funktionellen Domänen [2, 4, 17]. In Tabelle 1 sind die sieben Subfamilien aufgelistet, die in dieser Arbeit untersuchten MDR-Transporter sind dort explizit erwähnt.

Tab. 1: Übersicht über die humanen ABC-Transporter abgewandelt nach Dean [4]

Subfamilie	Anzahl Mitglieder	untersuchter Vertreter
ABCA	13	-
ABCB	11	P-gp (ABCB1)
ABCC	12	MRP1 (ABCC1) MRP2 (ABCC2)
ABCD	4	-
ABCE	1	-
ABCF	3	-
ABCG	8	BCRP (ABCG2)

Die Struktur der menschlichen MDR-Transporter konnte bisher nur über ihre biochemischen Eigenschaften, Mutationsanalysen und durch bakterielle Homologien erahnt werden, da es bisher noch nicht gelungen ist, eine Röntgenstrukturanalyse durchzuführen [3, 17]. Die Funktionsweise sowie der Aufbau von MDR-Transportern lässt sich am besten am Beispiel des Permeabilitätsglykoproteins (Permeability glycoprotein, P-gp) erklären, welches in Kapitel 1.2.1 ausführlich beschrieben wird. MDR-Transporter be-



stehen meist aus zwei hydrophoben Transmembrandomänen (Transmembrane Domain, TMD), von denen jede aus sechs, die Membran durchspannenden α -Helices besteht. Diese sind für die Substratbindung auf der zytoplasmatischen Seite verantwortlich und bilden dort eine Substrattasche. In Verbindung mit der TMD beinhaltet die hydrophile Nukleotidbindungsstelle (Nucleotide Binding Domain, NBD) auf der zytoplasmatischen Seite der Membran, die ATP-Bindungsstelle. ATP liefert unter Abspaltung einer Phosphatgruppe die Energie, die für den Substrattransport durch die Membran in den extrazellulären Raum nötig ist. Diese Eigenschaft macht MDR-Transporter zu Effluxtransportern [1, 3, 8].

Die unterschiedlichen Transportproteine weisen überlappende Substratspezifität auf, wodurch sie gemeinsam einen komplexen, zum Teil auch synergistischen Entgiftungsmechanismus für die Zellen bilden [19]. Die Transporter schleusen Substanzen wie Chemotherapeutika, andere Arzneistoffe und Xenobiotika sowie endogene Substanzen und Stoffwechselprodukte unterschiedlichster Struktur entgegen eines Gradienten aus der Zelle hinaus, nachdem diese durch ihren lipophilen Charakter in die Zelle diffundiert sind oder als Stoffwechselprodukte aus der Zelle selbst stammen [2, 3, 4].

Diese Arbeit befasst sich mit den in Caco-2-Zellen am häufigsten vorkommenden MDR-Transportern. Diese sind das Permeabilitätsglykoprotein (Permeability Glycoprotein, P-gp), die Multidrug Resistance Proteine 1 und 2 (MRP1, MRP2) sowie das Breast Cancer Resistance Protein (BCRP).



1.2.1 Permeabilitätsglykoprotein

Das Permeabilitätsglykoprotein (Permeability glycoprotein, P-gp) wurde als erstes, für die Multiresistenz von Tumorzellen verantwortliche Membranprotein entdeckt [3]. Die Forscher um Juliano und Ling untersuchten in den 1970er Jahren colchicinresistente Ovarialzellen des Chinesischen Hamsters (Chinese Hamster Ovary, CHO-Zellen) auf die Zusammensetzung ihrer Zellmembran, um einen Grund für das Ausbleiben einer zytostatischen Wirkung von Colchicin auf die CHO-Zellen zu finden. Durch die Struktur von Colchicin wusste man, dass es durch die Zellmembran diffundieren konnte. Deshalb wurde angenommen, dass eine Veränderung der Membranpermeabilität colchicinresistenter Zellen für die Resistenz verantwortlich sein musste [20].

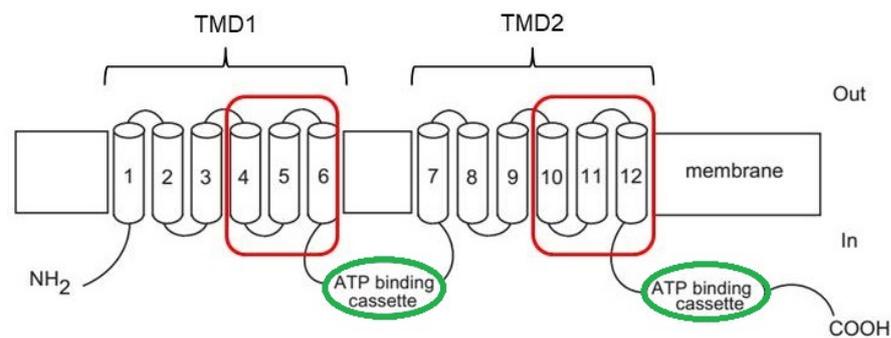


Abb. 4: Schematische Darstellung eines Permeabilitätsglykoproteins (P-gp) eingebettet in die Zellmembran mit zwei Transmembrandomänen (TMD1 und TMD2), bestehend aus jeweils sechs membran-durchspannenden α -Helices, sowie zwei Nukleotidbindungsdomänen (NBD), die für die Bindung und Hydrolyse von ATP sorgen. Die NBD sind als ATP-binding Cassette dargestellt (grün umrandet). Die α -Helices 4, 5 und 6 bilden mit den α -Helices 10, 11 und 12 die Substratbindungstasche (rot umrandet). Die Abbildung ist modifiziert nach Takano und Leslie [8, 13].

Bei weiteren Untersuchungen wurde festgestellt, dass die colchicinresistenten CHO-Zellen ebenfalls gegen eine Vielzahl anderer Wirkstoffe resistent waren und ein bestimmtes Glykoprotein auf der Zelloberfläche besaßen. Im Vergleich wies der CHO-Wildtyp weder eine Colchicinresistenz noch das Glykoprotein aus den resistenten Zellen auf. Da Juliano und Ling die veränderte Permeabilität der Zellmembran im erhöhten Gehalt dieses Glykoproteins begründet sahen, nannten sie es Permeabilitätsglykoprotein [20]. Nach dem Nachweis in colchicinresistenten CHO-Zellen konnte P-gp auch in zahlreichen anderen



resistenten Tumorzellen nachgewiesen werden und gilt seitdem als Hauptverursacher von Multiresistenzen gegen eine Vielzahl strukturell und pharmakologisch unterschiedlicher Substanzen. P-gp wurde daher bisher am ausführlichsten charakterisiert [21].

Wie in Abbildung 4 dargestellt, besteht P-gp aus zwölf, die Membran durchspannenden α -Helices und zwei ABC-Domänen, die für die ATP-Hydrolyse zuständig sind. Die α -Helices 4, 5 und 6 auf der N-terminalen Seite des Membranproteins bilden mit den α -Helices 10, 11 und 12 auf der C-terminalen Seite die Substrattasche [17]. P-gp hat ein Molekulargewicht von 170 kDa und besteht aus 1280 Aminosäuren. Es wird durch das MDR1-Gen codiert, welches sich auf dem chromosomalen Genlokus 7q21 befindet. P-gp wird der ABC-Transporter-Subfamilie ABCB zugeteilt (ABCB1) [3, 4]. Die Substrate von P-gp sind neutrale oder positiv geladene, relativ hydrophobe Moleküle, die durch die Membran ins Innere der Zelle gelangen. Dort treffen sie auf P-gp und werden wieder aus der Zelle herausgeschleust. Das Molekulargewicht der Substrate liegt zwischen 300 Da und 2000 Da. Oft besitzen diese Moleküle zwei planare Ringe, was die hydrophobe Eigenschaft erklärt [2].

1.2.2 Multidrug Resistance Protein

Die zweite große und wichtige Gruppe von Membrantransportern, die für die Multiresistenz von Tumorzellen verantwortlich gemacht wird, gehört zur Subfamilie ABCC. Am besten erforscht sind hier die Multidrug Resistance Proteine MRP1 (ABCC1) und MRP2 (ABCC2). Sie sind die größten Transportproteine unter den ABC-Transportern. MRP1 und MRP2 sind wie auch P-gp in fast allen Geweben zu finden. Sie weisen ein ähnliches Substratprofil wie P-gp auf und bieten der Zelle Schutz vor endogenen und exogenen, potentiell schädlichen Substanzen. Dazu zählen neben Xenobiotika auch körpereigene Stoffwechselprodukte und deren Derivate. Diese sind oft anionische organische Konjugate aus Glutathion und Glutathionsulfiden sowie Glukuroniden. Auch unkonjugierte anionische Wirkstoffe können transportiert werden, dann erfolgt ein Cotransport mit Glutathion [8].

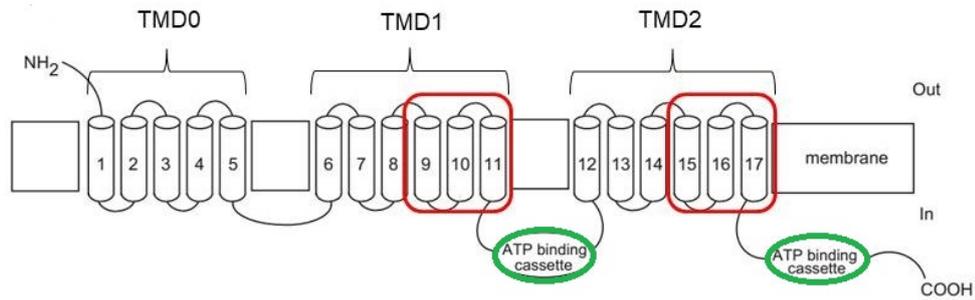


Abb. 5: Schematische Darstellung des Multidrug Resistance Proteins MRP1 bzw. MRP2 eingebettet in die Zellmembran mit drei TMD, bestehend aus jeweils sechs (TMD1 und TMD2) bzw. fünf (TMD0) membrandurchspannenden α -Helices, sowie zwei NBD. Die NBD sind als ATP-binding Cassette dargestellt (grün umrandet). Die α -Helices 9, 10 und 11 bilden mit den α -Helices 15, 16 und 17 die Substratbindungstasche (rot umrandet). Die Abbildung ist modifiziert nach Takano und Leslie [8, 13].

MRP1 liegt in polarisierten Epithelzellen wie den Caco-2-Zellen auf der basolateralen Seite. MRP2 hingegen befindet sich auf der apikalen Seite im Bürstensaum. Beide Transporter haben eine hohe Affinität zu Bilirubinkonjugaten, welche als Abbauprodukt des Hämstoffwechsels entstehen. Ein weiteres Substrat mit hoher Affinität zu den Transportern MRP1 und MRP2 ist Leukotrien C4 (LTC₄), als Gewebshormon an Entzündungsreaktionen beteiligt ist [2].

Wie in Abbildung 5 dargestellt ist, bestehen MRP1 und MRP2 aus drei Transmembrandomänen (TMD). Vom extrazellulär liegenden N-Terminus aus erfolgt die Einteilung in TMD0, TMD1 und TMD2. TMD0 hat anders als TMD1 und TMD2 nur fünf statt sechs membrandurchspannende α -Helices. Die beiden ATP-Bindungsstellen liegen jeweils am C-Terminus von TMD1 und TMD2. Die beiden beschriebenen MDR-Transporter MRP1 und MRP2 haben ein Molekulargewicht von 190 kDa und bestehen aus 1545 Aminosäuren [1, 8]. Das codierende Gen ABCC1 für MRP1 befindet sich auf dem chromosomalen Genlokus 16p13, das Gen ABCC2 für MRP2 befindet sich auf dem chromosomalen Genlokus 10q24.



1.2.3 Breast Cancer Resistance Protein

Das Breast Cancer Resistance Protein (BCRP) wurde erstmals 1998 aus einer Brustkrebszelllinie isoliert, bei der eine Resistenz gegen das Chemotherapeutikum Doxorubicin nachgewiesen wurde. Zur selben Zeit wurde ein Transportprotein in mitoxantronresistenten Colonkarzinomzellen gefunden. Es wurde als Mitoxantronresistenzprotein (Mitoxantrone Resistance Protein, MXR) bezeichnet. Bei Mitoxantron handelt es sich ebenfalls um ein gängiges Chemotherapeutikum. Ein weiterer ABC-Transporter wurde in der Plazenta entdeckt, welcher deshalb als ABCP bezeichnet wurde [19]. Da sich die drei Proteine nur geringfügig in ihrer Aminosäuresequenz unterscheiden, wurden sie in die ABCG-Subfamilie als zweites Mitglied zusammengefasst. ABCG2 steht also streng genommen für drei Transportproteine, dennoch hat sich BCRP als Bezeichnung durchgesetzt [19, 22].

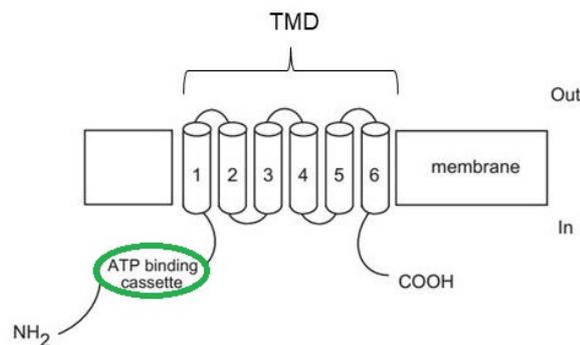


Abb. 6: Schematische Darstellung eines Breast Cancer Resistance Proteins (BCRP) eingebettet in die Zellmembran mit nur einer TMD, bestehend aus sechs membrandurchspannenden α -Helices, sowie einer N-terminalen NBD, die für die Bindung und Hydrolyse von ATP sorgt. Die NBD sind als ATP-binding Cassette dargestellt (grün umrandet). Die Abbildung ist modifiziert nach Takano und Leslie [8, 13].

BCRP wird genau wie P-gp vor allem in den Organen, welche für Absorption (zum Beispiel Dünndarm), Distribution (Blut-Gewebe-Schranken) und Exkretion (zum Beispiel Nieren) wichtig sind in hohem Maße exprimiert. Außerdem spielt BCRP unter anderem eine wichtige Rolle in der Schwangerschaft. BCRP verhindert, dass Schadstoffe über die Plazenta auf den Fötus übergehen und hält diese im Mutterleib zurück [17]. Auf polarisierten Epithelzellen wie den Caco-2-Zellen liegt BCRP apikal im Bürstensaum.



Auch BCRP hat mit anderen MDR-Transportern viele Substrate gemeinsam. Im Unterschied zu P-gp transportiert BCRP jedoch neben hydrophoben Stoffen auch hydrophile, konjugierte organische Anionen. Besonders hohe Affinität zu BCRP zeigen dabei Sulfatkonjugate [19].

BCRP ist das kleinste der MDR-Transporterproteine und hat nur eine einzige TMD mit sechs α -Helices. Wie in Abbildung 6 dargestellt befindet sich die ATP-Bindungsstelle am N-Terminus der TMD. BCRP gilt als Halbtransporter, da es erst polymerisieren muss um seine Funktion erfüllen zu können. Dabei bilden sich Dimere oder Multimere aus einzelnen BCRP-Molekülen [22]. BCRP hat ein Molekulargewicht von 72 kDa und besteht aus 655 Aminosäuren. Das codierende Gen ABCG2 befindet sich auf dem chromosomalen Genlocus 4q22 [4].



1.3 Modulatoren

Charakteristisch für MDR-Transporter ist ihr breites Substratspektrum. Die Substrate sind sowohl strukturell als auch pharmakologisch sehr unterschiedlich. Wie bereits erwähnt transportiert zum Beispiel P-gp relativ hydrophobe Moleküle durch die Zellmembran. MRP1 und MRP2 transportieren neben hydrophoben Molekülen auch Gluthation-Konjugate. BCRP transportiert sowohl hydrophobe Substrate als auch hydrophile konjugierte Anionen.

Hat ein Tumorgewebe durch die Überexpression von MDR-Transportern eine Resistenz gegen ein Chemotherapeutikum entwickelt, so ist es häufig auch gegen eine Vielzahl anderer Wirkstoffe unempfindlich. Tritt eine Resistenz auf, sind bis zu 600-fach höhere Konzentrationen des Wirkstoffes nötig, um die Tumorzellen abzutöten [3]. Eine erhöhte Wirkstoffkonzentration geht jedoch mit gesteigerter Toxizität für den Organismus einher und kann daher selten eingesetzt werden.

Auch bei der Behandlung anderer Krankheitsbilder kann eine Multiresistenz entstehen. Verabreichte Wirkstoffe können die Expression von MDR-Transportern steigern. Dadurch kann die Bioverfügbarkeit anderer Wirkstoffe stark beeinflusst werden, da diese in der Darmpassage zu einem geringeren Teil ins Blut übergehen können [9, 10, 23].



1.3.1 Inhibitoren für MDR-Transporter

In der Chemotherapie werden Substanzen benötigt, die einer Multiresistenz von Tumorzellen entgegenwirken. Dafür werden zum Beispiel Inhibitoren gegen MDR-Transporter eingesetzt. So wurde der Calciumkanalblocker Verapamil, welcher in der Kardiologie eingesetzt wird, als Inhibitor für P-gp, MRP1 und MRP2 identifiziert [3, 24]. Eine blockierende Wirkung für alle der genannten MDR-Transporter geht von Cyclosporin A aus, was als Immunsuppressivum nach Organtransplantationen eingesetzt wird. Die Indikation zur Gabe von Verapamil oder Cyclosporin A liegt also ursprünglich nicht in der Krebstherapie. Ihre inhibierende Wirkung wurde zufällig entdeckt [3, 25].

Es handelt sich bei den beiden Medikamenten Verapamil und Cyclosporin A um Inhibitoren der ersten Generation. Sie müssten sehr hoch dosiert werden, um eine ausreichend starke inhibierende Wirkung zu entfalten. Die nötigen Konzentrationen wären für den Patienten toxisch. Deshalb kommen sie als Zusätze in einer Chemotherapie nicht in Frage. Sie werden jedoch zu Forschungszwecken *in vitro* als Breitbandinhibitoren eingesetzt [25].

Inhibitoren der zweiten Generation weisen zwar eine höhere Affinität gegenüber den MDR-Transportern auf, beeinflussen jedoch oft auch Entgiftungsmechanismen gesunder Zellen. Sie sind damit ebenfalls toxisch und können nicht als Zusätze in einer Chemotherapie verwendet werden, auch wenn eine wirksame Dosis wesentlich geringer ist als noch in der ersten Generation. Daher wird seit einigen Jahren intensiv an weiteren Inhibitoren geforscht, um deren Affinität und Spezifität zu steigern. Ziel ist es, geeignete Zusätze für eine Chemotherapie zu finden, die sich in ihrer Wirkung auf die multiresistenten Tumorzellen konzentriert [3, 21]. Inhibitoren der zweiten Generation werden ebenfalls für Forschungszwecke verwendet.



Kanalspezifische Inhibitoren wie zum Beispiel Zosuquidar (LY335979) gegen P-gp, MK-571 gegen MRP1 und MRP2, sowie Ko143 gegen BCRP zählen bereits zur dritten Inhibitorgeneration [26, 27]. Sie werden derzeit noch erforscht und ihr Einsatz in der Chemotherapie scheint vielversprechend [17]. Eine Übersicht über die genannten Inhibitoren ist in Tabelle 2 zu finden.

Tab. 2: Inhibitoren für die in Caco-2 vorkommenden MDR-Transporter nach Sharom und Siharheyeva [3]

Inhibitor	P-gp	MRP1 und MRP2	BCRP
Verapamil	x	x	
Cyclosporin A	x	x	x
Zosuquidar	x		
MK571		x	
Ko143			x

Die Erstgenerationinhibitoren Verapamil und Cyclosporin A gelten als Substrate der untersuchten MDR-Transporter. Sie inhibieren die Transporter kompetitiv [28, 29]. Die Inhibition von P-gp durch Zosuquidar erfolgt durch eine Blockierung der Substratbindungsstelle. Zosuquidar wird selbst nicht aus der Zelle transportiert und inhibiert P-gp irreversibel [25]. Die Inhibition der Transporter MRP1 und MRP2 erfolgt kompetitiv durch den MRP-spezifischen Inhibitor MK-571. Die Hemmung von MRP1 und MRP2 ist reversibel [30]. Ko143 als spezifischer BCRP-Inhibitor blockiert die ATPase-Aktivität des Transportproteins, sodass für den aktiven Transport der Substrate keine Energie zur Verfügung steht [31].



1.3.2 Aktivatoren für P-gp

Wirkstoffe, die zu gesteigerter Expression von MDR-Transportern führen, werden als Aktivatoren bezeichnet. Vor allem für die Aktivierung von P-gp sind einige Beispiele bekannt. Die Wirkstoffe bilden im Zytoplasma mit dem Pregnan X Rezeptor (PXR) einen aktiven Komplex, der die Transkription des MDR-1-Gens, welches für P-gp codiert verstärkt. Die Zelle bildet als Folge mehr P-gp in der Zellmembran aus, wodurch sie entgiftet wird [23, 32]. In dieser Arbeit soll auf drei Arzneistoffe eingegangen werden, die besonders für eine gesteigerte Expression von P-gp verantwortlich gemacht werden. Diese sind Rifampicin, Valproat und Hypericin [9, 33, 34]. Das Antibiotikum Rifampicin wird

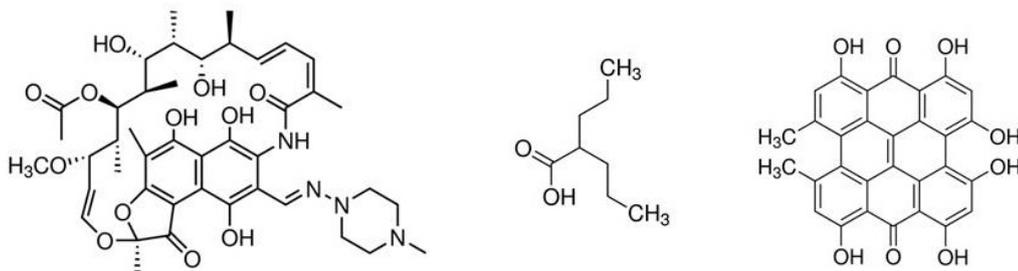


Abb. 7: Strukturformeln der P-gp-Aktivatoren Rifampicin (links), Valproat (mitte) und Hypericin (rechts), Quelle:<http://www.sigmaaldrich.com/catalog>, Stand Juli 2017

zum Beispiel gegen den Tuberkuloseerreger *Mycobacterium tuberculosis* eingesetzt [35]. Bei Valproat (Valproic Acid, VPA) handelt es sich um ein entkrampfendes Medikament, welches als Antiepileptikum Anwendung findet [33]. Hypericin gilt als der wirksame Bestandteil des Johanniskrauts, welches vor allem bei seelischen Erkrankungen in breiten Bevölkerungsschichten eingenommen wird [34]. Die genannten Moleküle sind jeweils Substrate von P-gp. Ihre unterschiedlichen Strukturformeln in Abbildung 7 geben einen Hinweis auf die breite Substratspezifität von P-gp. Die Aktivierung von MDR-Transportern sollte vor allem Beachtung finden, wenn gleichzeitig Wirkstoffe eingenommen werden müssen, die als Substrat der MDR-Transporter gelten. Ein Beispiel dafür ist das Herzglycosid Digoxin. Digoxin gelangt bei einer erhöhten Expression von MDR-Transportern nur noch zu einem geringen Teil über die Darmschranke ins Blut und wird so wirkungslos. Dies kann schwerwiegende Folgen haben. Eine simultane Behandlung mit einem der drei Aktivatoren und Digoxin ist daher kontraindiziert [9].



1.4 Funktionstestung von MDR-Transportern

Eine Möglichkeit die Anwesenheit der ausgebildeten MDR-Transporter zu überprüfen kann indirekt über ihre Funktion erfolgen. Dazu wird eine Verbindung aus Calcein und Acetoxymethyl verwendet (Siehe Abbildung 8). Calcein-Acetoxyethyl (Calcein-AM) ist ein membrangängiges, nicht fluoreszierendes Molekül. Diffundiert Calcein-AM durch die Zellmembran in die Zelle, wird es als Substrat von den MDR-Transportern erkannt und aus der Zelle geschleust. Sind die Transporter nicht vorhanden oder nicht funktionsfähig, akkumuliert Calcein-AM und wird durch unspezifische Esterasen im Zytoplasma hydrolysiert. Die Acetoxymethylgruppen (in Abbildung 8 rot umrandet) werden hierbei abgespalten und es entsteht Calcein. Dieses komplexiert mit Calciumionen aus dem Zytoplasma, wodurch eine grüne Fluoreszenz entsteht, die gemessen werden kann [36].

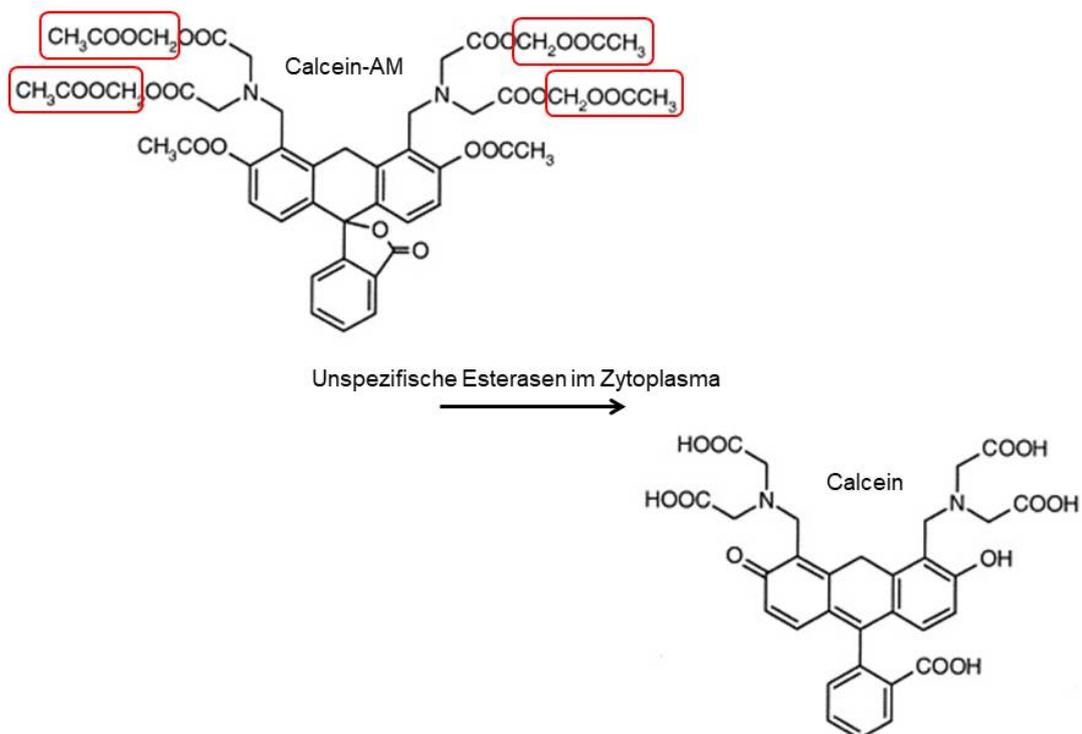


Abb. 8: Calcein-Acetoxyethyl-Molekül mit den rot umrandeten Acetoxyethylresten wird durch unspezifische Esterasen im Zytoplasma zu Calcein umgewandelt, welches mit Calciumionen im Zytoplasma komplexiert. Die Abbildung basiert auf den Beschreibungen von Homoloya [36].



1.5 Zielsetzung

Durch unterschiedliche Passagenanzahl und Medienzusammensetzungen differieren die Zellkulturstämme verschiedener Labore zum Teil gravierend. Daher ist es bei der Entwicklung von Biotestsytemen wie einem zellbasierten Testkit elementar, die Eigenschaften der verwendeten Zelllinien zu kennen. Für die Etablierung von Testkits, mit denen zum Beispiel die Permeabilität von oral verabreichten Wirksubstanzen in der Darmassage untersucht werden kann, ist es wichtig zu wissen, welche MDR-Transporter vom verwendeten Zellkulturmodell exprimiert werden und wie man diese beeinflussen kann. Ziel dieser Arbeit ist es daher, zwei Caco-2-Subklone auf ihre Transportereigenschaften zu untersuchen. Diese sind die Caco-2-Subklone D5 und F9, welche der kommerziell erhältlichen Caco-2-Zelllinie der Firma CLS entstammen und im Vorfeld durch Limited Dilution subkloniert wurden.

Neben dem Nachweis der Transporterproteine P-gp, MRP1, MRP2 und BCRP mittels indirekter Immunfluoreszenz, wird außerdem deren Funktion durch einen Calcein-AM-Assay überprüft. Dazu werden verschiedene Inhibitoren von MDR-Transportern verwendet, die bei Vorhandensein der zugehörigen MDR-Transporter ein erhöhtes Calcein-Signal erzeugen. Der Einsatz der Aktivatoren Hypericin, Rifampicin und Valproat soll eine Aussage darüber ermöglichen, ob sich die Expression der MDR-Transporter in den Caco-2-Subklonen stimulieren lässt.

Es soll ein Vergleich der MDR-Transporter-Expression zwischen aufgetauten Zellen und Zellen aus der laufenden Kultur gezogen werden. Außerdem soll die Passagenabhängigkeit der MDR-Transporter-Expression untersucht werden. Schließlich soll eine Aussage darüber getroffen werden, welcher der beiden Subklone sich für den Einsatz in einem Permeabilitätsassay besser eignet.



2 Material

2.1 Eingesetzte Zelllinien

Tab. 3: Eingesetzte Zelllinien

Zellklon	Laborinterne Chargennummer
Caco-2 (F9)	92-170418VJ01
Caco-2 (F9)	92-170505VJ01
Caco-2 (D5)	92-170324HB01
NIH-3T3	92-170715SaM01

2.2 Medien, Lösungen und Chemikalien

Tab. 4: Zellkulturmedium für Caco-2-Zellen

Medium	Zusätze	Hersteller
Alpha-MEM	20 % FBS	Sigma-Aldrich, M4526-500ML PAN-Biotech, P04-37500
	4 mM L-Glutamin	PAN-Biotech, P04-80100
	2 mM Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich, S8636-100ML
	1 % MEM NEAA (100x)	PAN-Biotech, P08-32100

Tab. 5: Einfriermedium für Caco-2-Zellen

Medium	Zusätze	Hersteller
Alpha-MEM	20 % FBS	Sigma-Aldrich, M4526-500ML PAN-Biotech, P04-37500
	4 mM L-Glutamin	PAN-Biotech, P04-80100
	2 mM Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich, S8636-100ML
	1 % MEM NEAA (100x)	PAN-Biotech, P08-32100
	5 % Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, D4540

**Tab. 6:** Lösungen

Bezeichnung	Hersteller
Accutase [®]	Sigma-Aldrich, A6964
Coulter Clenz Cleaning Agent	Beckman Coulter, 8448222
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, D4540
Dulbecco's Phostphatpuffer	Sigma-Aldrich, D8537
IsoFlow [™] Sheath Fluid	Beckman Coulter, 8546859
TrypLE [™] Express	Life Technologies, A12177-01

Tab. 7: Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Calcein-Acetoxyethyl, Calcein-AM	Sigma-Aldrich, 56496-20x50UG
Cyclosporin A	Sigma-Aldrich, C3662
Hypericin	Sigma-Aldrich, 56690
Ko143 Hydrat	Sigma-Aldrich, K2144
MK571	Sigma-Aldrich, M7571
Propidiumjodid, PI	Sigma-Aldrich, P4170
Rifampicin	Sigma-Aldrich, R3501
Valproat, VPA	Sigma-Aldrich, P4543
Verapamil	Sigma-Aldrich, V4269
Zosuquidar	Sigma-Aldrich, SML-1044

Tab. 8: Immunfluoreszenzreagenzien

Bezeichnung	Hersteller
4',6-Diamidin-2-phenylindol, DAPI	Sigma-Aldrich, 32670
Bovines Serum Albumin, BSA	Sigma, A4503
Mowiol Eindeckmedium	Roth, 0713
Paraformaldehyd, PFA	Roth, 0335.1
Triton X-100	AppliChem, A13880500

**Tab. 9:** Eingesetzte Antikörper

Bezeichnung	Hersteller
Alexa Fluor [®] 647 Anti-human/mouse MRP1 (ABCC1)	BioLegend, B210582
Cy3 Anti-mouse/goat	Dianova, 115-165-062
PE Anti-human/mouse CD338 (ABCG2)	BioLegend, B224838
PE Anti-human/mouse CD44 (ABCB1)	BioLegend, B223394
Purified Anti-human/mouse CD243 (ABCB1)	BioLegend, B173034
Purified Anti-human/mouse MRP1 (ABCC1)	BioLegend, B211227



2.3 Verbrauchsmaterial und Geräte

Tab. 10: Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Hersteller
Serologische Pipetten:	
1 mL	Sarstedt, 861251001
2 mL	Sarstedt, 861252001
5 mL	Sarstedt, 861253001
10 mL	Sarstedt, 861254001
25 mL	Sarstedt, 861685001
50 mL	Sarstedt, 861689001
Aspirette 2 mL	Sarstedt, 861252011
Zellkulturgefäße:	
T25 Flask	Sarstedt, 833910002
T75 Flask	Sarstedt, 833911002
T175 Flask	Sarstedt, 833912002
Cell [®] Stack, 5 Chamber	Corning, 3313
Cell [®] Stack, 10 Chamber	Corning, 3271
TC-Plate 6 Well, Standard, F	Sarstedt, 83.3920
Falcon Röhren:	
50mL	Sarstedt, 62547254
15mL	Sarstedt, 62554502
Cryotube 1,8 mL	Thermo Scientific, 377267

**Tab. 11:** Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Abfüllautomat	BioFill FluidX [®]	Cedrex A/S
Autoklav	V150	Systec
Barcodedrucker	CL-S631	Citizen
Durchflusszytometer	Cytomics FC500	Beckman Coulter
Fluoreszenzmikroskop	CKX41	Olympus
Inkubatoren	Heracell 150	Heraeus
	Forma Series II	Water Jacket
	Reach-In CO ₂ Inkubator	Thermo Scientific
Mehrkanalpipette	Xplorer 8-ch, 5-100 µL	Eppendorf
	Xplorer 8-ch, 50-1200 µL	Eppendorf
Mikroskop	Axiovert 40 CFL	Zeiss
Mikroskopkamera	Mirkocam 1.3MP	Bresser
	DFC320	Leica
Sterilwerkbank	Herasafe	Heraeus
Wasserbad	Typ 1003	GFL
Zellzählgerät	CASY [®] -Counter	ehemals Schärfe System, jetzt Roche
Zentrifuge	GPKR	Beckman

Tab. 12: Software

Software	Entwickler
BarTender UltraLite	Seagull Scientific
CXP Analysis, Version 2.2	Beckman Coulter
CXP Cytometer, Version 2.2	Beckman Coulter
ImageJ, Version 1.6.020	National Institute of Health
IrfanView 64, Version 4.42	Irfan Skiljan
MicroCamLab, Version 7.3.1.8	Bresser
MS Office Paket	Microsoft Corporation



3 Methoden

3.1 Zellkultur

Für diese Arbeit wurden zwei Subklone der laborinternen Caco-2-Zelllinie verwendet. Die beiden Subklone D5 und F9 wurden auf Grund ihrer guten Zellkultureigenschaften ausgewählt. Für die Versuche wurden zunächst voneinander unabhängige Testbatches der Zellklone hergestellt. Für den Vergleich von D5 und F9 wurde ein Batch des Subklons D5 erstellt. Ein direkter Vergleich zwischen zwei Testbatches des gleichen Subklons sollte zwischen zwei Batches des Klons F9 stattfinden. Dazu wurden die Zellen aufgetaut, in Kultur gebracht, expandiert und geerntet. Alle Arbeiten mit den Caco-2-Subklonen fanden unter aseptischen Bedingungen an der Sterilwerkbank statt. Auf Zusätze von Antibiotika wurde verzichtet.

3.1.1 Inkulturnahme von Caco-2-Zellen

Zu Beginn eines neuen Zellkulturbatches wurde ein kryokonserviertes Vial zügig aufgetaut. Die kryokonservierten Vials wurden zuvor bei einer Temperatur von unter $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ in der Gasphase über flüssigem Stickstoff gelagert. Zum Auftauen wurde ein Vial für zwei bis drei Minuten in ein $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ warmes Wasserbad gestellt. Anschließend wurde unter der Sterilwerkbank die Zellsuspension aus dem Cryovial (1,8 mL) in 10 mL vorgewärmtem Zellkulturmedium aufgenommen, sodass das im Einfriermedium enthaltene zytotoxische Dimethylsulfoxid (DMSO) verdünnt wurde. Die Caco-2-Zellen wurden anschließend für 5 min bei $80 \times g$ und Raumtemperatur abzentrifugiert und der Überstand aus Zellkulturmedium und DMSO abgesaugt. Das Zellpellet wurde durch leichtes „Schnippen“ gegen das Zentrifugenröhrchen aufgelockert und in 10 mL vorgewärmtem, frischem Zellkulturmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde abermals für 5 min bei $80 \times g$ und Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet erneut resuspendiert. Diese beiden aufeinanderfolgenden Waschschrte sollten gewährleisten, dass der Debrisanteil in der Zellsuspension möglichst gering bleibt. Eine Zellzählung blieb beim Start des neuen Batches aus. Hier wurde von der im Einfrierprozess festgelegten und durch drei Auftaukontrollen ermittelten Zellzahl ausgegangen. Nach der Resuspen-



dierung wurde ermittelt, welches Volumen der Zellsuspension benötigt wird, um die passende Aussaatdichte für die gewünschte Inkubationszeit zu erreichen.

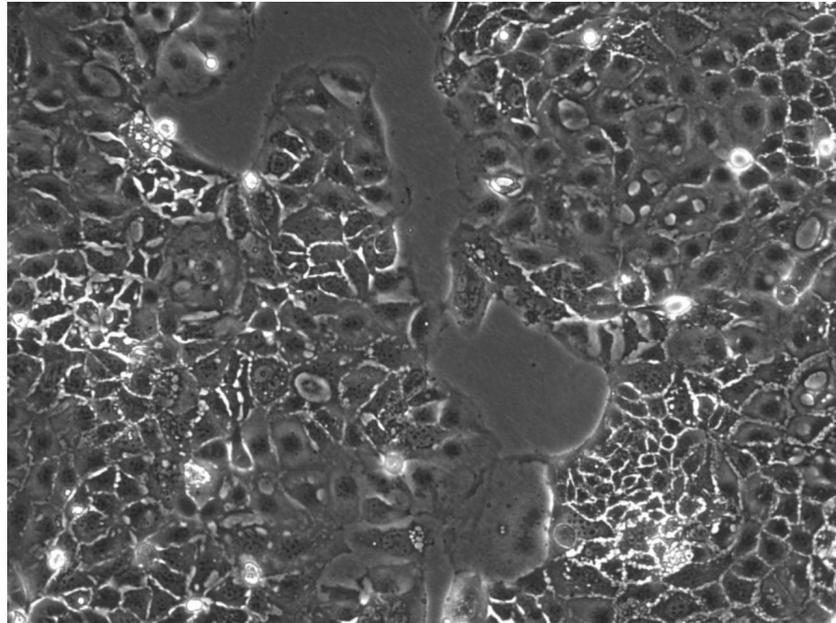


Abb. 9: Lichtmikroskopisches Bild einer Kultur von Caco-2-Zellen nach dreitägiger Inkubation in einer T175-Zellkulturflasche mit Caco-2-Zellkulturmedium bei 37 °C und 5 % CO₂; 100-fache Vergrößerung; als 80%ige Konfluenz eingeschätzte Zelldichte der pflastersteinartig wachsenden Caco-2-Zellen

Die Zelldichte sollte nach der gewählten Inkubationszeit nicht mehr als 70-80 % betragen, damit sich die Zellen durchgehend in der exponentiellen Wachstumsphase befinden. Als Beispiel für 80%ige Konfluenz dient Abbildung 9, wobei es sich um eine subjektive Einschätzung handelt. Die Caco-2-Zellen wurden für drei Tage Inkubationszeit mit $3 \cdot 10^4 \frac{\text{Zellen}}{\text{cm}^2}$ oder für vier Tage mit $2 \cdot 10^4 \frac{\text{Zellen}}{\text{cm}^2}$ ausgesät.



Folgende Rechenschritte waren für die Ermittlung des benötigten Suspensionsvolumens und damit der benötigten Anzahl an Zellen notwendig:

$$N_{\text{Cells, need}} = N_{\text{Flask}} \cdot A_{\text{Flask}} \cdot \text{SD} \quad (1)$$

$$V_{\text{Suspension}} = \frac{N_{\text{Cells, need}}}{N_{\text{Cells per vial}}} \cdot V_{\text{Gesamt}} \quad (2)$$

Mit

$N_{\text{Cells, need}}$ = benötigte Zellzahl für die Aussaat

N_{Flask} = Anzahl an Zellkulturflaschen

A_{Flask} = Fläche einer Zellkulturflasche in cm^2

SD = gewünschte Aussaatdichte (Seeding Density) für geplanten Zeitraum
in $\frac{\text{Zellen}}{\text{cm}^2}$; Erfahrungswerte

$V_{\text{Suspension}}$ = Volumen der Zellsuspension für die Aussaat in mL

$N_{\text{Cells per vial}}$ = Zellzahl in einem Cryovial

V_{Gesamt} = Resuspensionsvolumen in mL

3.1.2 Expansion und Passagierung

Nach drei bis vier Tagen wurden die Zellen aus der Zellkulturflasche abgelöst und gesplittet, expandiert oder für einen der Versuche eingesetzt. Dazu wurde zunächst das Kulturmedium abgesaugt, die Flasche vorsichtig mit phosphatgepufferter Salzlösung (Phosphate Buffered Saline, PBS-Puffer) gespült, um Reste des im Medium enthaltenen fötalen Kälberserums (Fetal Bovine Serum, FBS) zu entfernen. Es folgte ein Spülschritt mit TrypLETM Express um die Ablösezeit zu verringern und die Zellen so zu schonen. Anschließend wurde die für die Kulturflaschengröße entsprechende Menge an TrypLETM Express aufgegeben und bei 37 °C und 5 % CO₂ für 7 min inkubiert, bis sich alle Zellen vom Flaschenboden gelöst hatten oder durch leichtes Klopfen abschwammen. Zur Kontrolle des Ablösefortschrittes wurde ein Phasenkontrastmikroskop verwendet (100-fache Vergrößerung). In abgelöstem Zustand erschienen die Zellen kugelig und schwammen im Medium in der Zellkulturflasche. Zur Inhibition des Ablösereagenzes wurden die abgelösten Zellen mit dem Caco-2-Zellkulturmedium abgespült, aufgenommen und in



ein ausreichend großes Zentrifugengefäß überführt. Das enthaltene FBS stoppt die enzymatische Wirkung des TrypLETM Express. Zurückbleibende Zellen wurden durch einen weiteren Spülschritt mit frischem Zellkulturmedium ebenfalls in das Zentrifugenröhrchen überführt. Es folgten die gleichen Zentrifugations- und Rechenschritte wie bereits im oben beschriebenen Auftauprozess.

3.1.3 Kryokonservierung eines fertiges Batches

Die Erntefläche und -dichte wurde im Vorfeld durch Festlegung der Batchgröße (50 vials) und einzufrierenden Zellzahl pro Cryovial bestimmt. Am Tag der Ernte wurde im Zuge der Qualitätskontrolle zunächst eine Probe des verbrauchten Zellkulturmediums genommen und für die Mycoplasmenanalyse eingefroren. Anschließend wurden die Zellen wie gewohnt abgelöst und nach den beiden Waschvorgängen resuspendiert. Die Zellsuspension wurde durch dreimaliges auf und ab pipettieren vorsichtig homogenisiert und das genaue Volumen bestimmt. Dann wurden drei Stichproben (jeweils 100 µL) für die Zellzählung am CASY[®]-Counter genommen. Vor jeder Stichprobe wurde die Zellsuspension invertiert, um zu verhindern dass sich bei der nächsten Stichprobe bereits Zellen abgesetzt hatten. So konnte eine Abweichung der Zellzahl der einzelnen Stichproben minimiert werden. Nach der Zellzählung der Stichproben wurde der Mittelwert bestimmt und auf dessen Grundlage berechnet, wieviel der Erntesuspension benötigt wurde.



$$\begin{aligned}
 V_{\text{Mix}} &= V_{\text{Suspension}} + V_{\text{Einfriermedium}} \\
 &= N_{\text{Vials}} \cdot V_{\text{Vial}}
 \end{aligned} \tag{3}$$

$$V_{\text{Suspension}} = \frac{N_{\text{vials}} \cdot N_{\text{Cells per vial}} \cdot V_{\text{Harvest}}}{N_{\text{Cells total}}} \tag{4}$$

$$V_{\text{Einfriermedium}} = V_{\text{Mix}} - V_{\text{Suspension}} \tag{5}$$

Mit

V_{Mix}	= Volumen der Einfriermischung in mL
$V_{\text{Suspension}}$	= benötigtes Volumen der Erntesuspension in mL
$V_{\text{Einfriermedium}}$	= benötigtes Volumen an Einfriermedium in mL bestehend aus Caco-2-Zellkulturmedium + 0,5 %DMSO
N_{Vials}	= Anzahl an Vials für ein Batch, Batchgröße
V_{Vial}	= Standardvolumen in einem Cryovial, 1,8 mL
$N_{\text{Cells per vial}}$	= Anzahl der Zellen die in einem Vial eingefroren werden sollen
V_{Harvest}	= Gesamtvolumen der Erntesuspension bei der Zellzählung am CASY [®] -Counter in mL
$N_{\text{Cells total}}$	= Anzahl der gezählten Zellen aus der Erntesuspension



3.2 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ermöglicht es neben der Größe und der Homogenität von Zellen und Partikeln gleichzeitig auch Fluoreszenzsignale von markierten oder gefärbten Zellen zu messen [37]. Dabei wird Zellsuspension von ca. $1 \cdot 10^6 \frac{\text{Zellen}}{\text{mL}}$ über eine Kapillare angesogen und durch eine Hüllstromflüssigkeit (Sheathfluid) verdünnt. Zellaggregate werden durch die entstehenden Scherkräfte vereinzelt. Die einzelnen Zellen werden im rechten Winkel an einer monochromatischen Lichtquelle (Argon-Laser, 488 nm, optional HeNe-Laser 633 nm) vorbeigeführt [38]. Das von dort ausgehende Anregungslicht wird durch die Zellen gestreut. Gleichzeitig werden Fluoreszenzen angeregt. Das gestreute bzw. emittierte Lichtsignal wird auf einen Lichtdetektor geleitet. Die Stärke des entstehenden Stroms ist der Lichtintensität proportional. Das Stromsignal wird im Signalwandler umgewandelt und digital zur Anzeige gebracht. In Abbildung 10 ist der Aufbau eines Durchflusszytometers vereinfacht dargestellt [37, 39].

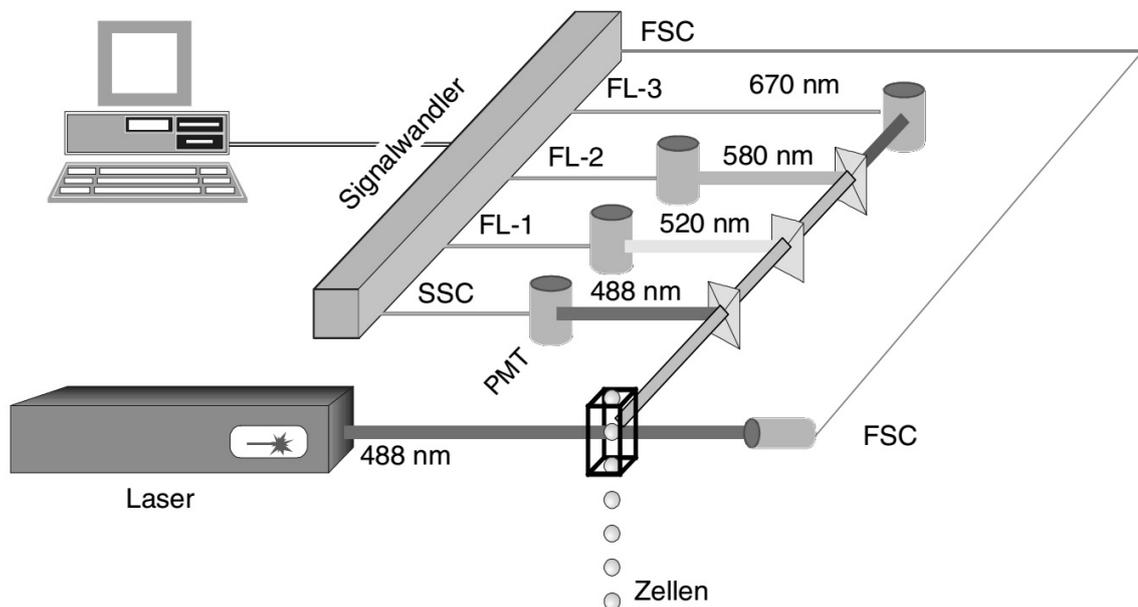


Abb. 10: Genereller Aufbau eines Durchflusszytometers: der anregende Laserstrahl trifft orthogonal auf die vorbeigeführten Zellen, welche vorher durch den Hüllstrom (Sheathfluid) vereinzelt wurden. Das Anregungslicht wird gestreut und regt gleichzeitig Fluoreszenzen von gefärbten oder markierten Zellen an. Farbteilerspiegel leiten das seitlich gestreute emittierte Licht zu den jeweiligen Lichtdetektoren. Dort entsteht ein Stromfluss der der Lichtintensität proportional ist und vom Signalwandler und dem Prozessor zur digitalen Anzeige gebracht wird [39, 37, 40]. Bei dem verwendeten Durchflusszytometer der Firma Beckman Coulter FC500 können fünf verschiedene Fluoreszenzfilter ausgewählt werden (FL1 bis FL5, Detektion von 185 nm bis 900 nm möglich) (Rothe, Technische und methodische Grundlagen der Durchflusszytometrie [37]).



Das Anregungslicht wird zunächst durch die Zellen geleitet und als Vorwärtslichtstreuung (Forward Scatter; FSC) detektiert. Die Vorwärtsstreuung des Lichtstrahls ist ein Maß für die Partikel- oder Zellgröße. Je größer die Ablenkung, desto größer ist auch der Partikel. Gleichzeitig wird die Seitwärtslichtstreuung (Sideward Scatter; SSC) orthogonal zum Anregungslichtstrahl gemessen. Die Seitwärtsstreuung steht für die Homogenität der Zellen und Partikel [37]. Für die Detektion von FSC und SSC werden Fotodioden eingesetzt, deren Widerstand mit der Lichtintensität abnimmt. Dadurch entsteht ein Stromfluss der vom Signalwandler verarbeitet und der Software gespeichert wird [40].

Die Signale von FSC und SSC können zur Darstellung von einzelnen Zellpopulationen grafisch gegeneinander aufgetragen werden. Es entsteht eine Punktegrafik (Dotplot) wie sie in Abbildung 11 veranschaulicht ist [39]. Hier lässt sich erkennen, dass neben intakten Zellen (in grün dargestellt) auch ein Anteil an Zelltrümmern und toten Zellen vorhanden ist (grau dargestellt). Zelltrümmer und tote Zellen sind kleiner und weniger homogen als intakte Zellen. Daher erscheinen sie in der linearen Dotplotgrafik im unteren Bereich und liegen weiter rechts [37].

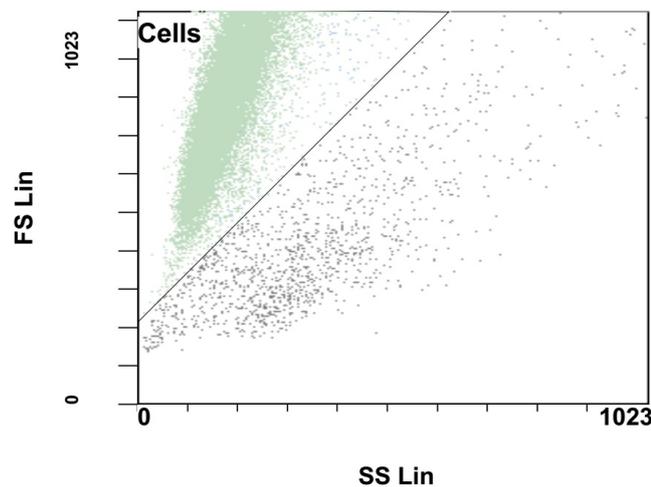


Abb. 11: Dotplot: Für jeden Partikel ist das Signal der Seitwärtslichtstreuung gegen seine Vorwärtslichtstreuung als Punkt (Dot) aufgetragen. Dadurch werden unterschiedliche Populationen erkennbar, die es dem Anwender erlauben, zwischen Zelltrümmern und intakten Zellen zu unterscheiden. Je kleiner die Zellen, desto eher handelt es sich um tote Zellen oder Zelltrümmer. Diese sind außerdem weniger homogen und erscheinen in der Grafik weiter rechts [37].



Im Programm des Durchflusszytometers kann zur weiteren Analyse der lebenden Zellen ein Rahmen (Gate) um die gewünschte Zellpopulation gelegt werden, was in Abbildung 11 durch eine Diagonale im Dotplot gekennzeichnet ist. Das Gate umschließt die grün dargestellte Population. Somit werden die Zelltrümmer von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Im nächsten Schritt können dann die gleichzeitig gemessenen Fluoreszenzsignale der ausgewählten Zellen analysiert werden [39].

Im Durchflusszytometer FC500 der Firma Beckman Coulter stehen fünf Filter zur Verfügung, die das emittierte Licht auf den jeweiligen Fluoreszenzdetektor (Fotomultiplier) lenken. Bei der Auswertung im Analyseprogramm wird der geeignete Fluoreszenzkanal (Fluorescencelight, FL) ausgewählt. Die Auswahl des passenden Kanals (FL1 bis FL5) richtet sich nach dem gewählten Fluoreszenzfarbstoff. In Tabelle 13 sind die eingesetzten Farbstoffe und der dazugehörige Fluoreszenzkanal aufgelistet. Werden mehrere Farbstoffe gleichzeitig verwendet, so ist darauf zu achten, dass sich die Emissionsmaxima nicht überschneiden, da sonst eine gleichzeitige Messung zu falschen Fluoreszenzsignalen führen würde. Als Beispiel ist die gleichzeitige Messung von Calcein und Propidiumjodid in Abbildung 12 dargestellt. Die Spektren der Anregungswellenlängen schließen die Wellenlänge des verwendeten Lasers von 488 nm ein. Ergo können beide Fluoreszenzfarbstoffe bei 488 nm angeregt werden. Die Emissionswellenlängen liegen weit genug auseinander, sodass beide Fluoreszenzfarbstoffe gleichzeitig gemessen werden können.

Tab. 13: Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe und zugehörige FL-Kanäle

Farbstoff	Anregungswellenlänge	Emissionswellenlänge	Fluoreszenzkanal
Calcein	494 nm	517 nm	FL1
R-Phycoerythrin (PE)	565 nm	575 nm	FL2
Alexa Fluor®647	650 nm	668 nm	FL4
Propidiumjodid	536 nm	617 nm	FL3

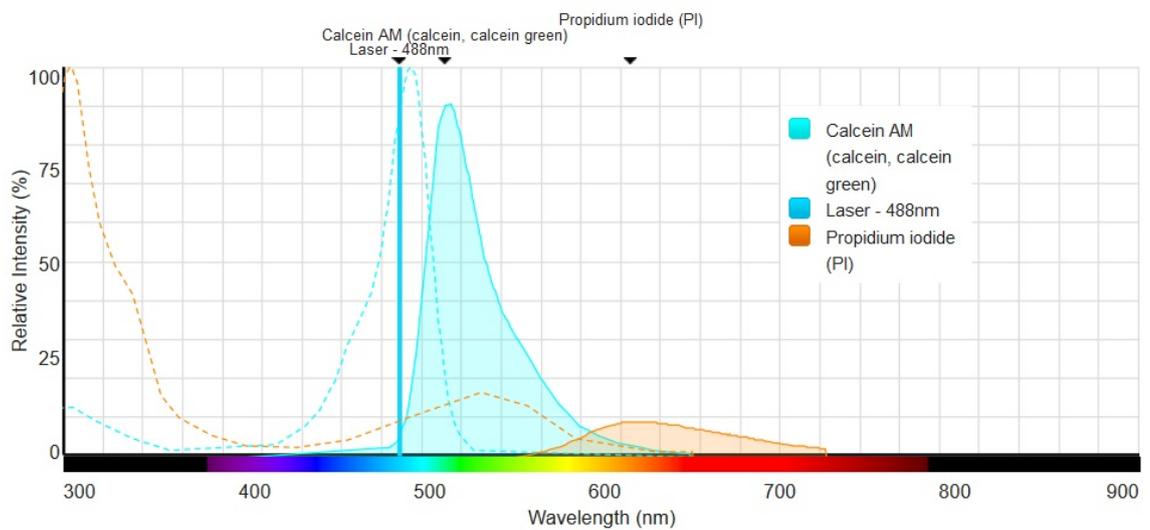


Abb. 12: Spektrum von Calcein und Propidiumjodid: Die Wellenlänge des Anregungslasers ist als Linie bei 488 nm eingezeichnet. Die unterbrochenen Linien stellen die Anregungsspektren von Calcein (türkis) und Propidiumjodid (orange) dar und liegen beide im Bereich des Anregungslasers. Die Spektren der Emissionswellenlängen sind in der jeweiligen Farbe flächig abgebildet. Sie haben ihr Emissionsmaximum bei 517 nm (Calcein) und 617 nm (Propidiumjodid). Damit liegen die Maxima weit genug auseinander und beide Fluoreszenzen können gleichzeitig gemessen werden. Die Abbildung ist modifiziert nach <http://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html?cid=fl-spectraviewer>; Stand: 13.07.2017



3.3 Nachweis der MDR-Transporter über Immunfluoreszenz

Der Nachweis der MDR-Transporter als Antigene in der Zellmembran kann über spezifische Antikörper erfolgen. Dazu wird ein monoklonaler Antikörper, welcher gegen das gesuchte Antigen gerichtet ist, auf die Zellen gegeben. Dieser Antikörper bindet an die exprimierten Antigenstrukturen und führt durch einen gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff entweder direkt zu einer detektierbaren Fluoreszenz oder ein zweiter Antikörper, welcher sich gegen den ersten richtet wird aufgebracht. Dieser wiederum ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt und erzeugt so ein Fluoreszenzsignal.

Geht das Fluoreszenzsignal vom Primärantikörper aus, so handelt es sich um eine direkte Immunfluoreszenz. Sie findet vor allem bei Antigennachweisen in der Durchflusszytometrie Anwendung, da hier eine niedrigere Nachweisgrenze erreicht werden kann. Wird zur Erzeugung eines Fluoreszenzsignals noch ein weiterer Antikörper eingesetzt (Sekundärantikörper), so handelt es sich um einen indirekten Immunfluoreszenznachweis. Dieser ist besonders für die Immunfluoreszenzmikroskopie geeignet, da das Signal meist stärker ausfällt.

Der Nachweis der MDR-Transporter P-gp, MRP1 und BCRP erfolgte sowohl mikroskopisch über einen indirekten Immunfluoreszenznachweis, als auch durch einen direkten Immunfluoreszenznachweis im Durchflusszytometer. Da ein geeigneter MRP2-Antikörper nicht verfügbar war, konnte für diesen Transporter kein Immunfluoreszenznachweis durchgeführt werden.



3.3.1 Indirekter Nachweis am Immunfluoreszenzmikroskop

Zum indirekten Nachweis der MDR-Transporter in den drei Testbatches wurden die Subklone mit einer Aussaatdichte von $2 \cdot 10^4 \frac{\text{Zellen}}{\text{cm}^2}$ in jeweils drei Wells einer 6-Well-Platte ausgesät. Die Wells wurden vor der Aussaat mit sterilen Deckgläschen bestückt, sodass die Zellen auf diesen wachsen konnten. Nach viertägiger Kultivierungsdauer bei 37°C und 5% CO_2 im Inkubator, wurden die Zellen in der 6-Well-Platte gefärbt.

Das verbrauchte Zellkulturmedium wurde abgesaugt und die Zellen mit $1 \frac{\text{mL}}{\text{Well}}$ PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit $500 \frac{\mu\text{L}}{\text{Well}}$ einer 4%igen Paraformaldehyd-Lösung für 10 min bei Raumtemperatur fixiert. Zur Permeabilisierung der Zellen wurden diese mit 0,1%iger Triton-X-Lösung gewaschen ($500 \frac{\mu\text{L}}{\text{Well}}$). Unspezifischen Bindungsstellen für die Antikörper wurden dann durch 3%ige BSA-Lösung (Bovines Serum Albumin) für eine Stunde bei Raumtemperatur blockiert ($500 \frac{\mu\text{L}}{\text{Well}}$).

Es folgte die Bindung des ersten Antikörpers. Die primären Antikörper wurden jeweils 1:60 in 3%iger BSA-Lösung verdünnt, sodass sich die in Tabelle 14 aufgelisteten Konzentrationen ergaben ($200 \frac{\mu\text{L}}{\text{Well}}$). Die Inkubationszeit betrug 1,5 h bei 37°C und 5% CO_2 . Überschüssige Primärantikörper wurden nach Ablauf der Inkubationszeit durch zwei Waschschrte mit 0,1%iger Triton-X-Lösung entfernt ($500 \frac{\mu\text{L}}{\text{Well}}$).

Tab. 14: Antikörperkonzentrationen indirekter Immunfluoreszenznachweis

Antikörper	Konzentration in $\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$
Purified Anti-human/mouse CD243 (ABCB1)	8
Purified Anti-human/mouse MRP1 (ABCC1)	8
Human ABCG2 Antibody	17
Cy3	7,5

Anschließend wurde der mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 gekoppelte Sekundärantikörper in einer 1:200 Verdünnung auf die Zellen gegeben und ebenfalls für 1,5 h 37°C und 5% CO_2 inkubiert ($50 \frac{\mu\text{L}}{\text{Well}}$). Da die im Tageslicht enthaltene UV-Strahlung die Fluoreszenz des Antikörperfarbstoffes verringert, fanden ab hier alle weiteren Schritte im Dunkeln statt. Die überschüssigen Sekundärantikörper wurden in zwei Waschschrten



mit 0,1 %iger Triton-X-Lösung entfernt.

Es folgte die Zellkernfärbung mit $10 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$ DAPI-Lösung für 5 min bei Raumtemperatur ($500 \frac{\mu\text{L}}{\text{Well}}$), welche anschließend wieder mit 0,1 %iger Triton-X-Lösung abgewaschen wurde ($500 \frac{\mu\text{L}}{\text{Well}}$). Die Deckgläschen wurden mit dem Eindeckmedium Mowiol auf einem Objektträger konserviert und konnten dann mikroskopiert werden.

3.3.2 Direkter Nachweis am Durchflusszytometer

Die drei Testbatches wurden jeweils für vier Tage in zwei T175-Zellkulturflaschen inkubiert. Am vierten Tag wurden die Zellen mit dem für die Zellen schonenderen Ablösereagenz Accutase[®] abgelöst, um die nachzuweisenden MDR-Transporter nicht zu schädigen. Dazu wurden die Zellen in jeder Flasche mit 3 mL des Ablösereagenzes für 7 min bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, bis sich die Zellen vom Flaschenboden ablösten oder durch leichtes klopfen abgelöst werden konnten. Anschließend wurden in jede Flasche 10 mL FBS-haltiges Zellkulturmedium gegeben, um die enzymatische Wirkung des Ablösereagenzes zu stoppen und die Zellen abzuspülen. Es folgten zwei Waschschrte um verbrauchtes Zellkulturmedium und Zelltrümmer zu entfernen. Die Zellen wurden wie im Passagierprozess mit dem CASY[®]-Counter gezählt und die Zellkonzentration auf ca. $1 \cdot 10^6 \frac{\text{Zellen}}{\text{mL}}$ eingestellt. Es wurden für jeden Zellklon jeweils zwei Aliquots von 1 mL in 1,5 mL-Eppendorf-Reaktionsgefäße abgefüllt.

Die Zellen wurden bei 300 x g für 3 min bei Raumtemperatur abzentrifugiert um das Zellkulturmedium abzutrennen. Anschließend erfolgten zwei Waschschrte mit 0,5 %iger BSA-Lösung um sowohl Zellkulturmedienreste zu entfernen als auch die unspezifischen Bindungsstellen auf den Zellen zu blockieren. Dazu wurden die Zellen zwischen den Waschschrten für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und nach der Hälfte der Inkubationszeit einmal invertiert.

**Tab. 15:** Antikörperkonzentrationen direkter Immunfluoreszenznachweis

Antikörper	Konzentration in $\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$
PE Anti-human/mouse CD44 (ABCB1)	2,5
Alexa Fluor [®] 647 Anti-human/mouse MRP1 (ABCC1)	0,6
PE Anti-human/mouse CD338 (ABCG2)	5

Anschließend folgte die Antikörperfärbung. Ein Aliquot von jedem Subklon wurde als Autoimmunfluoreszenzkontrolle und Basissignal verwendet. Der Ansatz erfolgte ohne Antikörper. Nach den Angaben des Herstellers wurden für einen Test jeweils 5 μL der zur Verfügung stehenden Antikörper verwendet. Die Antikörper wurden jeweils 1:20 in 0,5 %iger BSA-Lösung verdünnt, sodass sich die in Tabelle 15 aufgelisteten Konzentrationen ergaben. Die als Autoimmunfluoreszenzkontrolle deklarierten Aliquots wurden nach dem zweiten Waschschrift mit jeweils 100 μL der 0,5 %igen BSA-Lösung resuspendiert, die zu färbenden Zellen mit 100 μL der Antikörperlösung. Anschließend erfolgte eine Inkubationszeit von 20 min bei Raumtemperatur im Dunkeln. Als Negativkontrolle zum Ausschluss von unspezifischen Antikörper-Bindungen wurden NIH-3T3-Zellen verwendet. Diese exprimieren keinerlei MDR-Transporter. Die Behandlung der Negativkontrolle mit den NIH-3T3-Zellen war identisch mit der Behandlung der zu testenden Subklone.



3.4 Nachweis der MDR-Transporter im Calcein-AM-Assay

Der Calcein-AM-Assay wurde zur Charakterisierung der verwendeten Zellklone eingesetzt. Hier wurde die Tatsache ausgenutzt, dass Calcein-AM als membrangängiges, nicht fluoreszentes Molekül in die Zellen diffundiert und bei vorhandenen, funktionsfähigen MDR-Transportern als Substrat wieder aus den Zellen ausgeschleust wird. Durch Blockierung der Transporter durch verschiedene Inhibitoren wurde erreicht, dass Calcein-AM von unspezifischen Esterasen im Zytoplasma hydrolysiert wurde. Dadurch wurde ein Calcein-Signal messbar, welches mit dem Basissignal aus der nicht inhibierten Probe verglichen werden konnte. So wurde eine Aussage über die Expression der MDR-Transporter möglich. Der Basiswert der nicht inhibierten Zellen wurde niedriger erwartet als das Calcein-Signal der inhibierten Proben.

3.4.1 Transporterspezifische Inhibitoren

Zunächst wurden die zu untersuchenden Zellklone für vier Tage mit einer Aussaatdichte von $2 \cdot 10^4 \frac{\text{Zellen}}{\text{cm}^2}$ in T175-Zellkulturflaschen ausgesät. Diese wurden dann bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Am vierten Tag konnten die Zellen jeder Flasche mit 3 mL TrypLE™ Express abgelöst werden. Die enzymatische Wirkung des Ablösereagens wurde wie beim Passagieren durch 10 mL FBS-haltiges Zellkulturmedium gestoppt und die Zellen wurden ab gespült. Es folgten die gleichen Schritte wie bei der Passagierung. Nach der Zellzählung am CASY®-Counter wurde die Suspension durch Auffüllen mit frischem Zellkulturmedium auf eine Zellkonzentration von $1 \cdot 10^6 \frac{\text{Zellen}}{\text{mL}}$ verdünnt und in 1,5 mL-Eppendorf Reaktionsgefäße aufgeteilt. Zur Inhibition der MDR-Transporter wurden zunächst die Breitbandinhibitoren Verapamil und Cyclosporin A eingesetzt. Drei weitere Aliquots der Zellsuspension wurden mit den einzelnen spezifischen Inhibitoren behandelt und zuletzt wurden Kombinationen aus den spezifischen Inhibitoren verwendet. Die eingesetzten Inhibitorkonzentrationen sind in Tabelle 16 aufgeführt. Die Inhibitoren hatten eine Inkubationsdauer von 5 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde Calcein-AM zu den Proben gegeben, sodass eine Calcein-AM-Konzentration von 1 nM in den Aliquots entstand. Die Inkubation mit Calcein-AM dauerte 10 min und wurde bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank vorgenommen. Zum Ausschluss von toten



Zellen wurde eine Propidiumjodidfärbung angeschlossen. Propidiumjodid (PI) dringt durch die Zellmembran toter Zellen und interkaliert mit der DNA im Zellkern, wodurch PI-positive Zellen am Durchflusszytometer ausgegrenzt werden konnten. Dann erfolgte die Messung des Calcein-Signals.

Tab. 16: Konzentration der eingesetzten Inhibitoren

Inhibitor	Endkonzentration in μM
Verapamil	100
Cyclosporin A	10
Zosuquidar	5
MK-571	50
Ko143	0,2



3.4.2 Aktivatoren für P-gp

Die aktivierende Wirkung der Substanzen Rifampicin, Valproat und Hypericin auf die P-gp-Transporter der Testbatches erfolgte durch elftägige Behandlung der Zellen mit den Substanzen. Die Wirkstoffe wurden in das Zellkulturmedium gegeben, sodass die in Tabelle 7 angegebenen Konzentrationen vorlagen. Es folgte eine einwöchige Erholungsphase ohne Aktivatorsubstanz, da die Zellen eine niedrigere Wachstumsgeschwindigkeit aufwiesen und an Vitalität verloren hatten. Dann wurden die Zellen wie oben beschrieben abgelöst und der Calcein-AM Assay wurde durchgeführt. Im Unterschied zu der oben genannten Calcein-AM Konzentration erfolgte die Überprüfung auf erfolgreiche Aktivierung der P-gp-Transporter mit 10 nM Calcein-AM.

Tab. 17: Aktivatoren für P-gp-Expression

Aktivator	Endkonzentration in μM
Hypericin	3
Rifampicin	10
Valproat	5



4 Ergebnisse

Die Charakterisierung der Transportereigenschaften der beiden Caco-2-Subklone D5 und F9 erfolgte über drei unterschiedliche Wege. Neben der Immunfluoreszenzmikroskopie und dem MDR-Transporternachweis über spezifische Antikörper am Durchflusszytometer erfolgte eine funktionelle Testung der MDR-Transporter im Calcein-AM Assay mit Hilfe spezifischer MDR-Inhibitoren. Zusätzlich wurde getestet, ob bekannte P-gp-aktivierende Substanzen einen Einfluss auf die MDR-Transporter-Aktivität in den getesteten Zellklonen haben.

4.1 Nachweis der MDR-Transporter über spezifische Antikörper

4.1.1 Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenzmikroskopie verschaffte einen Überblick über die exprimierten MDR-Transporter in den Caco-2-Subklonen D5 und F9. Dazu wurden Zellen aus allen drei Testbatches in Kultur gebracht. Die Immunfluoreszenzfärbung erfolgte bei Subklon D5 in Passage 21, beim ersten Batch des Subklons F9 in Passage 18, beim zweiten Batch in Passage 19.



Die Immunfluoreszenzfärbung der in Abbildung 13 dargestellten Zellen des Caco-2-Subklons D5 zeigt neben den DAPI-gefärbten Zellkernen eine leichte rote Fluoreszenz. Diese wird als Hintergrundsignal durch unspezifische Bindungen des sekundären Antikörpers bewertet. Im Subklon D5 konnte demnach keiner der MDR-Transporter durch eine indirekte Immunfluoreszenztestung nachgewiesen werden.

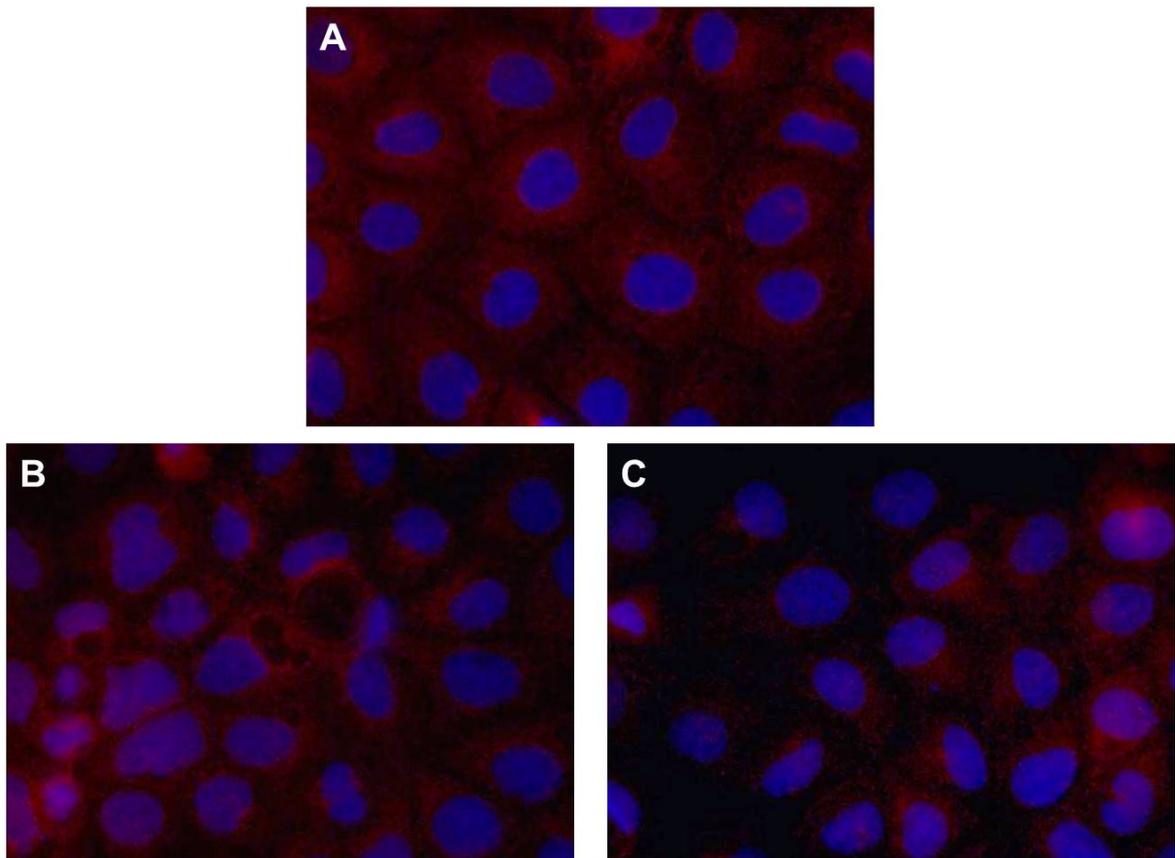


Abb. 13: Mikroskopische Aufnahmen des Caco-2-Subklons D5 in 400-facher Vergrößerung unter dem Fluoreszenzmikroskop: Die Ausschnitte A, B und C zeigen die DAPI-gefärbten Zellkerne in blau. Der sekundäre, Cy3-markierte Antikörper erzeugt eine leichte rote Fluoreszenz. Die Zellen in Ausschnitt **A** wurde mit dem primären P-gp-Antikörper behandelt. Ausschnitt **B** zeigt das Ergebnis der mit MRP1-Antikörpern behandelten Zellen. In Ausschnitt **C** ist das Ergebnis der mit BCRP-Antikörpern behandelten Zellen abgebildet.



Die Ergebnisse der Immunfluoreszenzmikroskopie der beiden Kulturen des Subklons F9 sind in Abbildung 14 und 15 dargestellt. Für P-gp und BCRP kann eine deutliche Fluoreszenz des Cy3-Antikörpers festgestellt werden (Abbildungen 14 und 15, A und C). Demnach haben die spezifischen Primärantikörper an die Antigenstrukturen von P-gp und BCRP gebunden und der markierte Sekundärantikörper konnte wiederum an die Primärantikörper binden. In den Bildausschnitten B wird von einem Hintergrundsignal ausgegangen. Demnach bildet der Subklon F9 sowohl P-gp als auch BCRP aus. MRP1 konnte durch indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie nicht nachgewiesen werden.

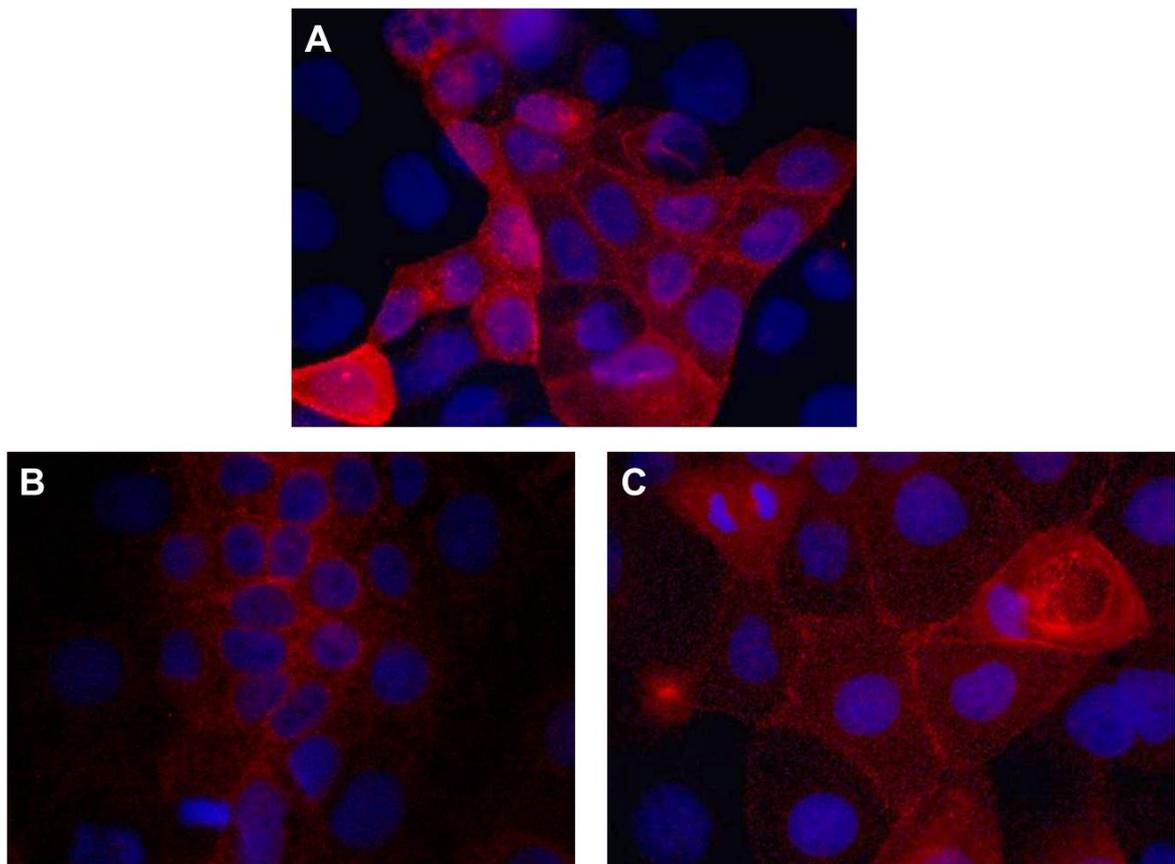


Abb. 14: Mikroskopische Aufnahmen des Caco-2-Subklons F9 Batch 1 in 400-facher Vergrößerung unter dem Fluoreszenzmikroskop: In allen Bildern fluoreszieren die DAPI-gefärbten Zellkerne blau. Der sekundäre, Cy3-markierte Antikörper erzeugt bei den Zellen der Ausschnitte A und C ein positives Fluoreszenzsignal. Die Zellen der Ausschnitte A wurden mit dem primären P-gp-Antikörper behandelt. Die Ausschnitte B zeigen das Ergebnis der mit MRP1-Antikörpern behandelten Zellen. In den Ausschnitten C ist das Ergebnis der mit BCRP-Antikörpern behandelten Zellen abgebildet.

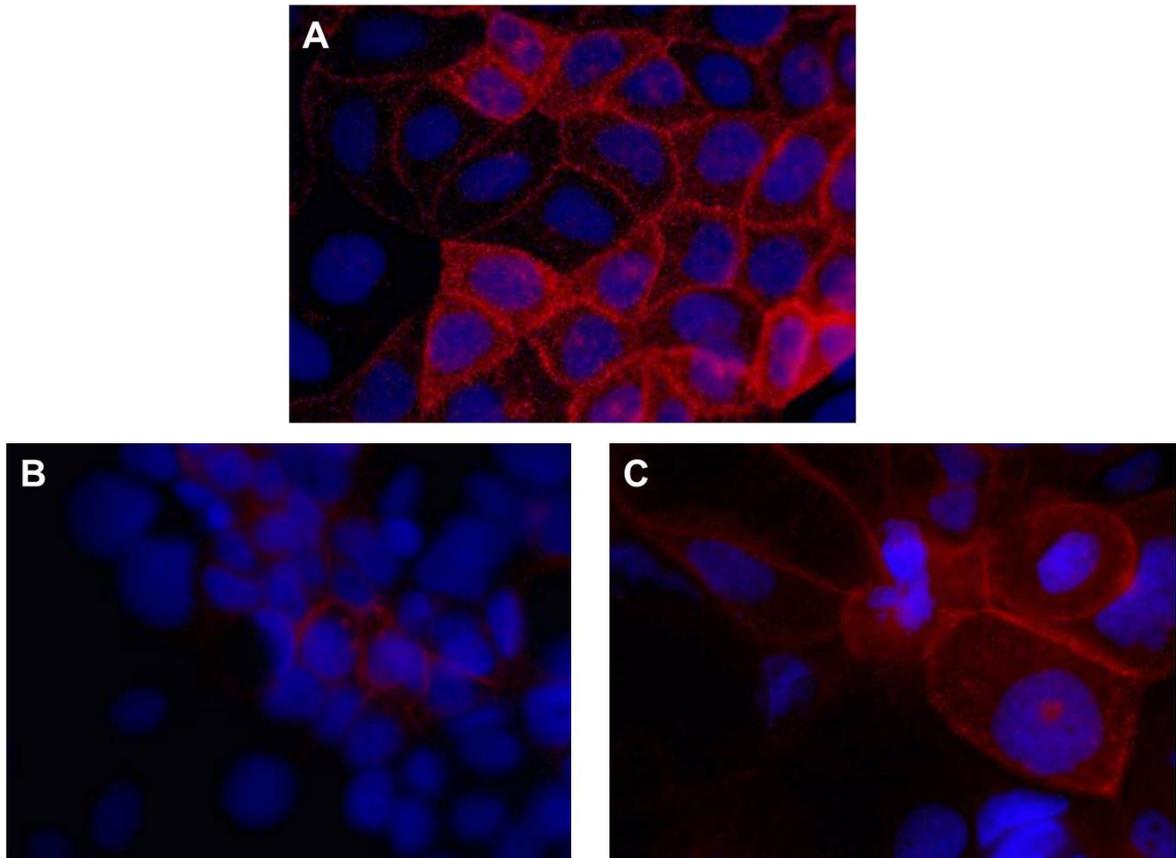


Abb. 15: Mikroskopische Aufnahmen des Caco-2-Subklons F9 Batch 2 in 400-facher Vergrößerung unter dem Fluoreszenzmikroskop: In allen Bildern fluoreszieren die DAPI-gefärbten Zellkerne blau. Der sekundäre, Cy3-markierte Antikörper erzeugt bei den Zellen der Ausschnitte A und C ein positives Fluoreszenzsignal. Die Zellen der Ausschnitte A wurden mit dem primären P-gp-Antikörper behandelt. Die Ausschnitte B zeigen das Ergebnis der mit MRP1-Antikörpern behandelten Zellen. In den Ausschnitten C ist das Ergebnis der mit BCRP-Antikörpern behandelten Zellen abgebildet.



4.1.2 Durchflusszytometrische Analyse

Für die Analyse am Durchflusszytometer der Subklone D5 und F9 wurden direkt markierte Primärantikörper gegen P-gp, MRP1 und BCRP verwendet. Zunächst wurde das Fluoreszenzsignal der Zellen ohne Antikörperbehandlung gemessen. Dieses diente als Vergleichsmessung zu den mit markierten Antikörpern behandelten Zellen. Als Kontrolle unspezifischer Antikörperbindungen wurden Zellen der NIH-3T3-Zelllinie eingesetzt (Abbildung 16). Die Vergleichsmessungen der nicht antikörpergefärbten Zellen (grau) liegen auf gleicher Höhe mit Fluoreszenzmessungen der antikörpergefärbten Zellen (blau). Auch die Verteilungen der Signale im Histogramm der gefärbten Zellen entsprechen denen der ungefärbten Zellen. Sowohl für P-gp (Abbildung 16.A) als auch für MRP1 (Abbildung 16.B) und BCRP (Abbildung 16.C) besteht zwischen den unbehandelten Zellen und den behandelten kein Unterschied. Eine unspezifische Bindung der Antikörper konnte somit ausgeschlossen werden.

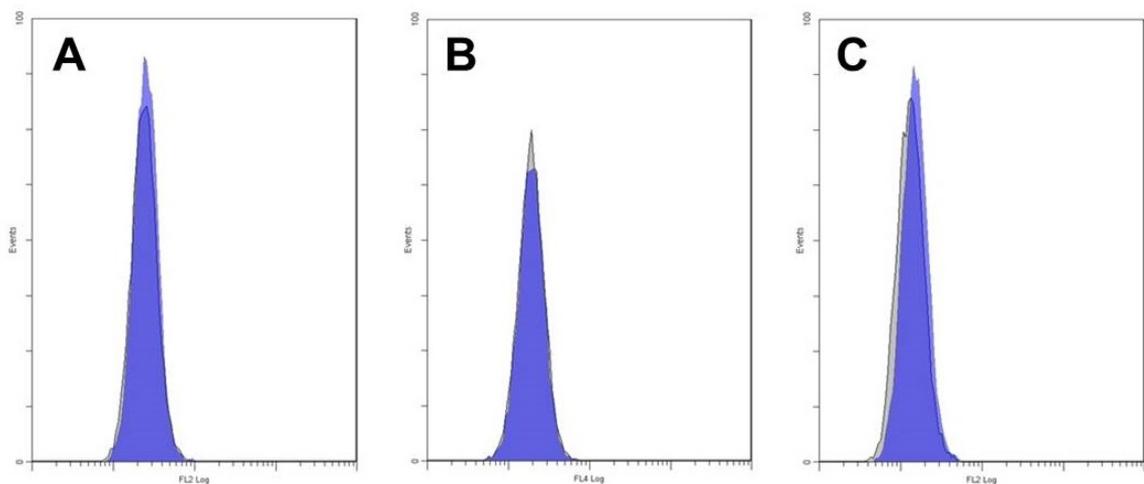


Abb. 16: Histogramme der Immunfluoreszenzmessung der Kontrolle auf unspezifische Antikörperbindungen mit NIH-3T3 am Durchflusszytometer; Messung der Fluoreszenzsignale über Kanal FL2 (P-gp und BCRP) bzw. FL4 (MRP1): In grau ist das Fluoreszenzsignal der Zellen dargestellt, welche nicht mit spezifischen Antikörpern behandelt wurden. In blau sind die Fluoreszenzsignale der mit den spezifischen Antikörpern behandelten Zellen abgebildet. Ausschnitt **A** stellt die Signale der P-gp-Antikörper dar. Ausschnitt **B** zeigt die Signale der MRP1-Antikörper und **C** die der BCRP-Antikörper.

Die Immunfluoreszenzmessung des Subklons D5 wurde an Zellen aus laufender Kultur der Passage 17 durchgeführt. Der Subklon D5 zeigt eine Zunahme der Fluoreszenzsignale von der Vergleichsmessung (grau) zur Messung der antikörpergefärbten Zellen (blau) für P-gp (17.A) und BCRP (17.C). Ein positiver Nachweis für MRP1 konnte nicht erbracht



werden. Hier blieb das Fluoreszenzsignal der gefärbten Zellen auf der gleichen Höhe wie das der ungefärbten Zellen (17.B). Die schlanke Form der dargestellten Peaks blieb in den Vergleichsmessungen und den Fluoreszenzmessungen der gefärbten Zellen gleich.

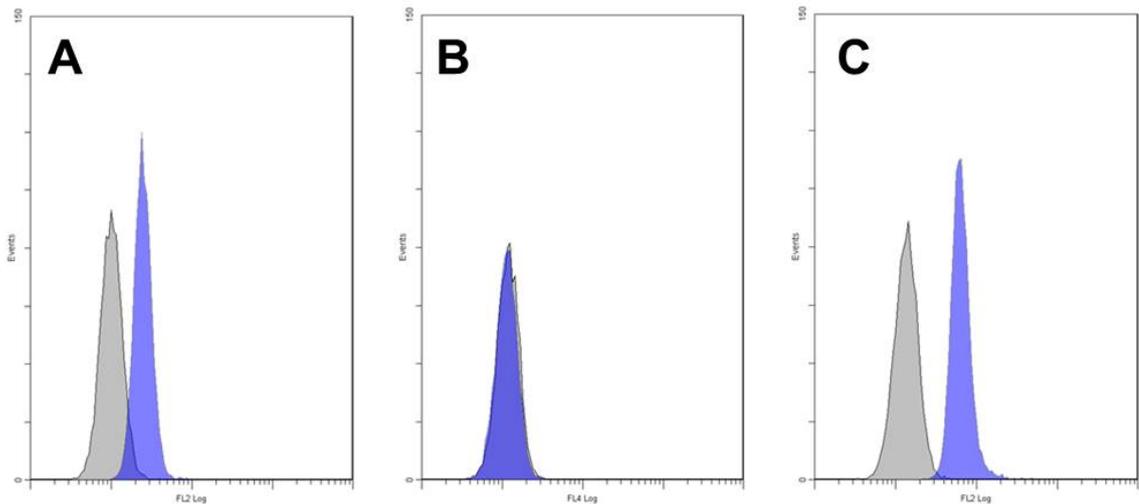


Abb. 17: Histogramm der Immunfluoreszenzmessung des Subklons D5 am Durchflusszytometer; Messung der Fluoreszenzsignale über Kanal FL2 (P-gp und BCRP) bzw. FL4 (MRP1): In grau ist das Fluoreszenzsignal der Zellen dargestellt, welche nicht mit spezifischen Antikörpern behandelt wurden. In blau sind die Fluoreszenzsignale der mit den spezifischen Antikörpern behandelten Zellen abgebildet. Die Ausschnitte **A** stellen die Signale der P-gp-Antikörper dar. Die Ausschnitte **B** zeigen die Signale der MRP1-Antikörper und **C** die der BCRP-Antikörper.

Der Nachweis der MDR-Transporter am Subklon F9 erfolgte an beiden F9-Testbatches. Die Immunfluoreszenzmessung des Subklons F9 Batch 1 wurde an Zellen aus laufender Kultur der Passage 14 durchgeführt, Batch 2 befand sich in Passage 15. Die Ergebnisse sind in Abbildung 18 zusammengefasst. Reihe 1 der Abbildung zeigt die Messungen des ersten Batches, Reihe 2 die des zweiten Batches. Auch hier zeigte sich eine Zunahme der Fluoreszenzsignale der Vergleichsmessungen (grau) zur Messung der antikörpergefärbten Zellen (blau) für P-gp (Abbildung 18 A1 und 2) und BCRP (Abbildung 18.C1 und 2). Ein positiver Nachweis für MRP1 blieb ebenfalls aus (Abbildung 18.B1 und 2). Die Verteilung der fluoreszierenden Zellen hat sich im Subklon F9 im Vergleich zu den unbehandelten Zellen verändert. Das P-gp-Signal weist einen breiten Ausläufer bis in hohe Signalbereiche auf (Abbildung 18 A1 und 2). Einige wenige Zellen zeigen eine sehr starke Fluoreszenz. Die Verteilung des BCRP-Fluoreszenzsignals ist im Vergleich zu den unbehandelten Zellen leicht verändert. Das Signal ist breiter geworden.

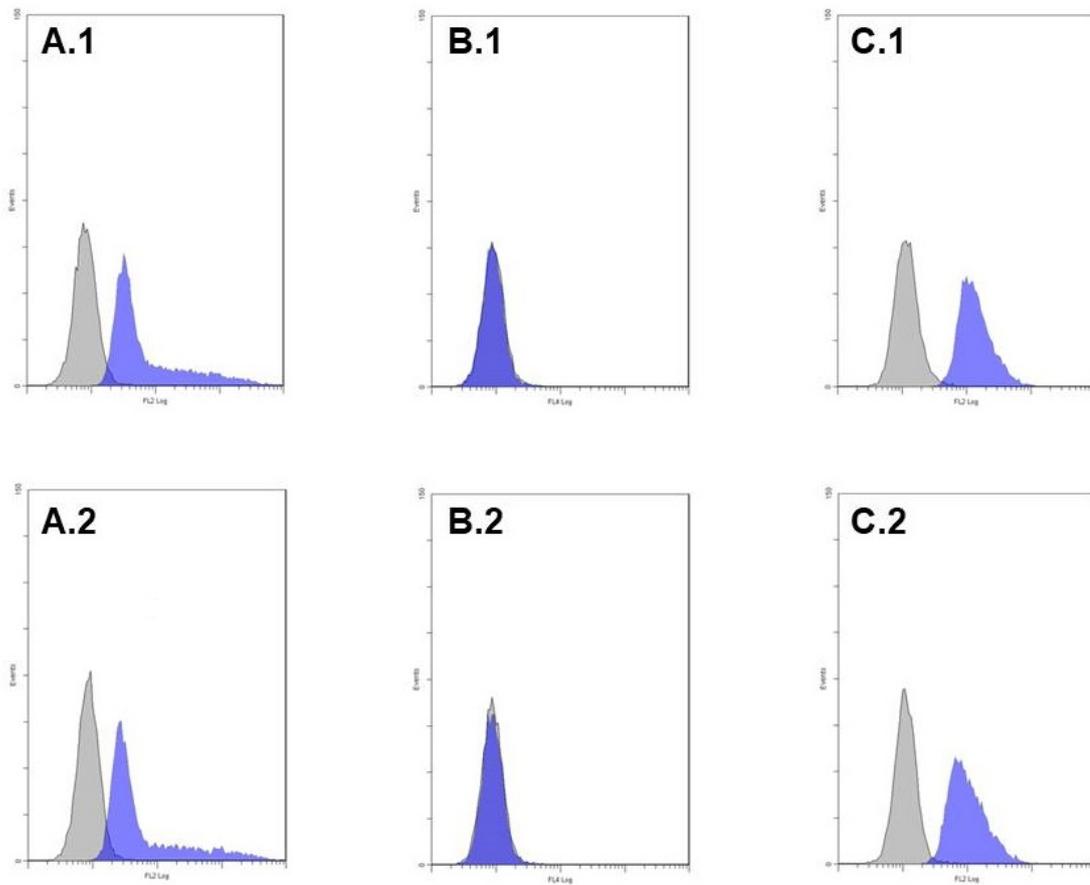


Abb. 18: Histogramm der Immunfluoreszenzmessung des Subklons F9 am Durchflusszytometer; Reihe 1 Batch 1, Reihe 2 Batch 2; Messung der Fluoreszenzsignale über Kanal FL2 (P-gp und BCRP, PE-markiert) bzw. FL4 (MRP1, Alexa tFluor[®] 647-markiert): In grau ist das Fluoreszenzsignal der Zellen dargestellt, die nicht mit spezifischen Antikörpern behandelt wurden. In blau sind die Fluoreszenzsignale der mit den spezifischen Antikörpern behandelten Zellen abgebildet. Die Ausschnitte **A.1** und **A.2** stellen die Signale der Anti-P-gp-Antikörper dar, **B.1** und **B.2** zeigen die Signale der MRP1-Antikörper, **C.1** und **C.2** der BCRP-Antikörper.



4.2 Nachweis der MDR-Transporter über Inhibition

Der Nachweis der MDR-Transporter P-gp, MRP1, MRP2 und BCRP im Calcein-AM-Assay erfolgte durch den Einsatz von Breitband- und spezifischen Inhibitoren. Das Ziel der Messungen war es, durch Inhibition der MDR-Transporter eine Akkumulation von Calcein in den Zellen zu erzeugen. Im Vergleich zur Messung einer nicht inhibierten Probe als Basissignal sollte sich eine Erhöhung des Calcein-Signals zeigen. Der Inhibitionsversuch wurde sowohl am Subklon D5 als auch an den beiden Batches des Subklons F9 durchgeführt. Es sollte ermittelt werden, welche MDR-Transporter in den untersuchten Subklonen exprimiert werden und ob sich die Expression abhängig von der Passagenzahl verändert.

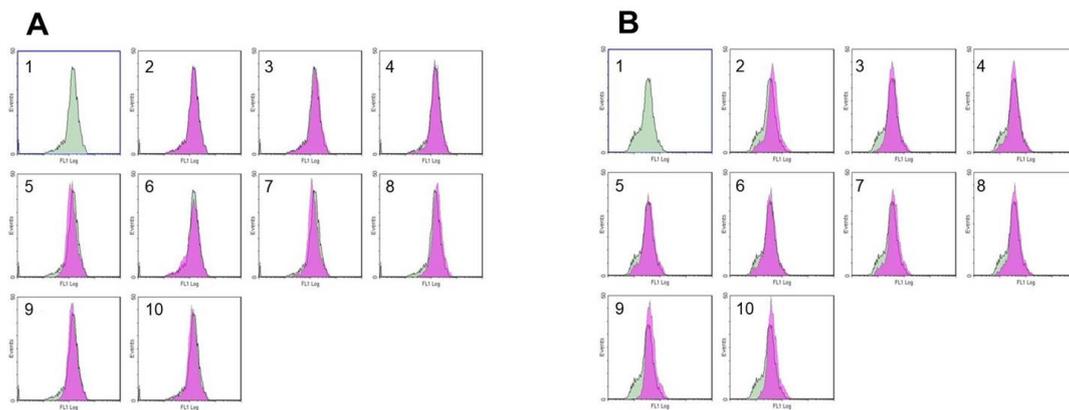


Abb. 19: Inhibition des Subklons D5; Messung des Calcein-Signals am Durchflusszytometer mit Fluoreszenzfilter FL1: In grün dargestellt ist das Histogramm der Zellen ohne Inhibition als Vergleichswert (1). Eine Überlagerung der Messungen aus den inhibierten Proben ist in pink abgebildet (2 bis 10). Die abgebildeten Messungen zeigen die Inhibition von: 2 P-gp, MRP1, MRP2 und BCRP durch Verapamil, 3 allen untersuchten MDR-Transporter durch Cyclosporin A, 4 P-gp durch Zosuquidar, 5 MRP1 und MRP2 durch MK-571, 6 BCRP durch Ko143, 7 P-gp, MRP1 und MRP2 durch Kombination aus Zosuquidar und MK-571, 8 P-gp und BCRP durch Kombination aus Zosuquidar und Ko143, 9 MRP1, MRP2 und BCRP durch Kombination aus MK-571 und Ko143, 10 P-gp, MRP1, MRP2 und BCRP durch Kombination aus Zosuquidar, MK-571 und Ko143. Ausschnitt A zeigt exemplarisch die Messungen des Inhibitionsversuches mit aufgetauten Zellen aus der Kryokonservierung (Passage 14), Ausschnitt B die Messung von Zellen aus laufender Kultur (Passage 19).

Wie Abbildung 19 zeigt, lässt sich bei den frisch aufgetauten Zellen des Subklons D5 durch den Einsatz von verschiedenen Inhibitoren keine Akkumulation von Calcein



bewirken. Die Calcein-Signale in den inhibierten Proben (pink) bleiben unverändert auf der Höhe des Basissignals (grün). Die nach der Inhibition gemessenen Peaks veränderten sich im Vergleich zum Basissignal nicht.

Die Zellen wurden nach dem Auftauen über mehrere Passagen kultiviert und der Versuch wurde erneut durchgeführt. Exemplarisch ist hier die Messung für die Zellen des Subklons D5 nach fünf weiteren Passagen abgebildet, die Messungen der anderen Passagen befinden sich im Anhang (Abbildung 27 und 29). Das Basissignal (Abbildung 19 B.1) hat sich nach fünf Passagen im Vergleich zum Basissignal der aufgetauten Zellen (Abbildung 19 A.1) verringert. Eine Inhibition durch die verschiedenen Substanzen und deren Kombinationen lässt die linke Schulter des Basissignals verschwinden. Das Basissignal der Zellen nach fünf Passagen ist also leicht angestiegen.

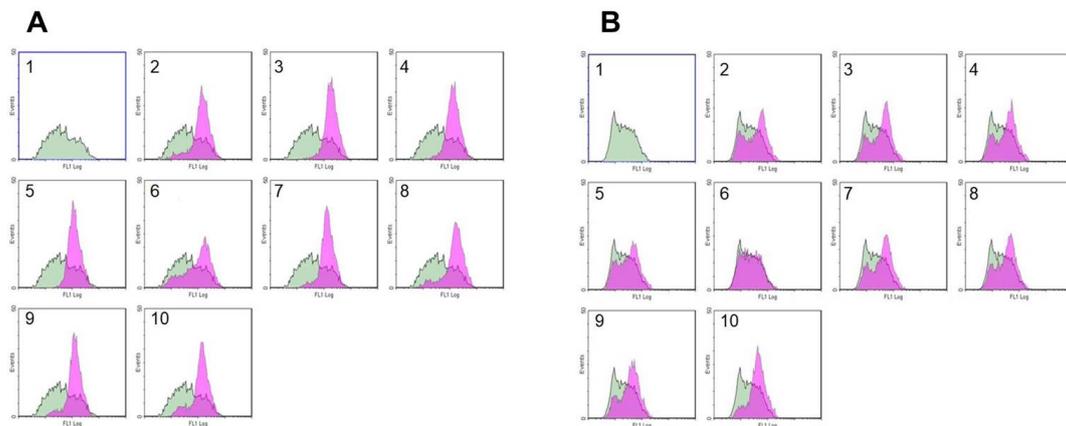


Abb. 20: Inhibition des Subklons F9 Batch 1; Messung des Calcein-Signals am Durchflusszytometer mit Fluoreszenzfilter FL1: In grün dargestellt ist das Histogramm der Zellen ohne Inhibition als Vergleichswert (1). Eine Überlagerung der Messungen aus den inhibierten Proben ist in pink dargestellt (2 bis 10). Die abgebildeten Messungen zeigen die Inhibition von: **2** P-gp, MRP1, MRP2 und BCRP durch Verapamil, **3** allen untersuchten MDR-Transporter durch Cyclosporin A, **4** P-gp durch Zosuquidar, **5** MRP1 und MRP2 durch MK-571, **6** BCRP durch Ko143, **7** P-gp, MRP1 und MRP2 durch Kombination aus Zosuquidar und MK-571, **8** P-gp und BCRP durch Kombination aus Zosuquidar und Ko143, **9** MRP1, MRP2 und BCRP durch Kombination aus MK-571 und Ko143, **10** P-gp, MRP1, MRP2 und BCRP durch Kombination aus Zosuquidar, MK-571 und Ko143.

Ausschnitt **A** zeigt die Messungen des Inhibitionsversuches mit aufgetauten Zellen aus der Kryokonservierung des Subklon F9 Batch 1 (Passage 11), Ausschnitt **B** die Messungen der Zellen aus laufender Kultur (Passage 16).



Die Ergebnisse des Inhibitionsversuches mit Batch 1 des Subklons F9 sind in Abbildung 20 dargestellt. Die gemessenen Basissignale (grün) sind als Vergleichswert für die Calcein-Signale der inhibierten Proben (pink) dargestellt. In der Abbildung sind die Messungen an frisch aufgetauten Zellen (A) abgebildet und als Vergleich Zellen aus laufender Kultur (B).

Der erste Batch des Subklons F9 zeigt bei den aufgetauten Zellen ein breites Basissignal (Abbildung 20.A 1). Dieses verschiebt sich bei der Inhibition durch die Breitbandinhibitoren Verapamil und Cyclosporin A nach rechts. Das Calcein-Signal steigt also nach der Inhibition an (Abbildung 20.A 2 und A3). Bei der Inhibition durch die Breitbandinhibitoren ist erkennbar, dass es bereits vor der Inhibition der aufgetauten Zellen teilweise zu einer Akkumulation von Calcein kommt. Das Calcein-Signal der inhibierten Zellen verlagert sich zwar nach rechts, steigt jedoch nicht weiter an, als bis zum höchsten Wert des Basissignals.

Die spezifische Inhibition der einzelnen Transporter zeigt, dass sowohl P-gp, als auch die MRP-Transporter am Efflux von Calcein-AM beteiligt sind, denn die Inhibition von P-gp durch Zosuquidar und den MRP-Transportern durch MK-571 zeigt eine deutliche Erhöhung des Calcein-Signals (Abbildung 20 A 4 und 5). Die Inhibition von BCRP durch den spezifischen Inhibitor Ko143 erzeugt ebenfalls einen Anstieg des Calcein-Signals in den Zellen (Abbildung 20 A 6). Die Inhibition scheint jedoch weniger effizient, als die der beiden anderen MDR-Transporter. Durch die Inhibition von BCRP entsteht anders als bei der Inhibition von P-gp und MRP ein breites Calcein-Signal.

Der Einsatz von Kombinationen aus des spezifischen Inhibitoren bestätigt die Ergebnisse durch einen Anstieg des Calcein-Signals zwar, jedoch scheinen sich die Inhibitoren gegenseitig zu blockieren, da ein kleiner Anteil der Zellen ein niedrigeres Calcein-Signal erzeugt (Abbildung 20 A 7 bis 10). In den frisch aufgetauten Zellen des ersten Batches des Subklons F9 konnten alle untersuchten MDR-Transporter inhibiert werden.

Die Zellen wurden nach dem Auftauprozess ebenfalls über mehrere Passagen kultiviert und der Versuch wurde wiederholt. Exemplarisch ist hier die Messung für die



Zellen des ersten Batches des Subklons F9 nach fünf Passagen abgebildet (Abbildung 20 B). Die Messungen der anderen Passagen befinden sich im Anhang (Abbildung 31 und 33). Die Ergebnisse unterscheiden sich wie beim Subklon D5 von den Messungen mit den frisch aufgetauten Zellen. Zum einen ist das Histogramm des Basissignals schmaler geworden, zum anderen ist das Signal gesunken (Abbildung 20 B 1). Die Inhibition der MDR-Transporter durch die Breitbandinhibitoren Verapamil und Cyclosporin A scheint außerdem weniger effizient zu sein (Abbildung 20 B 1 bis 3). Nach der Inhibition zeigt sich anders als in den Messungen der aufgetauten Zellen ein Doppelpeak, welcher darauf hinweist, dass ein Teil der Zellen trotz Inhibition weiterhin Calcein-AM ausstoßen kann. Die spezifische Inhibition der einzelnen Transporter zeigt, dass der Subklon F9 fünf Passagen nach dem Auftauprozess kein BCRP mehr zu exprimieren scheint (Abbildung 20 B 6). P-gp und die beiden MRP-Transporter konnten weniger effizient inhibiert werden, wodurch sich das Calcein-Signal nur leicht erhöhte (Abbildung 20 B 4 und 5).

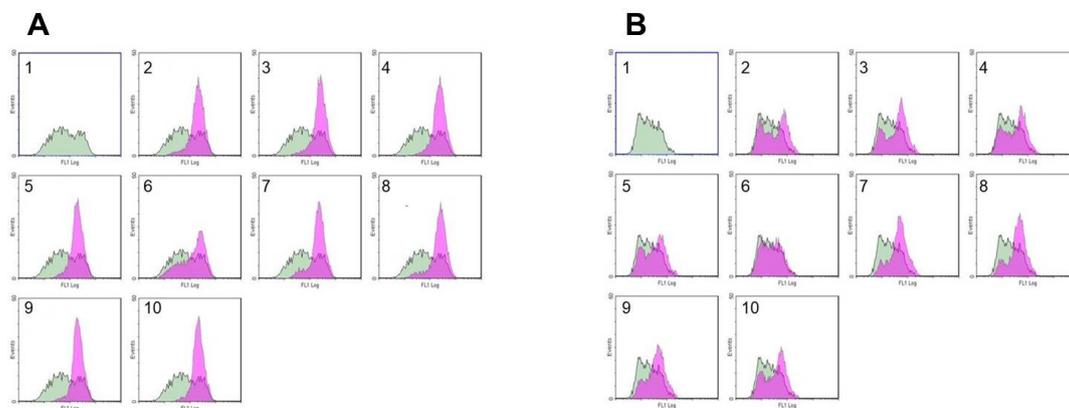


Abb. 21: Inhibition des Subklons F9 Batch 2; Messung des Calcein-Signals am Durchflusszytometer mit Fluoreszenzfilter FL1: In grün dargestellt ist das Histogramm der Zellen ohne Inhibition als Vergleichswert (1). Eine Überlagerung der Messungen aus den inhibierten Proben ist in pink dargestellt (2 bis 10). Die abgebildeten Messungen zeigen die Inhibition von: 2 P-gp, MRP1, MRP2 und BCRP durch Verapamil, 3 allen untersuchten MDR-Transporter durch Cyclosporin A, 4 P-gp durch Zosuquidar, 5 MRP1 und MRP2 durch MK-571, 6 BCRP durch Ko143, 7 P-gp, MRP1 und MRP2 durch Kombination aus Zosuquidar und MK-571, 8 P-gp und BCRP durch Kombination aus Zosuquidar und Ko143, 9 MRP1, MRP2 und BCRP durch Kombination aus MK-571 und Ko143, 10 P-gp, MRP1, MRP2 und BCRP durch Kombination aus Zosuquidar, MK-571 und Ko143. Ausschnitt **A** zeigt die Messungen des Inhibitionsversuches mit aufgetauten Zellen aus der Kryokonservierung Subklon F9 Batch 2 (Passage 12), Ausschnitt **B** die Messungen der Zellen aus laufender Kultur (Passage 17).



Die durchgeführten Inhibitionsversuche an den aufgetauten Zellen und den Zellen aus laufender Kultur des zweiten F9-Batches ergaben die gleichen Ergebnisse und werden daher nicht weiter beschrieben (Abbildung 21). Die Ergebnisse der einzelnen Inhibitionsversuche befinden sich im Anhang (Abbildung 34 bis 37).



4.3 Passagenabhängige Expression der MDR-Transporter

Die Ergebnisse der durchgeführten Inhibitionsversuche mit den Caco-2-Subklonen D5 und F9 zeigen, dass sich die Expression der MDR-Transporter in der Zellmembran mit Erhöhung der Passagenzahl verändert. Neben den aufgetauten Zellen wurden jeweils drei weitere Versuche durchgeführt um eine Passagenabhängigkeit der MDR-Transporter-Expression zu überprüfen. In Tabelle 18 sind die untersuchten Passagen der Subklone aufgelistet.

Tab. 18: Getestete Passagen der Caco-2 Subklone

Caco-2-Subklon	Chargennummer	Passage
D5	92-170324HB01	14, aufgetaute Zellen
		16
		19
		21
F9	92-170418VJ01	11, aufgetaute Zellen
		13
		16
		18
F9	92-170505VJ01	12, aufgetaute Zellen
		14
		17
		19

Die Ergebnisse aller Inhibitionsversuche befinden sich im Anhang. Um zu erfassen, wie sich die Expression der MDR-Transporter mit Erhöhung der Passagenzahl verändert, wurden die Calcein-Basissignale aller vier Messungen verglichen. Das Ergebnis ist in Abbildung 22 und 23 dargestellt. Das Calcein-Basissignal des Subklon D5 sinkt zunächst nach zwei Passagen und der Histogrammpeak wird schmaler (Abbildung 22, Grau). Im Inhibitionsversuch kann jedoch weder bei den frisch aufgetauten Zellen noch nach zwei Passagen in Kultur eine Expression von MDR-Transportern festgestellt

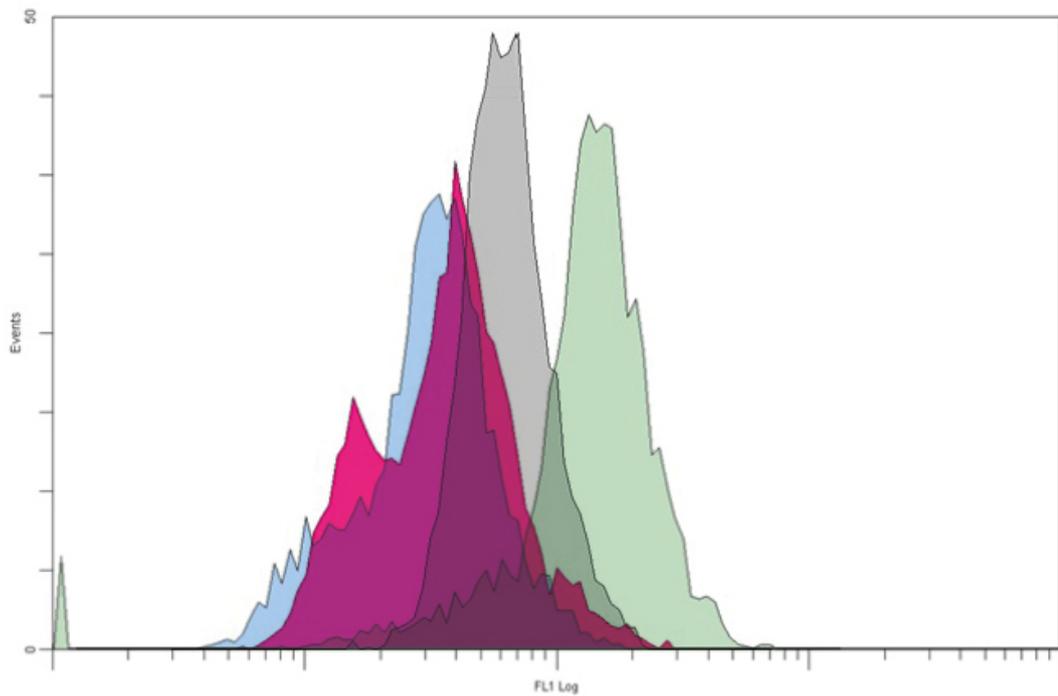


Abb. 22: Passagenabhängigkeit der MDR-Expression im Subklon D5: Überlagerung der am Durchflusszytometer gemessenen Calcein-Basissignale aller getesteten Passagen ohne den Einsatz eines Inhibitors. **Grün:** Passage 14, aufgetaute Zellen; **Grau:** Passage 16; **Blau:** Passage 19; **Rot:** Passage 21

werden. Erst nach fünf Passagen war neben weiterem Absinken des Calcein-Basissignals auch eine Inhibition von MDR-Transportern möglich, was sich nach sieben Passagen bestätigte (Abbildung 28 und 29 im Anhang).

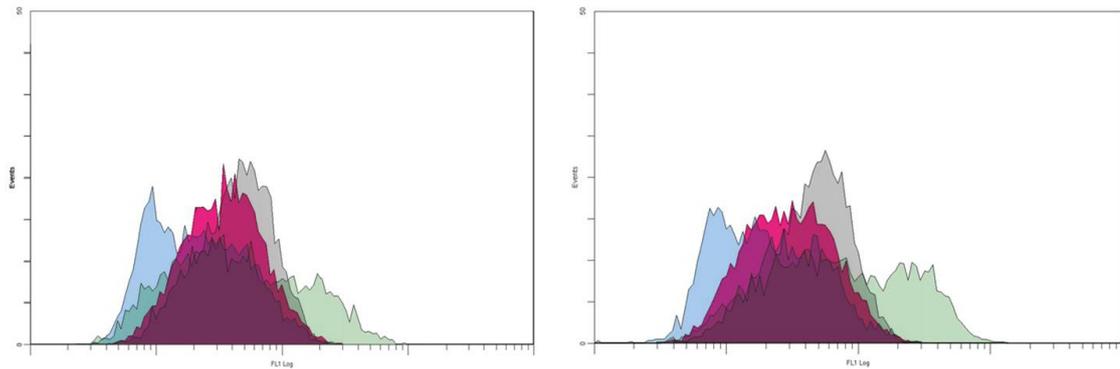


Abb. 23: Passagenabhängigkeit der MDR-Expression im Subklon F9: Überlagerung der am Durchflusszytometer gemessenen Calcein-Basissignale aller getesteten Passagen beider F9-Testbatches ohne den Einsatz eines Inhibitors.

Links sind die Basis-Signale des ersten Batches überlagert dargestellt; **Grün:** Passage 11, aufgetaute Zellen; **Grau:** Passage 13; **Blau:** Passage 16; **Rot:** Passage 18;

Rechts sind die Basis-Signale des zweiten Batches überlagert dargestellt; **Grün:** Passage 12, aufgetaute Zellen; **Grau:** Passage 14; **Blau:** Passage 17; **Rot:** Passage 19

Der Subklon F9 weist in beiden Batches nach dem Auftauen einen breiten Basispeak auf (Abbildung 23, Grün). Scheinbar sind sowohl Zellen vorhanden, die Calcein-AM ausstoßen als auch solche, die das Abbauprodukt Calcein akkumulieren, was bereits bei den Ergebnissen des Inhibitionsversuches des Subklons F9 erwähnt wurde. Bei steigender Passagenzahl wird der Basispeak schmaler (Abbildung 23, Grau). Das Calcein-Basissignal sinkt ab der zweiten Passage ab (Abbildung 23, Blau und Rot). Im Inhibitionsversuch ab der zweiten Passage konnten P-gp und MRP-Transporter nachgewiesen werden, jedoch ließ sich durch die Inhibition von BCRP keine Erhöhung des Calcein-Signals bewirken.



4.4 Aktivierung von P-gp

Die Subklone D5 und F9 wurden über elf Tage mit potentiellen P-gp-Aktivatoren behandelt, um den Zellen genügend Zeit zu geben, auf die äußere Einwirkung zu reagieren. Diese waren Rifampicin, Hypericin und Valproat. Die Expression von P-gp wurde im Calcein-AM-Assay überprüft. Als Vergleichswert wurden unbehandelte Zellen mitgeführt. Bei einer erfolgreichen Steigerung der P-gp-Expression wurde eine Abnahme des Calcein-Signals im Vergleich zu den unbehandelten Zellen erwartet.

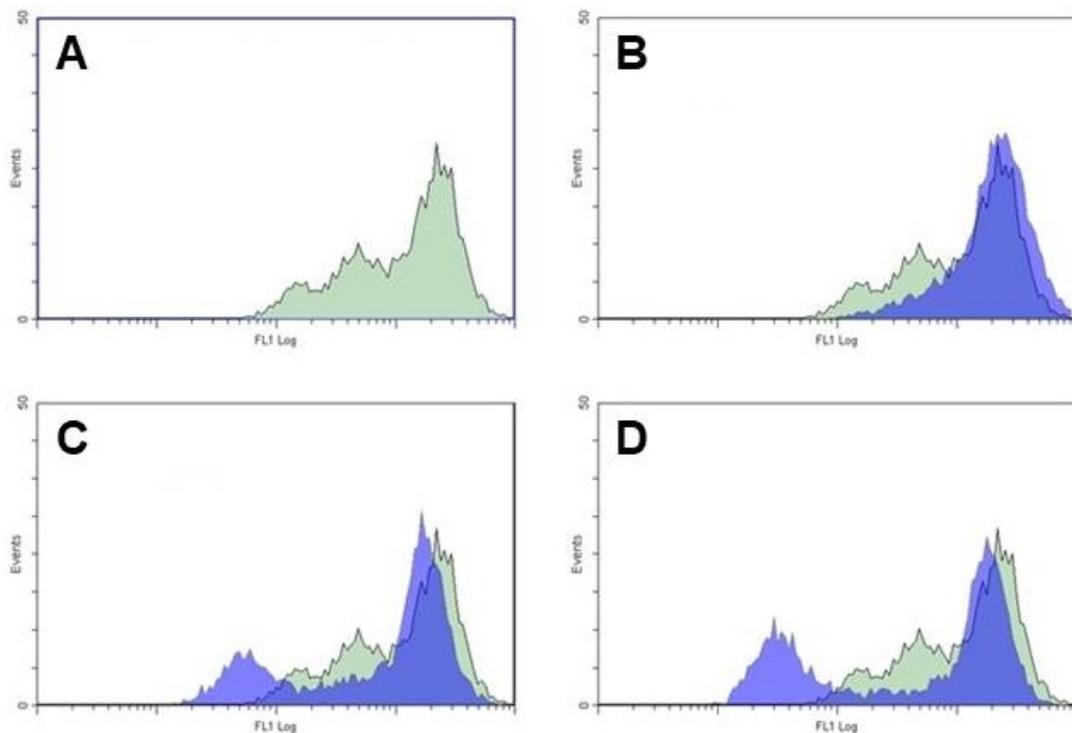


Abb. 24: Aktivierung der P-gp-Expression im Subklon D5: In grün ist das Calcein-Basissignal (**A**) der unbehandelten Zellen dargestellt. Als Überlagerung kommen die Calcein-Basissignale der mit Hypericin (**B**), Rifampicin (**C**) und VPA (**D**) behandelten Zellen in blau hinzu.

Durch die Behandlung der Zellen des Subklons D5 mit Hypericin konnte das Calcein-Basissignal nicht abgesenkt werden (Abbildung 24 A). Rifampicin und VPA senkten das Basissignal teilweise ab (Abbildung 24 C und D). Das Basissignal der unbehandelten Zellen zeigte neben einem Hauptpeak im oberen Bereich der Calcein-Fluoreszenz einen separat liegenden Peak im unteren Fluoreszenzbereich.

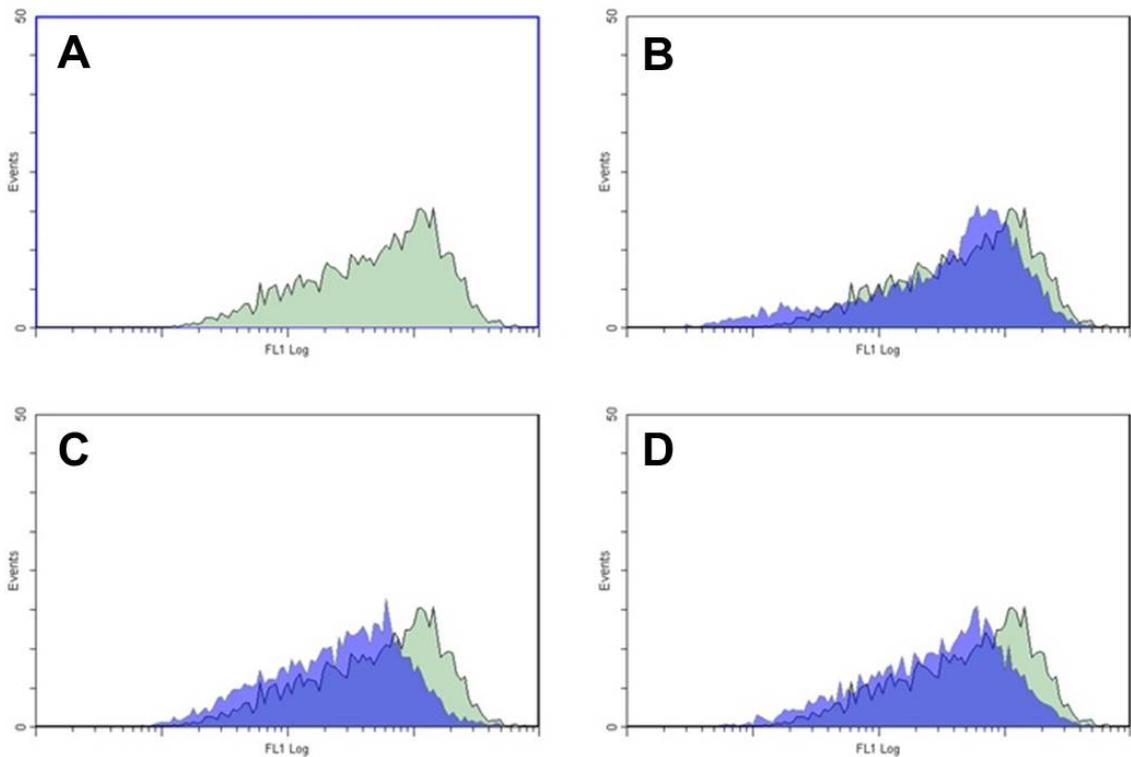


Abb. 25: Aktivierung der P-gp-Expression im Subklon F9: In grün ist das Calcein-Basissignal (**A**) der unbehandelten Zellen dargestellt. Als Überlagerung kommen die Calcein-Basissignale der mit Hypericin (**B**), Rifampicin (**C**) und VPA (**D**) behandelten Zellen in blau hinzu.

Das Calcein-Basissignal des Subklons F9 konnte durch die P-gp-Aktivatoren nicht deutlich gesenkt werden (Abbildung 25). Eine gesteigerte Expression von P-gp-Transportern konnte durch den Calcein-AM Assay nicht festgestellt werden. Zunächst schien eine Behandlung der Zellen mit Hypericin einen separat liegenden Peak zu erzeugen (Abbildung 25 B) was bei der Wiederholung des Versuches nicht bestätigt werden konnte.



5 Diskussion

Für die Entwicklung von neuen Medikamenten gegen unterschiedliche Krankheiten ist es von großer Bedeutung zu wissen, welche Wechselwirkungen zwischen Medikament und Darmassage auftreten. Eine wichtige Hürde beim Übergang vom Darmlumen in die Blutbahn, stellen die in der Zellmembran der Enterozyten exprimierte MDR-Transporter dar. Wirkstoffe, welche gleichzeitig Substrate der MDR-Transporter sind, werden aus den Enterozyten zurück in das Darmlumen befördert und wieder ausgeschieden. Der aktivierte Entgiftungsmechanismus der Enterozyten kann dazu führen, dass die Zellen sogar vermehrt Effluxtransporter in der Zellmembran exprimieren. Wegen des breiten Substratspektrums der MDR-Transporter führt eine Steigerung der MDR-Transporter-Expression durch einen Wirkstoff letztendlich dazu, dass andere Arzneistoffe ebenfalls vermehrt aus den Enterozyten ausgestoßen werden. Die Folge ist, dass der Blutserumspiegel der Wirkstoffe beträchtlich sinkt und der gewünschte therapeutische Effekt verringert wird oder sogar ausbleibt. Neben der aktivierenden Wirkung können Arzneistoffe auch inhibierend auf die MDR-Transporter wirken. Diese Tatsache wird in der Therapie wirkstoffresistenter Krebszellen ausgenutzt, welche MDR-Transporter überexprimieren. Inhibierende Substanzen werden als Zusätze in der Chemotherapie eingesetzt und können resistente Tumore wieder chemosensitiv machen.

Ob ein Wirkstoff Substrat, Aktivator oder Inhibitor von den in der Darmschranke ausgebildeten MDR-Transportern ist, kann in einem zellbasierten Permeabilitätsassay überprüft werden. Die verwendeten Zellen für ein solches Testkit müssen hierfür ausführlich charakterisiert werden. Als Modell für die Darmschranke werden zum Beispiel Caco-2-Zellen eingesetzt. Diese können sich durch verschiedene Parameter während der Kultivierung von Labor zu Labor stark unterscheiden. Auch Subklone von Caco-2 können unterschiedliche Eigenschaften haben. Ziel dieser Arbeit war es daher, zwei Subklone der laborinternen Caco-2-Zelllinie, die für die Entwicklung eines Permeabilitätstestes in Frage kommen, auf ihre MDR-Transporter-Expression zu untersuchen. Die in der Darmschranke wichtigen MDR-Transporter, welche auch im Zellkulturmodell vorkommen, sind P-gp, MRP1, MRP2 und BCRP.



Die Charakterisierung der Subklone D5 und F9 erfolgte an eigens dafür hergestellten Testbatches. Für den Subklon D5 stand ein Testbatch zur Verfügung, aus dem Subklon F9 wurden zwei Testbatches hergestellt. Zunächst wurden die drei Testbatches auf das Vorhandensein der in Caco-2 und der Darmschranke vorkommenden MDR-Transporter mittels Immunfluoreszenznachweis überprüft. Ein indirekter Nachweis über Immunfluoreszenzmikroskopie mit primären, gegen die MDR-Transporter gerichteten Antikörpern aus der Maus wurde durchgeführt. Ein markierter anti-Maus Sekundäranantikörper wurde zur Detektion der gebundenen Primäranantikörper verwendet. Da kein geeigneter MRP2-Antikörper verfügbar war, konnte ein Immunfluoreszenznachweis nur für MRP1 durchgeführt werden.

Des Weiteren kamen spezifische Antikörper in der Analyse am Durchflusszytometer zum Einsatz. Hier wurde eine direkte Antikörperfärbung durchgeführt und am Durchflusszytometer gemessen. Die Messung am Durchflusszytometer ist wegen einer niedrigeren Nachweisgrenze sensitiver als die Immunfluoreszenzmikroskopie. Auch hier entfiel der Nachweis für MRP2, da ein geeigneter Antikörper nicht verfügbar war.

Der Nachweis über ausgebildete MDR-Transporter reichte allein nicht aus, um die Subklone als Zellkulturmodell für die menschliche Darmschranke als geeignet zu erklären. Es konnte nicht ausgeschlossen werden, dass MDR-Transporter exprimiert wurden, die nicht funktionstüchtig sind. Deshalb wurde neben der Anwesenheit der Transporter auch ihre Funktionalität durch den Calcein-AM-Assay überprüft. Neben Breitbandinhibitoren Verapamil gegen P-gp und die MRP-Transporter sowie Cyclosporin A gegen alle genannten MDR-Transporter wurden auch transporterspezifische Inhibitoren eingesetzt. Dadurch sollte die Funktion jedes MDR-Transporters einzeln nachgewiesen werden. Schlussendlich wurde versucht, durch die in Patientenstudien als P-gp-Aktivatoren identifizierten Wirkstoffe Hypericin, Rifampicin und Valproat auch eine gesteigerte P-gp-Expression in den Testbatches hervorzurufen.



5.1 Caco-2 (D5) 92-170324HB01

Die Immunfluoreszenzmikroskopie zeigte im Subklon D5 (Passage 21) für keinen der nachzuweisenden MDR-Transporter ein positives Signal. Eine leichte rote Fluoreszenz wurde als Hintergrundsignal durch unspezifische Bindungen des Cy3-markierten Sekundärantikörpers bewertet. Die Expression von MDR-Transportern schien so gering zu sein, dass erst durch den Nachweis am Durchflusszytometer ein Signal erzeugt werden konnte. Hier konnten sowohl P-gp als auch BCRP nachgewiesen werden. Der Nachweis von MRP1 blieb jedoch aus. Ein Grund hierfür könnte sein, dass MRP1 in den polarisierten Caco-2-Zellen basolateral exprimiert wird. Da die Kultur in Zellkulturflaschen durchgeführt wurde, wurden vermutlich nur apikal vorkommende MDR-Transporter exprimiert. Basolateral konnte weniger Stoffaustausch mit dem Zellkulturmedium stattfinden, weshalb eine Expression von MRP1 vermutlich ausblieb. Um diese Theorie zu beweisen, könnte in nachfolgenden Versuchen eine Kultivierung der Zellen auf einer permeablen Membran durchgeführt werden, wodurch sowohl von apikaler als auch von basolateraler Seite ein Stoffaustausch stattfinden kann. Da auch ein Permeabilitätsassay mit einer Zellkultur auf einer Membran stattfindet, sollte die Überprüfung der MRP1-Expression noch weiter verfolgt werden.

Bei der Funktionstestung der in Caco-2 (D5) vorkommenden MDR-Transporter zeigte sich, dass direkt nach dem Auftauen (Passage 14) und nach zwei Passagen keiner der MDR-Transporter inhibiert werden konnte. Erst nach drei weiteren Passagen (Passage 19) konnte durch die Inhibition eine leichte Erhöhung des Calcein-Signals erzeugt werden. Da bereits durch den Antikörpernachweis am Durchflusszytometer die MDR-Transporter P-gp und BCRP in Zellen der siebzehnten Passage nachgewiesen werden konnten, wird vermutet, dass von Beginn an MDR-Transporter exprimiert werden, diese jedoch erst nach einiger Zeit in Kultur aktiv sind. Weitere Untersuchungen mit dem Durchflusszytometer könnten hier für Klarheit sorgen.

Bei dem passagenabhängigen Vergleich des Calcein-Signals fiel auf, dass das Basisignal der Zellen mit steigender Passage zu sinken scheint. Da jedoch kein Nachweis von ausreichend MDR-Transportern erbracht werden konnte, wird vermutet, dass die Nachweismethode nicht sensitiv genug ist. Es scheinen aktive Transporter vorhanden



zu sein, die sich jedoch im Inhibitionsversuch nicht darstellen lassen. Diese werden vermehrt ausgebildet, wenn die Zellen unter Stress stehen (Auftauprozess) und senken ihre Aktivität im Kulturverlauf.

Bei der Behandlung der Zellen des Subklons D5 mit P-gp-aktivierenden Wirkstoffen konnte durch das Antibiotikum Rifampicin und das Antiepileptikum Valproat eine Abnahme des Calcein-Basissignals bewirkt werden. Eine Aktivierung von Calcein-AM-ausstoßenden Transportproteinen war also erfolgreich. Hypericin führte im Versuch nicht zu einem gesenkten Calcein-Basissignal. Es wurden also auch keine zusätzlichen MDR-Transporter ausgebildet. Eine Optimierung des Aktivierungsversuches wurde in dieser Arbeit nicht durchgeführt. Ein weiterführender Versuch könnte sein, in aktivierten Testbatches zu überprüfen, ob die Expression von MDR-Transportern durch Dauerbehandlung mit einem der Wirkstoffe aufrecht erhalten werden kann.



5.2 Caco-2 (F9) 92-170418VJ01 (Batch 1) und 92-170505VJ01 (Batch 2)

Die Testbatches des Subklons F9 erzielten in allen Versuchen vergleichbare Ergebnisse. Daher können die Testbatches gleichermaßen für einen möglichen Permeabilitätsassay eingesetzt werden. In der Immunfluoreszenzmikroskopie konnte in den Zellmembranen der Zellen aus laufender Kultur (Batch 1: Passage 18, Batch 2: Passage 17) sowohl P-gp, als auch BCRP nachgewiesen werden. Ein MRP1-Nachweis blieb auch im Subklon F9 aus. Die Begründung ist vermutlich wie beim Subklon D5 in der Kultivierung in einer Zellkulturflasche zu suchen, denn auch bei der Messung spezifischer Antikörper am Durchflusszytometer konnte MRP1 nicht nachgewiesen werden. Da der Stoffaustausch mit dem Zellkulturmedium von apikaler Seite erfolgt, wird auch hier vermutet, dass der basolateral liegende MRP1-Transporter nicht exprimiert wird. Die Überprüfung dieser Vermutung könnte durch eine Zellkultur auf einer Membran erfolgen.

Der Funktionalitätsnachweis der MDR-Transporter im Subklon F9 durch den Calcein-AM-Assay und spezifische Inhibitoren zeigte, dass die Inhibition von P-gp, den MRP-Transportern und BCRP erfolgreich war. Die Anwesenheit und Funktionalität von P-gp, MRP-Transportern und BCRP konnte somit bewiesen werden. Mit steigender Passagenzahl konnte jedoch durch die Inhibition von BCRP keine Akkumulation von Calcein mehr hervorgerufen werden. BCRP scheint für den Efflux von Calcein-AM also eine untergeordnete Rolle zu spielen. Möglicher Weise ist die Affinität von BCRP zu Calcein-AM niedriger als bei den anderen MDR-Transportern.

Die Passagenabhängigkeit der MDR-Transporter-Expression zeigte in beiden Testbatches des Subklon F9, dass der Calcein-Peak der Zellen zunächst schlanker wurde und sich absenkte, dann aber wieder leicht anstieg. Möglicher Weise ist die Reaktion der Zelle auf den äußeren Stress während des Auftauprozesses ein Grund dafür. Der Detoxifikationsmechanismus über die MDR-Transporter wurde zu Beginn der Kultur vermutlich noch voll ausgebildet und eine Inhibition der MDR-Transporter zeigte einen deutlichen Effekt. Dann bleibt ein Reiz von außen aus, wodurch die Zellen die MDR-Transporter-Expression senkten. Dadurch wurde weniger Calcein-AM ausgestoßen und das Calcein-Basissignal stieg wieder an.



Auch mit den Zellen des Subklons F9 wurde eine Aktivierung der MDR-Transporter durch die Behandlung mit Hypericin, Rifampicin und VPA versucht. Es konnte jedoch keine Senkung des Calcein-Basissignals erzielt werden. Eine Wirkung auf zelluläre MDR-Transporter kann trotzdem nicht ausgeschlossen werden. Liegen in den Zellen bereits vor der Behandlung mit einer aktivierenden Substanz genug MDR-Transporter in den Zellen vor, um Calcein-AM auszustoßen, so kann eine gesteigerte MDR-Expression keine zusätzliche Senkung des Calcein-Signals hervorrufen. Über den Calcein-AM-Assay konnte eine Aktivierung der MDR-Transporter nicht nachgewiesen werden.



6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden die zwei Subklone D5 und F9 der laborinternen Caco-2-Zelllinie auf ihre Transportereigenschaften untersucht. Es sollte eine Aussage getroffen werden, welcher Subklon für einen Permeabilitätsassay geeignet ist, mit welchem man Wechselwirkungen von Medikamenten mit der Darmschranke untersuchen kann. Die untersuchten Transporter waren P-gp, MRP1, MRP2 und BCRP. Zum Nachweis wurden spezifische Antikörper verwendet, um Aufschluss über die Anwesenheit der untersuchten MDR-Transporter zu geben. In beiden Subklonen konnten so die MDR-Transporter P-gp und BCRP nachgewiesen werden. Der Nachweis von MRP1 blieb in beiden Subklonen negativ, für MRP2 konnte kein geeigneter Antikörper gefunden werden. Im Calcein-AM-Assay wurde festgestellt, dass frisch aufgetaute Zellen des Subklon D5 scheinbar nur eine sehr geringe Anzahl an MDR-Transportern besitzen, welche jedoch im Laufe einer Kultur mit Erhöhung der Passagenzahl ansteigt. Es konnte nachgewiesen werden, dass der Subklon D5 auch nach mehreren Passagen nur wenige MDR-Transporter auszubilden scheint. Im Vergleich dazu exprimieren bereits die frisch aufgetauten Zellen des Subklon F9 genügend MDR-Transporter aus, die inhibiert werden konnten. Zwar sinkt mit steigender Passagenzahl die Expression scheinbar ab, jedoch sind immer noch genug MDR-Transporter vorhanden, um effektiv Calcein-AM auszuschleusen. Beim Versuch die Expression von MDR-Transportern zu steigern, konnte nur der Subklon D5 überzeugen. Das Basissignal der unbehandelten Zellen des Subklons D5 überspannte einen kleineren Bereich an Fluoreszenzintensitäten, als dies beim Subklon F9 der Fall war. Daher war eine Steigerung der P-gp-Aktivität bei D5 besser detektierbar.

In einem Permeabilitätsassay in dem Wechselwirkungen von Medikamenten an der Darmschranke untersucht werden sollen können beide Subklone eingesetzt werden. Soll untersucht werden ob ein Medikament Inhibitor oder Substrat der MDR-Transporter ist, empfiehlt sich der Subklon F9. Dieser kommt durch eine höhere MDR-Expression als D5 näher an die physiologische Darmschranke heran als D5. Sollen Substanzen im Permeabilitätsassay auf ihre aktivierende Wirkung untersucht werden, sollte Subklon D5 eingesetzt werden. Die hergestellten Testbatches des Subklons F9 erzielten in allen Versuchen die gleichen Ergebnisse. Daher können sie gleichermaßen eingesetzt werden.



Literatur

- [1] Balázs Sarkadi, László Homolya, Gergely Szakács, and András Váradi. Human Multidrug Resistance ABCB and ABCG Transporters: Participation in a Chemoinnunity Defense System. *Physiological reviews*, 86(4):1179–1236, 2006.
- [2] Supratim Choudhuri and Curtis D Klaassen. Structure, function, expression, genomic organization, and single nucleotide polymorphisms of human ABCB1 (MDR1), ABCC (MRP), and ABCG2 (BCRP) efflux transporters. *International journal of toxicology*, 25(4):231–259, 2006.
- [3] Frances J Sharom and Alena Siarheyeva. Functional assays for identification of compounds that interact with P-gp. *Multidrug Resistance: Biological and Pharmaceutical Advances in Antitumour Treatment (Colabufo, NA Ed.)*, pages 261–290, 2008.
- [4] Michael Dean, Yannick Hamon, and Giovanna Chimini. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Journal of lipid research*, 42(7):1007–1017, 2001.
- [5] Alfred H Schinkel. P-Glycoprotein, a gatekeeper in the blood brain barrier. *Advanced drug delivery reviews*, 36(2):179–194, 1999.
- [6] Franz Thiebaut, Takashi Tsuruo, Hirofumi Hamada, Michael M Gottesman, Ira Pastan, and Mark C Willingham. Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(21):7735–7738, 1987.
- [7] Saura Gil, R Saura, F Forestier, and R Farinotti. P-glycoprotein expression of the human placenta during pregnancy. *Placenta*, 26(2):268–270, 2005.
- [8] Mikihiisa Takano, Ryoko Yumoto, and Teruo Murakami. Expression and function of efflux drug transporters in the intestine. *Pharmacology & therapeutics*, 109(1):137–161, 2006.
- [9] Bernd Greiner, Michel Eichelbaum, Peter Fritz, Hans-Peter Kreichgauer, Oliver von Richter, Johannes Zundler, and Heyo K Kroemer. The role of intestinal



- P-glycoprotein in the interaction of digoxin and rifampin. *The Journal of clinical investigation*, 104(2):147–153, 1999.
- [10] Megan R Ansbro, Suneet Shukla, Suresh V Ambudkar, Stuart H Yuspa, and Luowei Li. Screening Compounds with a novel High-Throughput ABCB1-mediated Efflux Assay identifies Drugs with known therapeutic Targets at Risk for Multidrug Resistance Interference. *PLoS One*, 8(4):e60334, 2013.
- [11] Norbert Ulfig. *Kurzlehrbuch Histologie, 2. Auflage*. Thieme, 2005.
- [12] Martin Trebsdorf. *Biologie, Anatomie, Physiologie: Lehrbuch und Atlas*. Verlag Europa-Lehrmittel Nourney, Vollmer, 2009.
- [13] Elaine M Leslie, Roger G Deeley, and Susan PC Cole. Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicology and applied pharmacology*, 204(3):216–237, 2005.
- [14] J Fred Pritchard, Malle Jurima-Romet, Mark LJ Reimer, Elisabeth Mortimer, Brenda Rolfe, and Mitchell N Cayen. Making better drugs: Decision gates in non-clinical drug development. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2(7):542–553, 2003.
- [15] Y Sambuy, I De Angelis, G Ranaldi, ML Scarino, A Stammati, and F Zucco. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell biology and toxicology*, 21(1):1–26, 2005.
- [16] Anna Olejnik, Monika Lewandowska, W³odzimierz Grajek, Katarzyna Czaczyk, et al. New rapid method of Caco-2 cell differentiation. *Methodology of the Novel Food Evaluation. Pol J Food Nutr Sci*, 12(53):60–64, 2003.
- [17] Chung-Pu Wu, Anna M Calcagno, and Suresh V Ambudkar. Reversal of ABC drug transporter-mediated multidrug resistance in cancer cells: evaluation of current strategies. *Current molecular pharmacology*, 1(2):93–105, 2008.
- [18] Christopher F Higgins. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annual review of cell biology*, 8(1):67–113, 1992.



- [19] Zhanglin Ni, Zsolt Bikadi, Mark F Rosenberg, and Qingcheng Mao. Structure and function of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Current drug metabolism*, 11(7):603–617, 2010.
- [20] Rudolph L Juliano and V Ling. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 455(1):152–162, 1976.
- [21] Michael M Gottesman and Ira Pastan. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annual review of biochemistry*, 62(1):385–427, 1993.
- [22] Takeo Nakanishi and Douglas D Ross. Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2): its role in multidrug resistance and regulation of its gene expression. *Chinese journal of cancer*, 31(2):73, 2012.
- [23] Heidi R Kast, Bryan Goodwin, Paul T Tarr, Stacey A Jones, Andrew M Anisfeld, Catherine M Stoltz, Peter Tontonoz, Steve Kliewer, Timothy M Willson, and Peter A Edwards. Regulation of multidrug resistance-associated protein 2 (ABCC2) by the nuclear receptors pregnane X receptor, farnesoid X-activated receptor, and constitutive androstane receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 277(4):2908–2915, 2002.
- [24] Mitchell E Taub, Lalitha Podila, Diane Ely, and Iliana Almeida. Functional assessment of multiple P-glycoprotein (P-gp) probe substrates: influence of cell line and modulator concentration on P-gp activity. *Drug Metabolism and Disposition*, 33(11):1679–1687, 2005.
- [25] Anne H Dantzig, Robert L Shepard, Jin Cao, Kevin L Law, William J Ehlhardt, Todd M Baughman, Thomas F Bumol, and James J Starling. Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by a potent cyclopropyldibenzosuberane modulator, LY335979. *Cancer Research*, 56(18):4171–4179, 1996.
- [26] Cindy Q Xia, Ning Liu, David Yang, Gerald Miwa, and Liang-Shang Gan. Expression, localization, and functional characteristics of breast cancer resistance protein in Caco-2 cells. *Drug metabolism and disposition*, 33(5):637–643, 2005.



- [27] Yuexian Li, Erik Hayman, Mihaela Plesescu, and Shimoga R Prakash. Synthesis of potent BCRP inhibitor Ko143. *Tetrahedron Letters*, 49(9):1480–1483, 2008.
- [28] D Anglicheau, N Pallet, M Rabant, P Marquet, B Cassinat, P Meria, P Beaune, C Legendre, and E Thervet. Role of P-glycoprotein in cyclosporine cytotoxicity in the cyclosporine sirolimus interaction. *Kidney international*, 70(6):1019–1025, 2006.
- [29] Peng Hsiao, Lucy Sasongko, Jeanne M Link, David A Mankoff, Mark Muzi, Ann C Collier, and Jashvant D Unadkat. Verapamil P-glycoprotein transport across the rat blood-brain barrier: cyclosporine, a concentration inhibition analysis, and comparison with human data. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 317(2):704–710, 2006.
- [30] Marko Vezmar and Elias Georges. Reversal of mdr-mediated doxorubicin resistance with quinoline-based drugs. *Biochemical pharmacology*, 59(10):1245–1252, 2000.
- [31] L Austin Doyle and Douglas D Ross. Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2). *Oncogene*, 22(47):7340, 2003.
- [32] Stefan Harmsen, I Meijerman, CL Febus, RF Maas-Bakker, JH Beijnen, and JHM Schellens. PXR-mediated induction of P-glycoprotein by anticancer drugs in a human colon adenocarcinoma-derived cell line. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 66(4):765–771, 2010.
- [33] Lukas Cervený, Lucie Svecova, Eva Anzenbacherova, Radim Vrzal, Frantisek Staud, Zdenek Dvorak, Jitka Ulrichova, Pavel Anzenbacher, and Petr Pavek. Valproic acid induces CYP3A4 and MDR1 gene expression by activation of constitutive androstane receptor and pregnane X receptor pathways. *Drug metabolism and disposition*, 35(7):1032–1041, 2007.
- [34] Michael D Perloff, Lisa L Von Moltke, Elke Störmer, Richard I Shader, and David J Greenblatt. Saint John’s wort: An in vitro analysis of P-glycoprotein induction due to extended exposure. *British journal of pharmacology*, 134(8):1601–1608, 2001.
- [35] Mikko Niemi, Janne T Backman, Martin F Fromm, Pertti J Neuvonen, and Kari T



- Kivistö. Pharmacokinetic interactions with rifampicin. *Clinical pharmacokinetics*, 42(9):819–850, 2003.
- [36] L Homolya, M Hollo, M Müller, EB Mechetner, and B Sarkadi. A new Method for a quantitative Assessment of P-glycoprotein-related Multidrug Resistance in Tumour Cells. *British journal of cancer*, 73(7):849, 1996.
- [37] Gregor Rothe. Technische und methodische Grundlagen der Durchflusszytometrie. In *Zelluläre Diagnostik*, pages 27–70. Karger Publishers, 2006.
- [38] Mark J Jaroszeski and Gilbert Radcliff. Fundamentals of flow cytometry. *Molecular biotechnology*, 11(1):37–53, 1999.
- [39] Daniel H Ryan, Margaret A Fallon, and Paul K Horan. Flow cytometry in the clinical laboratory. *Clinica chimica acta*, 171(2-3):125–173, 1988.
- [40] Michael Brown and Carl Wittwer. Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology. *Clinical chemistry*, 46(8):1221–1229, 2000.



Anhang

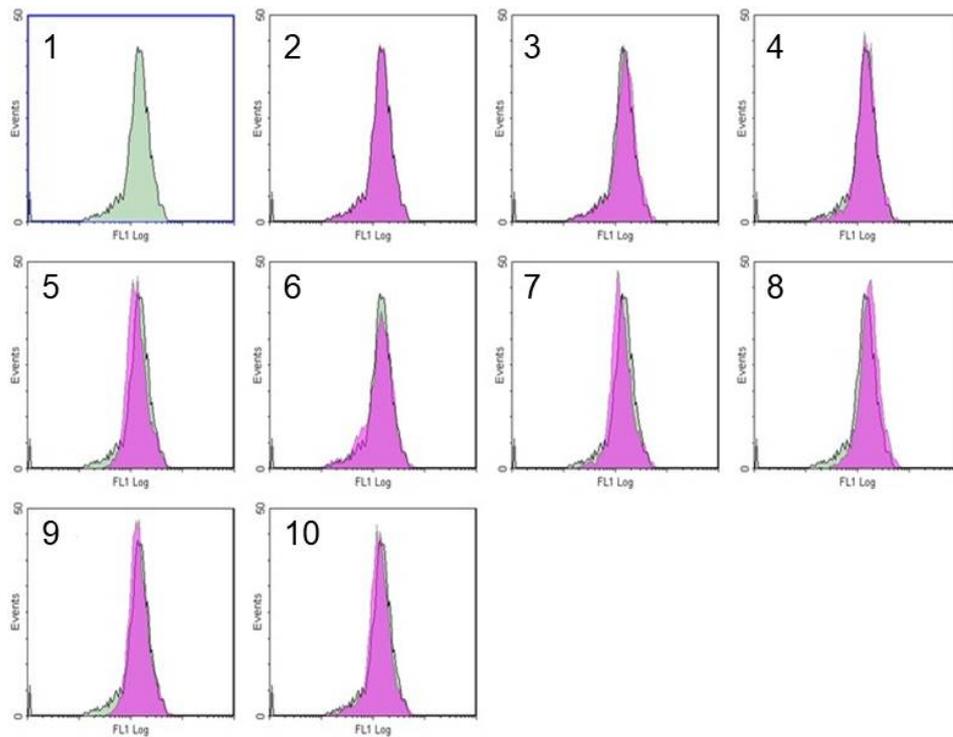


Abb. 26: Inhibition Subklon D5, frisch aufgetaute Zellen, Passage 14; Messung des Calcein-Signals am Durchflusszytometer mit Fluoreszenzfilter FL1: In grün dargestellt ist das Histogramm der Zellen ohne Inhibition als Vergleichswert (1). Eine Überlagerung der Messungen aus den inhibierten Proben ist in pink abgebildet (2 bis 10). Die abgebildeten Messungen zeigen die Inhibition von: 2 P-gp, MRP1, MRP2 und BCRP durch Verapamil, 3 allen untersuchten MDR-Transporter durch Cyclosporin A, 4 P-gp durch Zosuquidar, 5 MRP1 und MRP2 durch MK-571, 6 BCRP durch Ko143, 7 P-gp, MRP1 und MRP2 durch Kombination aus Zosuquidar und MK-571, 8 P-gp und BCRP durch Kombination aus Zosuquidar und Ko143, 9 MRP1, MRP2 und BCRP durch Kombination aus MK-571 und Ko143, 10 P-gp, MRP1, MRP2 und BCRP durch Kombination aus Zosuquidar, MK-571 und Ko143.

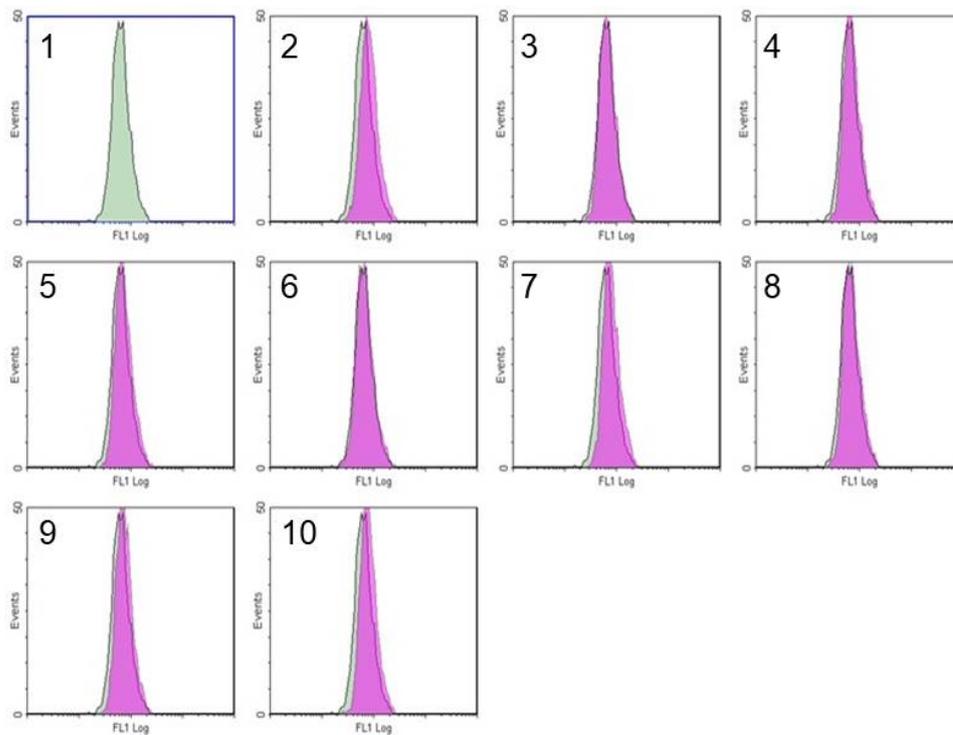


Abb. 27: Inhibition Subklon D5, Zellen aus laufender Kultur, Passage 16; Messung des Calcein-Signals am Durchflusszytometer mit Fluoreszenzfilter FL1: In grün dargestellt ist das Histogramm der Zellen ohne Inhibition als Vergleichswert (1). Eine Überlagerung der Messungen aus den inhibierten Proben ist in pink abgebildet (2 bis 10). Die abgebildeten Messungen zeigen die Inhibition von: **2** P-gp, MRP1, MRP2 und BCRP durch Verapamil, **3** allen untersuchten MDR-Transporter durch Cyclosporin A, **4** P-gp durch Zosuquidar, **5** MRP1 und MRP2 durch MK-571, **6** BCRP durch Ko143, **7** P-gp, MRP1 und MRP2 durch Kombination aus Zosuquidar und MK-571, **8** P-gp und BCRP durch Kombination aus Zosuquidar und Ko143, **9** MRP1, MRP2 und BCRP durch Kombination aus MK-571 und Ko143, **10** P-gp, MRP1, MRP2 und BCRP durch Kombination aus Zosuquidar, MK-571 und Ko143.

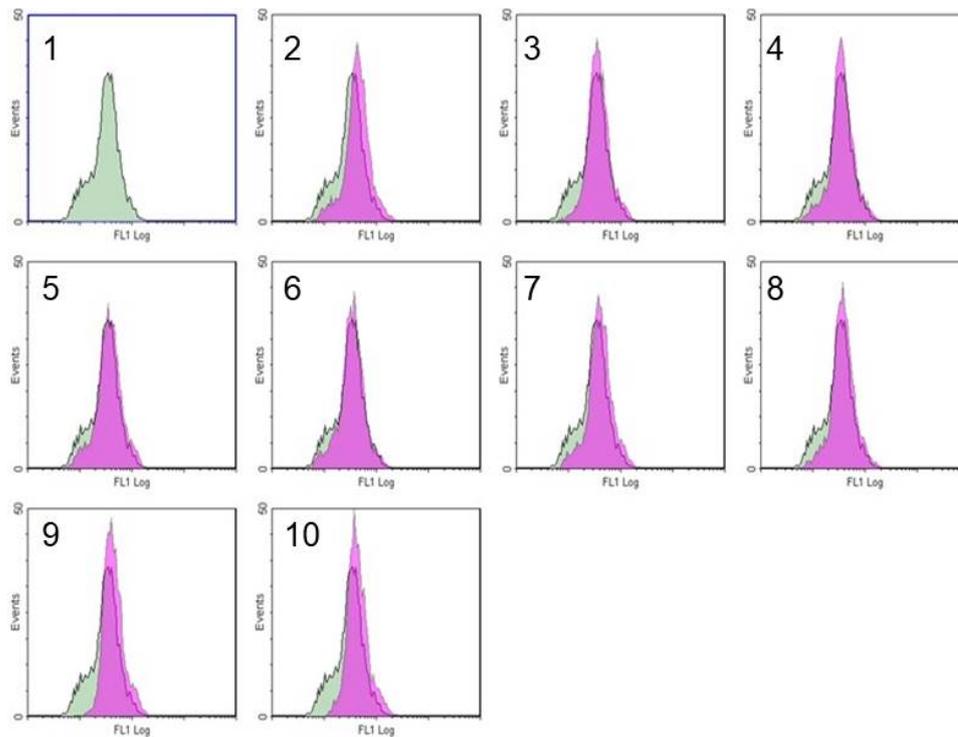


Abb. 28: Inhibition Subklon D5, Zellen aus laufender Kultur, Passage 19; Messung des Calcein-Signals am Durchflusszytometer mit Fluoreszenzfilter FL1: In grün dargestellt ist das Histogramm der Zellen ohne Inhibition als Vergleichswert (1). Eine Überlagerung der Messungen aus den inhibierten Proben ist in pink abgebildet (2 bis 10). Die abgebildeten Messungen zeigen die Inhibition von: **2** P-gp, MRP1, MRP2 und BCRP durch Verapamil, **3** allen untersuchten MDR-Transporter durch Cyclosporin A, **4** P-gp durch Zosuquidar, **5** MRP1 und MRP2 durch MK-571, **6** BCRP durch Ko143, **7** P-gp, MRP1 und MRP2 durch Kombination aus Zosuquidar und MK-571, **8** P-gp und BCRP durch Kombination aus Zosuquidar und Ko143, **9** MRP1, MRP2 und BCRP durch Kombination aus MK-571 und Ko143, **10** P-gp, MRP1, MRP2 und BCRP durch Kombination aus Zosuquidar, MK-571 und Ko143.

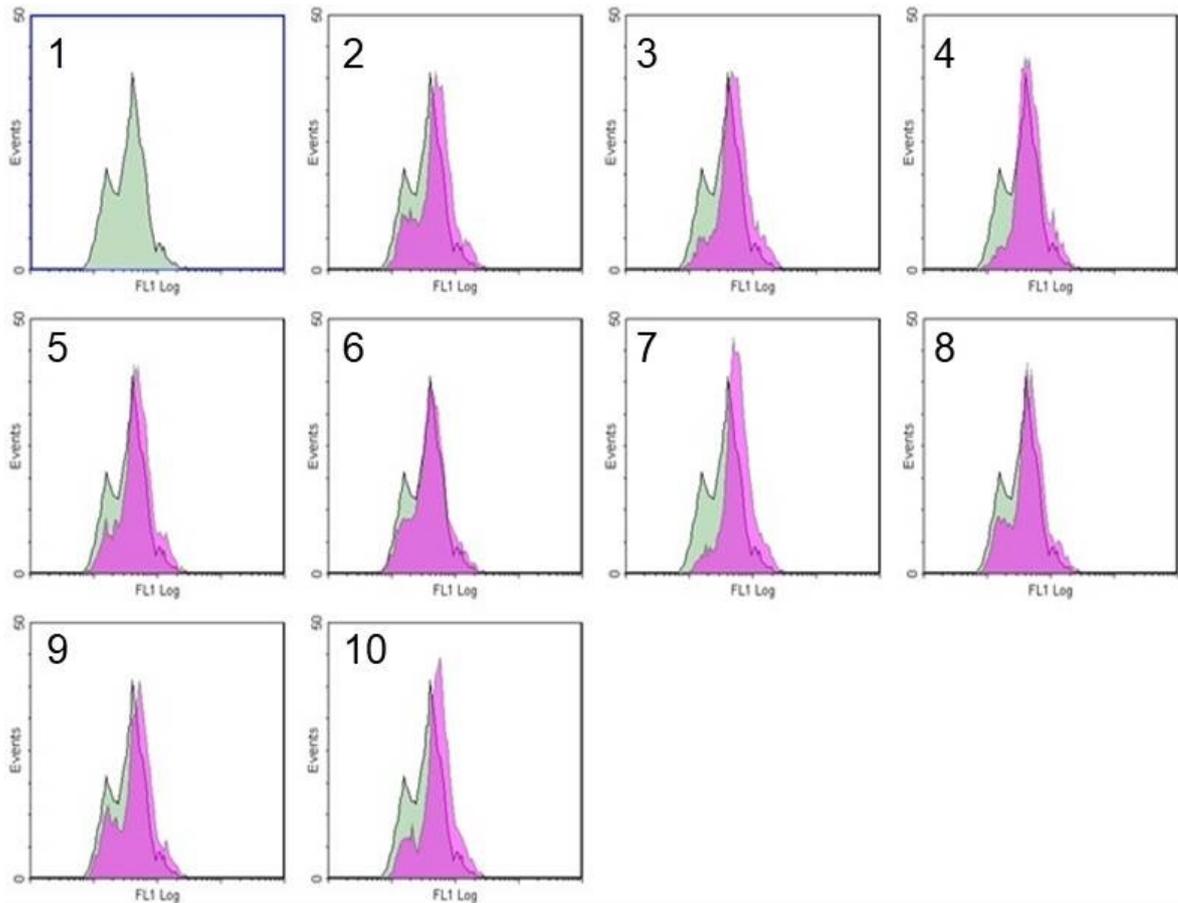


Abb. 29: Inhibition Subklon D5, Zellen aus laufender Kultur, Passage 21; Messung des Calcein-Signals am Durchflusszytometer mit Fluoreszenzfilter FL1: In grün dargestellt ist das Histogramm der Zellen ohne Inhibition als Vergleichswert (1). Eine Überlagerung der Messungen aus den inhibierten Proben ist in pink abgebildet (2 bis 10). Die abgebildeten Messungen zeigen die Inhibition von: **2** P-gp, MRP1, MRP2 und BCRP durch Verapamil, **3** allen untersuchten MDR-Transporter durch Cyclosporin A, **4** P-gp durch Zosuquidar, **5** MRP1 und MRP2 durch MK-571, **6** BCRP durch Ko143, **7** P-gp, MRP1 und MRP2 durch Kombination aus Zosuquidar und MK-571, **8** P-gp und BCRP durch Kombination aus Zosuquidar und Ko143, **9** MRP1, MRP2 und BCRP durch Kombination aus MK-571 und Ko143, **10** P-gp, MRP1, MRP2 und BCRP durch Kombination aus Zosuquidar, MK-571 und Ko143.

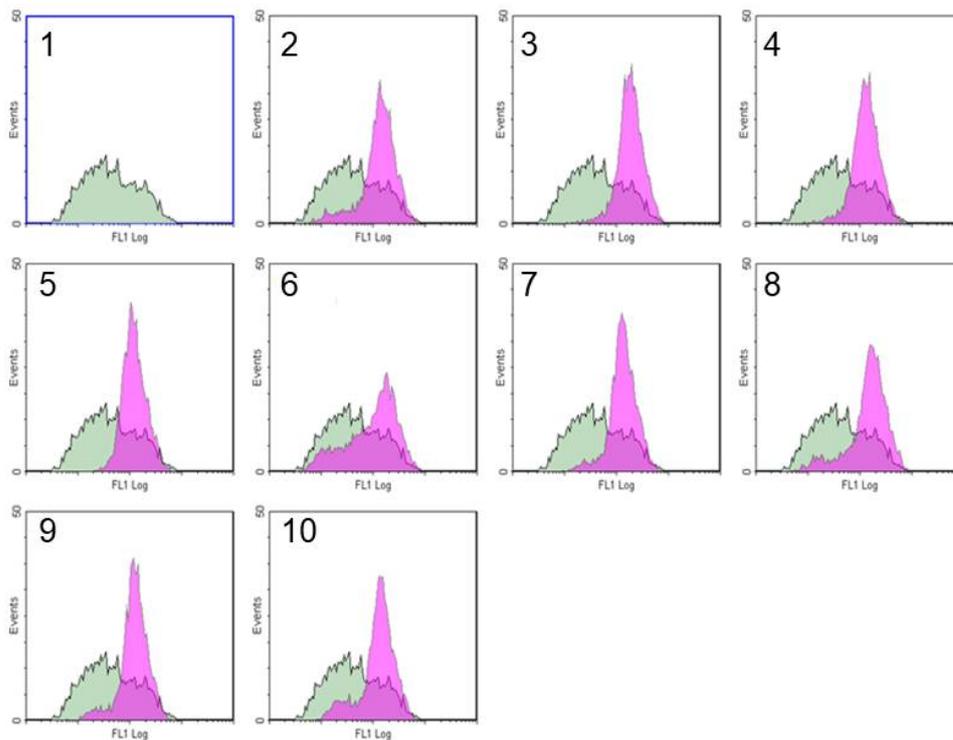


Abb. 30: Inhibition Subklon F9 Batch 1, frisch aufgetaute Zellen, Passage 11; Messung des Calcein-Signals am Durchflusszytometer mit Fluoreszenzfilter FL1: In grün dargestellt ist das Histogramm der Zellen ohne Inhibition als Vergleichswert (1). Eine Überlagerung der Messungen aus den inhibierten Proben ist in pink abgebildet (2 bis 10). Die abgebildeten Messungen zeigen die Inhibition von: **2** P-gp, MRP1, MRP2 und BCRP durch Verapamil, **3** allen untersuchten MDR-Transporter durch Cyclosporin A, **4** P-gp durch Zosuquidar, **5** MRP1 und MRP2 durch MK-571, **6** BCRP durch Ko143, **7** P-gp, MRP1 und MRP2 durch Kombination aus Zosuquidar und MK-571, **8** P-gp und BCRP durch Kombination aus Zosuquidar und Ko143, **9** MRP1, MRP2 und BCRP durch Kombination aus MK-571 und Ko143, **10** P-gp, MRP1, MRP2 und BCRP durch Kombination aus Zosuquidar, MK-571 und Ko143.

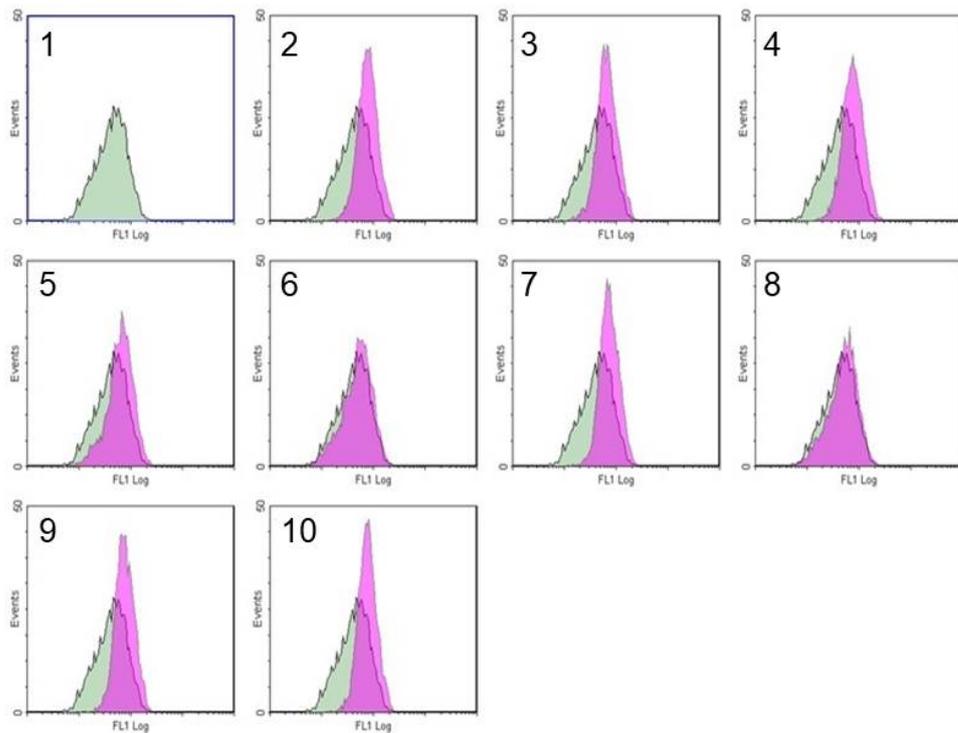


Abb. 31: Inhibition Subklon F9 Batch 1, Zellen aus laufender Kultur, Passage 13; Messung des Calcein-Signals am Durchflusszytometer mit Fluoreszenzfilter FL1: In grün dargestellt ist das Histogramm der Zellen ohne Inhibition als Vergleichswert (1). Eine Überlagerung der Messungen aus den inhibierten Proben ist in pink abgebildet (2 bis 10). Die abgebildeten Messungen zeigen die Inhibition von: **2** P-gp, MRP1, MRP2 und BCRP durch Verapamil, **3** allen untersuchten MDR-Transporter durch Cyclosporin A, **4** P-gp durch Zosuquidar, **5** MRP1 und MRP2 durch MK-571, **6** BCRP durch Ko143, **7** P-gp, MRP1 und MRP2 durch Kombination aus Zosuquidar und MK-571, **8** P-gp und BCRP durch Kombination aus Zosuquidar und Ko143, **9** MRP1, MRP2 und BCRP durch Kombination aus MK-571 und Ko143, **10** P-gp, MRP1, MRP2 und BCRP durch Kombination aus Zosuquidar, MK-571 und Ko143.

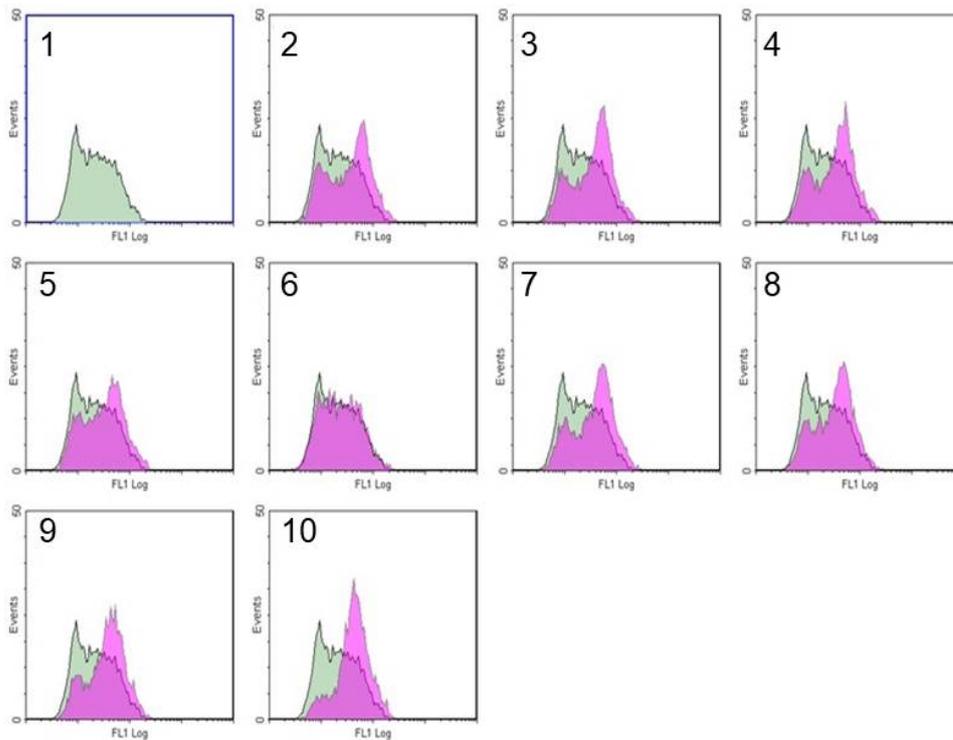


Abb. 32: Inhibition Subklon F9 Batch 1, Zellen aus laufender Kultur, Passage 16; Messung des Calcein-Signals am Durchflusszytometer mit Fluoreszenzfilter FL1: In grün dargestellt ist das Histogramm der Zellen ohne Inhibition als Vergleichswert (1). Eine Überlagerung der Messungen aus den inhibierten Proben ist in pink abgebildet (2 bis 10). Die abgebildeten Messungen zeigen die Inhibition von: **2** P-gp, MRP1, MRP2 und BCRP durch Verapamil, **3** allen untersuchten MDR-Transporter durch Cyclosporin A, **4** P-gp durch Zosuquidar, **5** MRP1 und MRP2 durch MK-571, **6** BCRP durch Ko143, **7** P-gp, MRP1 und MRP2 durch Kombination aus Zosuquidar und MK-571, **8** P-gp und BCRP durch Kombination aus Zosuquidar und Ko143, **9** MRP1, MRP2 und BCRP durch Kombination aus MK-571 und Ko143, **10** P-gp, MRP1, MRP2 und BCRP durch Kombination aus Zosuquidar, MK-571 und Ko143.

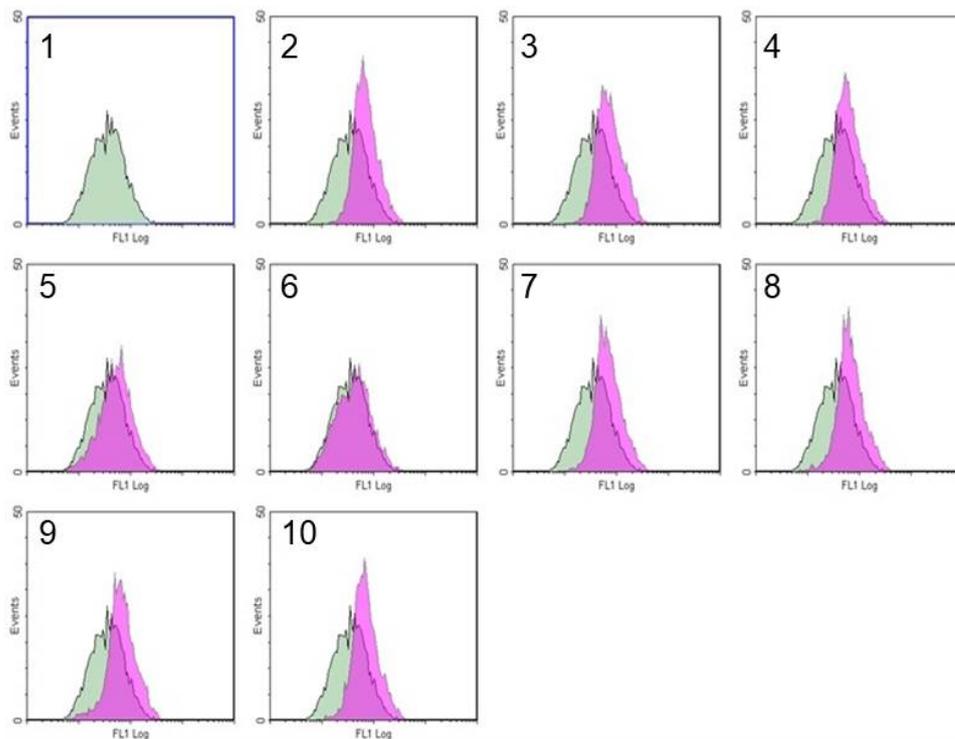


Abb. 33: Inhibition Subklon F9 Batch 1, Zellen aus laufender Kultur, Passage 18; Messung des Calcein-Signals am Durchflusszytometer mit Fluoreszenzfilter FL1: In grün dargestellt ist das Histogramm der Zellen ohne Inhibition als Vergleichswert (1). Eine Überlagerung der Messungen aus den inhibierten Proben ist in pink abgebildet (2 bis 10). Die abgebildeten Messungen zeigen die Inhibition von: **2** P-gp, MRP1, MRP2 und BCRP durch Verapamil, **3** allen untersuchten MDR-Transporter durch Cyclosporin A, **4** P-gp durch Zosuquidar, **5** MRP1 und MRP2 durch MK-571, **6** BCRP durch Ko143, **7** P-gp, MRP1 und MRP2 durch Kombination aus Zosuquidar und MK-571, **8** P-gp und BCRP durch Kombination aus Zosuquidar und Ko143, **9** MRP1, MRP2 und BCRP durch Kombination aus MK-571 und Ko143, **10** P-gp, MRP1, MRP2 und BCRP durch Kombination aus Zosuquidar, MK-571 und Ko143.

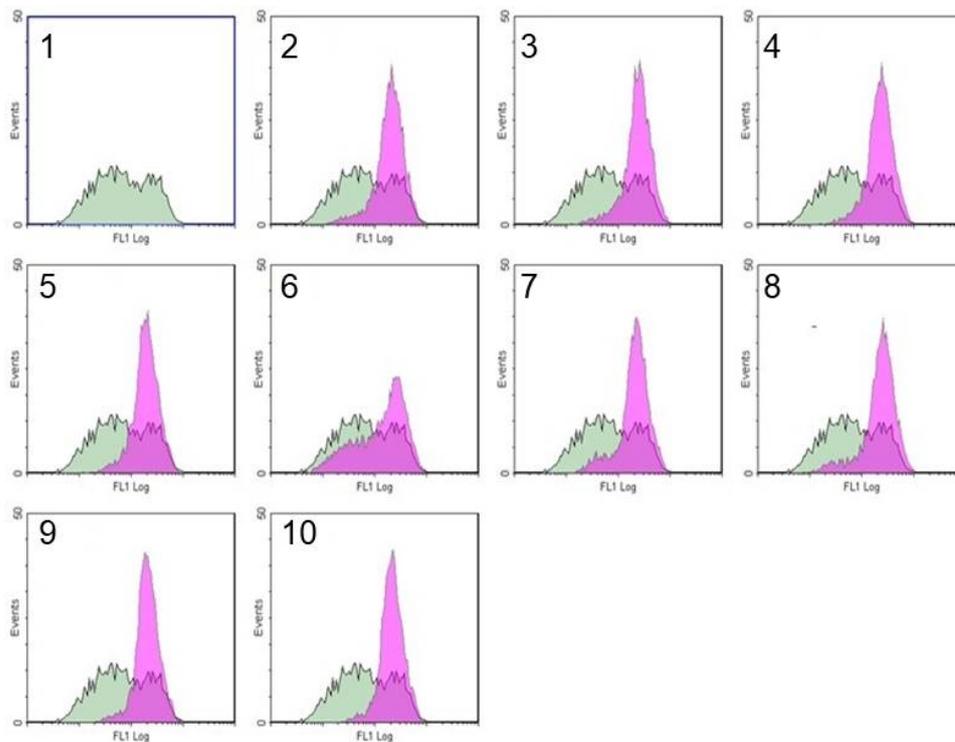


Abb. 34: Inhibition Subklon F9 Batch , frisch aufgetaute Zellen , Passage 12; Messung des Calcein-Signals am Durchflusszytometer mit Fluoreszenzfilter FL1: In grün dargestellt ist das Histogramm der Zellen ohne Inhibition als Vergleichswert (1). Eine Überlagerung der Messungen aus den inhibierten Proben ist in pink abgebildet (2 bis 10). Die abgebildeten Messungen zeigen die Inhibition von: **2** P-gp, MRP1, MRP2 und BCRP durch Verapamil, **3** allen untersuchten MDR-Transporter durch Cyclosporin A, **4** P-gp durch Zosuquidar, **5** MRP1 und MRP2 durch MK-571, **6** BCRP durch Ko143, **7** P-gp, MRP1 und MRP2 durch Kombination aus Zosuquidar und MK-571, **8** P-gp und BCRP durch Kombination aus Zosuquidar und Ko143, **9** MRP1, MRP2 und BCRP durch Kombination aus MK-571 und Ko143, **10** P-gp, MRP1, MRP2 und BCRP durch Kombination aus Zosuquidar, MK-571 und Ko143.

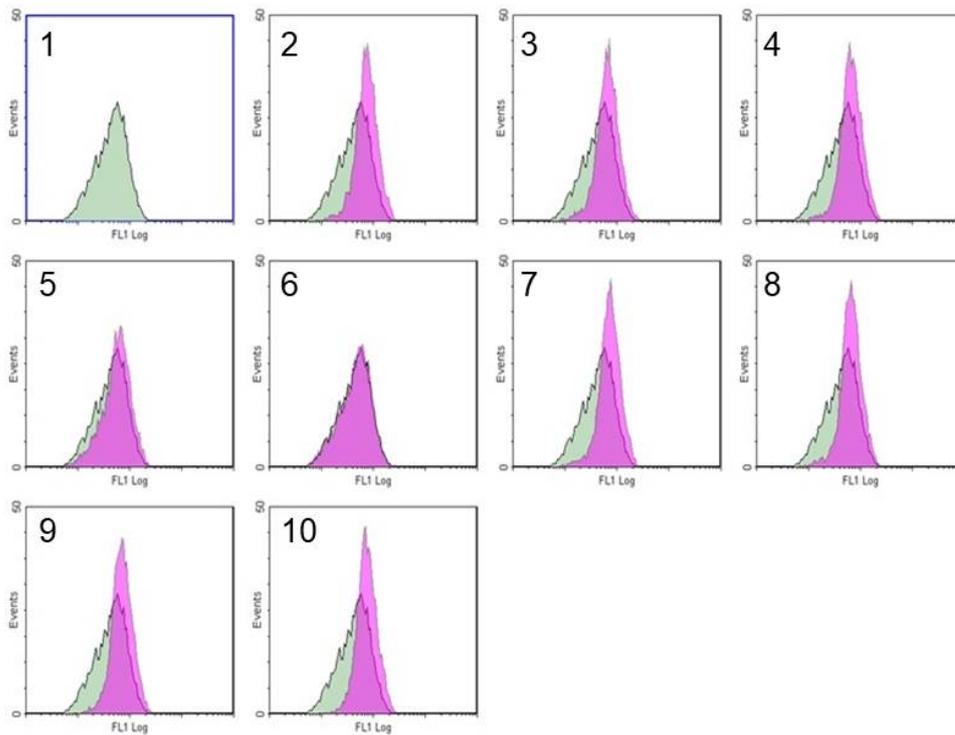


Abb. 35: Inhibition Subklon F9 Batch , Zellen aus laufender Kultur, Passage 14; Messung des Calcein-Signals am Durchflusszytometer mit Fluoreszenzfilter FL1: In grün dargestellt ist das Histogramm der Zellen ohne Inhibition als Vergleichswert (**1**). Eine Überlagerung der Messungen aus den inhibierten Proben ist in pink abgebildet (**2 bis 10**). Die abgebildeten Messungen zeigen die Inhibition von: **2** P-gp, MRP1, MRP2 und BCRP durch Verapamil, **3** allen untersuchten MDR-Transporter durch Cyclosporin A, **4** P-gp durch Zosuquidar, **5** MRP1 und MRP2 durch MK-571, **6** BCRP durch Ko143, **7** P-gp, MRP1 und MRP2 durch Kombination aus Zosuquidar und MK-571, **8** P-gp und BCRP durch Kombination aus Zosuquidar und Ko143, **9** MRP1, MRP2 und BCRP durch Kombination aus MK-571 und Ko143, **10** P-gp, MRP1, MRP2 und BCRP durch Kombination aus Zosuquidar, MK-571 und Ko143.

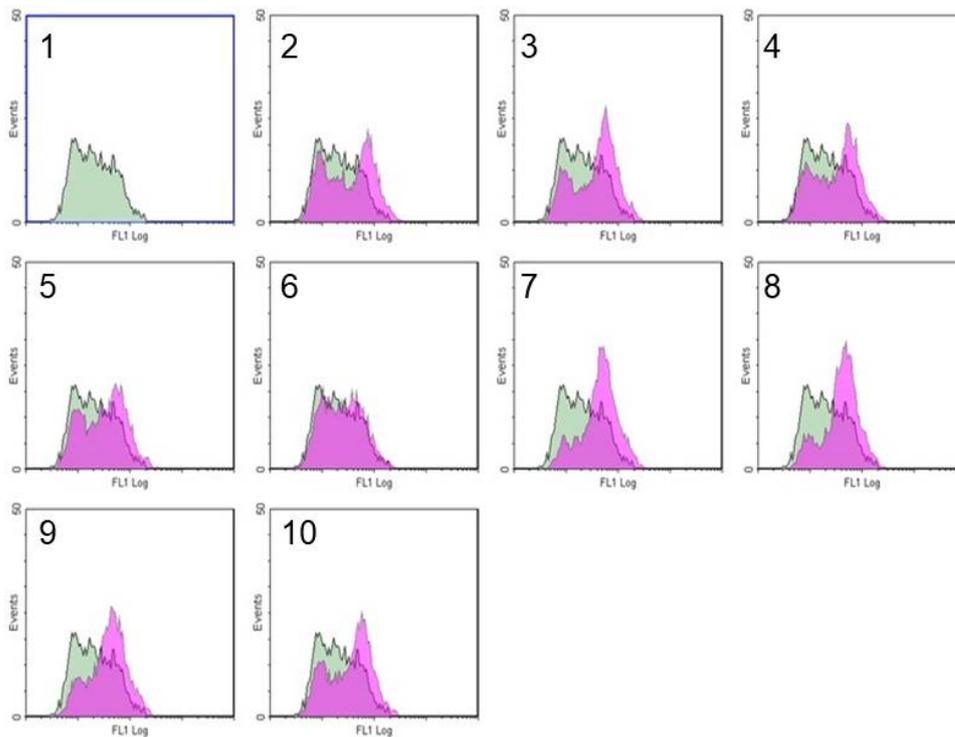


Abb. 36: Inhibition Subklon F9 Batch , Zellen aus laufender Kultur, Passage 17; Messung des Calcein-Signals am Durchflusszytometer mit Fluoreszenzfilter FL1: In grün dargestellt ist das Histogramm der Zellen ohne Inhibition als Vergleichswert (1). Eine Überlagerung der Messungen aus den inhibierten Proben ist in pink abgebildet (2 bis 10). Die abgebildeten Messungen zeigen die Inhibition von: **2** P-gp, MRP1, MRP2 und BCRP durch Verapamil, **3** allen untersuchten MDR-Transporter durch Cyclosporin A, **4** P-gp durch Zosuquidar, **5** MRP1 und MRP2 durch MK-571, **6** BCRP durch Ko143, **7** P-gp, MRP1 und MRP2 durch Kombination aus Zosuquidar und MK-571, **8** P-gp und BCRP durch Kombination aus Zosuquidar und Ko143, **9** MRP1, MRP2 und BCRP durch Kombination aus MK-571 und Ko143, **10** P-gp, MRP1, MRP2 und BCRP durch Kombination aus Zosuquidar, MK-571 und Ko143.

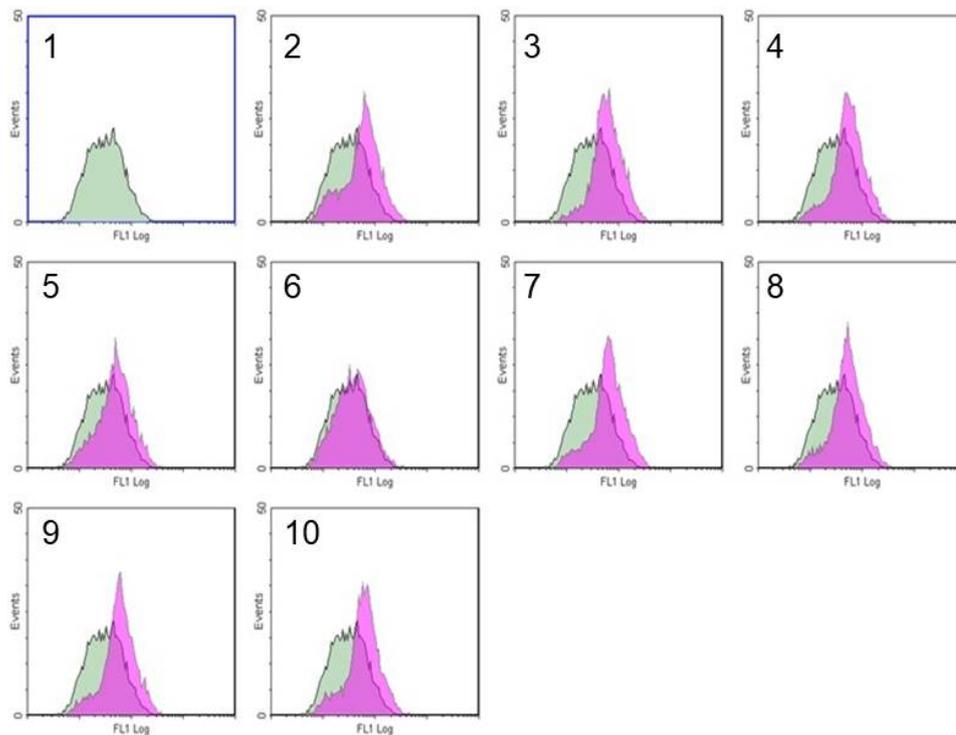


Abb. 37: Inhibition Subklon F9 Batch , Zellen aus laufender Kultur, Passage 19; Messung des Calcein-Signals am Durchflusszytometer mit Fluoreszenzfilter FL1: In grün dargestellt ist das Histogramm der Zellen ohne Inhibition als Vergleichswert (1). Eine Überlagerung der Messungen aus den inhibierten Proben ist in pink abgebildet (2 bis 10). Die abgebildeten Messungen zeigen die Inhibition von: **2** P-gp, MRP1, MRP2 und BCRP durch Verapamil, **3** allen untersuchten MDR-Transporter durch Cyclosporin A, **4** P-gp durch Zosuquidar, **5** MRP1 und MRP2 durch MK-571, **6** BCRP durch Ko143, **7** P-gp, MRP1 und MRP2 durch Kombination aus Zosuquidar und MK-571, **8** P-gp und BCRP durch Kombination aus Zosuquidar und Ko143, **9** MRP1, MRP2 und BCRP durch Kombination aus MK-571 und Ko143, **10** P-gp, MRP1, MRP2 und BCRP durch Kombination aus Zosuquidar, MK-571 und Ko143.