

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
des Fachbereiches Veterinärmedizin
Betreuer: Prof. Dr. med. vet. Ernst Petzinger
eingereicht über das
Institut für Biochemie des Fachbereiches
Biologie, Chemie und Geowissenschaften
der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Untersuchungen zur Aufnahme und Elimination
von Gallensäure-Oligonukleotid-Konjugaten
und ihren Antisense-Eigenschaften**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaftlichen Fachbereiche
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Kerstin Lischka
aus Gießen

Gießen 2003

Dekan: Prof. Dr. Jürgen Janek

1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Alfred M. Pingoud

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. vet. Ernst Petzinger

Tag der mündlichen Prüfung: 30. September 2003

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden wie folgend veröffentlicht:

Publikationen:

Starke D, Lischka K, Pagels P, Uhlmann E, Kramer W, Wess G and Petzinger E (2001):
Bile acid-oligodeoxynucleotide conjugates: synthesis and liver excretion in rats.
Bioorg. Med. Chem. Lett. 11, 945-949

Lischka K, Starke D, Failing K, Herling A, Kramer W and Petzinger E (2003):
Hepatobiliary Elimination of Bile Acid-modified Oligodeoxynucleotides in
Wistar- and TR⁻-rats: Evidence for mrp2 as carrier for oligodeoxynucleotides.
Biochem. Pharmacol. 66, 565-577

***Wir werden nicht nachlassen in unserem Forschen.
Und das Ende unseres Forschens
Ist, an den Ausgangspunkt zu kommen
Und zum ersten Mal den Ort zu erkennen.***

AUS: THOMAS STEARN ELIOT: «VIER QUARTETTE» (1943)

Inhalt

<i>Inhalt</i>	<i>I</i>
Verzeichnis der Abkürzungen	V
<i>I</i> <i>Einleitung</i>	<i>I</i>
1.1 Anatomie und Physiologie der Leber	1
1.1.1 Parenchymzellen	2
1.1.2 Nichtparenchymzellen	3
1.1.3 Gallensäuren und enterohepatischer Kreislauf	4
1.2 Transportproteine der Hepatozyten	5
1.2.1 Basolaterale Transportproteine	6
1.2.2 Canaliculäre Transportproteine	8
1.2.3 Glutathion-Transporter	10
1.2.4 Charakteristika verschiedener Rattenstämme	11
1.3 Eigenschaften ausgewählter Substrate	13
1.3.1 Taurocholat	13
1.3.2 Bromsulphthalein (BSP)	15
1.3.3 S 3025	18
1.3.4 CDNB	20
1.3.5 MK 571	22
1.3.6 Sirolimus	25
1.4 Strukturen und Modifikationen von Oligonukleotiden	27
1.4.1 Allgemeine Struktur	27
1.4.2 Modifikationen am Zucker	28
1.4.3 Modifikationen am Phosphat	28
1.4.4 Modifikationen an den Basen	29
1.4.5 Oligonukleotid-Konjugate	30
1.4.6 Oligonukleotide der 2. Generation	31
1.5 Oligonukleotide als Nukleinsäure-Therapeutika	32
1.5.1 Antigen-Oligonukleotide	32
1.5.2 Antisense-Oligonukleotide	33
1.5.2.1 Länge der Oligonukleotide	34
1.5.2.2 Auswahl geeigneter Antisense-Sequenzen	34
1.5.3 Nukleinsäure-Enzyme	35

1.5.4	Aptamere und Nonantisense-Effekte.....	36
1.6	In vivo-Stabilität und Pharmakokinetik der Oligonukleotide.....	37
1.7	Ziele der Arbeit.....	39
2	Material.....	42
2.1	Versuchstiere und Zellkulturen.....	42
2.2	Gallensäurederivate.....	42
2.3	Oligonukleotide.....	43
2.4	Substrate canalicärer Transporter	46
2.5	Chemikalien	47
2.6	Puffer und Lösungen	49
2.7	Geräte.....	51
3	Methoden	52
3.1	Gallensäurederivate.....	52
3.1.1	Synthese des Gallensäure-C ₂ -Amins.....	52
3.1.2	Synthese des Gallensäure-C ₂ -Monoamids.....	53
3.1.3	Dünnschichtchromatographie	54
3.2	Synthese von Gallensäure-Oligonukleotid-Konjugaten.....	54
3.2.1	Kopplung.....	54
3.2.2	Esterhydrolyse	55
3.2.3	Fällung	55
3.2.4	Kinasierung	56
3.2.5	Gelelektrophorese	56
3.2.6	Festphasenextraktion.....	58
3.2.7	Konzentrationsbestimmung	58
3.2.8	Lagerung und Aliquotieren.....	58
3.3	Chemisch-physikalische Analytik der Oligonukleotide.....	59
3.3.1	HPLC und MS	59
3.3.2	Strukturmodell	59
3.4	Transportstudien an Membranvesikeln.....	60
3.4.1	Filtration durch Nitrocellulosefilter.....	61
3.4.2	Gelmatrix-Zentrifugation.....	61

3.5	In situ-Galleausscheidung.....	62
3.5.1	Versuchsdurchführung	62
3.5.1.1	In vivo-Stabilität der Oligonukleotide.....	63
3.5.1.2	Substrateigenschaften des Glukose-6-Phosphat-Translokase-Inhibitors S 3025.....	64
3.5.1.3	Applikation von Substraten canaliculärer Transporter	66
3.5.2	Galleproben nach Applikation von Substraten canaliculärer Transporter.....	67
3.5.3	Organproben nach Applikation von Substraten canaliculärer Transporter	68
3.6	Antisense-Studien an <i>Xenopus laevis</i>-Oozyten.....	68
3.6.1	Präparation der Oozyten	69
3.6.2	Injektion der Oligonukleotide.....	69
3.6.3	Aufnahmemessungen	69
3.7	Statistische Methoden.....	70
4	Ergebnisse.....	73
4.1	Chemisch-physikalische Analytik der Oligonukleotide.....	73
4.1.1	Dünnschichtchromatographie	73
4.1.2	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie	75
4.1.3	Massenspektrometrie.....	77
4.1.4	Strukturmodell	80
4.2	Transportstudien an Membranvesikeln.....	82
4.2.1	Filtration durch Nitrocellulosefilter.....	82
4.2.2	Gelmatrix-Zentrifugation.....	83
4.3	In situ-Galleausscheidung I: Vorversuche	85
4.3.1	In vivo-Stabilität der Oligonukleotide.....	85
4.3.2	Substrateigenschaften des Glucose-6-Phosphat-Translokase-Inhibitors S 3025	86
4.3.2.1	Einfluss von S 3025 auf die hepatobiliäre Elimination von BSP	86
4.3.2.2	Einfluss von S 3025 auf die hepatobiliäre Elimination von Taurocholat.....	92
4.4	In situ-Galleausscheidung II: Transportverhalten der Oligonukleotide.....	96
4.4.1	Einfluss des Applikationsortes.....	96
4.4.2	Einfluss des Lösungsmittels	99
4.4.3	Effekte verschiedener Substrate canaliculärer Transporter.....	111
4.4.3.1	Bromsulphthalein (BSP).....	111
4.4.3.2	S 3025	119
4.4.3.3	MK 571	127
4.4.3.4	CDNB	130
4.4.3.5	Sirolimus	133

4.5	Verteilung der Oligonukleotide auf die Organe.....	136
4.5.1	Einfluss des Applikationsortes.....	137
4.5.2	Einfluss des Lösungsmittels	138
4.5.3	Effekte verschiedener Substrate canaliculärer Transporter.....	145
4.5.3.1	Bromsulphthalein (BSP).....	145
4.5.3.2	S 3025	150
4.5.3.3	MK 571	154
4.5.3.4	CDNB	156
4.5.3.5	Sirolimus	158
4.5.4	Prozentualer Vergleich der Oligonukleotidmengen in Organen und Körperflüssigkeiten.....	159
4.5.4.1	Wirkung von BSP	160
4.5.4.2	Wirkung von S 3025	162
4.6	Antisense-Studien an <i>Xenopus laevis</i>-Oozyten.....	165
5	<i>Diskussion</i>.....	168
6	<i>Zusammenfassung</i>.....	179
7	<i>Summary</i>.....	181
8	<i>Literatur</i>.....	183
9	<i>Anhang</i>	200
9.1	Gallefluss.....	200
9.1.1	Einfluss von S 3025 auf den Gallefluss während der BSP-Ausscheidung.....	200
9.1.2	Einfluss von S 3025 auf den Gallefluss während der Taurocholat-Ausscheidung	202
9.1.3	Einfluss des Applikationsortes.....	204
9.1.4	Einfluss des Lösungsmittels	205
9.1.5	Gallemengen nach Applikation verschiedener Substrate canaliculärer Transporter.....	209
9.1.5.1	Bromsulphthalein (BSP).....	209
9.1.5.2	S 3025	213
9.1.5.3	MK 571	216
9.1.5.4	CDNB	217
9.1.5.5	Sirolimus	218
	<i>Danksagung</i>.....	219

Verzeichnis der Abkürzungen

Å	Ångström; 1 Å = 10 ⁻¹⁰ m
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
20mer-AS-n-ODN	20mer Antisense-Oligonukleotid (Phosphorothioat)
20mer-AS-n-ODN-DE	20mer Antisense-Oligonukleotid (Phosphodiester)
20mer-AS-2G-ODN	20mer Antisense-Oligonukleotid mit konjugierter Gallensäure in 3'- und 5'-Position (Phosphorothioat)
20mer-AS-2G-ODN-DE	20mer Antisense-Oligonukleotid mit konjugierter Gallensäure in 3'- und 5'-Position (Phosphodiester)
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
γ-[³⁵ S]-ATP	Adenosin-5'-[γ- ³⁵ thio]-triphosphat
BPB	Bromphenolblau
Bq	Becquerel
Bsep	Bile salt export pump
BSP	Bromsulphthalein; 4,5,6,7-Tetrabrom-3,3-bis(4-hydroxyphenyl)-1(3H)-isobenzofuranon-dinatriumsalz
BSP-GS	Bromsulphthalein-S-glutathion
c	Konzentration
Calu-3 Cells	Human Bronchiolar Epithelial Cells
CDNB	1-Chlor-2,4-dinitrobenzol
CHO	<u>C</u> hinese <u>h</u> amster <u>o</u> vary cells
cmoat	canalicular multispecific organic anion transporter
CMV	<u>c</u> analiculäre <u>M</u> embran <u>y</u> esikel
CYP3A4	Cytochrom P 450-Enzym 3A4
d	dezi (10 ⁻¹)
Da	Dalton
DC	Dünnschichtchromatographie, Dünnschichtchromatogramm
DE	(Phospho-)Diester
DMF	N,N-Dimethylformamid
DIPEA	N,N-Diisopropylamin

DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNP-SG	Dinitrophenyl-Glutathion
ϵ	Extinktionskoeffizient
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EHBR	<u>E</u> isei <u>H</u> yper <u>b</u> ilirubinemic <u>R</u> at
E_{pot}	potenzielle Energie
ESI	Elektronenstossionisation
EtOH	Ethanol
g	Gramm
GS	Gallensäure
GS-C ₂ -Alkohol	3 β -(2-Hydroxyethoxy)-7 α ,12 α -dihydroxy-5 β -cholsäuremethylester
GS-C ₂ -Amid	Bernsteinsäureamid des Gallensäure-C ₂ -Amins
GS-C ₂ -Amin	3 β -(2-Aminoethoxy)-7 α ,12 α -dihydroxy-5 β -cholsäuremethylester
GS-C ₂ -Mesylat	3 β -(2-Mesyloethoxy)-7 α ,12 α -dihydroxy-5 β -cholsäuremethylester
GS-C ₂ -Phthalimid	3 β -(2-Phthalimidoethoxy)-7 α ,12 α -dihydroxy-5 β -cholsäuremethylester
G-ODN	15mer-Oligonukleotid mit konjugierter Gallensäure in 3'- oder 5'-Position (Phosphorothioat)
2G-ODN; 2G	15mer-Oligonukleotid mit konjugierter Gallensäure in 3'- und 5'-Position (Phosphorothioat)
GSH	Glutathion
h	Stunde
HEK	<u>H</u> uman <u>E</u> mbryonic <u>K</u> idney Cells
HeLa	Human Cervix Epitheloid Carcinoma Cells
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie, high performance liquid chromatography
³ H-TC	Tritium-markiertes Taurocholat
HWZ	Halbwertszeit
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
kg	Kilogramm
K _i -Wert	Inhibierungskonstante

kJ	Kilojoule
K_M	Michaelis-Menten-Konstante
KM	Körpermasse
Lsm.	Lösungsmittel(gemisch)
M	molare Masse
μ	mikro
m	milli
mbar	Millibar
MDR, mdr	<u>m</u> ultidrug <u>r</u> esistance
MRP, mrp	<u>m</u> ultidrug-resistance <u>r</u> elated <u>p</u> rotein
MeSO ₂ Cl	Methansulfonsäurechlorid
min	Minute
MK 571	(+)-3-(((3-(2-(7-Chlor-2-chinoliny1)-ethenyl)-phenyl)-((3-(dimethylamino)-3-oxopropyl)-thio)-methyl)-thio)-propansäure
mM	millimolar
mol	Stoffmenge
mrp2	multidrug resistance-associated protein2
MS	Massenspektrometrie, Massenspektrum
n	nano
n	Stichprobenumfang
NADPH	reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
Nb	Nukleotidbase
nm	Nanometer
n.s.	nicht signifikant
Ntcp	<u>N</u> atrium-dependent <u>t</u> aurocholate <u>c</u> otransporting <u>p</u> olypeptide
oatp	<u>o</u> rganic <u>a</u> nion <u>t</u> ransporting <u>p</u> olypeptide
n-ODN	unmodifiziertes 15mer-Oligonukleotid (Phosphorothioat)
OD _[260]	optische Dichte bei 260 nm
p	piko
p	statistische Irrtumswahrscheinlichkeit
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung, <i>phosphate buffered saline</i>
Pgp	P-Glycoprotein

pH	negativer dekadischer Logarithmus der H_3O^+ -Ionenkonzentration in mol/l
pK _A	Säuredissoziationskonstante
PTFE	Polytetrafluorethylen (Teflon [®])
RcGshT	<u>R</u> at <u>c</u> analicular <u>GSH</u> <u>t</u> ransporter
Rf-Wert	Retentionsfaktor
RNA	Ribonukleinsäure
RsGshT	<u>R</u> at <u>s</u> inusoidal <u>GSH</u> <u>t</u> ransporter
s	Sekunde
S 3025	(1-[2-(4-Chlor-phenyl)-cyclopropylmethoxy]-3,4-dihydroxy-5-(3-imidazo[4,5-b]pyridin-1-yl-3-[4-carboxy]phenyl-acryloyloxy)-cyclohexancarbonsäure)
20mer-Sense-ODN-DE	20mer Sense-Oligonukleotid (Phosphodiester)
Sf9 Cells	Zellen aus <i>Spodoptera frugiperda</i> (Heerwurm)
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-gepufferte EDTA-Lösung; <i>tris-buffered EDTA</i>
TBTU	O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluroniumtetrafluoroborat
TC	Taurocholat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
THF	Tetrahydrofuran
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TR ⁻ -Ratten	Groningen Yellow/Transport-deficient (GY/TR ⁻)-Wistar-Ratten
U	Unit
UDG	Uridin-5'-diphosphat-glucuronosid
UV	Ultraviolett
V	Volt
Ww	Wechselwirkung

1 Einleitung

1.1 Anatomie und Physiologie der Leber

Die Leber ist das zentrale Stoffwechselorgan und neben der Niere das wichtigste Ausscheidungsorgan des Körpers. Alle anderen Organe werden ausschließlich über Arterien mit Blut versorgt. Bei der Leber erfolgt die Blutversorgung jedoch zu 75 % über die Vena portae und zu 25 % über die Arteria hepatica (Schmidt und Thews 1997). Die Leber besteht aus mehreren Lobuli, deren Anzahl und relative Größe von der betrachteten Spezies abhängt. Gebildet werden diese Lobuli aus einem Netzwerk von Parenchymzellen (Hepatozyten), Venen und Arterien, den sog. Glisson-Trias. Die Vena portae verzweigt sich zu den Venae interlobulares, welche am Rand der Leberlobuli in die weiten Kapillaren des Lebersinusoids übergehen. Zwischen Sinusoidwand und Hepatozyten befindet sich der kapilläre Dissé'sche Raum. Schematisch sind die zu- und ableitenden Blutgefäße der Leberlobuli in Abb. 1.1 dargestellt.

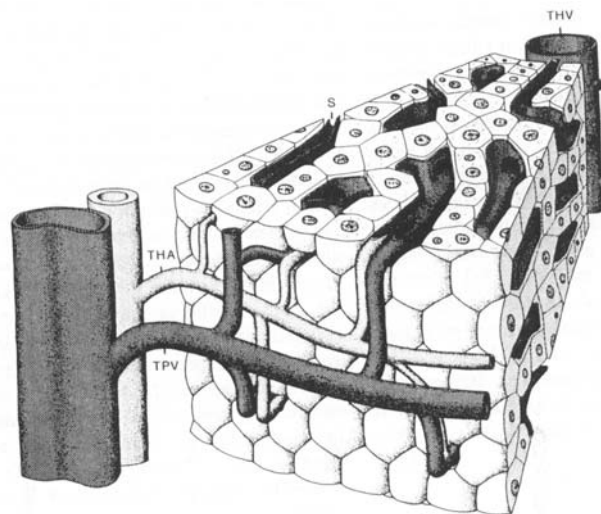


Abb. 1.1: Schema der zu- und ableitenden Blutgefäße der Leberlobuli. THA = terminale hepatische Arterie; TPV = terminale Portalvene; S = Sinusoid; THV = terminale hepatische Vene.
Entnommen aus Sasse et al. 1992.

Das hepatische Sinusoid wird von vier verschiedenen Zelltypen gebildet, wobei jeder Zelltyp seine spezifischen phänotypischen Charakteristika, Funktionen und Topographien besitzt. Bei diesen sinusoidalen Zellen handelt es sich um Endothelzellen, Kupfferzellen, Pitzellen und Fettspeicher- oder Ito-Zellen. Aus rinnenförmigen

Einstülpungen der Plasmamembranen einander zugekehrter Hepatozyten werden die Gallenkapillaren gebildet.

Säugetierlebern bestehen zu rund 80% ihrer Masse aus Hepatozyten; dies entspricht etwa 65 % aller Leberzellen. 15-20% der Leberzellen sind Endothelzellen, 8,5-11,7 % Kupfferzellen, 2-5,5 % Fettspeicherzellen und weniger als 1 % Pitzellen (Pertoft und Smedsrød 1987, Sasse et al. 1992). Abb. 1.2 zeigt Leberzellplatten und angrenzende Sinusoide.

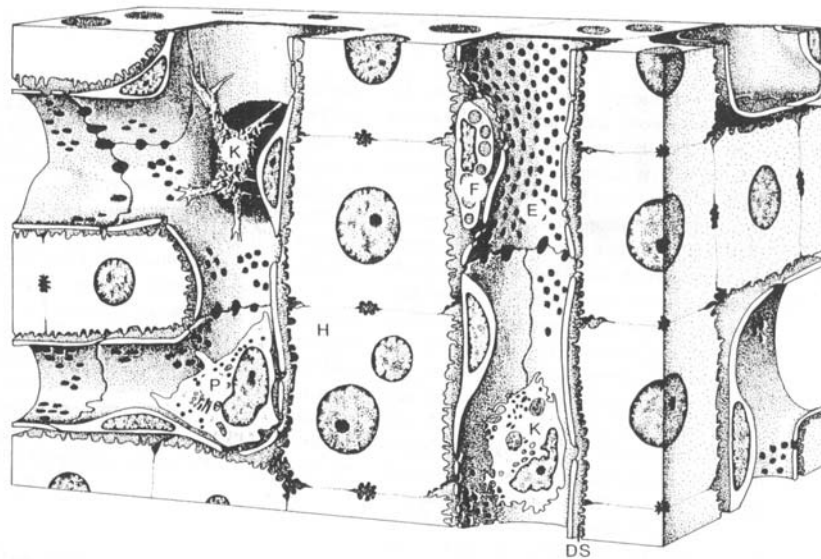


Abb. 1.2: Leberzellplatten und angrenzende Sinusoide, entnommen aus Sasse et al. 1992. H = Hepatozyte; E = Endothelzellen; K = Kupfferzellen; F = Fettspeicherzellen; P = Pitzellen; DS = Dissé'scher Raum.

1.1.1 Parenchymzellen

Leberparenchymzellen (Hepatozyten) sind polarisierte Zellen: Ihre basolaterale oder sinusoidale Seite ist dem Portalblut zugewandt, und über die apicale oder canaliculäre Hepatozytenmembran erfolgt die Sekretion von Substanzen in die Galle (Makowski und Pikuła 1997).

Das mit Nährstoffen und Xenobiotika angereicherte Portalblut erreicht den Dissé'schen Raum über die Endothelzellen. Aus ihnen erfolgt die sinusoidale Aufnahme von Substanzen in Hepatozyten. Der Transportmechanismus dieser Aufnahme hängt ab von Größe und Polarität der Substrate (Meijer und Molema 1995). Lipophile Substanzen werden bevorzugt über passive Diffusion (Müller und Petzinger 1988, Ziegler et al. 1988, Petzinger 1994), hydrophile dagegen über Carrier-vermittelte Diffusion oder über aktive Transportprozesse aufgenommen (Meijer 1987, Petzinger 1994). Der Transport hochmolekularer Verbindungen und polymerer Moleküle erfolgt über vesikuläre,

endozytotische Prozesse (Forgac 1988, Sugiyama und Hanano 1989, Burwen und Jones 1990). Nach basolateraler Aufnahme werden die meisten Substanzen in unveränderter oder metabolisierter Form in die Galle sezerniert. Einige Stoffe werden jedoch sinusoidal ins Blut zurücktransportiert. Die Ausscheidung dieser Substanzen erfolgt durch die Niere (Petzinger 1991).

1.1.2 Nichtparenchymzellen

Kupfferzellen bilden die größte Makrophagenpopulation der Leber. Sie besitzen eine strategische anatomische und histologische Position, um das Vorliegen einer Vielzahl von Substanzen im Blut zu kontrollieren. Lokalisiert sind sie vor allem im sinusoidalen Lumen, wo sie an oder zwischen den Sinusendothelzellen verankert sind. Die Funktionen der Kupfferzellen können in vier Bereiche unterteilt werden: Endocytose, Antigen-Processing, Sekretion bioaktiver Faktoren und Modulation der Cytotoxizität endo- und exogener Substrate (Bouwens et al. 1992).

Charakteristisch für Sinusendothelzellen sind ihre Fenestrationsen, d.h. Poren mit einem Durchmesser von 150-175 nm, die in Siebplatten organisiert sind (Wisse et al. 1985). Vermutlich findet der Hauptteil des Transports und Austausches von Stoffen zwischen Blut und Dissé'schem Raum - und damit auch den Hepatozyten - über diese Fenestrationsen statt (Sasse et al. 1992). Wichtigste Aufgaben der Sinusendothelzellen sind die Partikelfiltration, die eine wichtige Rolle im Fettstoffwechsel spielt, sowie Endocytose und Sekretion bioaktiver Faktoren wie Prostaglandin E₂, Prostacyclin und den Cytokinen. Außerdem ist dieser Zelltyp an der Synthese der hepatischen extrazellulären Matrix beteiligt (Bouwens et al. 1992).

Pitzellen stellen eine spezielle Population von großen granulären Lymphozyten dar und werden in vielen nicht lymphoiden Organen einschließlich des Lebersinusoids gefunden. Es handelt sich bei ihnen um non-T-/non-B-Lymphozyten, die weder phagozytotische noch Peroxidaseaktivität besitzen. Sie sind verantwortlich für die spontane Cytotoxizität gegenüber einigen Tumorzellen (Sasse et al. 1992). Ihre physiologische Funktion ist noch nicht genau bekannt; wahrscheinlich sind sie an der Abwehr von Tumorzellen und Viren beteiligt. Des weiteren regulieren sie vermutlich die Hepatozytenproliferation im Perinatalstadium und während verletzungsbedingter Regenerationsprozesse (Bouwens et al. 1992).

Fettspeicherzellen befinden sich im Dissé'schen Raum zwischen Endothel und Parenchymzellen. Sie sind an der Fettsäuresynthese beteiligt (Sasse et al. 1992) und enthalten im Cytoplasma charakteristische Fetttropfchen, deren Zahl und Durchmesser zwischen verschiedenen Spezies und unter verschiedenen physiologischen und pathologischen Bedingungen variiert. Sowohl Fettspeicherzellen als auch Parenchymzellen beteiligen sich an Speicherung und Metabolisierung von Retinoiden

der Leber, wobei die Fettspeicherzellen 80-90 % der hepatischen Retinoide enthalten. Während chronischer Infektionen ist ihre Anwesenheit nicht länger auf den Dissé'schen Raum beschränkt. In diesem Fall akkumulieren sie sich am Entzündungsherd in der Nähe der beschädigten Parenchymzellen. Ruhende Fettspeicherzellen exprimieren zahlreiche Wachstumsfaktoren und tragen gemeinsam mit Parenchym- und Endothelzellen zur Sekretion von extrazellulärer Matrix in der normalen Leber bei (Bouwens et al. 1992).

1.1.3 Gallensäuren und enterohepatischer Kreislauf

Natürliche Gallensäuren entstehen durch Abbau von Cholesterol. Der Abbau erfolgt in mehreren Schritten: Zunächst wird die Seitenkette an C17 des Steroidgerüsts verkürzt, anschließend erfolgen Hydroxylierungen an den C-Atomen 3, 6, 7 und / oder 12 (Russell und Setchell 1992, Hoffmann 1994). Der initiiierende Schritt erfolgt durch das P450-Enzym Cholesterol-7 α -Hydroxylase, das im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist (Shoda et al. 1993). Für die Gallensäuresynthese aus Cholesterol ist ein umfangreicher intrazellulärer Transport der dabei entstehenden Zwischenprodukte notwendig, da Enzyme verschiedener Organellen an diesem Abbau beteiligt sind: So befindet sich die Sterol-27-Hydroxylase in den Mitochondrien, die Gallensäureoxidase in den Peroxisomen und die Δ^4 -3-Oxosteroid-5 β -Reduktase im Zytoplasma.

In der Leber werden endo- und exogene Substanzen durch Gallensäurekonjugation gallengängig gemacht. Dabei werden fast ausschließlich Glycin- und Taurin-Konjugate gebildet. Konjugierte Gallensäuren unterliegen dann dem enterohepatischen Kreislauf, der in Abb. 1.3 schematisch dargestellt ist.

Die konjugierten Gallensäuren werden zunächst in die Galle ausgeschieden. Physikochemisch betrachtet handelt es sich bei der Galle um ein quarternäres System, bestehend aus Wasser, Cholesterin, Phospholipiden und Gallensäuren (Reichen 2000). Über die Bsep werden die Gallensäuren durch die canalikuläre Membran der Hepatozyten aktiv ausgeschieden; die Exkretion der Phospholipide erfolgt über einen weiteren Carrier (mdr1 bei der Maus, MDR3 beim Menschen). Die Ausscheidung von Phospholipiden und Cholesterin wird durch die Gallensalzsekretion getrieben.

Über die Gallenflüssigkeit gelangen die Gallensäuren zunächst in das Duodenum. Konjugierte Gallensäuren werden bereits in Duodenum und Jejunum durch passive Diffusion, im Ileum carriervermittelt über den Ntcp in das Portalblut zurückresorbiert. Im Ileum werden primäre Gallensäuren außerdem durch Bakterien zu 7 α -dehydroxylierten sekundären Gallensäuren umgewandelt. Zusätzlich werden die Gallensäuren dort dekonjugiert und durch passive Diffusion in die Vena portae abgegeben. Aus dieser gelangen die Gallensäuren über sinusoidale Transporter wieder in die Hepatozyten. Die hepatischen Transportsysteme sind in Kap. 1.2 beschrieben.

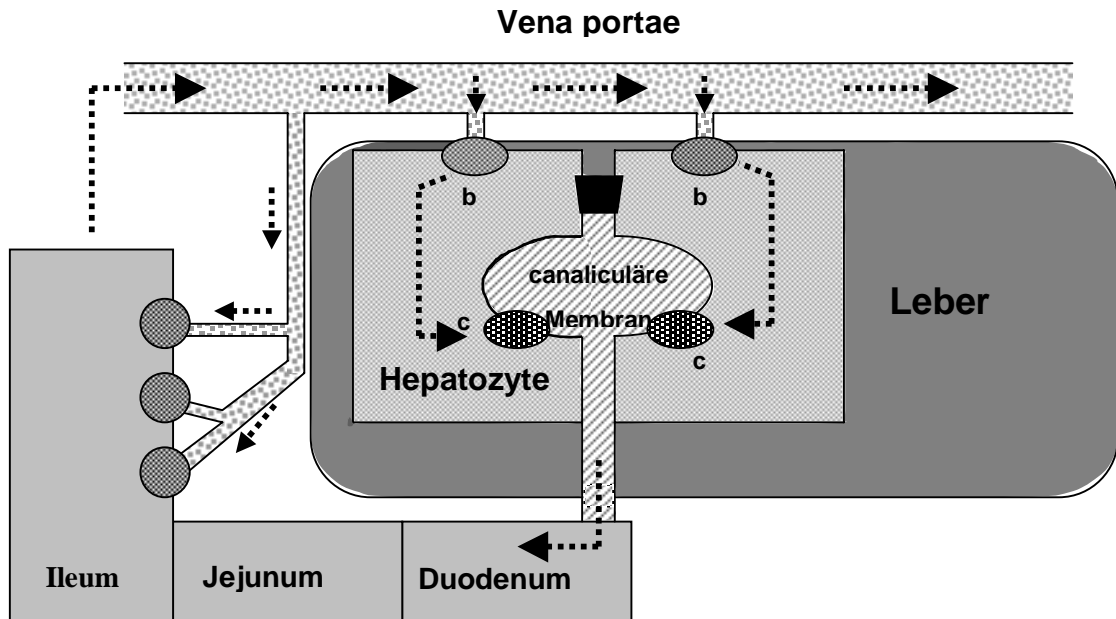


Abb. 1.3: Schematische Darstellung des enterohepatischen Kreislaufs, b = basolaterale, c = canaliculäre Transporter

Über die Niere wird nur ein sehr kleiner Teil der Gallensäuren filtriert (Coleman 1987), denn ihre starke Bindung an Plasmaproteine verhindert eine nennenswerte renale Ausscheidung. Bereits im Harn vorhandene Gallensäuren werden zusätzlich durch luminaire Gallensäuretransporter renal rückresorbiert (Burckhardt et al. 1984, Burckhardt et al. 1987), die im luminalen Tubulus der Henleschen Schleife lokalisiert sind.

1.2 Transportproteine der Hepatozyten

Eigenschaften und Substratspektrum der Transportproteine werden nachfolgend erläutert. In Abb. 1.4 sind nicht alle der auf den folgenden Seiten beschriebenen Transporter abgebildet.

Eine schematische Darstellung der wichtigsten Transporter der Rattenleber ist nachfolgend gezeigt:

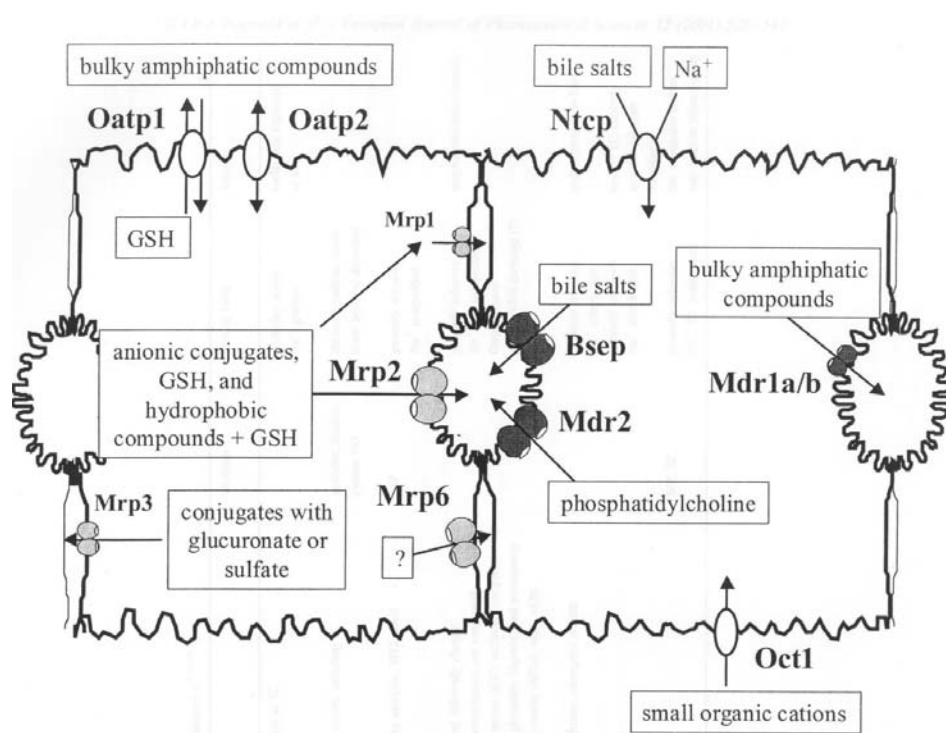


Abb. 1.4: Transportproteine für Gallensäuren und andere Substrate in der Rattenleber (entnommen aus Hooiveld et al. 2001).

1.2.1 Basolaterale Transportproteine

Das Natrium-abhängige Taurocholat-cotransportierende Polypeptid Ntcp wird bei allen bisher untersuchten Spezies ausschließlich in der basolateralen Membran von Hepatozyten exprimiert (Kullak-Ublick et al. 2000). Es ist einzigartig unter den Natrium-Cotransportern, da es nur sieben Membran-spannende Domänen besitzt. Sein C-terminales Ende ist intrazellulär, das N-terminale Ende extrazellulär lokalisiert. Der Ntcp transportiert ausschließlich einwertige Gallensäuren wie Taurocholat (Müller und Jansen 1997). Bei der Ratte besteht dieser Transporter aus 362 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von etwa 51 kDa. Dagegen existieren bei der Maus zwei Isoformen, die beide ebenfalls nur in der sinusoidalen Hepatozytenmembran zu finden sind: Der murine Ntcp1 besteht aus 362 Aminosäuren; der Ntcp2 ist dagegen ein trunkiertes Protein aus 317 Aminosäuren (Kullak-Ublick et al. 2000). Beim Menschen besteht der NTCP aus 349 Aminosäuren (≈ 50 kDa). Taurocholat hat eine höhere Affinität zum humanen NTCP als zum murinen oder zum Ntcp der Ratte.

Organic anion transporting polypeptides (oatp) stellen eine zweite, wichtige Familie von Transportern dar, die ebenfalls an der basolateralen Membran der Hepatozyten lokalisiert sind. Charakteristisch für alle oatps ist, dass sie aus zwölf Membrandomänen

bestehen (Kullak-Ublick et al. 2000). N- und C-Terminus dieses Transporters sind im Cytoplasma lokalisiert (Hagenbuch 1997). Alle oatps sind bidirektional, können also Substrate sowohl in Hepatozyten hinein als auch aus ihnen hinaus transportieren, wobei der Transport von Substraten in die Zellen gegenüber den Transport in die Gegenrichtung bevorzugt abläuft (Kullak-Ublick et al. 2000). In der sinusoidalen Hepatozytenmembran der Ratte sind vor allem der oatp1 und in wesentlich geringerem Maß auch oatp2 und oatp4 exprimiert. Neben Hepatozyten ist der oatp1 der Ratte auch in der apicalen Membran von proximalen Tubuluszellen der Niere und in Epithelzellen des Choroidplexus zu finden. Er besteht aus 670 Aminosäuren (≈ 80 kDa) und transportiert ein breites Spektrum von organischen Anionen, amphiphatischen Verbindungen und sogar Kationen, aber kein unkonjugiertes Bilirubin (Müller und Jansen 1997). Zu den Substraten des Ratten-oatp1 zählen beispielsweise BSP, Gallensäuresalze, LTC₄, Östron-3-sulfat, Östradiol-17 β -glucuronid, Aldosteron, Cortisol, Dexamethason, die Thyroidhormone T₃ und T₄, der Thrombin-Inhibitor CRC 220 (Eckhardt et al. 1996), GS-DNP, Bilirubin-Monoglucuronid, Ouabain, Ochratoxin A, Gadoksetat, Enalapril, Pravastatin und sogar die organischen Kationen N-(4,4-Azo-n-pentyl)-21-deoxy-ajmalin, N-Methylchinin und Rocuronium (Kullak-Ublick et al. 2000). Der murine oatp1 besitzt eine identische Substratspezifität und kommt in denselben Organen vor wie der oatp1 der Ratte. Treibende Kraft für den oatp1-vermittelten Transport von organischen Anionen ist der Austausch von Anionen durch die basolaterale Membran. In Hepatozyten, Retina, Endothelzellen der Blut-Hirnschranke sowie der basolateralen Plasmamembran von Epithelzellen des Choroidplexus der Ratte ist der oatp2 exprimiert. Er besitzt 77 % Sequenzhomologie zum oatp1, besteht aus 661 Aminosäuren (≈ 92 kDa) und hat ein ähnliches Substratspektrum organischer Anionen und Kationen. LTC₄, Bilirubin-Diglucuronid, BSP und Gadoksetat werden jedoch nur über den oatp1 und nicht über den oatp2 transportiert (Kullak-Ublick et al. 2000). Während der oatp1 im Leberacinus homogen verteilt ist, ist der oatp2 vor allem in perivenösen Hepatozyten mit Ausnahme von ein bis zwei Zellschichten um die Zentralvene lokalisiert. Im Gegensatz zum oatp1 wird der oatp2 ausschließlich in der Leber exprimiert (Hsiang et al. 1999). Beim dritten in der basolateralen Membran von Rattenhepatozyten lokalisierten, organische Anionen transportierenden Polypeptid handelt es sich um den oatp4. Er besitzt 43 % bzw. 44 % Aminosäure-Analogie zum oatp1 bzw. oatp2. Sein Substratspektrum gleicht denjenigen der beiden anderen oatps. Der humane OATP-C kommt ausschließlich in der sinusoidalen Membran der humanen Leber vor und ist der am stärksten exprimierte OATP des Menschen. Er besteht aus 691 Aminosäuren. Mit 64 % Aminosäureidentität existiert die größte Ähnlichkeit zum oatp4 der Ratte (Kullak-Ublick et al. 2000), der ein ähnliches Substratspektrum hat. Der OATP-C transportiert allerdings ausschließlich Anionen und ist das wichtigste Natrium-unabhängige Aufnahmesystem für Gallensäuren in der humanen Leber. Dagegen ist der

humane OATP-A vor allem in cerebralen Endothelzellen und weniger in der Leber exprimiert (Kullak-Ublick et al. 2001). Er besteht aus 670 Aminosäuren (≈ 85 kDa) und transportiert amphiphatische Anionen. OATP-A ist der einzige humane OATP, der große organische Kationen wie N-Methyl-chinin aufnimmt. Der durch dieses Protein vermittelte Transport ist im Gegensatz zu allen anderen humanen OATPs ladungsunabhängig (Kullak-Ublick et al. 2001). Das Substratspektrum der humanen organischen Anionentransporter vergrößert sich in der Reihenfolge OATP-B < OATP-C < OATP8 < OATP-A. Der OATP-B transportiert nur eine begrenzte Anzahl organischer Anionen, darunter BSP, Östron-3-sulfat und Dehydro-androsteron-sulfat. Dagegen ist der durch den OATP-C vermittelte Transport auf organische Anionen beschränkt und abhängig von der Ladung des Substrates.

Organische Kationen werden bei der Ratte basolateral über den oct1 transportiert. Er wird in renalen proximalen Tubuluszellen, Hepatozyten und Dünndarmenterozyten exprimiert. Der oct1 besteht aus 556 Aminosäuren (≈ 62 kDa) und hat wahrscheinlich die Funktion eines basolateralen Transportproteins für kleine organische Kationen wie Tetraethylammonium, N-Methyl-4-phenylpyridin und Cholin. Signifikante Homologien zwischen oatp/OATP-Proteinen und dem oct1 existieren nicht. Dagegen gibt es Ähnlichkeiten zum nierenspezifischen Kationentransporter oct2 (Müller und Jansen 1997).

1.2.2 Canaliculäre Transportproteine

Die canaliculäre Sekretion ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der hepatobiliären Sekretion von Gallensäuresalzen. In Hepatozyten liegt die Konzentration von Gallensäuresalzen im Bereich von einigen μM , während sie canaliculär etwa 1000-fach höher ist. Dies erfordert einen aktiven Transport durch die canaliculäre Membran der Hepatozyten (Kullak-Ublick et al. 2000).

Seit langer Zeit ist bekannt, dass viele Säugerzellen durch Expression gegenüber einer einzigen Substanz Resistenzen gegenüber einer Vielzahl funktional und strukturell nicht verwandter Substrate entwickeln. Dieses Phänomen der erworbenen Resistenz ist als Multidrug Resistance bekannt. Verantwortlich für diese Resistenz sind Plasmamembranproteine, deren Überexpression für einen aktiven Transport der betreffenden Substanzen aus der Zelle sorgt. Diese Proteine sind als MDR-Proteine oder Pgp (P-Glycoproteine) bekannt (Frijters et al. 1997). MDR-Proteine treten in zahlreichen Organen auf und weisen hohe Aminosäurehomologien zueinander auf. Bezogen auf das Substratspektrum lassen sich jedoch zwei Klassen von MDR-Proteinen unterscheiden: Der MDR1 des Menschen sowie *mdr1a* und *mdr1B* von Maus und Ratte sind - neben zahlreichen anderen Zelltypen - in der canaliculären Hepatozytenmembran lokalisiert. Sie transportieren bevorzugt große, sterisch anspruchsvolle Substanzen. Der

von ihnen vermittelte Transport ist abhängig von der ATP- und der Mg^{2+} -Konzentration. Im Gegensatz zum humanen MDR1, der in fast allen Geweben exprimiert ist, kommt der murine *mdr1a* vor allem in Darm, Leber und Blutkapillaren von Gehirn und Testes vor, der murine *mdr1b* dagegen in Nebenniere, Plazenta, Ovarien und schwangerem Uterus. Lediglich in der Niere werden annähernd gleiche Expressionslevel von *mdr1a* und *mdr1b* gefunden. In der Maus scheinen *mdr1a* und *mdr1b* gemeinsam diejenigen Funktionen zu erfüllen, die der humane MDR1 allein übernimmt. Hierzu zählt vor allem die Verhinderung der Aufnahme einer Reihe toxischer Xenobiotika über die Blut-Hirn-Schranke (Schinkel et al. 1995). Der humane MDR3 sowie der entsprechende Transporter *mdr2* von Ratte und Maus sind ebenfalls an der canaliculären Hepatozytenmembran lokalisiert, transportieren jedoch Phospholipide und Phosphatidylcholin (Müller und Jansen 1997). Das *mdr2*-Protein (bzw. MDR3) ist essentiell für die hepatobiliäre Exkretion von Phospholipiden (Schinkel et al. 1997). Nach Transfektion von Zelllinien mit dem humanen MDR1 bzw. dem *mdr1a* oder *mdr1b* der Maus zeigte sich, dass diese Proteine zur Multidrug Resistance gegenüber amphiphatischen Substraten führten, was nach Transfektion mit dem MDR3 bzw. dem murinen *mdr2* nicht der Fall war (Frijters et al. 1997).

Am canaliculären Pol der Hepatozyten vermitteln zwei Mitglieder der ATP-Bindungskassetten-Superfamilie (ABC-Transporter) die Sekretion von organischen Anionen und Gallensäuresalzen: Bsep und *mrp2*/MRP2 (Hagenbuch et al. 2001).

Die Bsep (Bile salt export pump) vermittelt den ATP-abhängigen Transport zahlreicher einwertiger Gallensäuren wie Taurocholat, Glycocholat, Taurochenodeoxycholat und Tauroursodeoxycholat. Das Protein gehört zur Familie der ABC-Transporter. Bei der Ratte besteht die Bsep aus 1321 Aminosäuren (≈ 160 kDa) und enthält vier potenzielle N-gelinkte Glycosylierungsstellen. Ihre Aminosäuresequenz ist zu 26 % bzw. 25 % identisch zum humanen MRP2 bzw. *mrp2* der Ratte. Dagegen existieren 49 % bzw. 48 % Homologie zum *Mdr1b* bzw. *Mdr2* der Ratte. Aus diesem Grund ist von einer höheren Homologie der Bsep zur Mdr- als zur Mrp-Familie auszugehen (Kullak-Ublick et al. 2000). Für die Bsep der Maus wurde ebenfalls ein Protein von ≈ 160 kDa gefunden, das 90 % bzw. 81 % Identität zur Ratten-Bsep bzw. zur humanen BSEP aufweist.

Unter den Homologen der Multidrug Resistance Protein-Familie (*mrp* bzw. MRP) ist der *mrp2* (Ratte) bzw. MRP2 (Mensch) derjenige, der den wichtigsten organischen Anionentransporter in der canaliculären Membran von Hepatozyten darstellt (Kool et al. 1997). Der *mrp2* bzw. MRP2 ist in der Leber hoch und in Niere, Ileum und Duodenum schwach exprimiert; in anderen Geweben wurde er bis heute nicht nachgewiesen (Paulusma und Oude Elferink 1997). Es existieren große Ähnlichkeiten zwischen humanem MRP2 und Ratten-*mrp2*: Erstgenannter besteht aus 1545, letzterer aus 1541 Aminosäuren; der Rattentransporter hat 78 % Homologie zum menschlichen (Keppler

und König 1997). Der humane MRP2 besteht vermutlich aus 12 Transmembran-Domänen: Nach dem extrazellulären Aminoterminus folgt eine einzelne, Membran-assoziierte Region, darauf ein Segment aus fünf und zuletzt eines aus sechs Membran-assoziierten Regionen (Kast und Gros 1997).

Während der *mrp2* auf wenige Gewebe beschränkt ist, ergibt sich für den *mrp1*/MRP1 eine ubiquitäre Verteilung im Körper, wobei dieser Transporter in der Leber nur schwach exprimiert ist (Borst et al. 1999). Er besteht beim Menschen aus 1531, bei der Maus aus 1528 Aminosäuren (Keppler und König 1997) und weist beim Menschen eine 49 %-ige Homologie zum MRP2 auf (Inui et al. 2000). Beide MRP-Isoformen - *mrp1*/MRP1 und *mrp2*/MRP2 - transportieren anionische Glutathion-, Sulfat- und Glucuronid-Konjugate, unkonjugierte organische Anionen, viele Cytostatika und Bilirubin-Konjugate. Es gibt kinetische Unterschiede zwischen beiden Isoformen; bis heute wurden jedoch keine Substrate oder Inhibitoren gefunden, die für eine der beiden *mrp*-Isoformen spezifisch wären (Inui et al. 2000). Spezifisch ist dagegen die Lokalisation der beiden MRP-Isoformen in Hepatozyten: Der *mrp2*/MRP2 ist in Hepatozyten hoch exprimiert und ausschließlich in der apicalen Membran lokalisiert. Der *mrp1*/MRP1 ist dagegen schwach exprimiert und sitzt exklusiv an der lateralen Membran (Müller und Jansen 1997).

Weitere *mrp*-Isoformen besitzen eine ähnliche Anzahl von Aminosäuren und je nach Art des Transporters und untersuchter Spezies 30-80 % Homologie zu *mrp1*/MRP1 bzw. *mrp2*/MRP2 (Kool et al. 1997, Borst et al. 1999, Kool et al. 1999). MRP5 ist wie MRP1 in allen Organen vertreten, MRP6 nur in Leber und Niere. Der MRP3 wurde in Leber, Nebenniere, Pankreas, Niere und Darm gefunden, der MRP4 in Prostata, Lunge, Muskelgewebe, Pankreas, Testes, Ovarien, Harn- und Gallenblase (Borst et al. 1999). Das genaue Substratspektrum von MRP3 bis MRP6 ist zur Zeit noch unbekannt. Alle MRP-Transporter scheinen jedoch Glutathionkonjugate und viele andere organische Anionen zu transportieren (Kool et al. 1997, Borst et al. 1999). Neben MRP2 ist MRP6 jedoch das einzige Protein dieser Familie, das den Endothelin-Rezeptor-Antagonist BQ 123 transportiert (Madon et al. 2000).

1.2.3 Glutathion-Transporter

Der hepatische Level des Tripeptids Glutathion (GSH) beträgt etwa 5-10 mM und wird normalerweise durch ein Gleichgewicht zwischen Synthese und Efflux aufrecht erhalten, wovon bei der erwachsenen Ratte ca. 50 % biliärer Natur sind. In Rattenhepatozyten wurden zwei verschiedene Gene identifiziert, die für Transporter für reduziertes GSH codieren: RmGshT in mitochondrialen und RsGshT in sinusoidalen Membranen (Müller und Jansen 1997). Der RmGshT ist in der inneren mitochondrialen Membran lokalisiert und vermittelt den GSH-Transport vom Cytosol in die Matrix.

Diese Translokation wird durch ATP stimuliert und durch Glutamat inhibiert. Der RsGshT erleichtert den Natrium-unabhängigen bidirektionalen Transport und wird weder durch ATP stimuliert noch durch Glutamat gehemmt (Müller und Jansen 1997).

1.2.4 Charakteristika verschiedener Rattenstämme

Zu den bekanntesten aus Wistarratten gezüchteten mutierten Stämmen zählen die GY/TR⁻-Ratten, die Gunn-Ratten sowie ein doppelt mutierter Stamm, der durch Kreuzung von TR⁻ und Gunn-Ratten entsteht (Jansen et al. 1987).

Bei GY/TR⁻-Ratten handelt es sich um einen Wistar-Inzuchtstamm, der erstmals in Groningen (Niederlande) etabliert wurde. Diese *mrp2-deficient Groningen Yellow / Transport deficient Wistar rats* tragen einen Defekt des *multidrug resistance protein mrp2* (früher als *canalicular multispecific organic anion transporter cmoat* bezeichnet). Das Transportprotein *mrp2* ist für die hepatobiliäre Exkretion verschiedener hydrophiler Anionen verantwortlich (Jedlitschky et al. 1996, Keppler et al. 1997). Bei TR⁻-Ratten liegt eine 1-Basenpaar-Deletion an Aminosäure 393 vor, die in der Einführung eines Stopcodons an Aminosäure 401 resultiert (Ito et al. 1998). Die Tiere besitzen gelb gefärbte, hyperbilirubinämische Schleimhäute und gelten als Modell für das humane Dubin-Johnson-Syndrom (Büchler et al. 1996, Paulusma et al. 1996). Charakteristisch für GY/TR⁻-Ratten und Menschen mit Dubin-Johnson-Syndrom ist das Vorliegen einer konjugierten Hyperbilirubinämie (Jansen et al. 1987).

Gunn-Ratten fehlt die Uridin-5'-diphosphat-glucuronyl-transferase. Dieser Defekt führt zu einer unkonjugierten Hyperbilirubinämie (Jansen et al. 1987). Gallefluss und Exkretion von Gallensäuren sind bei Gunn- und TR⁻-Ratten gegenüber normalen Wistarratten vermindert, wobei dieser Effekt bei TR⁻-Ratten deutlich stärker zum Tragen kommt. TR⁻-Ratten sind homozygot in Bezug auf den *mrp2*-Defekt und homo- oder heterozygot im Hinblick auf das funktionsfähige UDG-Transferase-Gen (GGtt und Ggtt). Dagegen verhält es sich bei Gunn-Ratten genau umgekehrt; ihr Genotyp ist ggTT oder ggTt. Durch Kreuzung dieser beiden Rattenstämme kommt man zu doppelt mutierten TR⁻-Ratten (ggtt), die ebenso wie Gunn-Ratten eine unkonjugierte Hyperbilirubinämie aufweisen und ebenso wie TR⁻-Ratten Glutathion-Konjugate verzögert ausscheiden.

Gunn-, TR- und doppelt mutierte TR⁻-Ratten zeigen ähnliche Konjugationsgeschwindigkeiten von BSP zu BSP-GS (vgl. Kap. 1.3.2, S. 15). Im Plasma von TR⁻-Ratten finden sich jedoch wesentlich höhere Konzentrationen von BSP-GS; die Exkretion von BSP-GS wirkt sich bei diesem Rattenstamm daher stärker geschwindigkeitsbestimmend aus als die Konjugation. Dagegen ist die hepatobiliäre Ausscheidung von unkonjugiertem BSP im Gegensatz zur biliären Elimination von BSP-Monoglucuronid und BSP-Diglucuronid bei TR⁻-Ratten kaum beeinträchtigt.

Doppelt und einfach mutierten TR⁻-Ratten ist eine stark verlängerte Halbwertszeit der BSP-Elimination gemein (Jansen et al. 1987). Im Gegensatz zu „normalen“ TR⁻-Ratten können die doppelt mutierten Tiere Bilirubinglucuronide nicht in der Leber akkumulieren (Oude Elferink et al. 1989a).

Neben Wistarratten werden Sprague-Dawley-Ratten häufig in Tierversuchen eingesetzt. Aus ihnen gezüchtete EHBR-Ratten (*Eisei hyperbilirubinemic rat*) besitzen ebenso wie TR⁻-Ratten den canalikulären Transporter mrp2 nicht. Während bei TR⁻-Ratten eine 1-Basenpaar-Deletion an Aminosäure 393 vorliegt, die in der Einführung eines Stopcodons an Aminosäure 401 resultiert, führt bei EHBR-Ratten eine 1-Basenpaar-Mutation von Guanin zu Adenin an Aminosäure 855 zu einem frühen Stopcodon (Ito et al. 1998). „Normale“ Sprague-Dawley-Ratten weisen einen Serum-Bilirubinspiegel von etwa 0,2 mg/dl auf (Takikawa et al. 1991). Dagegen ist dieser Wert bei männlichen EHBR-Ratten im Alter von 8 Wochen mit 1,5 mg/dl am niedrigsten, steigt bis zum Alter von ca. 20 Wochen auf 5-7 mg/dl und bleibt danach konstant. Der Serum-Bilirubinspiegel von TR⁻-Ratten stabilisiert sich indessen ca. 6,4 Wochen nach der Geburt bei 1,9 mg/dl. Histologische Untersuchungen von EHBR-Ratten zeigten mit zunehmendem Lebensalter der Tiere gelbbraune Pigmente in den Hepatozyten, die bei TR⁻-Ratten nicht beobachtet wurden.

GY/TR⁻- und EHBR-Ratten ist gemein, dass bei ihnen ein reduzierter Gehalt an mrp2-mRNA in der Leber vorhanden ist, das mrp2-Protein in der canalikulären Membran der Hepatozyten fehlt und kein ATP-abhängiger Membrantransport anionischer GSH-Konjugate vorhanden ist (Schaub et al. 1997).

Nagase-albuminämische Ratten stellen eine weitere Mutante der Sprague-Dawley-Ratte dar, bei denen das Processing des mRNA-Vorläufers gestört ist (Inoue et al. 1983). Im Plasma dieser Mutante findet sich kein Albumin; dennoch zeigt dieser Rattenstamm außer einer Hyperlipidämie sowie einer leichten Anämie keinen pathologischen Befund. Die Gesamtkonzentration an Serumproteinen gleicht jedoch derjenigen von Sprague-Dawley-Ratten, da der Anteil der Globulinfraktion bei Nagase-Ratten höher ist.

Schließlich handelt es sich bei Fischerratten um einen Rattenstamm, bei dem die Dipeptidylpeptidase IV basolateral und canaliculär nicht exprimiert wird (Thompson et al. 1991).

1.3 Eigenschaften ausgewählter Substrate

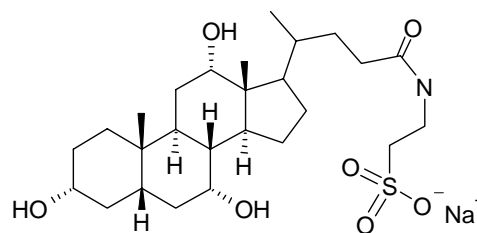
1.3.1 Taurocholat

Der Natrium-abhängige Transport der natürlichen Gallensäure Taurocholat erfolgt über den Ntcp (Hagenbuch et al. 1990, Kramer et al. 1994, Anwer 1998), der Natrium-unabhängige über Peptide aus der oatp-Familie (Hagenbuch et al. 1996, Kullak-Ublick et al. 2000, Kullak-Ublick et al. 2001). Die Taurocholataufnahme ist sättigbar (Hagenbuch et al. 1990, Kramer et al. 1992) und ATP-abhängig (Ballatori et al. 2000, Stieger et al. 2000, Noe et al. 2001). Canaliculär wird TC über die Bsep ausgeschieden (Wallstab et al. 1999). Über den mrp2 findet keine Taurocholat-Ausscheidung statt, denn die hepatobiliäre Exkretion dieses Substrates ist bei TR⁻-Ratten gegenüber Wistarratten kaum verändert (Oude Elferink et al. 1989b). Nach i.v.-Bolusinjektion wurde das Exkretionsmaximum bei Wistarratten nach wenigen Minuten erreicht, anschließend fiel die Ausscheidungskurve steil ab. Bei TR⁻-Ratten stieg die TC-Konzentration in der Galle dagegen bis etwa 20 min nach Injektion an, um dann erst abzufallen. Beide Rattenstämme schieden das applizierte TC jedoch innerhalb kurzer Zeit quantitativ aus (Kuipers et al. 1988). Die Struktur des Taurocholat-Natriumsalzes ist in Abb. 1.5 dargestellt.

Frisch isolierte Hepatozyten nehmen wesentlich mehr TC auf als kultivierte: Schon nach 4h in Kultur nimmt die TC-Aufnahme um 15 % gegenüber frisch isolierten Zellen ab; nach 72 h ist überhaupt keine Aufnahme mehr zu verzeichnen. Die Aktivität der Na⁺-K⁺-ATPase nimmt in dieser Zeit nicht ab (Föllmann et al. 1990). An frisch isolierten Hepatozyten aus männlichen und oophorektomierten weiblichen Sprague-Dawley-Ratten konnte gezeigt werden, dass die Expression des Ntcp bei weiblichen Tieren um rund 46% niedriger ist als bei männlichen. Die K_M-Werte für den Transport von TC wurden zu 38±21 (männlich) bzw. 20±4 µM (weiblich) ermittelt, wobei der Unterschied nicht signifikant war. Die maximale Aufnahmegeschwindigkeit war bei Hepatozyten aus männlichen Tieren mit 141±10 pmol pro µg DNA und Sekunde gegenüber 76±10 bei weiblichen fast doppelt so hoch. Die Expression von oatp1 und Na⁺-K⁺-ATPase war nicht geschlechtsabhängig (Simon et al. 1999).

Hauptaufnahmesystem für Taurocholat in der humanen und der Rattenleber ist der NTCP (über 80%) bzw. der Ntcp (Kullak-Ublick et al. 1997, Kullak-Ublick et al. 2000). Der NTCP ist das Hauptaufnahmesystem für konjugierte Gallensäuren in der humanen Leber (Kullak-Ublick et al. 1997). IHH-Zellen exprimieren den NTCP nicht, weshalb sie nur wenig Taurocholat aktiv aufnehmen (Schippers et al. 1997). Darüber hinaus wird TC bei der Ratte Na⁺-unabhängig über den oatp1 und in geringeren Mengen über den oatp2 aufgenommen (Kullak-Ublick et al. 2000). Beim Menschen erfolgt die Na⁺-unabhängige Aufnahme vor allem über den OATP-C und in etwas geringerem Ausmaß

über OATP-A und OATP-8 (Kullak-Ublick et al. 2000); der OATP-B transportiert dagegen keine Gallensäuren (Kullak-Ublick et al. 1997). Die K_M -Werte für die Aufnahme von TC liegen je nach Spezies und untersuchtem System zwischen 6 und 34 μM (Kullak-Ublick et al. 1997, Kullak-Ublick et al. 2000) für den Ntcp und 14-200 μM für die Transporter der oatp-Familie (Hagenbuch et al. 1990, Kullak-Ublick et al. 1996, van Montfoort et al. 1999). An Hepatozyten aus Wistarratten sowie ilealen Bürstensaum-Membranvesikeln aus Kaninchen konnte gezeigt werden, dass die Taurocholol-Aufnahme durch HMG-CoA-Reduktasehemmer (Kramer et al. 1994) und durch Chlorambucil (Kramer et al. 1992) sowie ihre Gallensäurederivate hemmbar ist.



Taurocholsäure-Natriumsalz
M = 537,7 g/mol

Abb. 1.5: Strukturformel von Taurocholsäure-Natriumsalz (Natrium 2-[4-(3,7,12-trihydroxy-10,13-dimethyl-hexadecahydro-cyclopenta[a]phenanthren-17-yl)-pentanoylamino]-ethansulfonat)

Auf canaliculärer Seite wird Taurocholol fast ausschließlich ATP-abhängig über die Bsep sezerniert. Geschwindigkeit und Michaelis-Menten-Konstante sind dabei Spezies-abhängig: Mit Ratten-Bsep-transfizierte Sf9-Zellen transportierten TC mit einer Geschwindigkeit von $69,2 \pm 4,1$ pmol pro min und mg Protein; bei mrp2-transfizierten Zellen wurde dagegen nur ein Wert von $1,1 \pm 0,7$ gefunden (Stieger et al. 2000). Vesikel aus Sf9-Zellen, die mit murinem Bsep transfiziert waren, lieferten einen K_M -Wert der TC-Aufnahme von $30,3 \mu\text{M}$ (Noe et al. 2001), für den Ratten-Bsep wurde ein K_M von $7,5-28 \mu\text{M}$ ermittelt (Lee et al. 2000, Akita et al. 2001). Bei humanen CMV betrug der K_M -Wert $4-21 \mu\text{M}$ (Kullak-Ublick et al. 2000) und bei *Raja erinacea* (kleiner Rochen) $40 \pm 7 \mu\text{M}$ (Ballatori et al. 2000). Die Taurocholol-Aufnahme ist durch Bsep-Substrate wie Gallensäuresalze und andere Gallensäurederivate hemmbar (Ballatori et al. 2000, Akita et al. 2001). Mrp1- und Pgp-Substrate wie Verapamil, Vincristin (Chu et al. 1998, Ballatori et al. 2000), unkonjugiertes Bilirubin (Pascolo et al. 1998), das Acridon-carboxamid-Derivat GG918 (Wallstab et al. 1999) und das cyclische kationische Octapeptid Octreotid (Yamada et al. 1998) haben keinen Wirkung auf den TC-Efflux. In ausschließlich Bsep-transfizierten CMVs bewirken mrp2-Substrate wie BSP, DNP-SG, GSSG, LTC₄ und sulfatierte Gallensäuren keine Veränderung der Taurocholol-Aufnahme (Ballatori et al. 2000, Akita et al. 2001). Dagegen kommt es in

Zellen, die sowohl mrp2 als auch Bsep besitzen, zu einer Konzentrierung von mrp2-Substraten; dies führt zu einer trans-Inhibierung des Bsep-vermittelten TC-Transportes (Akita et al. 2001). Ein umgekehrter Effekt ist zu beobachten, wenn Taurocholol in *Xenopus laevis*-Oozyten injiziert wird, in denen zuvor *kein einziger* Transporter exprimiert wurde: Es ist ein endogener TC-Transport zu beobachten, da TC den transcytotischen Transport stimuliert (Hayes et al. 1999). Dieser Transport wird transstimuliert durch Glycocholol, Taurochenodeoxycholol und S-Hexyl-glutathion, nicht aber durch Taurolithocholol und Daunomycin; Glycocholol besitzt bei cis-Applikation dagegen eine inhibierende Wirkung (Shneider und Moyer 1993).

1.3.2 Bromsulphthalein (BSP)

Der anionische Phthaleinfarbstoff BSP (Abb. 1.6) besitzt einen pK_A -Wert von ungefähr 8,6 (Baldini et al. 1986). Er dient der Prüfung der exkretorischen Leberfunktion (Wheeler et al. 1960). Nach Applikation von 0,3-3 mg BSP pro min wurden beim Menschen etwa 70 % der applizierten Dosis hepatisch, der Rest von Skelettmuskeln aufgenommen (Leevy und Bender 1963). Hepatobiliär aufgenommenes BSP wird biliär sezerniert (Inoue et al. 1983). Im Plasma wird BSP rasch an Albumin gebunden, wobei experimentell ca. 10 BSP-Bindungsstellen pro Albumin-Molekül (Piller 1963) bzw. eine Bindung von 1,2 nmol BSP pro mg Protein für die High affinity binding sites des Albumins ermittelt wurden (Schwenk et al. 1976). Bei in vitro-Experimenten nahm der Anteil des Albumin-gebundenen BSP bei Konzentrationen von 0,05 - 5 μ mol BSP pro ml Serum dosisabhängig zu (Inoue et al. 1983). Unter den Bindungsproteinen des Lebercytosols weist die Y-Fraktion die höchste, die Z-Fraktion eine mittlere und die X-Fraktion die niedrigste Affinität zu BSP auf (Gregus und Klaassen 1982). Die genannten Fraktionen bestehen jeweils aus mehreren verschiedenen Proteinen. Zu den Proteinen der Y-Fraktion gehört das sog. Ligandin (Glutathion-S-Transferase), welches die höchste Affinität zum BSP aufweist und für dessen Glutathion-Konjugation verantwortlich ist (Sugiyama et al. 1979). Die Hauptrolle des Ligandins bei der biliären Exkretion des BSP ist nicht die intrazelluläre Bindung, sondern die enzymatische Konjugation (Gregus und Klaassen 1982): In vivo wird BSP durch GSH-S-transferase vermittelte Katalyse rasch GSH-konjugiert. Das Konjugat BSP-GS ist hydrophiler und weniger toxisch als freies BSP (Inoue et al. 1983), wird schneller hepatobiliär eliminiert und hat eine choleretische Wirkung. Dagegen besitzt unkonjugiertes BSP eine cholestatische Wirkung (Gregus und Klaassen 1982). Die choleretische Wirkung von BSP-GS ist auf die Erhöhung des Gallensäure-unabhängigen Galleflusses zurückzuführen; die biliäre Cholesterol-Sekretion wird dagegen reduziert (Labori et al. 2000). An isolierten Hepatozyten wurde gezeigt, dass die BSP-Aufnahme zwar ATP-abhängig ist, Natrium auf die Aufnahme aber keinen Einfluss hat (Schwarz et al. 1980,

Wolkoff 1996). Eine Aufnahme von BSP aus Albumin erfordert extern Chloridionen. Dennoch ist die BSP-Aufnahme selbst nicht an Chlorid gekoppelt, denn in Abwesenheit von Albumin besteht diese Chloridabhängigkeit nicht (Wolkoff 1996).

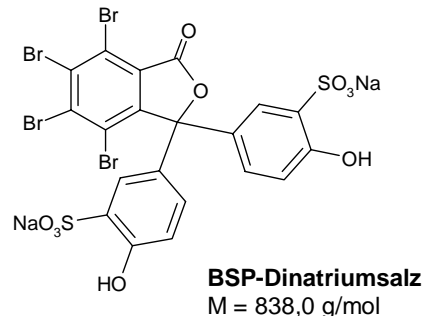


Abb. 1.6: BSP: 4,5,6,7-Tetrabrom-3,3-bis(4-hydroxyphenyl)-1(3H)-isobenzofuranon-dinatriumsalz

An Sprague-Dawley-Ratten konnte gezeigt werden, dass die hepatische Aufnahme von BSP eine exklusive Funktion der Parenchymzellen ist. Kupferzellen nehmen weder BSP auf, noch sind sie zu einer GSH-Konjugation des Farbstoffes in der Lage (Stege et al. 1975). Rattenweibchen besitzen mehr Fettsäurebindungsproteine und weniger GSH-Transferasen als männliche Tiere (Sorrentino et al. 1988). Sorrentino et al. ermittelten bei isoliert perfundierten Lebern von Rattenweibchen einen Gleichgewichtsverteilung von BSP-GS, die für einen langsameren Influx und schnelleren Efflux sprach.

I.v. injiziertes BSP wurde bei Wistar- und Sprague-Dawley-Ratten innerhalb von ca. 60 min fast quantitativ hepatobiliär sezerniert; nach Ablauf dieses Zeitraums war im Plasma dieser Tiere kein BSP mehr nachweisbar. Die höchsten BSP-Konzentrationen in der Galle wurden zwischen 10 und 20 min nach Injektion gemessen (Gregus und Klaassen 1982, Inoue et al. 1983, Hickey et al. 1991, Takikawa et al. 1991, Kurisu et al. 1991). Dagegen schieden GY/TR⁻- und EHBR-Ratten hepatobiliär nur sehr geringe Mengen BSP aus. Die Effluxraten waren sehr niedrig, und es trat kein exkretorisches Maximum auf. Im Vergleich zu Wistar- und Sprague-Dawley-Ratten war die Plasmaclearance stark verzögert (Kurisu et al. 1991, Takikawa et al. 1991, Meier et al. 1997, Labori et al. 2000). EHBR- und GY/TR⁻-Ratten besitzen den canalikulären Transporter mrp2 nicht und weisen eine konjugierte Hyperbilirubinämie sowie einen hereditären Ikterus auf (vgl. 1.2.4, S. 11). Deshalb können sie das mrp2-Substrat BSP (Jäger et al. 1997, Paulusma und Oude Elferink 1997) weder Glutathion-konjugieren (Jansen et al. 1993, Labori et al. 2000) noch hepatobiliär sezernieren; ihr Plasma weist deshalb auch bedeutend höhere Konzentrationen an unkonjugiertem BSP auf als Plasma von Wistar- und Sprague-Dawley-Ratten (Jansen et al. 1987), die diesen Transporter besitzen und GSH-Konjugate bilden können.

Basolateral werden sowohl unkonjugiertes BSP als auch BSP-GS über den oatp1 (Ratte, Maus) bzw. die OATPs (Mensch) aufgenommen. Mehrere Arbeitsgruppen fanden bei der Ratte K_M -Werte für die oatp1-vermittelte Aufnahme von BSP-GS von 1,5-3,3 μ M

(Schwarz et al. 1980, Meier et al. 1997, Reichel et al. 1997) bzw. $\approx 7 \mu\text{M}$ für BSP (Schwenk et al. 1976, Schwarz et al. 1980). Der humane OATP transportiert BSP-GS mit einem K_M -Wert von $20 \mu\text{M}$ (Meier et al. 1997). BSP-GS wird langsamer aufgenommen als unkonjugiertes BSP (Schwarz et al. 1980): Frisch isolierte Hepatozyten transportierten BSP mit einer V_{\max} von $2,6 \text{ nmol} / \text{mg Protein}$, die V_{\max} für BSP-GS betrug $0,16 \text{ nmol} / \text{mg Protein}$. Der Transport von BSP-GS wird durch BSP kompetitiv gehemmt; $K_i \approx 1 \mu\text{M}$. Die BSP- bzw. BSP-GS-Aufnahme ist sättigbar (Stremmel und Diede 1990), und zwar mit K_M -Werten von $3 \mu\text{M}$ für HeLa-Zellen und $\approx 3 \mu\text{M}$ für *oatp1*-exprimierende Oozyten (Wolkoff 1996). Inhibieren lässt sich die BSP-Aufnahme durch mindestens äquimolare Mengen der *oatp1*-Substrate 17β -Glucuronosyl-östradiol, Progesteron, Phenolphthalein (Schwarz et al. 1980), Gadoxetat (van Montfoort et al. 1999) und S 1743 (Schwab et al. 2001), deren K_M - und K_i -Werte in etwa mit denen des BSP-GS vergleichbar sind. Dagegen werden die Gallensäuren Taurocholat und Cholat bevorzugt über den Ntcp und nur zu einem geringen Anteil über den *oatp1* aufgenommen. Sie hemmen die BSP-Aufnahme nicht bei äquimolarer Dosierung (Wolkoff 1996), sondern erst bei etwa zehnfach höherer Konzentration (Schwarz et al. 1980). Die initiale Aufnahmegeschwindigkeit eines Substrates durch verschiedene Transporter korreliert nicht zwangsläufig mit dem jeweiligen K_M -Wert. So wurden cRNA verschiedener Transporter in *Xenopus laevis*-Oozyten exprimiert und die initiale Aufnahmegeschwindigkeit von $1 \mu\text{mol BSP}$ bestimmt (Meier et al. 1997) und für Ntcp bzw. NTCP in Anwesenheit von Na^+ zu 4 ± 2 bzw. 6 ± 3 sowie *oatp1* bzw. OATP1 zu 19 ± 4 und $1,9 \pm 0,8 \text{ fmol}/\text{min} \cdot \text{Oozyte}$ ermittelt. Für den Transporter mit dem kleinsten K_M -Wert (*oatp1*) wurde somit der geringste V_i -Wert gemessen.

Bis heute ist außer dem *oatp1* bei der Ratte kein basolateraler Transporter bekannt, der BSP transportiert (Paulusma und Oude Elferink 1997); selbst beim ebenfalls organische Anionen transportierenden Peptid *oatp2* war kein BSP-Transport festzustellen (Reichel et al. 1997). Inzwischen sind zahlreiche Transporter der humanen OATP-Familie bekannt (vgl. Kap. 1.2.1, S. 6). Unter ihnen transportieren drei BSP: In *Xenopus laevis*-Oozyten, denen cRNA von OATP-B, OATP-C bzw. OATP-8 injiziert worden war, wurden sättigbare BSP-Aufnahmen mit K_M -Werten von $0,7 \mu\text{M}$, $0,3 \mu\text{M}$ bzw. $0,4 \mu\text{M}$ gefunden (Kullak-Ublick et al. 2001). Allerdings hemmt BSP Aufnahme und Efflux von GSH (Yi et al. 1995): Die beiden Transporter RsGshT bzw. RcGshT (vgl. Kap. 1.2.3, S. 10) wurden in *Xenopus laevis*-Oozyten exprimiert. Anschließend wurden Aufnahme und Efflux von GSH in Gegenwart und Abwesenheit eines 500-fachen Überschusses an *cis*-appliziertem BSP bestimmt. BSP verminderte die basolaterale Aufnahme und Ausscheidung von GSH um 70-80 %, hatte aber keinen Einfluss auf den GSH-Transport durch den canalikulären RcGshT.

1.3.3 S 3025

Chlorogensäurederivate sind amphiphile organische Anionen mit pK_A -Werten von etwa 5 (Schwab et al. 2001). Sie sind potente und spezifische Inhibitoren der Glucose-6-Phosphat-Translocase. Die Glucose-6-Phosphat-Translocase ist eine wesentliche Komponente des hepatischen Glucose-6-Phosphat-Systems; sie vermittelt den Zugang von Glucose-6-Phosphat zum Lumen des endoplasmatischen Retikulums. Schematisch ist der hepatische Kohlehydrat-Metabolismus in Abb. 1.7 dargestellt:

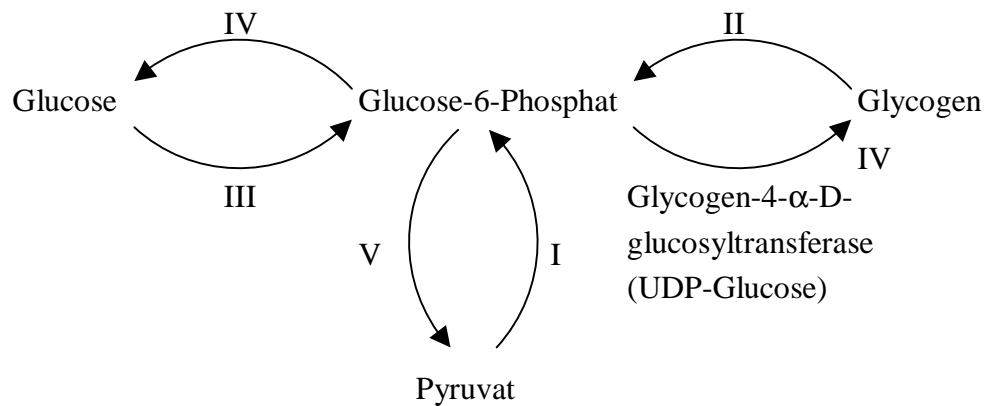


Abb. 1.7: Schematisches Modell des hepatischen Kohlehydrat-Metabolismus (nach van Dijk et al. 2001.)

- I: de novo-Synthese von Glucose-6-Phosphat
- II: Glycogenolyse
- III: Glucose-Phosphorylierung
- IV: Glucose-6-Phosphat-Hydrolyse
- V: Glycolyse
- VI: Glycogen-Synthese

Der gluconeogene Flux zur Glucose (Gluconeogenese) wird durch I + IV repräsentiert, der Flux zur UDP-Glucose ist durch I + VI dargestellt.

Die Auswirkungen des Chlorogensäurederivates S 4048 (s. Abb. 1.8) auf den Kohlehydrat-Metabolismus wurde an frisch isolierten Hepatozyten, isoliert perfundierten Lebern sowie im Ganztierversuch an Wistarratten untersucht (van Dijk et al. 2001). S 4048 führte zu einer akuten Hemmung der Glucose-6-Phosphatase-Translocase. Daraus resultierte ein deutlicher Anstieg des hepatozellulären Glucose-6-Phosphats und des Glycogens, wobei der gluconeogene Flux zum Glucose-6-Phosphat nicht beeinflusst wurde. Die Expression der Gene der Enzyme des Glucosezyklus, der Glycogensynthese und der Glycolyse wurden durch S 4048 verändert. Dabei führten die Veränderungen zu einer maximierten Umwandlung von Glucose-6-Phosphat in Glycogen, um die zelluläre Glucose-6-Phosphat-Homöostase aufrechtzuerhalten.

Untersuchungen zur Aufnahme des Chlorogensäurederivates S 1743 (s. Abb. 1.8) in frisch isolierte Hepatozyten aus Wistarratten zeigten, dass viele andere Chlorogensäurederivate die Aufnahme von S 1743 mit K_i -Werten zwischen 1,1 und 11 μM hemmten (K_i für S 4048: $0,004 \pm 0,001$, K_i für S 3025: $0,026 \pm 0,025$ μM). Bekannte oatp1-Substrate wie Sulfolithotaurocholsäure, BSP und Östron-3-sulfat hemmten die Aufnahme von S 1743 in oatp1-exprimierenden CHO-Zellen ebenfalls (Schwab et al. 2001). Diffusion schien beim Transport von Chlorogensäurederivaten keine Rolle zu spielen. Auf Grund dieser Befunde scheint der oatp1 das Hauptsystem für den hepatischen basolateralen Transport von S 4048, S 1743 und S 3025 zu sein.

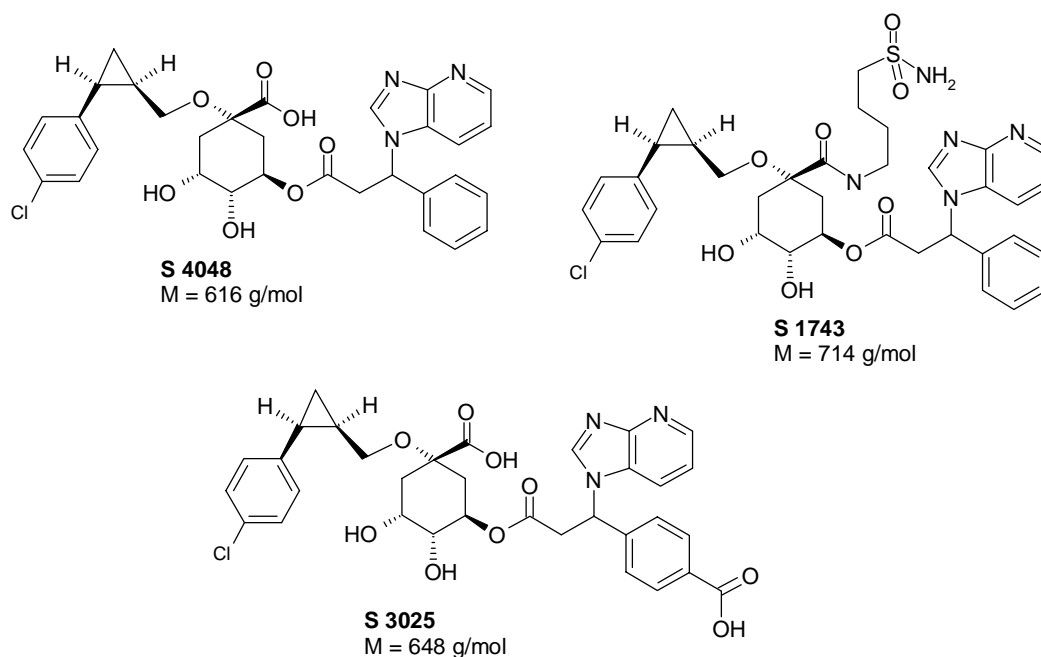


Abb. 1.8: Die Chlorogensäurederivate S 4048, S 1743 und S 3025

S 3025: (1-[2-(4-Chlor-phenyl)-cyclopropylmethoxy]-3,4-dihydroxy-5-(3-imidazo-[4,5-b]pyridin-1-yl-3-[4-carboxy]-phenyl-acryloyloxy)-cyclohexancarbonsäure)

Ein Vergleich der hepatobiliären Eliminationsprofile von S 4048 in Wistar- und TR⁻-Ratten ergab keine Beteiligung des mrp2, da beide Rattenstämme identische Ergebnisse lieferten (Herling et al. 2002). S 3025, ein strukturell eng mit S 4048 verwandtes Chlorogensäurederivat, zeigte bei Wistarratten eine ähnlich hohe Plasmaclearance und hepatobiliäre Elimination (Herling et al. 2002). Beide Substanzen werden bei Wistarratten binnen 5 h fast vollständig in die Galle sezerniert. Dagegen war die Galleausscheidung bei TR⁻-Ratten erheblich vermindert; nach Injektion von 50 mg/kg wurden innerhalb von 5 h nur 12 % des applizierten S 3025 in der Galle detektiert. Im Urin wurden unter diesen Bedingungen bei Wistarratten 0,01 %, bei TR⁻-Ratten jedoch 18 % der applizierten Dosis gefunden. Herling et al. konnten zeigen, dass die maximale

Reduktion des Blutglucosespiegels bei beiden Rattenstämmen etwa 1 h nach Bolusinjektion von S 3025 erreicht wurde. Bei Wistarratten hielt dieser pharmakodynamische Effekt nur 1 h vor, während TR⁻-Ratten erst 5 h nach Applikation wieder den Blutglucosespiegel der Kontrolltiere erreichten.

Zusammengefasst lassen die Befunde von Herling et al. den Schluss zu, dass Chlorogensäurederivate über den oatp1 hepatobiliär aufgenommen werden. S 3025 besitzt zwei Carboxylgruppen, S 4048 eine und S 1743 eine Aminosulfonsäuregruppe. Im Gegensatz zu den beiden anderen Substanzen scheint S 3025 über den mrp2 hepatobiliär sezerniert zu werden. Dies erscheint plausibel auf Grund der Präferenz dieses Transporters für amphiphile Verbindungen mit mehr als einer negativen Ladung.

1.3.4 CDNB

1-Chlor-2,4-dinitrobenzol wird sowohl in vitro als auch in vivo rasch Glutathionkonjugiert (Takikawa et al. 1998, Paulusma et al. 1999): Nach Inkubation von isolierten Rattenleberhepatozyten mit 5 µMol CDNB pro mg Protein bei 10°C lagen innerhalb von 10 min über 90% des Substrates als Glutathionkonjugat vor (Oude Elferink et al. 1990); im Ganztiersversuch wurde injiziertes CDNB sogar innerhalb von 30 s quantitativ Glutathionkonjugiert (Oude Elferink et al. 1989a). CDNB und sein Glutathionkonjugat DNP-SG sind in Abb. 1.9 dargestellt. Während CDNB lipophil ist, handelt es sich bei DNP-SG um eine hydrophile Substanz (Paulusma et al. 1999).

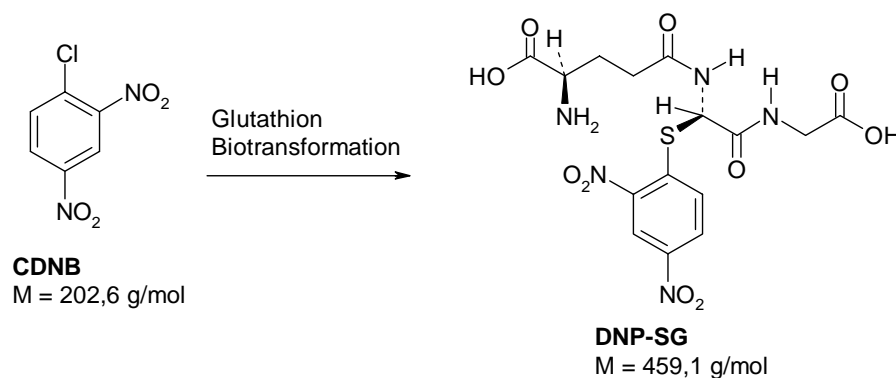


Abb. 1.9: Strukturen des CDNB (1-Chlor-2,4-dinitrobenzol) und seines Glutathionkonjugates. Das Glutathionkonjugat DNP-SG ist das eigentliche mrp2-Substrat.

Sowohl CDNB als auch DNP-SG werden von verschiedenen Proteinfractionen des Cytosols gebunden. Die höchste Bindungsaffinität besteht gegenüber der Y-Fraktion; etwas geringere zur Z- sowie zur X-Fraktion. Hierbei spielt wie beim BSP (vgl. S. 15) die Glutathion-S-Transferase (Ligandin) eine entscheidende Rolle (Sugiyama et al. 1979).

DNP-SG ist ein Substrat von MRP1/mrp1 (Paulusma et al. 1999, Ueda et al. 1999) und MRP2/mrp2 (Oude Elferink et al. 1989a, Masuda et al. 1997, Madon et al. 1997, Yamazaki et al. 1997, Ito et al. 1998). Der mrp2-vermittelte Transport dieser Substanz ist ATP-abhängig (Oude Elferink et al. 1989a, Ni'inuma et al. 1997) und sättigbar (Oude Elferink et al. 1989a, Kobayashi et al. 1990). Bei EHBR- und TR⁻-Ratten, die beide keinen mrp2 besitzen, wurde weder in Ganztierversuchen noch an frisch isolierten Hepatozyten ein nennenswerter canaliculärer Transport von DNP-SG beobachtet. An isoliert perfundierten Lebern von TR⁻-Ratten konnte jedoch gezeigt werden, dass der Flux des Substrates von der sinusoidalen Membran zum Blut nicht gestört war (Oude Elferink et al. 1989a). Nach i.v.-Injektion von 1-30 µMol CDNB steigt die DNP-SG-Konzentration in der Galle bis zur 10. min rasch an, bleibt etwa 10-20 min konstant (Plateau) und fällt dann langsam ab. Wistar- und Sprague-Dawley-Ratten scheiden innerhalb von 2h etwa 84% des applizierten CDNB in Form des Glutathionkonjugates aus, während bei den Rattenstämmen ohne mrp2 im gleichen Zeitraum nur etwa 2% biliär sezerniert werden und in der Ausscheidungskurve kein Peak zu beobachten ist (Oude Elferink et al. 1989a, Takikawa et al. 1998). CDNB wirkt bei Wistarratten in höheren Konzentrationen choleretisch, bei TR⁻-Ratten jedoch nicht (Oude Elferink 1989a). Der Efflux von DNP-SG ist durch GSSG und Glutathion-Konjugate hemmbar (Oude Elferink et al. 1990, Kobayashi et al. 1990); (reduziertes) GSH hemmt in wesentlich geringerem Ausmaß (Paulusma et al. 1999).

Zahlreiche Arbeitsgruppen untersuchten den Transport von DNP-SG in canaliculären Membranvesikeln. Eingesetzt wurden dabei Vesikel aus Wistar-, Sprague-Dawley- und EHBR-Ratten (Kobayashi et al. 1990, Ni'inuma et al. 1997, Kusuhara et al. 1998a) sowie Vesikel aus canaliculären Membranen verschiedener mrp2-transfizierter Zelllinien (Leier et al. 1994, Ito et al. 1998). Die dabei ermittelten K_M -Werte differierten von Studie zu Studie. Allen war jedoch gemein, dass Vesikel aus Wistar- und Sprague-Dawley-Ratten sowie mrp2-transfizierten Zelllinien signifikant mehr DNP-SG transportierten als solche aus EHBR-Ratten. Die K_M -Werte aller canaliculären Vesikel, die aus mrp2-haltigen Zellen stammten, schwankten zwischen 0,2 und 35 µM. Dagegen wurden für den DNP-SG-Transport durch canaliculäre Membranvesikel aus EHBR-Ratten ein K_M -Werte von 44,6 µM bestimmt wurde (Ni'inuma et al. 1997). Der canaliculäre Transport von DNP-SG konnte durch das mrp2-Substrat Methotrexat-(+)-amethopterin gehemmt werden (Masuda et al. 1997). Basolaterale Membranvesikel transportierten nur wenig DNP-SG ($K_M = 260$ µM, Kobayashi et al. 1990); die Aufnahme war unabhängig von ATP, abhängig von der Chloridionenkonzentration und hemmbar durch GSH.

Hinweise für einen durch das basolateral lokalisierte Protein MRP1-vermittelten Transport von CDNB und DNP-SG fanden sich bei MDCK-II-Zellen, die mit dem humanen MRP1 transfiziert waren (Paulusma et al. 1999) sowie bei MBEC4-Zellen

(Kusuhara et al. 1998b), die den murinen *mrp1*, nicht aber den *mrp2* exprimieren: Beide Zelllinien transportierten DNP-SG. Des Weiteren verglichen Paulusma et al. MDCK-Zelllinien, die mit dem MRP1 oder dem MRP2 transfiziert waren. Der apicale Efflux von DNP-SG stieg mit steigendem Expressionslevel von MRP2; die Konzentration des intrazellulären DNP-SG war umgekehrt proportional zur Konzentration des sezernierten DNP-SG. Der basolaterale Efflux war ebenso hoch wie der canaliculäre, aber unabhängig vom Expressionslevel des MRP1. Nach Paulusma et al. ist der MRP1-vermittelte Transport bei hinreichender Expression dieses Transporters nicht geschwindigkeitsbestimmend; dagegen hat die GSH-Konjugation entscheidenden Einfluss auf die Exkretion von DNP-SG (Paulusma et al. 1999).

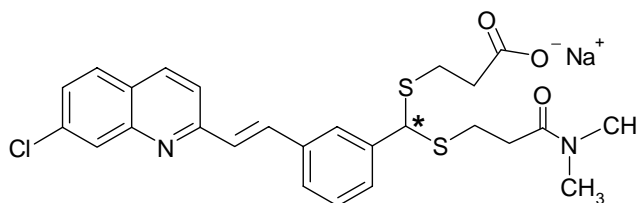
Hinweise zur Bedeutung der verschiedenen multidrug resistance-assoziierten Proteine für den Transport von DNP-SG liefern Untersuchungen von Ueda et al.: Die Ausscheidung von DNP-SG wurde an verschiedenen humanen epidermoiden Tumorzellen untersucht. C-A500-Zellen exprimieren MRP1 und Pgp; KCP-4-Zellen Pgp, MRP1, MRP2 und MRP3. Für den Transport von DNP-SG wurde bei der erstgenannten Zelllinie ein K_M -Wert von 2,56 μM , für die zweite ein K_M von 1,43 μM ermittelt (Ueda et al. 1999), was die Beteiligung mehrerer Transporter an der Sekretion von DNP-SG nahe legt. Anionen sind typische *mrp2*/MRP2-Substrate; Kationen jedoch nicht. Verschieden Arbeitsgruppen untersuchten die Aufnahme von linearen, cyclischen und kationischen Peptiden durch canaliculäre Membranvesikel aus Sprague-Dawley-Ratten (Yamada et al. 1998, Akhteruzzaman et al. 1999) und fanden, dass der Transport linearer und cyclischer Peptide durch DNP-SG hemmbar ist, die Aufnahme kationischer Peptide aber nicht beeinflusst wird. Kationische Peptide keine *mrp2*- sondern Pgp-Substrate. DNP-SG ist auf Grund dieser Befunde nicht als Pgp-Substrat zu betrachten (Yamada et al. 1998).

Der lateral lokalisierte Transporter MDR1 transportiert kein DNP-SG: Östradiol-17 β -glucuronid ist sowohl ein MRP2- als auch ein MDR1-Substrat. Selbst in Anwesenheit eines zehnfachen Überschusses an DNP-SG wurde der Transport von Östradiol-17 β -glucuronid in Sf9-Zellen, die mit dem MDR1-Baculovirus infiziert waren, nicht inhibiert (Huang et al. 1998).

1.3.5 MK 571

MK 571 wurde ursprünglich für die Asthma-Behandlung entwickelt und ist ein potenter und selektiver LTD₄-Rezeptor-Antagonist, wohingegen LTC₄ nicht antagonisiert wird (Jones et al. 1989, Tocco et al. 1990). Bei diesem Chlorochinolin-phenylpropionat (s. Abb. 1.10) handelt es sich um eine racemische Verbindung (Tocco et al. 1990); das reine R-Enantiomer ist unter dem Namen L660,018, das S-Enantiomer unter Verlukast

erhältlich (Depré et al. 1992). In vivo werden sowohl MK 571 als auch Verlukast rasch glucuronidiert (Nicoll-Griffith et al. 1992).



MK 571
M = 514,1 g/mol

Abb. 1.10: MK 571: (+)-3-(((3-(2-(7-Chlor-2-chinolinyl)-ethenyl)-phenyl)-((3-(dimethylamino)-3-oxopropyl)-thio)-methyl)-thio)-propansäure

Plasmabindung und -elimination sind sowohl vom Enantiomer als auch von der Spezies abhängig: Bei der Ratte weist das R-Enantiomer eine stärkere Plasmabindung auf, und das S-Enantiomer wird 3,7 mal schneller aus Plasma eliminiert. Hund und Affe zeigen den entgegengesetzten Effekt; bei ihnen findet eine raschere Plasmaelimination des R-Enantiomers statt (Tocco et al. 1990). Ein enterohepatischer Kreislauf von MK 571 ohne Abbau scheint bei der Ratte möglich. Es existiert jedoch keine Stereoselektivität der beiden Enantiomere im Hinblick auf die Bioverfügbarkeit. Die stereoselektive Elimination dürfte nach Tocco et al. deshalb nicht auf den enterohepatischen Kreislauf zurückzuführen sein. Die Bindung an Gewebe ist stereoselektiv; das S-Enantiomer wird bei der Ratte 1,84 Mal stärker an Gewebe gebunden (Tocco et al. 1990). Beim Menschen wird das R-Enantiomer dosisunabhängig schneller aus dem Plasma eliminiert (Depré et al. 1992). Die Kinetik beider Enantiomere ist dosisabhängig. Die Eliminationsgeschwindigkeit nimmt bei beiden Enantiomeren mit steigender Dosis ab, beim R-Enantiomer ist die Abnahme jedoch stärker als beim S-Enantiomer.

MK 571 hat eine choleretische Wirkung; dabei nimmt die biliäre Konzentration von LTD₄ ab, während die Gesamtmenge an Leukotrienen in der Galle ansteigt (Denzlinger et al. 1991). Toxische Effekte sind bisher nicht beobachtet worden. An MDR-Sublinien humaner promyelotischer Leukämiezellen wurde ein IC₅₀-Wert von 70-90 µM ermittelt (Gekeler et al. 1995).

Bisher vorliegende Untersuchungsergebnisse weisen darauf hin, dass es sich bei MK 571 um ein MRP1/mrp1- und MRP2/mrp2-Substrat handelt (Walle et al. 1999a): So inhibiert MK 571 den humanen MRP-vermittelten ATP-abhängigen Transport von LTC₄, 17β-Glucuronosyl-östradiol und GSSG mit K_i-Werten von etwa 0,6 µM (Keppler und Kartenbeck 1996, Keppler und König 1997); ebenso den mrp2-vermittelten Transport dieser Substrate in canaliculären Membranvesikeln der Ratte (Keppler und Kartenbeck 1996), in Sf9-Zellen, die mit mrp2 aus Kaninchen transfiziert waren (van

Aubel et al. 1998), und in murinen Mastocytom-Zellmembranen (Keppler und Kartenbeck 1996). In Wettbewerbsversuchen mit MRP-transfizierten HeLa-Zellen hemmten 50 μM MK 571 den vesikulären Transport von 150 nM LTC₄ mit einem K_i-Wert von 0,6 μM , dagegen ergaben sich für Cyclosporin A und sein Derivat PSC 833 K_i-Werte von 5 bzw. 27 μM (Leier et al. 1994). Basolaterale und canaliculäre Membranvesikel aus Lebern von Sprague-Dawley- und EHBR-Ratten wurden mit 50 nM LTC₄ und 5 μM MK 571 inkubiert (Büchler et al. 1996). Die basolateralen Vesikel beider Rattenstämme zeigten keinen nennenswerten LTC₄-Transport. Canaliculäre Vesikel aus Sprague-Dawley-Ratten wiesen nach Applikation von MK 571 einen um 80% gegenüber den Kontrollen verminderten LTC₄-Transport auf; bei entsprechenden Vesikeln aus EHBR war kein Einfluss von MK 571 festzustellen.

Das Flavonoid-Derivat Chrysin (5,7-Dihydroxyflavon) wird durch Caco-2-Zellen innerhalb von 1h zu über 90% zu Chrysin-Glucuronid und Chrysin-Sulfat metabolisiert (Walle et al. 1999a). Dieser Zelltyp exprimiert den MRP2, aber nicht den MRP1. Caco-2-Monolayer wurden apical mit 20 μM Chrysin und 0-50 μM MK 571 beladen; anschließend wurde der Efflux der beiden Metaboliten bestimmt. MK 571 hemmte den Efflux von Chrysin-Glucuronid und Chrysin-Sulfat in konzentrationsabhängiger Weise. Dabei wurde der Efflux des Glucuronids um bis zu 71% und der des Sulfates um bis zu 21% gegenüber den Kontrollen gehemmt (Walle et al. 1999a). MK 571 scheint demnach die MRP2-vermittelte Sekretion von Glucuroniden wesentlich potenter zu hemmen als diejenige von Sulfaten.

In weiteren Studien untersuchten Walle et al. die Aufnahme von Genistin an Monolayern aus Caco-Zellen in basolateral-apicaler Richtung und umgekehrt (Walle et al. 1999b). Die Zellen wurden mit je 50 μM MK 571 und Genistin inkubiert, wobei MK 571 immer apical gegeben wurde. Dabei verminderte MK 571 den Transport von basolateral in Richtung apical um 87% im Vergleich zu den Kontrollen. Von apical nach basolateral war keinerlei Genistin-Transport zu beobachten. Dieser Befund wurde von den Autoren als überraschend bezeichnet, da Genistin keine anionische Verbindung und damit kein klassisches mrp2-Substrat ist. Bei Genistin handelt es sich um Genistein-7-glucuronosid; Genistein ist ein Isoflavon-Derivat. Walle et al. halten es für möglich, dass MK 571 zusätzlich zum mrp2 noch weitere Transporter inhibiert.

Calu-3-Zellen sind humane bronchiolare Epithelzellen, in denen der MRP1 basolateral lokalisiert ist. Der Transport von 5 μM Etoposid wurde durch 5 μM MK 571 in diesen Zellen weder in basolateral-apicaler Richtung noch umgekehrt beeinflusst (Hamilton et al. 2001). Dagegen senkten das Pgp-Substrat Cyclosporin und das Pgp- und MRP1-Substrat Chinidin den Etoposid-Transport von basolateral nach apical um etwa 80%. In umgekehrter Richtung hemmten auch sie nicht.

Rhodamin 123 ist ein Substrat der Pgps der humanen Transporter MDR1 und MDR2, der murinen Transporter mdr1a und mdr1b sowie des mrp2 der Ratte (Sturm et al.

2001). An kultivierten Hepatozyten der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) zeigte sich kein Einfluss von MK 571 auf den Efflux von Rhodamin 123.

Nach chronischer Exposition gegenüber anorganischen Arsenverbindungen kommt es zu einer verstärkten Expression der Gene für die Glutathion-S-transferase sowie die Transporter MRP1, MRP2 und den für Pgp codierenden MDR1 (Liu et al. 2001). Leberepithelzellen aus Fischerratten wurden mit 5-50 μM MK 571 inkubiert. Diese Inkubationen hatten keinen Einfluss auf die Arsensensitivität der zuvor nicht Arsen-exponierten Kontrollen, führten aber zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme der Arsentoleranz in chronisch Arsen-exponierten Zellen. Nach Ansicht von Liu et al. spielen *mrp1* und *mrp2* eine Rolle bei der Reduktion des zellulären Arsens durch die Erhöhung des Effluxes möglicher Arsen-GSH-Konjugate.

1.3.6 Sirolimus

Sirolimus (Rapamycin, Rapamune[®]) ist ein Macrolid-Lacton und dient ebenso wie Cyclosporin A und Tacrolimus als Immunsuppressivum in der Transplantationsmedizin (Lo und Burckhardt 1999, Paine et al. 2002). Cyclosporin A und Tacrolimus hemmen die erste Phase der T-Zell-Aktivierung, indem sie Calcineurin blockieren und damit die Interleukin-2-Produktion inhibieren (Deters et al. 2001). Sirolimus hat dagegen keinen Effekt auf Calcineurin, sondern greift durch Hemmung der Interleukin-2-vermittelten Signaltransduktion in die zweite Phase der T-Zell-Aktivierung ein. Alle drei genannten Substanzen werden sowohl in der menschlichen Leber als auch in Dünndarmmikrosomen durch CYP3A4 zu zahlreichen demethylierten und hydroxylierten Spezies metabolisiert. Hauptmetabolit von Sirolimus in der intestinalen Mucosa und der Leber ist Dihydro-Sirolimus. Paine et al. konnten zeigen, dass Sirolimus zunächst durch Enzym-unabhängigen Abbau zu Seco-Sirolimus und anschließend NADPH-abhängig zu Dihydro-Sirolimus metabolisiert wird. Abb. 1.11 zeigt Sirolimus und seine beiden Hauptmetaboliten.

Sirolimus, Cyclosporin A und Tacrolimus sind Substrate des humanen MDR1-Pgp (Paine et al. 2002), des murinen *mdr1b*-Pgp (Kerr et al. 2001) sowie des *mdr1*-Pgp der Ratte (Deters et al. 2001). Kerr et al. untersuchten den Einfluss verschiedener Pgp-Substrate auf die ATPase-Aktivität des humanen Pgp. „Echte“ K_M -Werte konnten wegen der auch in Abwesenheit von Substraten vorhandenen ATPase-Aktivität des Pgp nicht ermittelt werden. Stattdessen ließen sich approximierte Werte (K_{app}) bestimmen, indem die in Abwesenheit von Substraten ermittelte ATPase-Aktivität gleich 1 gesetzt wurde. K_{app} stellte dann die Substratkonzentration bei halb-maximaler Stimulation der ATPase-Aktivität dar. Für Sirolimus ergab sich $K_{app} < 4 \mu\text{M}$, für Cyclosporin A war $K_{app} < 2 \mu\text{M}$. Cyclosporin A reduzierte die ATPase-Aktivität des Pgp um 50%. Sirolimus um 80%.

Sirolimus ist als Pgp-Substrat zwar in der Lage, die ATPase-Aktivität dieses Transporters sowie den Pgp-vermittelten Gallefluss zu inhibieren, beeinflusst die Ausscheidung von Gallensäuresalzen jedoch nicht (Lo und Burckhardt 1999).

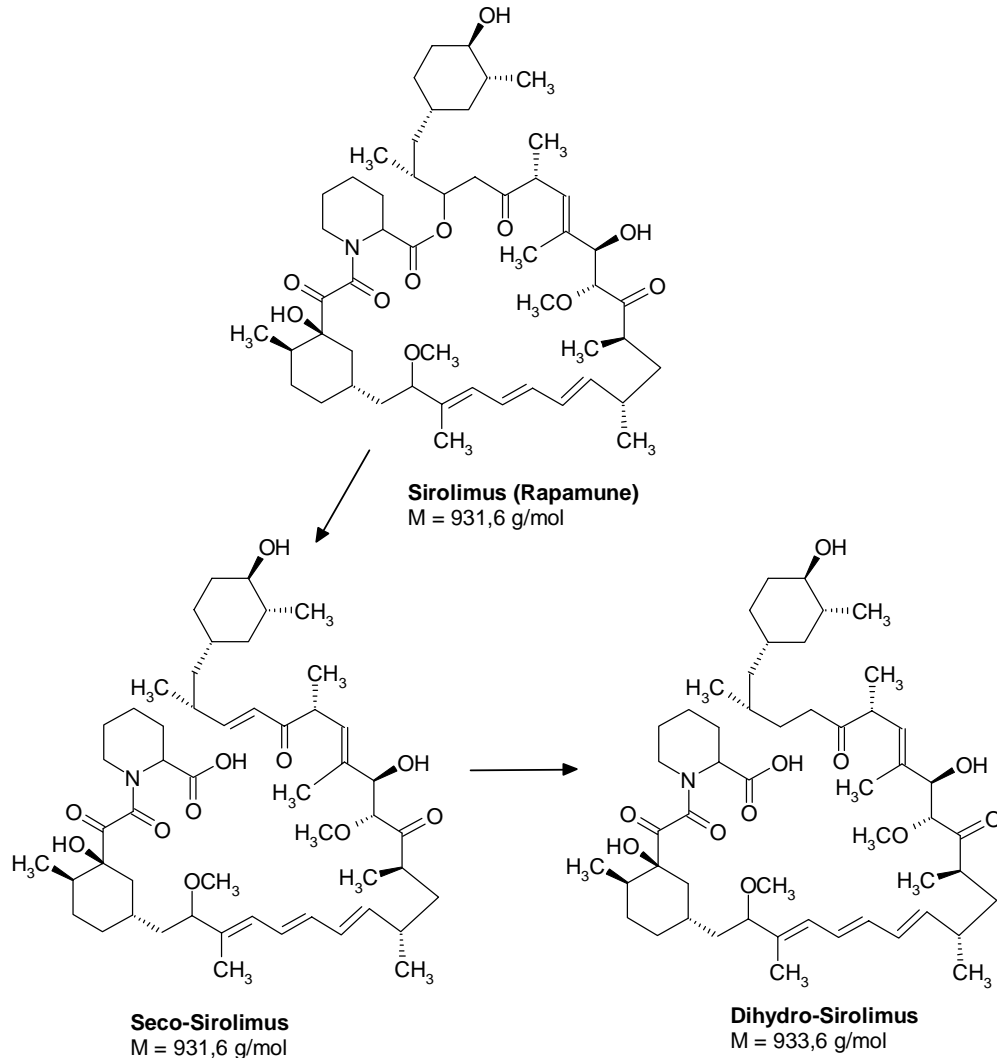


Abb. 1.11: Sirolimus (Rapamune®) und seine beiden Hauptmetaboliten

Der letztgenannte Befund wurde von Deters et al. bestätigt: An Gallengangs-kanülierten Wistarratten wurde gezeigt, dass Sirolimus (6 mg/kg i.p.) den Gallefluss um 50% und die Exkretion von GSH um 70% im Vergleich zu Kontrolltieren verringerte, jedoch keinen Effekt auf die Ausscheidung von Cholesterin und Gallensäuresalzen hatte. Sirolimus reduzierte ausschließlich den Gallensäure-unabhängigen Gallefluss; Ursache war wahrscheinlich die Reduktion der biliären GSH-Ausscheidung (Deters et al. 2001). Beim Menschen trat diese cholestatische Wirkung ebenfalls auf, wenn Sirolimus allein oder in Kombination mit Cyclosporin A verabreicht wurde (Bramow et al. 2001). Die basolateralen Transporter Ntcp und oatp1 sowie der basolaterale Transporter mrp2 transportieren Sirolimus nicht. Dies konnte an frisch isolierten Hepatozyten der Ratte

gezeigt werden: Die Taurocholataufnahme wurde durch Sirolimus nicht beeinflusst (Webster und Anwer 1999). Sirolimus führt aber sowohl bei alleiniger Applikation als auch in Kombination mit Cyclosporin A zu einer verminderten Expression des *oatp1* und einer erhöhten *oatp2*-Expression (Bramow et al. 2001).

1.4 Strukturen und Modifikationen von Oligonukleotiden

1.4.1 Allgemeine Struktur

In natürlicher vorkommender DNA und RNA liegen Oligonukleotide als Phosphodiester vor. Phosphodiester sind für in vitro- und in vivo-Anwendungen ungeeignet, da sie durch Einzelstrang-Nukleasen sehr leicht abbaubar sind. Dies betrifft besonders 3'-Exonukleasen (Boiziau et al. 1995). Weitere enzymatische Abbaureaktionen sind die Deethylierung von Phosphotriestern sowie die Deglykosylierung von Methylphosphonaten; beide spielen jedoch nur eine untergeordnete Rolle (Goodchild 1990). Abb. 1.12 zeigt die Grundstruktur von Oligonukleotiden.

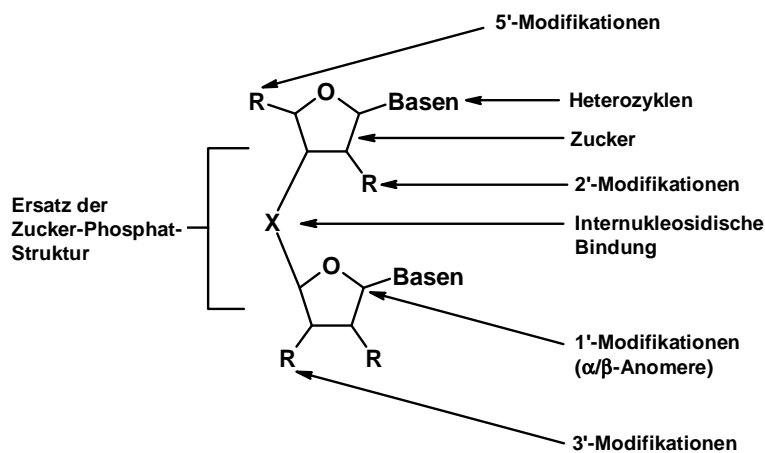


Abb. 1.12: Grundstruktur der Oligonukleotide sowie Positionen und Arten möglicher Modifikationen (nach Crooke und Bennett 1996)

In der Literatur wurden zahlreiche Oligonukleotid-Derivate beschrieben (Wagner 1994). Sie haben zum Ziel, Oligonukleotide zu synthetisieren, die hinreichend stabil sind, in geeigneter Weise mit natürlicher DNA oder RNA hybridisieren und Zellmembranen besser passieren als unmodifizierte Oligonukleotid-Phosphodiester. Modifikationen erfolgten an allen oben aufgeführten Strukturelementen: am Phosphat, den Zuckern, den Basen sowie am 3'- und am 5'-Ende (Zon 1998, Uhlmann und Peymann 1990, Milligan et al. 1993).

1.4.2 Modifikationen am Zucker

Modifikationen des Ribosemoleküls gibt es z.B. in Form von α -Anomeren, 2'-modifizierten Zuckern und 2'-O-Alkylderivaten. Ferner existieren modifizierte Zucker, bei denen der zyklisch gebundene Sauerstoff entweder wie bei Carbocyclen durch Kohlenstoff ersetzt ist oder bei denen die Verknüpfungsposition wie bei 2',5'-verknüpften Zuckern verändert ist (s. Abb. 1.13) (Uhlmann und Peymann 1990, Altmann et al. 1995). Die natürlich vorkommenden β -Anomere sind weniger resistent gegenüber DNAsen als α -Anomere, wohingegen letztere die RNase H nicht aktivieren (Gagnor et al. 1989).

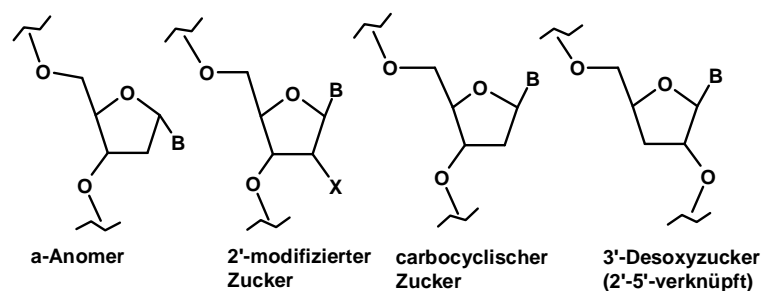


Abb. 1.13: Beispiele für Modifikationen am Zuckermolekül; B = Basen (nach Uhlmann 1998)

1.4.3 Modifikationen am Phosphat

Wegen ihrer geringen Nukleasestabilität sind unmodifizierte Phosphodiester für in vitro- und in vivo-Anwendungen nur eingeschränkt einsetzbar (Milligan et al. 1993). Aus diesem Grund wurden Phosphat- und Nichtphosphat-Analoga der natürlich vorkommenden Phosphodiester synthetisiert (Abb. 1.14). Phosphorothioate, Phosphorodithioate, Methylphosphonate und Alkylphosphotriester stellen Phosphatanaloga dar, während es sich bei Methylen(methylimino)-, 3'-Thioformacetal- und Peptid-Nukleinsäuren um Nichtphosphat-Analoga handelt (Uhlmann und Peymann 1990, Miller 1991, Milligan et al. 1993).

Thermodynamisch sind Hybride mit Peptid-Nukleinsäuren sehr stabil; allerdings sind sie nur sehr wenig in der Lage, Zellmembranen zu durchdringen, weshalb sie für eine Applikation in zellulären Systemen wenig geeignet sind (Ho und Parkinson 1997). Dieses Problem lässt sich nur durch Mikroinjektion der Hybride umgehen (Hanvey et al. 1992). Werden dagegen Chimären aus Peptidnukleinsäuren und DNA eingesetzt, so zeigen sich gegenüber reinen Peptidnukleinsäuren veränderte Eigenschaften: Diese Chimären sind Substrate zellulärer Enzyme wie z.B. der DNA-Polymerasen, und sie stimulieren RNase H (Uhlmann 1998). In vivo wurde mit Hilfe von

Benzylphosphonatderivaten nachgewiesen, dass Chimären aus Peptidnucleinsäuren und DNA virale DNA sequenzspezifisch hemmen können (Samstag et al. 1996).

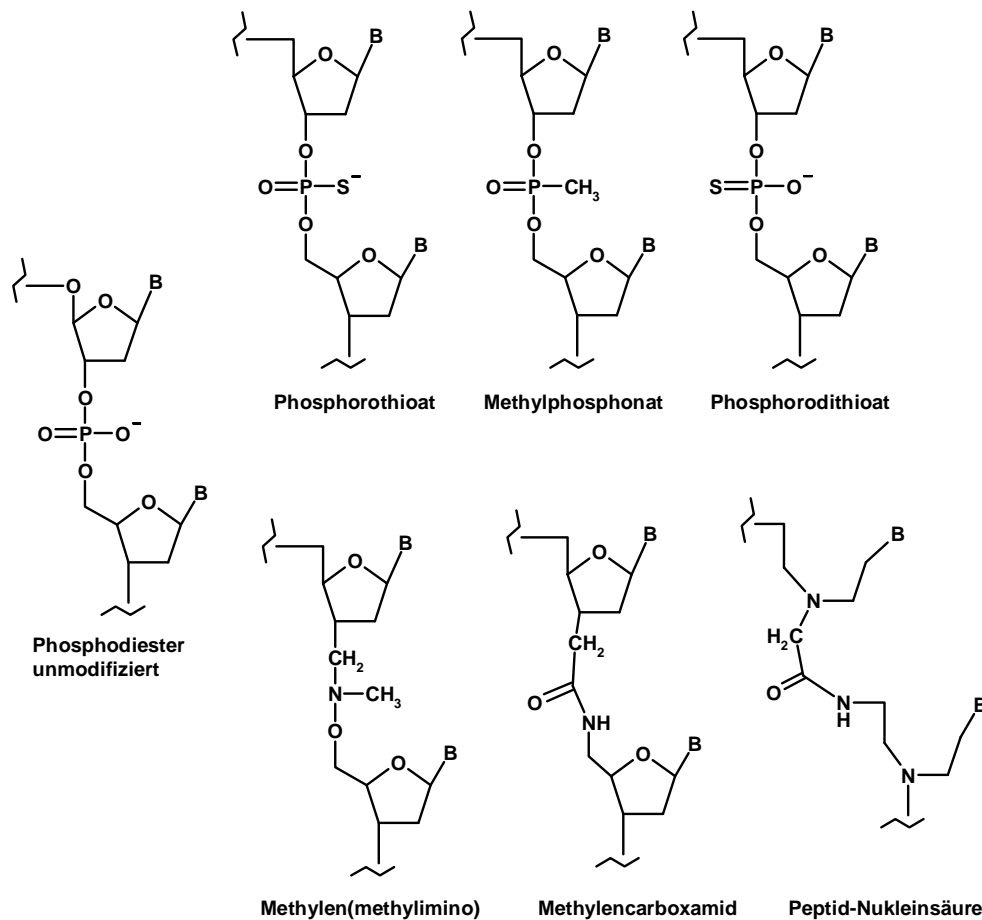


Abb. 1.14: Natürlich vorkommende Phosphodiester sowie Modifikationen am Phosphat bzw. Grundgerüst; B = Basen (nach Uhlmann 1998)

1.4.4 Modifikationen an den Basen

Die heterocyclischen Purin- und Pyrimidinbasen Adenin, Guanin, Thymin, Cytosin und Uracil sind planar. Ihre Stapelung in natürlicher DNA und RNA ist in hohem Maße verantwortlich für die Stabilität doppelsträngiger DNA. Werden Aromatizität und Hydrophobizität dieser Basen erhöht, so steigt die DNA-Stabilität. Dieser Effekt führte bei Oligonucleotiden, die 5'-Propinylpyrimidin enthielten, zu verstärkten Antisense-Effekten *in vitro* (Wagner et al. 1993). Die Einführung von Phenoxazingruppen resultierte in einer besseren Zellgängigkeit der auf diese Weise derivatisierten Oligonucleotide (Flanagan et al. 1999). Tricyclische Phenothiazinderivate wiesen ebenfalls eine erhöhte Hybridstabilität auf (Lin et al. 1995). Abb. 1.15 zeigt einige Basen-modifizierte Oligonucleotide.

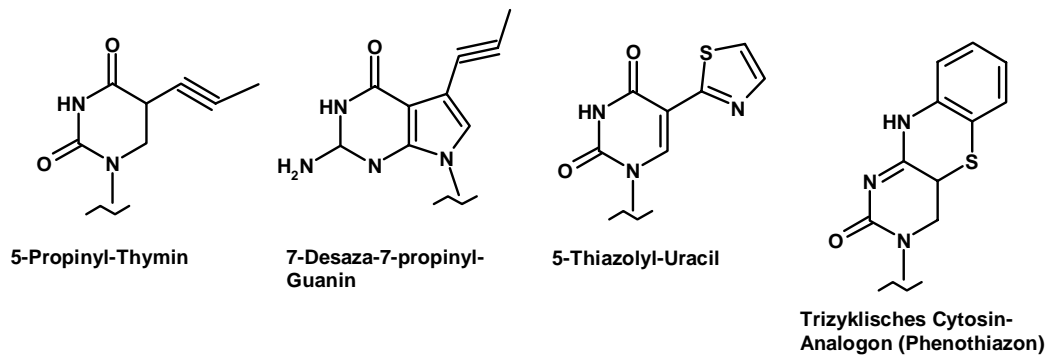


Abb. 1.15: Beispiele Basen-modifizierter Oligonukleotide (nach Wagner 1995, Uhlmann 1998)

1.4.5 Oligonukleotid-Konjugate

Durch Bildung von Konjugaten mit verschiedenen Nicht-Nukleinsäurekomponenten lassen sich die Eigenschaften von Oligonukleotiden weiter modifizieren (Uhlmann und Peymann 1990, Goodchild 1990). Im Folgenden sind einige Konjugate exemplarisch genannt.

Konjugatbildung am 3'- oder 5'-Ende kann die Funktionen des gesamten Oligonukleotids verändern. So führt die Kopplung an Substanzen, die an die kleine Furche von einzelsträngiger DNA oder RNA binden, zu einer Stabilisierung der Hybride. Hierfür sind beispielsweise synthetische Peptide wie N-Methylpyrrol-carboxamid oder N-3-Carbamoyl-1,2-dihydro-3H-pyrrolo[3,2-e]indol-7-carboxylat geeignet. Sie binden nichtkovalent und erhöhen Affinität und Spezifität im Vergleich zu nicht konjugierten Oligonukleotiden (Afonina et al. 1996). Nach Einführung zusätzlicher Sequenzen, die einen Hairpinloop am 3'-Ende bilden, wurde die Stabilität gegenüber 3'-Exonukleasen erhöht (Kahn und Coulson 1993).

Zelluläre Aufnahme, biologische Halbwertszeit und Stabilität der Oligonukleotide konnten durch Einführung bioabbaubarer Schutzgruppen erhöht werden. Hierbei sind Phosphodiester und Phosphorothioate die eigentlich wirksamen Substanzen; sie werden von zellulären Enzymen aus den Serum-stabilen Vorstufen freigesetzt (Mignet et al. 1997).

Um spezifische Rezeptoren auf den Zellmembranen wie z.B. Lektine zu nutzen, wurden Konjugate aus Oligonukleotiden und Neoglycoproteinen synthetisiert. Neoglycoproteine sind an Serumalbumin gebundene Saccharide. An Makrophagen und Monozyten befinden sich Rezeptorproteine, die spezifisch Saccharide erkennen und diese sowie an sie gebundene Reste endozytotisch aufnehmen. Auf diese Weise nahmen Makrophagen im Vergleich zu unkonjugierten Oligonukleotiden 30 % mehr Neoglycoprotein-Oligonukleotid-Konjugate auf (Bonfils et al. 1992).

Polyethylenglycol an der 5'-Position erhöht die Nukleaseresistenz und die Plasma-retention von Oligonukleotiden, führt dagegen aber zu keiner Veränderung des Verteilungsvolumens (Kawaguchi et al. 1995). In L929-Zellen wurde eine um das Acht- bis Zehnfache gegenüber unmodifizierten Oligonukleotiden gesteigerte Aufnahme von 5'-Lipid- bzw. Glycolipid-konjugierten Oligonukleotiden festgestellt (Shea et al. 1990). Auswirkungen einer Konjugation von Oligonukleotiden mit Poly-L-Lysin sind dagegen widersprüchlich: Die Konjugate werden nicht von allen Zelllinien aufgenommen (Degols et al. 1989, Clarenc et al. 1993) und wirken in höheren Konzentrationen toxisch; manchmal ist die zusätzliche Gabe von Heparin und anderen Polyanionen notwendig, die u.a. für eine verminderte Toxizität der applizierten Lysin-Konjugate verantwortlich gemacht werden (Degols et al. 1991).

Verschiedene Ansätze sollen dazu führen, die Aufnahme von Oligonukleotid-Derivaten in Leberzellen zu verbessern. So ist das Tri-Lysyl-tetra-galactopyranosyl-Derivat L₃G₄ ein Substrat des Asialoglycoprotein-Rezeptors. Konjugation dieses Substrates mit Oligonukleotid-Phosphodiestern erhöhte die hepatische Aufnahme um das Vierfache, wobei die Akkumulation in Parenchymzellen um das 60-fache gegenüber den underivatisierten Oligonukleotiden erhöht war (Biessen et al. 1999). Eine andere Arbeitsgruppe verknüpfte Antisense-Oligonukleotide (s. Kap. 1.5.2), deren Sequenz gegen die nicht-codierende oder die Core-Region des humanen Hepatitis C-Virus (HCV) gerichtet war, an deren 5'-Ende mit Derivaten natürlicher Gallensäuren. Die so entstandenen Konjugate bildeten stabile Duplices und Heteroduplices mit der HCV-RNA (Lehmann und Engels 2001). Derivate natürlicher Gallensäuren lassen sich auch über sog. Linker oder Spacer kovalent mit Oligonukleotid-Derivaten verknüpfen (Wess et al. 1992, Wess et al. 1993), wobei die Konjugation nur am 3'-Ende, nur am 5'-Ende oder an beiden Enden des Oligonukleotide erfolgen kann (Kramer und Wess 1996). Auf diese Weise erhaltene 3',5'-Gallensäure-konjugierte Oligonukleotide steigerten die hepatobiliäre Sekretion etwa um das Fünffache im Vergleich zu den unkonjugierten Oligonukleotiden (Starke et al. 2001).

1.4.6 Oligonukleotide der 2. Generation

Bei in vitro- und in vivo-Experimenten werden häufig Oligonukleotid-Phosphorothioate eingesetzt, da sie im Gegensatz zu den natürlich vorkommenden Phosphodiestern nukleasestabil sind. Nachteilig wirken sich jedoch die hohe unspezifische Proteinbindung und die verminderte Affinität der Phosphorothioate aus. Um die Vorteile von Phosphodiestern und Phosphorothioaten miteinander zu kombinieren und die jeweiligen Nachteile zu minimieren, wurden sog. Oligonukleotide der 2. Generation synthetisiert (Matteucci und Wagner 1996, Kandimalla et al. 1997): Es handelt sich dabei um chimäre Oligonukleotide (*mixed backbone oligonucleotides*), die aus einem

zentralen Anteil von mindestens sechs bis acht Phosphorothioaten oder Phosphodiestern sowie flankierenden, modifizierten Sequenzen bestehen.

1.5 Oligonukleotide als Nukleinsäure-Therapeutika

Oligonukleotide (ODN) stellen eine vielversprechende neue Strategie dar, um Therapeutika zu entwickeln, die die Genexpression beeinflussen und auf diese Weise beispielsweise zur Behandlung von Tumoren und viralen Infektionen geeignet erscheinen. Diese Substanzen können nach ihrem Wirkprinzip in vier Gruppen eingeteilt werden (s. Tab. 1.1):

Tab. 1.1: Wirkprinzip von Oligonukleotid-Therapeutika (verändert nach Stull und Szaka 1995)

	Antigen-ODN	Antisense-ODN	NS-Enzyme	Aptamere
Zielstruktur	genomische DNA	mRNA	mRNA	Protein
Struktur der ODN	DNA / RNA	DNA / RNA	RNA / (DNA)	DNA / RNA
Mechanismus	Triplex-Bildung	Hybridisierung: Hemmung und/oder RNase H- Aktivierung	Hybridisierung und mRNA- Spaltung	Bindung
beeinflusster Prozess	Transkription	Translation	Translation	biologische Funktion
Wirkort	Nukleus	Nukleus / Cytoplasma	Nukleus / Cytoplasma	intra- / extrazellulär

1.5.1 Antigen-Oligonukleotide

Antigen-Oligonukleotide sind Nukleinsäuren, die verwendet werden, um an genomische DNA zu binden und die Transkription zu hemmen. Es gibt zwei Möglichkeiten der Bindung an DNA: Zum einen können die Antigen-Nukleinsäuren während der Replikation an Einzelstrang-DNA binden, zum anderen ist eine Anlagerung an Doppelstrang-DNA denkbar. Der letztgenannte Prozess führt zur Bildung von Tripelhelices und wurde bislang umfangreicher untersucht. Er beruht auf der sequenzspezifischen Bindung von Oligonukleotiden in der großen Furche der DNA-Doppelhelix. Zielregionen sind dabei vor allem Polypurine, wie sie z.B. in Promotoren vorkommen; die Antigen-Therapeutika sollen dabei die Bindung von Transkriptionsfaktoren verhindern (Maher et al. 1991). In einigen Zellsystemen wurde tatsächlich eine Triplexbildung beobachtet (Postel et al. 1991, Orson et al. 1991, Okada

et al. 1994, Stull und Szoka 1995), wobei auch unspezifische Bindungseffekte auftraten. Phosphodiester zeigen eine geringe zelluläre Aufnahme und sind nicht nukleasestabil. Dagegen bilden modifizierte Oligonukleotide keine hinreichend stabilen Tripelhelices (Baertschi 1994).

Peptid-Nukleinsäuren binden mit hoher Affinität an DNA und sind in der Lage, einen Strang aus der Doppelhelix zu verdrängen und dabei selbst an den komplementären zu binden (Nielsen et al. 1993, Nielsen et al. 1994). Nachteilig für eine in vivo-Anwendung der Peptid-Nukleinsäuren ist jedoch ihre sehr geringe Membranpermeabilität (Ho und Parkinson 1997).

1.5.2 Antisense-Oligonukleotide

Die Wirkung so genannter Antisense-Oligonukleotide beruht auf ihrer Bindung an mRNA oder mRNA-Vorläufer, so dass die Funktion dieser Nukleinsäuren inhibiert wird. Erstmals wurde das Wirkprinzip dieser Therapeutika an Rous-Sarkom-Viren (RSV) gezeigt (Stephenson und Zamecnik 1978). Es sind verschiedene Mechanismen denkbar, durch die Antisense-Oligonukleotide in die Reifung, Stabilität und Transkriptionswirkung der mRNA eingreifen können (Crooke 1993):

- die direkte Transkriptionshemmung
- die Verhinderung des Zutritts verschiedener Enzyme und Faktoren, damit einhergehend eine Hemmung des Spleißens oder der Spaltung
- die Hemmung des 5'-Cappings oder der Funktionen des 5'-Caps
- Veränderungen in den 3'- und 5'-nichttranslatierten Regionen
- die Veränderung der Polyadenylierung
- die Verhinderung der Ausbildung notwendiger dreidimensionaler Strukturen
- die Aktivierung der RNase H

Das Enzym RNase H ist in der Lage, RNA-DNA-Hybride zu erkennen und den RNA-Anteil abzuspalten. Dadurch kann sich der DNA-Anteil lösen und an ein weiteres mRNA-Molekül binden. Bisher ist die Aktivierung der RNase H nur mit natürlich vorkommenden Phosphodiestern sowie den daraus abgeleiteten Phosphorothioat- und Phosphorodithioat-Derivaten gelungen (Milligan et al. 1993, Matteuci und Wagner 1996).

Alternativ kann ein weiteres zelluläres Enzym zur Inaktivierung der Zielsequenz genutzt werden, wenn RNA-Oligonukleotide verwendet werden, die RNA-RNA-Duplices bilden: Die Adenosin-Desaminase desaminiert Adenin zu Inosin und inaktiviert damit im Gegensatz zur RNase H nicht nur einen, sondern beide RNA-Stränge (Uhlmann und Peymann 1990, Rossi 1995).

Grundvoraussetzung für eine Wirkung von Antisense-Oligonukleotiden ist eine hinreichende zelluläre Aufnahme dieser Substanzen. Einige Arbeitsgruppen sind der

Auffassung, dies sei nur durch Verwendung sog. „Permeations-Enhancer“ möglich (Rossi 1995, Lebleu et al. 1997, Alahari et al. 1998). Oligonukleotid-Derivate mit geringer zellulärer Permeabilität wie beispielsweise Peptid-Nukleinsäuren weisen nur dann Antisense-Effekte auf, wenn sie in ausreichenden Mengen in die Zelle gelangen, was in vitro z.B. durch direkte Injektion möglich ist (Good und Nielsen 1998).

1.5.2.1 Länge der Oligonukleotide

Oligonukleotide sind von besonderem therapeutischem Interesse, da sie potenziell hoch selektiv sind. Es ist theoretisch denkbar, dass ein geeignetes Antisense-Molekül ausschließlich mit einer einzigen komplementären Zielnukleinsäure hybridisiert.

Statistische Berechnungen und Überlegungen zur Mindestlänge der einzusetzenden Sequenzen ergaben, dass die chemische Zusammensetzung des therapeutisch wirksamen Oligonukleotids und die Größe des Genoms der Zielzelle die entscheidende Rolle spielen. So besitzen humane Zellen etwa 4×10^9 Basenpaare, die nur zu ca. 0,5 % in RNA transkribiert werden. Eine Sequenz von 15 Nukleotiden kommt daher unter 2×10^7 umgeschriebenen Basenpaaren statistisch nur einmal vor. Besitzt die Antisense-Sequenz ein CG-Motiv, so ist bereits eine Länge von 10 Nukleotiden hinreichend selektiv, da diese Basenfolge im Vergleich zu allen anderen Dinukleotiden in Eukaryonten sehr selten vorkommt (Hélène und Thoulmé 1990).

Zu lang sollten die eingesetzten Antisense-Oligonukleotide jedoch auch nicht sein: Längere Oligonukleotide besitzen zwar eine höhere Affinität und Selektivität zur Zielsequenz, gleichzeitig steigt aber auch die Gefahr einer Anlagerung an ähnliche Sequenzen, womit die Spezifität der Wirkung verloren geht (Milligan et al. 1993). An HeLa-Zellen wurde der Einfluss von Oligonukleotiden auf die Ha-ras-Expression untersucht. Dabei wurden Antisense-Sequenzen mit Längen von 5 bis 25 Basen am Wildtyp sowie an einem punktmultierten Stamm untersucht. Es zeigte sich, dass ein Antisenseeffekt erst ab einem 15mer eintrat. Bei Einsatz eines 17mers war die selektive Inhibition der Ha-ras-Expression des punktmultierten Stammes im Gegensatz zum Wildtyp am deutlichsten. Dagegen führte das 19mer einerseits zu einer ebenfalls stark verminderten Expression, andererseits wies es aber eine geringere Selektivität auf, da es sowohl Wildtyp als auch Mutante hemmte (Monia et al. 1992).

1.5.2.2 Auswahl geeigneter Antisense-Sequenzen

Antisense-Oligonukleotide sollten aus mindesten 15 Basen bestehen, um hinreichend spezifisch mit der Zielsequenz zu hybridisieren. Mit Ausnahme von α -Anomeren erfolgt die Hybridisierung antiparallel (Gagnor et al. 1989). Je länger eine Antisense-Sequenz ist, desto stabiler ist die entstehende Duplexformation; andererseits nimmt die

Selektivität wegen der zunehmenden Gefahr der Bildung falscher Basenpaarungen (*mismatches*) ab.

Das AUG-Triplett codiert für Methionin und initiiert die Translation, weshalb dieses Codon häufig als Zielregion für die Anlagerung oder Überlappung von Antisense-Oligonukleotiden an mRNA gewählt wird. Des Weiteren sind Cap- oder Splice-Regionen von Vorläufer-mRNA wirksame Zielsequenzen. Dagegen sind solche Antisense-Sequenzen wenig effektiv, die sich an 3'- oder 5'-nichttranslatierende Bereiche anlagern; vermutlich überlagern sich dabei Proteine, die andere Moleküle sterisch behindern (Marcus-Sekura 1988).

Im Allgemeinen ist es wenig effizient, Oligonukleotide einzusetzen, die antisense gegen translatierende Bereiche in großer Entfernung vom Startcodon gerichtet sind. In wenigen Fällen waren derartige Experimente dennoch erfolgreich (Kleuss et al. 1991).

In vitro lassen sich potenzielle geeignete Antisense-Sequenzen screenen durch mRNA-Hybridisierungs-Assays (Goodchild et al. 1988), Retikulozyten-Lysate (Chen et al. 1996) oder *Xenopus laevis*-Oozyten (Cazenave et al. 1989, Woolf et al. 1992).

1.5.3 Nukleinsäure-Enzyme

Proteine sind nicht die einzigen Substanzen mit enzymatischer Aktivität, obwohl dies lange Zeit angenommen wurde. Eine weitere Klasse von Enzymen stellen die als Ribozyme bezeichneten RNA-Enzyme dar, deren katalytische Wirkung eine lagespezifische Spaltung von sich selbst oder anderen Ribonukleinsäuren oder eine Autoligation bewirkt. Bei Transkripten der rRNA-Gene des Ciliaten *Tetrahymena thermophila* wurde diese Eigenschaft der Ribozyme erstmalig beschrieben (Cech et al. 1981). RNA-Enzyme binden ihr Substrat zwar mit hoher Spezifität und Affinität, besitzen jedoch nur eine geringe Katalysegeschwindigkeit: Im Gegensatz zu Proteinen finden nur wenige Umsätze pro Minute statt. Durch die von RNA-Enzymen katalysierte Spaltung wird die Phosphodiestergruppe dieses Katalysators umgeestert; dadurch entstehen eine freie 5'-OH-Gruppe und eine 2',3'-cyclische Phosphatgruppe. Kofaktoren der Reaktion sind zweiwertige Kationen (Scott und Klug 1996, Lewin et al. 1998).

Bislang kennt man sechs Klassen natürlich vorkommender Ribozyme: Gruppe I-Introns, RNA-Komponenten der RNase P, das Neurospora-Ribozym, Axtkopf-Ribozyme (*axehead ribozymes*) des Hepatitis-Delta-Virus, Haarnadel-Ribozyme (*hairpin ribozymes*) und Hammerkopf-Ribozyme (*hammerhead ribozymes*) (Curcio et al. 1997). Nach klassischer Definition gehen Katalysatoren unverändert aus einer Reaktion hervor. Ribozyme entsprechen dieser Definition nicht, da sie alle - mit Ausnahme der RNase P - in *cis* und damit intramolekular sich selbst spalten. Damit handelt es sich bei dem durch Ribozyme vermittelten Prozess um eine Quasi- oder Autokatalyse (Cech und Bass

1986, Bramlage und Eckstein 1997). Inzwischen wurden jedoch *trans*-aktive Ribozyme entwickelt, die fremde RNA intermolekular spalten und danach für weitere Spaltungsreaktionen zur Verfügung stehen, so dass therapeutische Anwendungen möglich sind (Marschall et al. 1994, Kijima et al. 1995, Beck und Nassal 1995, James et al. 1996).

Zur Zeit sind Hammerkopf-Ribozyme die am besten untersuchten RNA-Enzyme, die exogen oder endogen appliziert wurden. Bei exogener Applikation wird das Ribozym außerhalb der Zelle in natürlicher oder derivatisierter, chemisch stabilerer Form synthetisiert und anschließend extrazellulär zugeführt. Die Aufnahme in Zellen ist dabei sehr gering und kann entweder durch hohe Ribozym-Konzentrationen oder den Zusatz von Hilfsmitteln wie kationischen Lipiden gesteigert werden. Allerdings werden exogen verabreichte Ribozyme rasch enzymatisch abgebaut. Erhöhen lässt sich die Stabilität gegenüber Ribonukleasen durch verschiedene Derivatisierungen. So können an der 2'-Position der Ribose z.B. Methyl-, Amino-, Allyl- oder Fluorgruppen eingeführt werden oder Phosphodiester durch Phosphorothioate ersetzt werden. Phosphorothioate führen jedoch an einigen Stellen zum Verlust der enzymatischen Aktivität. Des Weiteren kann die Ribose durch Desoxyribose ersetzt werden, wodurch Chimären mit teilweise höherer Aktivität entstehen (Kashani-Sabet und Scanlon 1995, Eckstein 1996, Zhenodarova 1998).

Um Ribozyme endogen zu applizieren, werden sie mittels Vektorsystemen wie Adeno- oder Retroviren über ein Plasmid in die zu behandelnde Zelle transfiziert und dort vom zelleigenen Synthesepapparat exprimiert (Marschall et al. 1994, Marr 1996, Bramlage und Eckstein 1997, Irie et al. 1997).

Haarnadel-Ribozyme unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Spaltungseigenschaften und -bedingungen nicht sehr von Hammerkopf-Ribozymen und werden deshalb ebenfalls für therapeutische Anwendungen diskutiert. Hinsichtlich einer *in vivo*-Applikation sind sie zur Zeit jedoch weniger gut charakterisiert (Burke 1996, Earnshaw und Gaith 1997).

1.5.4 Aptamere und Nonantisense-Effekte

Oligonukleotide können nicht nur an Nucleinsäuren, sondern auch an Proteine und sogar strukturell völlig anders geartete, niedermolekulare Substanzen wie Theophyllin oder Ribosom-Untereinheiten binden. Im Falle einer Bindung an Proteine spricht man vom „Sense-Effekt“ (Hélène und Thoulmé 1990). Sequenzen, die hochaffin an andere Moleküle anlagern, werden als Aptamere bezeichnet. Selektivität, Spezifität und Dissoziationskonstanten dieser Bindungen sind denen von Antikörpern ähnlich (Xu und Ellington 1996).

In Zellsystemen wurden bisher aptamere Eigenschaften von Phosphodiestern, Phosphorothioaten und RNA-Transkripten untersucht (Stull und Szoka 1995). *In vivo*

und *in vitro* zeigen einige Antisense-Oligonukleotide Effekte, die auf Wechselwirkungen mit Proteinen zurückzuführen sind und als Nonantisense-Effekte bezeichnet werden (Stein und Krieg 1994). Bei Phosphorothioaten wurden derartige Nonantisense-Effekte häufiger beobachtet als bei Phosphodiestern (Cazenave et al. 1989), da die erstgenannten Oligonukleotid-Derivate stärker mit Proteinen wechselwirken (Tonkinson et al. 1994, Srinivasan et al. 1995). Im Vergleich zu Antisense-Effekten treten Nonantisense-Wirkungen jedoch meist erst bei signifikant höheren Oligonukleotid-Konzentrationen auf (Mirabelli et al. 1991).

Antisense-Effekte können durch sequenzunabhängige, strukturspezifische und sequenzabhängige Bindungen entstehen. Sequenzunabhängig ist die Wechselwirkung beispielweise bei der Inhibierung zellulärer und viraler Polymerasen und anderen Enzymen sowie bei der Interaktion mit Serumalbumin (Crooke und Bennett 1996). Dagegen wurden sequenzabhängige Wechselwirkungen z.B. mit Typ II Phospholipase A₂, dem Interferon- γ -Rezeptor, dem Glycoprotein gp120 des HI-Virus und der Stickstoffmonoxid-Synthetase NOS beobachtet (Crooke und Bennett 1996, Arima et al. 1997). In manchen Fällen ging die Sequenzabhängigkeit mit einer Strukturspezifität einher: Es kam zur Bildung sog. G-Quartettstrukturen. Sie entstehen, wenn sich vier Oligonukleotide, die jeweils vier aufeinander folgende Guaninbasen tragen, intermolekular unter Ausbildung zusätzlicher Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Guaninmolekülen zusammen lagern.

Um geeignete Aptamere zu finden, werden zunächst mit Hilfe von Random-Primern und Polymerase-Kettenreaktion viele verschiedene Oligonukleotide synthetisiert. Sie werden anschließend über eine feste Säulenmatrix geleitet, auf der die zu bindende Substanz aufgebracht ist. Affine Oligonukleotide haften an der Matrix, nicht affine passieren die Säule. Die an die Zielsubstanz gebundenen Oligonukleotide werden danach eluiert und amplifiziert. Durch Wiederholung aller Schritte können hochaffine Oligonukleotide gewonnen werden. Diese *in vitro*-Methode ist als SELEX-Verfahren bekannt (Systematic evolution of ligands by exponential enrichment). Vorteil des SELEX-Verfahrens gegenüber klassischen Methoden der Entwicklung von Diagnostika und Therapeutika ist die hohe Automatisierbarkeit der Methode, gepaart mit Systematik und Effizienz (Ellington und Szostak 1990, Gold 1995).

1.6 *In vivo*-Stabilität und Pharmakokinetik der Oligonukleotide

Oligonukleotid-Phosphodiester weisen eine schnelle Plasmaclearance auf und reichern sich nach *i.v.*-Injektion rasch in Niere, Blut, Herz, Leber, Lunge und Milz an (Sands et al. 1994). In allen Organen außer der Milz nahm die Konzentration eines 20mer-Phosphodiesters rasch ab; in der Milz blieb der Oligonukleotid-Gehalt über 24 h relativ hoch. Für eine therapeutische Anwendung erscheinen unmodifizierte Oligonukleotid-

Phosphodiester jedoch ungeeignet, da sie Organ-abhängig innerhalb von 30 Minuten bis 4 Stunden nach Applikation quantitativ zu monomeren Nukleotiden abgebaut werden. Dagegen sind modifizierte Oligonukleotide *in vivo* lange stabil: die Konzentration eines 15mer-Methylphosphonats blieb in isoliert perfundierten Rattenlebern über 2 h konstant. Unter den selben Bedingungen wurde das strukturhomologe Phosphorothioat zwar langsam eliminiert, blieb dabei aber intakt (Nolting et al. 1997). Eine weitere Arbeitsgruppe untersuchte die zelluläre Verteilung von *i.v.* applizierten 20mer Phosphorothioaten, die komplementär zu verschiedenen Sequenzabschnitten des humanen Papilloma-Virus waren (Butler et al. 1997), an Ratten und Mäusen. Detektiert wurden die Phosphorothioate mittels dreier Methoden: Immunhistochemie mit einem monoklonalen Antikörper, der das jeweilige 20mer erkannte, direkte Fluoreszenzmikroskopie der 20mere, die zuvor an Rhodamin konjugiert worden waren, sowie Autoradiographie der ¹⁴C-markierten 20mere. Die höchsten Substratkonzentrationen traten innerhalb von 2 h in Leber, Niere, Milz, Muskel, Knochenmark und Haut auf, wobei die Oligonukleotide in intakter Form vorlagen. 24 h nach Injektion waren in den meisten Organen noch mehr als 50 % der applizierten Substanz intakt; bei den Hauptmetaboliten handelte es sich um verkürzte Oligonukleotide. Die biologische Halbwertszeit variierte von Organ zu Organ, weshalb die zeitabhängige Verteilung der Oligonukleotide auf die einzelnen Zelltypen innerhalb eines Organs sowie die Signalintensitäten von Organ zu Organ sehr verschieden waren. Die höchsten Oligonukleotid-Konzentrationen wurden in der Niere gefunden; die (schwerere) Leber nahm jedoch den größten Anteil der jeweils injizierten Substanz auf. Innerhalb der Leber ergaben Fluoreszenzmikroskopie und Immunfärbung, dass Kupfferzellen, Endothelzellen und Hepatozyten Oligonukleotide enthielten, wobei die höchsten Konzentrationen in den Kupfferzellen gefunden wurden. In Hepatozyten und Kupfferzellen konnten 2 h nach Applikation gut definierte fluoreszierende und immungefärbte Vesikel sichtbar gemacht werden. Untersuchungen der Zellkerne ergaben messbare Oligonukleotid-Konzentrationen im Falle der Kupfferzellen, während in den Nuclei der Hepatozyten keine Phosphorothioate gefunden wurden. Eine subzelluläre Lokalisation der Oligonukleotide war in den Endothelzellen auf Grund ihrer geringen Größe nicht möglich. Einen Tag nach Injektion der Substanzen waren in den Kupfferzellen immer noch hohe Konzentrationen messbar; in Hepatozyten und Endothelzellen hatten sie dagegen deutlich abgenommen. Ähnliche Ergebnisse fanden Yu et al., die die Verteilung eines 20mer Phosphorothioates in der Mäuseleber untersuchten (Yu et al. 2001). Das von ihnen verwendete Phosphorothioat war antisense gegen die murine Fas mRNA und enthielt 2'-O-(2-Methoxy)ethyl-Gruppen an den fünf Nukleotiden des 3'- und des 5'-Terminus. Das Oligonukleotid wurde mehrfach subkutan injiziert. Nach jeder Applikation wurde die Maximalkonzentration in

Hepatozyten schneller erreicht als in Kupfferzellen; Hepatozyten schieden das Oligonukleotid jedoch auch bedeutend schneller wieder aus.

Untersuchungen zur Konzentrationsabhängigkeit der Verteilung von Oligonukleotiden innerhalb der Leber zeigten, dass die Aufnahme eines 21mer Phosphorothioates in Nichtparenchymzellen sättigbar war: Wurden Ratten Dosen von weniger als 25 mg Oligonukleotid /kg KGW i.v. verabreicht, so wurden über 80 % der in der Leber gefundenen Dosis von Kupffer- und Endothelzellen aufgenommen, wobei nur wenig Substrat im Nucleus der Kupfferzellen lokalisiert war. Nach Applikation höherer Dosen nahm die Oligonukleotidmenge in den Nichtparenchymzellen nicht weiter zu, sondern stieg nur noch in den Hepatozyten. Der Anstieg erfolgte gleichmäßig in allen Zellkompartimenten inklusive des Nucleus (Graham et al. 1998).

Eine Sättigbarkeit der Oligonukleotidaufnahme wurde auch von Bijsterbosch et al. berichtet. Die i.v.-Applikation verschiedener Konzentrationen eines 21mer Phosphorothioates, das antisense gegen murines ICAM-1 ist, ergab sättigbare Aufnahmen in Leber, Milz, Knochenmark und Niere. Über 50 % des in der Leber lokalisierten Oligonukleotids wurden in Endothelzellen gefunden. Nach Präinjektion von Polyinosin nahm die Oligonukleotid-Aufnahme in Leber und Knochenmark signifikant ab, während Polyadenin keinen solchen Effekt hatte. In der Niere ergaben sich umgekehrte Effekte. Polyinosin ist ein Substrat des Scavenger-Rezeptors der Leber-Endothelzellen, Polyadenin hat eine hohe Affinität zu renalen Scavenger-Rezeptoren. Die Beteiligung von Scavenger-Rezeptoren an Aufnahme und Ausscheidung von Oligonukleotiden erscheint daher wahrscheinlich (Bijsterbosch et al. 1997). Dieser Befund wird weiter erhärtet durch Untersuchungen an mutierten Mäusen, die den Scavenger-Rezeptor nicht besitzen (Butler et al. 2000). Die zelluläre Verteilung von Phosphorothioat-Oligonukleotiden in diesen Mäusen glich derjenigen im Wildtyp. Kupfferzellen in mutierten Mäusen enthielten rund 25 % weniger Oligonukleotid als der Wildtyp. Dagegen war bei den peritonealen Makrophagen, die im Wildtyp ebenfalls einen Scavenger-Rezeptor enthalten, kein signifikanter Unterschied festzustellen. Butler et al. schlossen daraus, dass Scavenger-Rezeptoren bei der Verteilung von Oligonukleotiden zwar eine gewisse Rolle spielen, anderen Faktoren aber eine größere Rolle zukommt.

1.7 Ziele der Arbeit

Oligonukleotide sind ein attraktiver Ausgangspunkt für die Entwicklung neuer Behandlungsmethoden für Erkrankungen, die bislang nicht oder nur schwer therapierbar sind. Hierzu zählen beispielsweise einige virale Infektionen wie Hepatitis, ferner manche genetische bedingte und Tumorerkrankungen. Allerdings ist die zelluläre Aufnahme von Oligonukleotiden häufig unbefriedigend, so dass nach Möglichkeiten ihrer verbesserten Aufnahme in Cytosol und Nucleus gesucht wird.

Im Hinblick auf eine verbesserte Aufnahme von Therapeutika in Parenchymzellen der Leber ist dies bereits gelungen: So wurden verschiedene Arzneistoffe, darunter HMG-CoA-Reduktasehemmer oder Chlorambucil, durch Konjugation mit Gallensäuren deutlich besser von Hepatozyten aufgenommen, als dies bei den unkonjugierten Ausgangssubstanzen der Fall war. Die Gallensäurekonjugation führte außerdem zu einem Gallensäurecarrier-vermittelten Aufnahmemechanismus (Kramer et al. 1992, Petzinger et al. 1995, Kullak-Ublick et al. 1997). Dieses Prinzip ließ sich auch auf die strukturell und biophysikalisch völlig anders gearteten Oligonukleotide übertragen (Pagels 1999, Starke 1999, Starke et al. 2001).

Antisense-Effekte ließen sich bislang nur bei Oligonukleotid-Phosphodiestern und einigen Oligonukleotid-Phosphorothioat-Derivaten beobachten (Milligan et al. 1993, Matteuci und Wagner 1996). Dabei eigneten sich *Xenopus laevis*-Oozyten als Screening-Methode (Cazenave et al. 1989, Woolf et al. 1992). Es war nicht bekannt, ob dieser Effekt auch dann noch eintritt, wenn Phosphorothioate als Gallensäurederivate vorlagen.

Die Leber stellt ein Hauptorgan für die Clearance von Oligonukleotiden dar. Dabei spielen sowohl Nichtparenchymzellen als auch Parenchymzellen eine Rolle. Es konnte gezeigt werden, dass Oligonukleotide nach i.v.-Applikation in Hepatozyten gelangen (Nolting et al. 1997, Graham et al. 1998). Ein enterohepatischer Kreislauf wurde auch für Oligonukleotide nachgewiesen (Agrawal und Zhao 1998); er ist ohne Passage durch die Leberparenchymzellen nicht möglich (Kramer und Wess 1996).

In bisherigen Arbeiten wurde gezeigt, dass Oligonukleotide und Gallensäure-Oligonukleotid-Konjugate nach i.v.-Injektion in die Galle ausgeschieden werden, wobei die Konjugate in höherem Maße biliär sezerniert werden als die unkonjugierten Oligonukleotide (Starke 1999, Starke et al. 2001). Dabei schieden Wistarratten signifikant größere Mengen der Oligonukleotide oder ihrer Gallensäurederivate aus als TR⁻-Ratten (Starke 1999). Es war deshalb anzunehmen, dass der canalikuläre Transporter *mrp2*, der TR⁻-Ratten fehlt, bei der Ausscheidung von Oligonukleotiden und ihren Derivaten eine wichtige Rolle spielt.

In der vorliegenden Arbeit waren daher folgende Aspekte zu untersuchen:

- Sind Oligonukleotide und ihre Gallensäurederivate physikochemisch und *in vivo* hinreichend lange stabil, um eine pharmakologische Wirkung ausüben zu können?
- Lassen sich pharmakokinetische Parameter der biliären Elimination von Oligonukleotiden und ihren Gallensäure-Derivaten durch Substrate bestimmter Hepatozyten-Carrier beeinflussen?
- Beeinflussen Substrate von Hepatozyten-Carriern die Pharmakokinetik von Oligonukleotid-Konjugaten und unmodifizierten Oligonukleotiden in gleicher Weise? Welchen Einfluss hat der gewählte Rattenstamm?

- Eignen sich Gallensäure-konjugierte Phosphorothioate prinzipiell für Antisense-Therapien?

Um diese Fragestellung zu bearbeiten, wurden verschiedene Mixed backbone-Oligonukleotide mit und ohne Gallensäurekonjugation als Modellsubstrate eingesetzt. Als in vivo-Modelle für die Galleausscheidungsversuche dienten männliche Wistar- und TR⁻-Ratten. Die Antisense-Versuche wurden an *Xenopus laevis*-Oozyten durchgeführt.

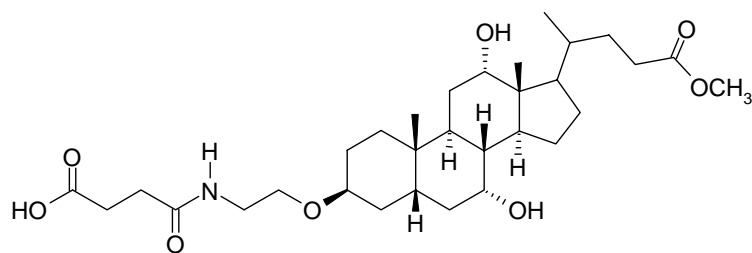
2 Material

2.1 Versuchstiere und Zellkulturen

Für die in situ-Galleausscheidungsversuche wurden männliche Wistar- und GY/TR-Ratten aus institutseigener Zucht eingesetzt (vgl. Kap. 1.2.4, S. 11). Die Ratten beider Stämme waren 8-14 Wochen alt; ihre Körpermasse betrug 170 bis 340 g. Alle Ratten erhielten Altromin[®]-Standardfutter für Mäuse und Ratten sowie Trinkwasser ad libitum. Für die Expressionsversuche an *Xenopus laevis*-Oozyten wurden weibliche afrikanische Krallenfrösche eingesetzt, die von der Medizinischen Tierversuchsanstalt Hamburg-Eppendorf bezogen wurden. Die Frösche erhielten Spezialfutter für *Xenopus laevis*. Für die Transportstudien an canaliculären inside-out Membranvesikeln wurden HEK 293-Zellen verwendet. Sie wurden freundlicherweise von Prof. Dr. D. Keppler, Heidelberg, zur Verfügung gestellt. Es wurden zwei Stämme eingesetzt (Jedlitschky 1999): HEK K0 (Wildtyp) und HEK Ca1 (stabil MRP2-transfizierte HEK-Zellen).

2.2 Gallensäurederivate

Zur Kopplung an Oligonukleotide wurde das Bernsteinsäuremonoamid des 3 β -(2-Aminoethoxy)-7 α ,12 α -dihydroxy-5 β -cholansäuremethylesters eingesetzt (GS-C₂-Amid):

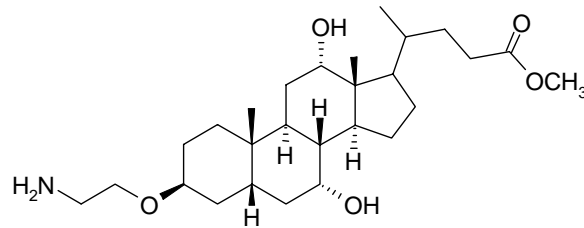


"GS-C₂-Amid"
M = 565,74 g/mol

Abb. 2.1: Bernsteinsäuremonoamid des 3 β -(2-Aminoethoxy)-7 α ,12 α -dihydroxy-5 β -cholansäuremethylesters

Das GS-C₂-Amid wurde über eine Mehrstufensynthese aus 3 β -(2-Hydroxyethoxy)-7 α ,12 α -dihydroxy-5 β -cholansäuremethylester (GS-C₂-Alkohol) hergestellt. Der GS-C₂-Alkohol wurde dankenswerterweise von Herrn Dr. G. Wess, Aventis Pharma Deutschland, zur Verfügung gestellt. Diese Substanz wurde nach der von Wess und Mitarbeitern beschriebenen Methode (Wess et al. 1992, Wess et al. 1993) zunächst zum

3 β -(2-Aminoethoxy)-7 α ,12 α -dihydroxy-5 β -cholansäuremethylester (GS-C₂-Amin) und anschließend zum GS-C₂-Amid umgesetzt (Starke et al. 2001). Beim GS-C₂-Amin handelt es sich im Gegensatz zum GS-C₂-Amid um eine längere Zeit unzersetzt lagerfähige Verbindung.



"GS-C₂-Amin"
M = 465,7 g/mol

Abb. 2.2: β -(2-Aminoethoxy)-7 α ,12 α -dihydroxy-5 β -cholansäuremethylester (GS-C₂-Amin)

Das GS-C₂-Amin wurde bei Bedarf unmittelbar vor der Darstellung von Gallensäure-Oligonukleotid-Konjugaten zum Amid umgesetzt.

2.3 Oligonukleotide

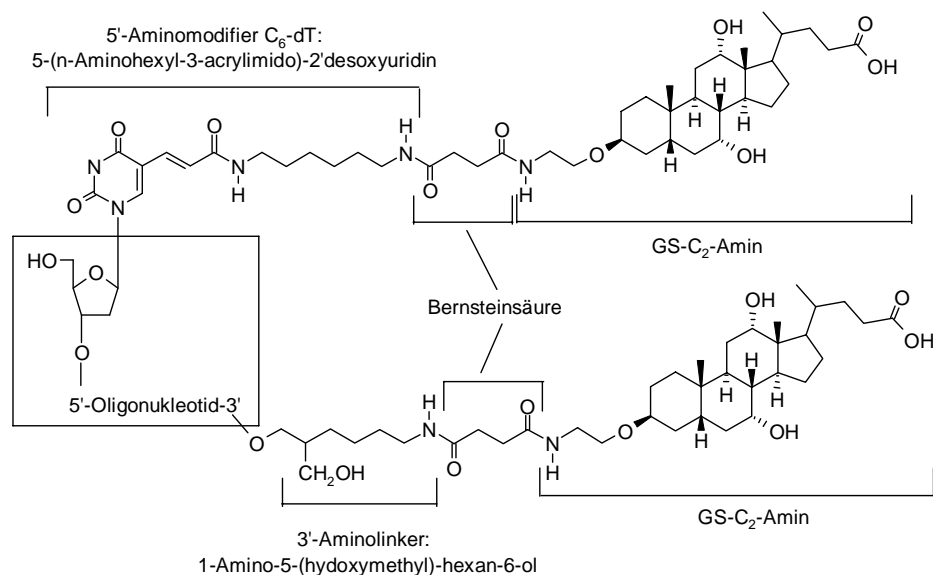


Abb. 2.3: Struktur der doppelt konjugierten Oligonukleotide. Die für die Synthese bedeutsamen Bestandteile wurden hervorgehoben. An der 5'-Position des Oligonukleotids (Kasten) wurde die terminale Desoxyribose des Oligonukleotids mit eingezeichnet.

Sowohl bei den in situ-Galleausscheidungsversuchen als auch bei den Antisense-Studien an *Xenopus laevis*-Oozyten wurden unmodifizierte und 3',5'-modifizierte

Oligonukleotide eingesetzt. Bei der 3'-Modifikation handelte es sich um 1-Amino-5-(hydroxymethyl)-hexan-6-ol, bei der 5'-Modifikation um 5-(N-Aminoethyl-3-acrylimido)-2'-desoxyuridin. Diese Modifikationen mit primären Aminogruppen ermöglichten die Kopplung der Oligonukleotide an die Gallensäurederivate.

Für die in situ-Galleausscheidungsversuche wurde ein 15mer-Oligonukleotid mit der Sequenz 5'-GsGsTs TGCs CAst GGTs CsCsC-3' zu Grunde gelegt. Bei diesem Modellmolekül handelt es sich um eine Sequenz aus dem Gen des humanen basischen Fibroblasten-Wachstumsfaktors bFGF. Sie ist weder selbstkomplementär noch komplementär zu bekannten Sequenzen aus dem Rattengenom. In allen hier angegebenen Sequenzen steht „s“ für die Substitution einer Phosphodiestergruppe durch eine Phosphorothioatgruppe. Phosphorothioate erhöhen die Stabilität der Oligonukleotide gegenüber Nukleasen. Dabei erhöhen die terminalen Phosphorothioate die Stabilität gegenüber Exonukleasen; die internen schützen vor dem durch Endonukleasen verursachten Angriff. Um Bindungseffekte zu vermeiden, wurden keine Homophosphorothioate eingesetzt.

In den Galleausscheidungsversuchen wurden das 15mer in unmodifizierter Form (n-ODN) sowie das entsprechende 3',5'-Bis-Gallensäurekonjugat (2G-ODN) verwendet.

Die Untersuchungen an *Xenopus laevis*-Oozyten sollten zeigen, ob und durch welche Oligonukleotide die Expression des basolateralen Transporters Ntcp der Ratte beeinflusst wird. Dieses *Natrium-dependent taurocholate co-transporting polypeptide* transportiert physiologische Gallensäuren wie Cholat, Taurocholat, Taurochenodeoxycholat und Tauroursodeoxycholat in Abhängigkeit von einem Natrium-Gradienten durch die basolaterale Membran von Hepatozyten (Hagenbuch et al. 1991). Für die Oozytenversuche wurden folgende Oligonukleotide verwendet:

1. 20mer Antisense-Phosphodiester; Sequenz:
5'-TAA CCC ATC AGA AAG CCA GA-3'
M = 6088,2 g/mol
„20mer AS-n-ODN-DE“

Diese Sequenz ist antisense zu den Nukleotiden 815-834 des Ntcp der Ratte. Hagenbuch konnte zeigen, dass dieses Oligonukleotid die Expression des Transporters in *Xenopus laevis*-Oozyten hemmt (Hagenbuch et al. 1996).

2. 3',5'-modifizierter Antisense-Phosphodiester mit 2 Gallensäuremolekülen; Sequenz:
Y-5'-TAA CCC ATC AGA AAG CCA GA-3'-X
M = 7485,4 g/mol
„20mer AS-2G-ODN-DE“

Die Nukleotidsequenz war dieselbe wie die von Oligo 1. Für die Oozytenversuche wurde das Bis-Gallensäure-Konjugat von Oligo 2 verwendet.

3. 20mer Antisense-Phosphorothioat; Sequenz:
5'-TsAsAs CCCs ATCs AGsA AAsG CCsAs GsA-3'
M = 6249,0 g/mol
„20mer AS-n-ODN“

Bei dieser Substanz wurde die Sequenz von Oligo 1 beibehalten, es wurden jedoch Phosphorothioatmodifikationen eingeführt.

4. 3',5'-modifiziertes 20mer Antisense-Phosphorothioat mit 2 Gallensäuremolekülen;
Sequenz:
Y-5'-TsAsAs CCCs ATCs AGsA AAsG CCsAs GsA-3'-X
M = 6550,1 g/mol
„20mer AS-2G-ODN“

Sequenz und Backbone-Modifikation entsprachen Oligo 3. Für die Oozytenversuche wurde das Bis-Gallensäure-Konjugat von Oligo 4 verwendet.

5. 20mer Sense-Phosphodiester; Sequenz:
5'-GGC ATT ATG ATA TCA CTA GT-3'
M = 6131,1 g/mol
„20mer Sense-n-ODN“

Diese Sequenz verhält sich sense zu den Nukleotiden 593-612 des Ntcp der Ratte (Hagenbuch et al. 1996).

6. 15mer Phosphorothioat (vgl. Galleausscheidung); Sequenz:
5'-GsGsTs TGCs CAsT GGTs CsCsC-3'
M = 4545,0 g/mol
„n-ODN“

7. 3',5'-modifiziertes 15mer Phosphorothioat mit 2 Gallensäuremolekülen (vgl. Galleausscheidung); Sequenz:
Y-5'-GsGsTs TGCs CAsT GGTs CsCsC-3'-X
M = 4847,0 g/mol
„2G-ODN“

Bei X und Y handelt es sich um die beiden oben angegebenen 3'- bzw. 5'-Modifikationen. Die Oligonukleotide 1, 2, 4 und 5 stammten von TIB Molbiol, Berlin, die Oligonukleotide 3 und 6 und das 3',5'-modifizierte 15mer Phosphorothioat von Biospring, Frankfurt; die oben aufgeführten Molekülmassen wurden den Produktbeschreibungen der Hersteller entnommen. Das 3',5'-modifizierte 15mer Phosphorothioat wurde anschließend zum 2G-ODN umgesetzt (s. Kap. 3.2, S. 54 ff.).

Für die Transportstudien an canaliculären inside-out Membranvesikeln wurde das 15mer Phosphorothioat (n-ODN) verwendet.

2.4 Substrate canaliculärer Transporter

Durch Konjugation mit Gallensäuren verändern sich die kinetischen Eigenschaften von Oligonukleotiden signifikant (Starke 1999). Des Weiteren ist die hepatobiliäre Ausscheidung von Oligonukleotiden und Gallensäure-Oligonukleotid-Konjugaten abhängig vom Rattenstamm. Bei Wistarratten resultiert die fraktionierte Ausscheidung unabhängig vom Oligoderivat nach ca. 8 min in einem Peak, der bei TR⁻-Ratten nicht auftritt. Die absolute Exkretion ist bei TR⁻-Ratten gegenüber Wistarratten stark vermindert. Diese Befunde (Starke 1999) deuten an, dass bei der biliären Ausscheidung von Oligonukleotiden der canaliculäre Transporter mrp2 beteiligt ist, den TR⁻-Ratten nicht besitzen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die in situ-Galleausscheidung des 15mer Phosphorothioates (n-ODN) und des 3',5'-modifizierten 15mer Phosphorothioates mit zwei Gallensäuremolekülen (2G-ODN) nach vorheriger Applikation verschiedener mrp2-Substrate untersucht. Unter der Voraussetzung, dass Oligonukleotide den mrp2-Transporter benutzen, sollten mrp2-Substrate ihre Ausscheidung verhindern. Die hepatobiliäre Elimination von Substraten anderer Transporter sollte dagegen durch mrp2-Substrate nicht beeinflusst werden.

Eingesetzt wurden folgende Substanzen:

- BSP-Na-Salz (Merck, Darmstadt). BSP (vgl. Abb. 1.6, S. 16) dient zur Prüfung der exkretorischen Leberfunktion (Wheeler et al. 1960) und wird über den mrp2 in die Galle ausgeschieden (Jäger et al. 1997).
- Taurocholat (Sigma, Deisenhofen) und [³H]-Taurocholat (Amersham, Braunschweig) ist eine natürliche Gallensäure, die über Ntcp und oatp1 sinusoidal aufgenommen und via Bsep canaliculär sezerniert wird (Kullak-Ublick et al. 2001), vgl. Abb. 1.5, S. 14.
- MK 571, ein selektiver Leukotrien-D₄-Rezeptor-Antagonist (Alexis Deutschland GmbH, Grünberg) und Substrat des humanen MRP1 und des mrp2 der Ratte, (Keppler und Kartenbeck 1996, Walle et al. 1999a), vgl. Abb. 1.10, S. 23.
- S 3025, ein Glucose-6-Phosphatase-Translocase-Inhibitor (Aventis Pharma Deutschland, Frankfurt; Herling et al. 2002), vgl. Abb. 1.8, S. 19.
- CDNB (ICN, Aurora /Ohio, USA). CDNB wird binnen ca. 10 min in vivo quantitativ Glutathion-konjugiert (Oude Elferink et al. 1989a). Das Glutathionkonjugat des CDNB besitzt eine hohe Affinität zum mrp2 (Keppler und Kartenbeck 1996), vgl. Abb. 1.9, S. 20.

- Sirolimus (Rapamune[®]) (vgl. Abb. 1.11, S. 26). Die Injektionslösung mit 1 mg Wirkstoff/ml Fettgemisch wurde freundlicherweise von Prof. V. Kaever, MHH Hannover, zur Verfügung gestellt.
Das mdr1-Pgp-Substrat Sirolimus wirkt cholestatisch und vermindert die biliäre Ausscheidung von Glutathion, wohingegen es die Exkretion von Cholesterol und Gallensäuresalzen nicht beeinflusst (Deters et al. 2001).

2.5 Chemikalien

[³ H]-Taurocholat	Amersham, Braunschweig
[γ - ³² P]-ATP	Amersham, Braunschweig
[γ - ³⁵ S]-ATP	Amersham, Braunschweig
Acrylamid 2x	Serva, Heidelberg
Acrylamid-/Bisacrylamidlösung (30%, 0,8%) (Rotiphorese [®] Gel 30)	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Serva, Heidelberg
Bernsteinsäureanhydrid	Sigma, Deisenhofen
Borsäure p.a.	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau Na-Salz reinst.	Serva, Heidelberg
Cer-(IV)-sulfat-tetrahydrat (Ce(SO ₄) ₂ *4H ₂ O)	Merck, Darmstadt
Chloroform	Reidel de Haën, Seelze
Cholin	Sigma, Deisenhofen
Collagenase D aus Clostridium histolyticum	Boehringer, Mannheim
Dimethylformamid (DMF) wasserfrei	Carl Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth, Karlsruhe
EDTA*2Na*2H ₂ O	Serva, Heidelberg
Fibrinkleber (Histoacryl [®])	Braun, Melsungen
Glycerin anal. grade	Serva, Heidelberg
Harnstoff	Gibco BRL, Eggenstein
Hydrazinhydrat	Institut für Organische Chemie, Gießen
Kieselgel 60, 35-70 mesh ASTM	Fluka, Neu-Ulm
Kieselgel 60, 70-230 mesh ASTM	Fluka, Neu-Ulm
Kinasepuffer 10x	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
Lyophilisator GT2	Heraeus, Hanau

Methansulfonsäurechlorid	Institut für Organische Chemie, Gießen
Molekularsieb Ø 4Å	Carl Roth, Karlsruhe
Molybdato-phosphorsäure	Merck, Darmstadt
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Serva, Heidelberg
N,N-Diisopropylethylamin (DIPEA)	Sigma, Deisenhofen
N,N-Methylenbisacrylamid 2x	Serva, Heidelberg
NICK Spin Columns (0,2 g Sephadex G-50, 3,3 ml)	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Nitrocellulosefilter (0,2 µm Porenweite, 25 mm Durchmesser)	Millipore, Bedford, USA
O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-Tetramethyluroniumtetrafluoroborat (TBTU)	Sigma, Deisenhofen
Oozyten-Injektor Wild M3Z	Wild, CH-Heerburg
Phenol	Carl Roth, Karlsruhe
Phthalimid-Kaliumsalz	Fluka, Neu-Ulm
Pyridin abs.	Merck, Darmstadt
Rotiszint Eco Puls Szintillatorflüssigkeit	Carl Roth, Karlsruhe
Spezialfutter für <i>Xenopus laevis</i> (afrikanischer Krallenfrosch)	Kähler, Hamburg
Taurocholat	Carl Roth, Karlsruhe
Tetrahydrofuran	Sigma, Deisenhofen
Triethylamin puriss. p.a.	Fluka, Neu-Ulm
Triethylammoniumbicarbonat	Sigma, Deisenhofen
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Carl Roth, Karlsruhe
Trovan Transponder ID 100	Trovan, Köln
Urethan	Sigma, Deisenhofen

Nicht genannte, aber verwendete Chemikalien wurden von Merck, Darmstadt, Serva, Heidelberg oder Sigma, Deisenhofen, sofern möglich in der Qualitätsstufe „pro analysi“ oder höher bezogen.

2.6 Puffer und Lösungen

<u>PBS-Puffer</u>		<u>Gelladepuffer</u>	
137 mM NaCl	8,01 g	Bromphenolblau	0,005 %
2,7 mM KCl	0,20 g	TBE-Puffer 1x	50 µl
0,5 mM MgCl ₂ *6H ₂ O	0,10 g	Glycerin	50 µl
3,9 mM Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O	0,69 g		
1,5 mM KH ₂ PO ₄	0,20 g	<u>Abdichtgel</u>	
pH-Korrektur mit H ₂ O/NaOH auf pH 7,4		Rotiphorese [®] -Gel 30%	2,5 ml
		H ₂ O	2,5 ml
<u>TBE-Puffer 10x</u>		TEMED	50 µl
Trisbase	108 g	10 % APS	25 µl
Borsäure	55 g		
0,5 M EDTA (pH 8,0)	40 ml	<u>Gelansatz</u>	
mit Aqua bidest. ad 1l		Trenngellösung	40 ml
		TEMED	20 µl
<u>Isotonische Kochsalzlösung</u>		10 % APS	200 µl
NaCl 0,9 % in Aqua bidest.			
<u>Trenngellösung für Polyacrylamidgel</u>		<u>3M Natriumacetat pH 5,2</u>	
<u>(30%, 0,8%)</u>		408,1 g CH ₃ COO Na*3H ₂ O in 800 ml	
Harnstoff	126 g	Aqua bidest. lösen. Mit Eisessig auf pH	
Acrylamid	60 g	5,2 bringen. Mit Aqua bidest. ad 1l.	
N,N'-Methylenbisacrylamid	6 g	<u>0,5M EDTA pH 8,0</u>	
TBE-Puffer 10x	30 g	EDTA*2Na*2H ₂ O	186,1 g
mit Aqua bidest. ad 300 ml		mit Aqua bidest. auf 800 ml, mit NaOH	
		auf pH 8,0, mit Aqua bidest. ad 1l	
<u>Szintillatorlösung</u>			
Rotiszint Eco Plus Szintillatorflüssigkeit		10,0 l	
Isopropanol		0,5 l	
Wasser		0,5 l	

<u>Molybdatophosphorsäure-Ce(IV)-sulfat-Lösung</u>		<u>Inkubationspuffer für Filteruptake</u>	
H ₂ O	9,4 ml	Sucrose	0,25 mM
Molybdatophosphorsäure	0,25 g	Tris-HCl	10 mM
Ce(SO ₄) ₂ *2H ₂ O	0,10 g	mit Aqua bidest. ad 1l, pH 7,4	
H ₂ SO ₄ conc.	0,6 ml		
<u>Transportassaymischung</u>		<u>OR2-Lösung (Ca-frei)</u>	
4 mM ATP (Kaliumsalz)	2,33 g	82,5 mM NaCl	4,82 g
10 mM Creatinphosphat (Tris-Salz)	4,53 g	5,0 mM Hepes	1,19 g
10 mM MgCl ₂	0,95 g	2,5 mM KCl	0,186 g
10 mM Tris-HCl pH 7,4	1,576 g	1,0 mM MgCl ₂ *6H ₂ O	0,2033 g
5 mM Glutathion	0,476 g	1,0 mM Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O	0,187 g
0,25 M Sucrose	85,575 g	in 900 ml Aqua bidest. lösen, mit NaOH	
Creatinphosphokinase	110 µg/µl	auf pH 7,8, dann mit Aqua bidest ad 1l	
mit Aqua bidest ad 1l			
Blindwert: ATP durch 5'-AMP ersetzen		<u>Na-Lösung für Oozyten</u>	
<u>modifizierte Barth's-Lösung</u>		100 mM NaCl	5,84 g
88 mM NaCl	5,14 g	10 mM Hepes	2,385 g
15 mM Hepes	3,57 g	2 mM KCl	0,149 g
2,4 mM NaHCO ₃	0,20 g	1 mM CaCl ₂ *2H ₂ O	0,147 g
1,0 mM KCl	0,0745 g	1 mM MgCl ₂ *6H ₂ O	0,2033 g
0,3 mM Ca(NO ₃) ₂ *4H ₂ O	0,0708 g	in 800 ml Aqua bidest. lösen, mit 1M Tris	
0,41 mM CaCl ₂ *2H ₂ O	0,0603 g	auf pH 7,5, dann mit Aqua bidest ad 1l	
0,82 mM MgSO ₄ *7H ₂ O	0,20 g	<u>Cholin-Lösung für Oozyten</u>	
in 900 ml Aqua bidest. lösen, mit NaOH		100 mM Cholinchlorid	13,96 g
auf pH 7,6, dann mit Aqua bidest ad 1l,		10 mM Hepes	2,385 g
vor Gebrauch 250 µl Barth's-Lsg. mit		2 mM KCl	0,149 g
250 µl Gentamycin versetzen		1 mM CaCl ₂ *2H ₂ O	0,147 g
		1 mM MgCl ₂ *6H ₂ O	0,2033 g
<u>Stopplösung für Oozyten</u>		in 900 ml Aqua bidest. lösen, mit 1M Tris	
1 L Cholinlösung mit 540 mg Taurocholat		auf pH 7,5, dann mit Aqua bidest ad 2l	
versetzen			
<u>SDS-Lösung für Oozyten</u>			
10% ige SDS-Lösung in Aqua bidest.			

2.7 Geräte

Desaga Spray Gun	Desaga, Heidelberg
Festphasenextraktionssäulen Varian bond Elut C ₁₈	Varian, USA
Frischhaltefolie	Melitta, Hamburg
Glasplatten für Elektrophorese	Glaskontor, Gießen
Kieselgel 60 F ₂₅₄ Dünnschichtplatten	Merck, Darmstadt
Laborzentrifuge Hettich 200	Hettich, Tuttlingen
Photometer Beckman DU 640	Beckman, USA
PTFE/Teflon [®] -Schlauch 0,6 x 0,3 mm	Bohlender, Königshofen
Rotationsverdampfer	Büchi, Schweiz
Schnellfiltrationsapparat	Millipore, Bedford, USA
Tischzentrifuge Eppendorf	Eppendorf, Hamburg
Vakuumpzentrifuge Savant Speed Vac Concentrator	Savant, USA
Videodigitizer Fröbel unter Verwendung eines UV-Sperrfilters Kodak Wratten Nr. 22 mit angeschlossenem Thermoprinter	Labortechnik Linden
Wallac 1409 Liquid Scintillation Counter	Wallac, USA
Vibrations-Handsüttler Ika VF2	Ika, Heidelberg

3 Methoden

3.1 Gallensäurederivate

3.1.1 Synthese des Gallensäure-C₂-Amins

Die Synthese des GS-C₂-Amins aus dem GS-C₂-Alkohol erfolgte nach der von Wess beschriebenen Methode (Wess et al. 1992, Wess et al. 1993).

Zu einer Lösung von 100 Volumenteilen 0,2 M GS-C₂-Alkohol in wasserfreiem Pyridin wurden bei 0°C binnen 10 min 110 Volumenteile Methansulfonsäurechlorid getropft. Diese Lösung wurde zunächst 30 min bei 0°C, dann 2 h bei Raumtemperatur nachgerührt und anschließend langsam zum zehnfachen Volumen Wasser gegeben. Der ausgefallene Niederschlag des GS-C₂-Mesylats wurde abgesaugt, einmal mit wenig Wasser nachgewaschen und im Lyophilisator getrocknet.

Innerhalb von 60 min wurden 150 Stoffmengenanteile Phthalimid-Kalium bei Raumtemperatur in eine Lösung von 100 Stoffmengenanteilen 0,3 M GS-C₂-Mesylat in wasserfreiem DMF eingetragen. Die Suspension wurde langsam auf 90°C erhitzt und 4 h bei dieser Temperatur gerührt. Nach dem Abkühlen wurde die überstehende klare Lösung des rohen GS-C₂-Phthalimids langsam zu einem zehnfachen Überschuss einer Lösung von 1 g NaH₂PO₄·H₂O pro Liter H₂O getropft. Der gebildete Niederschlag wurde 1 h bei Raumtemperatur nachgerührt, abgesaugt und im Lyophilisator getrocknet. Es wurden 100 Volumenteile absolutes Methanol vorgelegt, 0,28 M GS-C₂-Phthalimid darin gelöst und die Lösung mit 10 Volumenteilen wasserfreiem DMF gemischt. Innerhalb von 10 min wurden zu 1 Stoffmengenanteil des Phthalimids 5 Stoffmengenanteile Hydrazinhydrat bei Raumtemperatur getropft. Die klare Lösung wurde 3 h bei Raumtemperatur nachgerührt, anschließend in ca. 20 min mit 10%iger HCl leicht sauer gestellt, 30 min bei Raumtemperatur nachgerührt und filtriert. Das Filtrat wurde mit gesättigter NaHCO₃-Lösung versetzt, bis die CO₂-Entwicklung beendet war. Anschließend wurde 5 Mal mit CH₂Cl₂ extrahiert und die vereinigten organischen Extrakte über Na₂SO₄ getrocknet. Das auf diese Weise erhaltene rohe GS-C₂-Amin wurde mittels Säulenchromatographie gereinigt. Säulenbett: Kieselgel 60, 35-70 mesh / Kieselgel 60, 70-210 mesh; Elutionsgemisch: Essigsäureethylester / Methanol / Triethylamin 5:1:1 (Vol/Vol/Vol). Das Eluat des Endproduktes wurde am Rotationsverdampfer fast zur Trockene eingengt, abgesaugt, mit wenig Wasser gewaschen und im Lyophilisator getrocknet.

Identität und Reinheit aller Zwischenprodukte und des Endproduktes wurden mittels Dünnschichtchromatographie geprüft (s. 3.1.3 Dünnschichtchromatographie, S. 54).

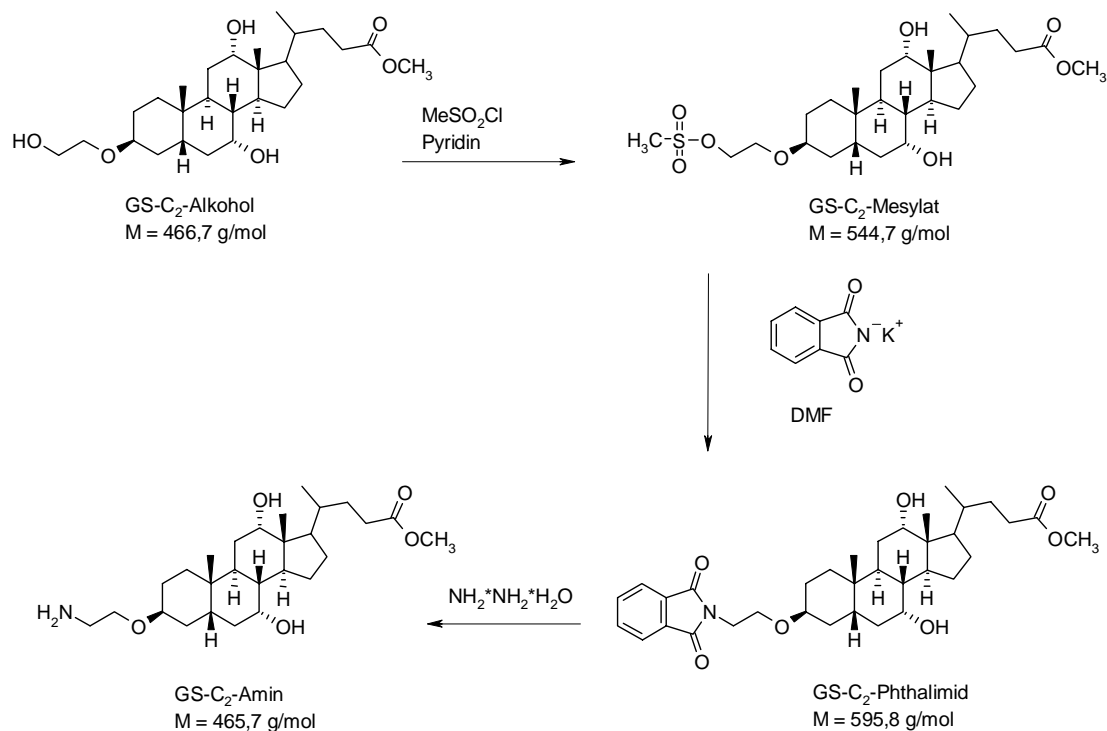


Abb. 3.1: Darstellung der Synthese des GS-C₂-Amins aus dem GS-C₂-Alkohol

3.1.2 Synthese des Gallensäure-C₂-Monoamids

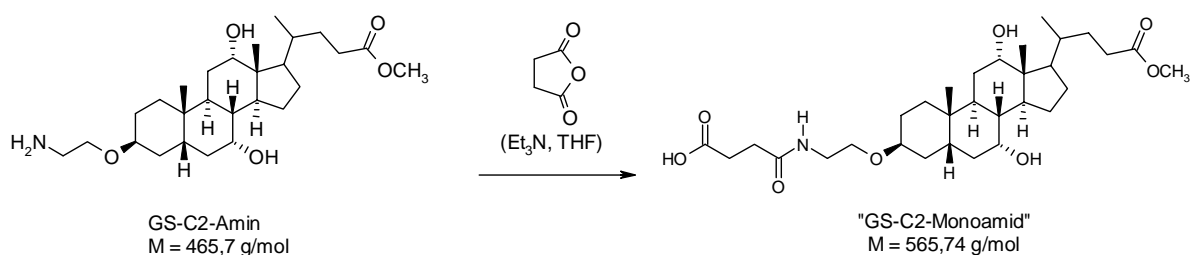


Abb. 3.2: Umsetzung des GS-C₂-Amins mit Bernsteinsäureanhydrid zum GS-C₂-Monoamid

Zu 100 Volumenteilen des 0,1 M GS-C₂-Amins in THF wurden nacheinander 1 Volumenteil Triethylamin und 100 Volumenteile einer 0,1 M Bernsteinsäureanhydridlösung in THF gegeben. Nach 10-minütigem Schütteln bei Raumtemperatur wurde der Ansatz zum fünffachen Volumen eisgekühlter 0,05 M HCl überführt. Das ausgefallene GS-C₂-Monoamid wurde abzentrifugiert, zweimal mit Eiswasser gewaschen (Pagels 1999) und im Exsikkator getrocknet. Die Kontrolle der Umsetzung

des GS-C₂-Amins zum homologen Monoamid erfolgte mittels DC (s. 3.1.3 Dünnschichtchromatographie).

3.1.3 Dünnschichtchromatographie

Der GS-C₂-Alkohol wurde über eine Mehrstufensynthese zum GS-C₂-Monoamid umgesetzt, wobei Identität und Reinheit des Eduktes, aller Zwischenprodukte und des Endproduktes dünnschichtchromatographisch überprüft wurden. Hierfür wurden 1%ige Lösungen von GS-C₂-Alkohol und GS-C₂-Mesylat in Pyridin, eine 1%ige Lösung von GS-C₂-Phthalimid in Aceton sowie 1%ige Lösungen von GS-C₂-Amin und GS-C₂-Amid in DMF hergestellt. Je 1 µl dieser Lösungen wurde mit einer Pipettenspitze auf eine Kieselgel 60 F₂₅₄-DC-Platte aufgetragen. Für die Kontrolle der drei Umsetzungsschritte vom GS-C₂-Alkohol zum GS-C₂-Amin wurde ein Laufmittelgemisch aus Essigsäureethylester/Methanol 10:1 (Vol/Vol) verwendet. Außerdem wurden die Reinheit des im Rahmen der vorliegenden Arbeit synthetisierten GS-C₂-Amins durch Vergleich mit der Reinsubstanz (Hoechst Marion Roussel, Frankfurt) sowie dessen Umsetzung zum GS-C₂-Monoamid geprüft. Bei diesen beiden Auftrennungen wurde ein Laufmittelgemisch aus Essigsäureethylester / Methanol / Triethylamin 5:1:1 (Vol/Vol/Vol) verwendet. Um die Substanzen zu detektieren, wurde das Laufmittelgemisch abgedampft und die DC-Platten mit schwefelsaurer Molybdatophosphorsäure/Cer(IV)-sulfatlösung besprüht. Die DC-Platten wurden bei 120°C im Wärmeschrank bis zum Erscheinen blauer Flecke auf gelbem Hintergrund entwickelt. Zur Auswertung wurden die R_F-Werte ermittelt; bei ihnen handelt es sich um den Quotienten der Laufstrecke einer Substanz zur Laufstrecke der Lösungsmittelfront.

3.2 Synthese von Gallensäure-Oligonukleotid-Konjugaten

Die Gallensäure-Oligonukleotid-Konjugate wurden in drei Schritten synthetisiert (Pagels 1999):

1. Kopplung des Oligonukleotids an das aktivierte GS-C₂-Amid
2. Abspaltung der Methylschutzgruppe an C₂₄ der Gallensäure
3. Radioaktive Markierung mit ³⁵S durch Kinasierung am 5'-Ende

3.2.1 Kopplung

Methoden zur Peptidsynthese in vitro bedienen sich häufig der Aktivierung bestimmter funktioneller Gruppen, um Aktivierungsenergien zu senken oder die Zusammensetzung des Produktgemisches zu steuern. In Anlehnung an diese Syntheseverfahren (Knorr et

al. 1989, Aldrian-Herrada et al. 1998) wurde die freie Carboxylgruppe des GS-C₂-Monoamids mit TBTU aktiviert. Die Umsetzung von Carbonsäuren mit Aminen zum Carbonsäureamid wird durch H⁺-Ionen gestört, weshalb die Base DIPEA zugesetzt wurde.

Zwecks Herstellung des aktivierten GS-C₂-Monoamids wurden zunächst drei Lösungen angesetzt: 0,1 M Lösungen von GS-C₂-Monoamid und TBTU sowie eine 0,4 M Lösung von DIPEA. Lösungsmittel war DMF. Gleiche Volumenteile der drei Lösungen wurden gemischt und bei Raumtemperatur 15 min zum „Aktivester“ vorinkubiert.

Gleichzeitig wurden 140 nmol des jeweiligen 3',5'-gelinkten Oligonukleotids in 12 µl H₂O und 2,4 µl Na₂CO₃-Lösung gelöst; anschließend wurden 48 µl DMF zugegeben. Diese Oligonukleotidlösung wurde für 5 min bei 95°C inkubiert und danach auf Eis abgekühlt. Daraufhin wurden 50 µl des 15 min vorinkubierten Aktivesters zur Oligonukleotidlösung pipettiert. Das Gemisch wurde 45 min bei Raumtemperatur geschüttelt, wobei die freie Carboxylgruppe des GS-C₂-Monoamids mit den Aminogruppen der Oligo-Linker zu den entsprechenden Carbonsäureamiden reagierte. Um die Ausbeute zu erhöhen, wurde die Zugabe von jeweils frisch inkubiertem Aktivester bis zu 11 Mal wiederholt.

Längere Oligonukleotide lösten sich schlechter in H₂O / 0,5 M Na₂CO₃ / DMF und setzen sich weniger gut mit Aktivester um als kürzere.

Der Umsetzungsgrad der 3',5'-gelinkten Oligonukleotide mit Aktivester zu den entsprechenden 2G-ODN wurde gelelektrophoretisch geprüft (s. 3.2.5, Gelelektrophorese, S.56), wobei die Geldicke 1 mm betrug.

Der maximal erreichbare Umsetzungsgrad der 3',5'-gelinkten Oligonukleotide zu den entsprechenden Bis-Gallensäure-Oligonukleotid-Konjugaten betrug etwa 50%. Nach Erreichen dieses Umsetzungsgrades (gelelektrophoretische Kontrolle) wurde die Carboxylgruppe an C₂₄ des Gallensäurederivates entschützt.

3.2.2 Esterhydrolyse

Um die Carboxylgruppe an C₂₄ des Gallensäurederivates zu entschützen, wurde die Lösung des Bis-Gallensäure-Oligonukleotid-Konjugates mit dem gleichen Volumen einer 100 mM NaOH-Lösung versetzt und 30 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurde das entschützte Oligo-Konjugat mit 3 M Natriumacetat gefällt.

3.2.3 Fällung

Die Lösung des Oligo-Konjugates wurde im Volumenverhältnis 10:1 mit 3 M Natriumacetatlösung pH 4,8 versetzt; danach wurde das zweieinhalbfache Volumen absoluten Ethanol zugefügt. Das Gemisch wurde über Nacht bei -20°C aufbewahrt, um die

Fällung zu vervollständigen. Anderntags wurde die Suspension 15 min bei 5000 U/min zentrifugiert und danach auf Eis gelagert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen. Nach Abziehen des Überstandes wurden noch vorhandene Ethanolreste im evakuierten Exsikkator in etwa 10 min entfernt. Das erhaltene feuchte Pellet war gut resuspendierbar (Sambrook et al. 1989).

3.2.4 Kinasierung

Bei der radioaktiven Markierung des 5'-Endes der Oligos (Sambrook et al. 1989) wurde Polynukleotid T4-Kinase verwendet, deren Wirkung durch Ammoniumionen inhibiert wird. Die von Biospring bezogenen Oligos lagen bereits als Natriumsalze vor, so dass beim unmodifizierten Oligo keine Umfällung nötig war.

Das unmodifizierte n-ODN bzw. das feuchte Pellet des 2G-ODNs wurden in Aqua bidest. gelöst, 5 min bei 95°C inkubiert und auf Eis gekühlt.

Die Oligolösungen wurden nach Herstellerangaben mit Kinasepuffer versetzt. Bei der anschließenden enzymatischen Kinasierung wurden pro 140 nmol-Ansatz des Oligos 5 µl γ -[³⁵S]-ATP-Lösung (37 MBq / 100 µl) zugesetzt. Zuletzt wurden 2 µl Polynukleotid T4-Kinase-Lösung zugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde bei 37°C für 60 min im Wasserbad inkubiert. Dann wurden 2 µl Kinase nachpipettiert und die Inkubation für weitere 30 min fortgesetzt. Die Oligos bzw. deren Konjugate wurden sofort im Anschluss mit Hilfe der Natriumacetatmethode gefällt.

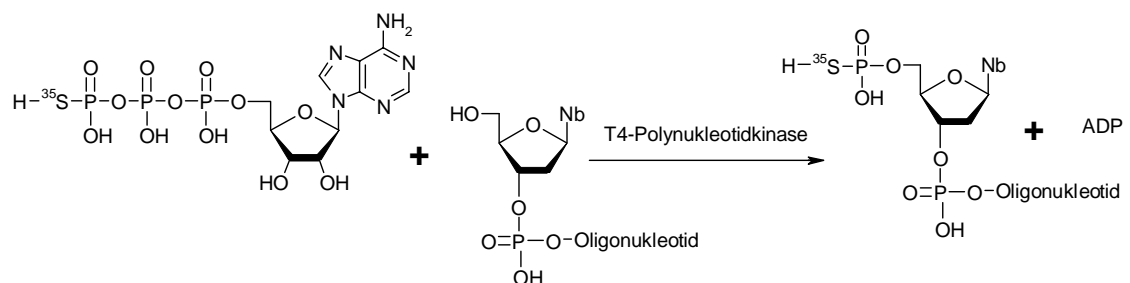


Abb. 3.3: 5'-Markierung der Oligos mit γ -[³⁵S]-ATP. Die endständige Thiophosphatgruppe des γ -[³⁵S]-ATP wird dabei auf das Oligo übertragen. Nb ist eine beliebige Nukleotidbase. Produkte der Reaktion sind 5'-radioaktiv markiertes Oligonukleotid und ADP.

3.2.5 Gelelektrophorese

Bei der Synthese der 2G-ODN entsteht ein Gemisch mehrerer Oligonukleotid-Derivate: Neben dem gewünschten 2G-ODN bilden sich zwei G-ODN, die entweder *nur* am 3' oder *nur* am 5'-Ende des Oligonukleotids Gallensäure-konjugiert sind; außerdem liegen

nicht umgesetztes 3',5'-gelinktes Oligonukleotid und kürzerkettige Oligonukleotid-Derivate vor.

Unmodifizierte Oligonukleotide (n-ODN) waren nach der Kinasierung mit kürzerkettigen Oligonukleotiden und mit nicht umgesetzten Mononukleotiden verunreinigt.

Die qualitative Kontrolle der Umsetzung zum 2G-ODN sowie die quantitative Trennung von gewünschtem Produkt und Nebenprodukten erfolgte gelelektrophoretisch. Moleküle laufen umso schneller durch ein Gel, je höher sie geladen sind bzw. je höher ihre Molekülmasse ist. Die Verlängerung eines Oligos um eine bzw. zwei Gallensäuremoleküle führte zu einem Laufverhalten, das demjenigen eines um eine bzw. zwei Nukleotide verlängerten Oligonukleotids entsprach. Bei der am langsamsten laufenden und damit höchstmolekularen Bande handelte es sich folglich um das gewünschte Produkt.

Die vertikale Gelkammer bestand aus zwei Glasplatten, zwischen denen sich Abstandshalter (Spacer) befanden. Bei qualitativen Gelen wurden 1 mm breite, bei quantitativen 2 mm breite Spacer verwendet. Vor dem Einfüllen des eigentlichen Trenngels wurde die Gelkammer mit Hilfe des Abdichtgels an den Außenseiten abgedichtet. Nach dem Aushärten des Abdichtgels wurde die entgaste Trenngellösung eingegossen und ein Gelkamm eingesetzt. Sobald das Trenngel auspolymerisiert war, wurde der Gelkamm entfernt und die Geltaschen mit 1x TBE-Puffer gespült.

Das Oligopellet wurde in Aqua bidest. gelöst, mit Gelladepuffer gemischt und in die Geltaschen pipettiert. Qualitative Gele dienten der Überprüfung der Umsetzung 3',5'-gelinkter Oligonukleotide zum entsprechenden 2G-ODN; bei diesen Gelen wurde ein paralleler Lauf des Eduktes als Kontrolle eingesetzt.

Die gelelektrophoretische Trennung erfolgte bei 30 V/cm Gelstrecke. Nach beendeter Trennung wurde das Gel in Frischhaltefolie gepackt und auf eine Kieselgel 60 F₂₅₄-Dünnschichtplatte gelegt. Bei Beleuchtung mit UV-Licht von 260 nm Wellenlänge waren die Oligonukleotide als dunkle Areale auf der ansonsten gelbgrün fluoreszierenden Platte sichtbar. Die mit UV-Licht bestrahlten Gele wurden mit einem Videodigitizer dokumentiert (Ausubel et al. 1995).

Bei den quantitativen Gelen wurde die am langsamsten laufende Bande markiert und mit einem Skalpell ausgeschnitten. Das ausgeschnittene Gelstück wurde zerkleinert und über Nacht bei Raumtemperatur mit 10 ml einer 0,2 M Triethylammoniumbicarbonat-Lösung eluiert. Anderntags wurde der Überstand abgenommen, der Rückstand nochmals mit 5 ml 0,2 M Triethylammoniumbicarbonat-Lösung eluiert und 30 min später für 5 min bei 5000 U/min zentrifugiert. Die vereinigten Überstände wurden mittels Festphasenextraktion entsalzt.

3.2.6 Festphasenextraktion

Um die Festphasenextraktionssäule zu aktivieren, wurden nacheinander je zwei Säulenfüllungen Methanol und Aqua bidest. durch die Säule gedrückt, wobei diese nicht trocken laufen durfte. Daraufhin wurden die vereinigten Oligonukleotidlösungen aufgetragen, danach Flüssigkeitsreste in der Säule mit einigen Lufthüben beseitigt. Die Oligonukleotide wurden anschließend mit zwei Säulenfüllungen MeOH/H₂O 6:4 (Vol/Vol) von der Säule abgespalten. Das erhaltene Eluat wurde im Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt, die Oligonukleotide zuletzt mit Aqua bidest. aufgenommen und quantitativ bestimmt.

3.2.7 Konzentrationsbestimmung

Ein Aliquot der wässrigen Oligonukleotid-Lösung wurde mit Aqua bidest. zu 1 ml verdünnt. Die Quantifizierung erfolgte photometrisch bei 260 nm in einer Quarzküvette, wobei die ermittelte Konzentration als „optische Dichte“ OD angegeben wurde. Die optische Dichte ist das Produkt aus Konzentration und Extinktionskoeffizient ϵ ; 1 OD ist also die Masse eines Oligonukleotids in einem Volumen von 1 ml und einer Küvettenlänge von 1 cm. Der Extinktionskoeffizient ϵ des Gesamtmoleküls wurde zur genauen Bestimmung der Konzentration aus der Summe der Extinktionskoeffizienten der einzelnen Nukleotide berechnet. Dafür wurden folgende Werte zugrunde gelegt: dATP = 15,4 ml/ μ mol, dCTP = 7,3 ml/ μ mol, dGTP = 11,7 ml/ μ mol und dTTP = 8,8 ml/ μ mol (Sambrook et al. 1989).

3.2.8 Lagerung und Aliquotieren

Nach der quantitativen Bestimmung wurden die wässrigen Lösungen der Oligonukleotide bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt. Für die in situ-Galleausscheidungsversuche wurden die wässrigen Oligonukleotid-Lösungen vor der Versuchsdurchführung aliquotiert und mit 0,9%iger Kochsalzlösung zur gewünschten Konzentration verdünnt. Dabei kamen alle eingesetzten Oligonukleotid-Derivate ausschließlich mit sterilen oder autoklavierten Materialien und Lösungen in Kontakt.

3.3 Chemisch-physikalische Analytik der Oligonukleotide

3.3.1 HPLC und MS

Unmodifiziertes n-ODN, 3',5'-modifiziertes n-ODN und 2G-ODN wurden mittels HPLC und ESI-MS charakterisiert (Starke et al. 2001). Die Untersuchungen wurden bei Herrn Dr. E. Uhlmann, Hoechst Marion Roussel, in Frankfurt am Main durchgeführt.

HPLC-Gerät:	Waters Gempack S/N 219-1862
HPLC-Säule:	Waters Gempack Fax column
Lösungsmittel A:	10 mM NaH ₂ PO ₄ in Acetonitril/H ₂ O 2:8 (Vol/Vol), pH 6,8
Lösungsmittel B:	10 mM NaH ₂ PO ₄ und 3M NaCl in Acetonitril/H ₂ O 2:8 (Vol/Vol), pH 6,8
Flussrate:	1 ml/min
Gradient:	5-60% B in 40 min
Detektion:	UV, 260 nm

Massenspektrometer: Varian G BIO-Q

Der Auswertung der Massenspektren erfolgte gemäss der massenspektrometrischen Grundgleichung:

$$\frac{m}{z} = \frac{r_m^2 \cdot B^2}{2 \cdot U}$$

mit	m:	Ionenmasse des detektierten Teilchens
	z:	Ionenladung des detektierten Teilchens
	r:	Ablenkradius des Teilchens im Massenspektrometer
	B:	magnetische Feldstärke
	U:	Beschleunigungsspannung

3.3.2 Strukturmodell

Chemische Verbindungen besitzen naturgemäß dreidimensionale Strukturen; große Moleküle können dabei bei identischer Abfolge der enthaltenen Atome oft mehrere energetisch günstige Anordnungen einnehmen. Energetisch günstig sind dabei solche Strukturen, bei denen relativ nah benachbarte, sterisch anspruchsvolle funktionelle Gruppen und gleichnamige Ladungen größtmögliche Abstände voneinander haben und

tautomere Gruppen in der energieärmsten Konformation vorliegen. Für Biomoleküle wie Peptide und Oligonukleotide sind zudem solche Konformationen sterisch und energetisch günstig, die viele Dipol-Dipol- und van der Waals-Wechselwirkungen erlauben. Grundsätzlich sind diejenigen 3D-Strukturen (Konformationen) energetisch günstig, bei denen die gesamte potenzielle Energie des Moleküls ein lokales oder absolutes Minimum erreicht. Je geringer die potenzielle Energie, desto stabiler und reaktionsträger das Molekül.

Bis heute ist es nicht möglich, die energetischen Minima großer (Bio-)Moleküle exakt zu berechnen. Mit Hilfe von Berechnungen der physikalischen Kraftfelder der in den großen Molekülen enthaltenen funktionellen Gruppen und einiger empirischer Parameter lassen sich jedoch die potenziellen Energien großer Moleküle abschätzen. Strukturell ähnliche Moleküle können auf diese Weise zumindest qualitativ miteinander verglichen werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden die potenziellen Energien und die zugehörigen 3D-Strukturen der Oligonukleotide n-ODN, 3',5'-gelinktes 15mer Phosphorothioat und 2G-ODN (vgl. Kap. 2.3, S. 43) mit dem Programm Chem 3D Pro 5.0 berechnet (Cambridge Soft 1998). Verwendet wurde dabei das MM2-Verfahren (Molecular Mechanics), das sich klassischer physikalischer Methoden bedient. Grundlage dieses Verfahrens sind Kraftfeldberechnungen und empirische Daten. Elektronische Eigenschaften der Atome werden nicht mit einbezogen, einige Diederwinkel auf Grund eines Mangels an exakten Daten abgeschätzt.

Für alle drei Oligonukleotid-Derivate wurde eine sie umgebende Hydrathülle angenommen, da die Substanzen in allen Versuchen in wässriger Lösung vorlagen. Hydrathüllen, die ein Molekül umgeben, besitzen in aller Regel einen Radius von 1,4 Å (Cambridge Soft 1998); dieser Wert wurde den Simulationen der Oligonukleotid-Strukturen zu Grunde gelegt. Graphisch dargestellt wurden die Energie-minimierten 3D-Strukturen von n-ODN, 3',5'-gelinktem 15mer Phosphorothioat und 2G-ODN mit und ohne Hydrathülle. Wasserstoffatome und freie Elektronenpaare wurden wegen der besseren Übersichtlichkeit nicht mit abgebildet.

3.4 Transportstudien an Membranvesikeln

Die Substratspezifität der MRP-Isoformen sollte in canaliculären inside-out orientierten Membranvesikeln bestimmt werden, da die Substratkonzentration bei diesen Experimenten genau eingestellt werden kann. Des weiteren können in Vesikelstudien im Gegensatz zu Untersuchungen an intakten Zellen Metabolisierung und Komplexbildung des Substrates kontrolliert werden. In intakten Zellen ist es außerdem nicht direkt möglich, die ATP-Abhängigkeit des MRP-vermittelten Transportes zu ermitteln; eine beliebige Einstellung der ATP-Konzentration ist dort wegen der raschen

Gleichgewichtseinstellung zwischen ATP und anderen Nukleotiden unmöglich. Aus den genannten Gründen bieten sich canalikuläre inside-out Membranvesikel zur Bestimmung der kinetischen Eigenschaften, der Substratspezifität und der Inhibition des MRP-vermittelten Transportes an (Keppler et al. 1998). In der vorliegenden Arbeit wurde die ATP-Abhängigkeit des Transportes von unmodifiziertem Oligonukleotid (n-ODN) an canalikulären inside-out Membranvesikeln zweier HEK-Zellstämme untersucht; dabei wurden zwei alternative Methoden eingesetzt.

3.4.1 Filtration durch Nitrocellulosefilter

Nitrocellulosefilter (0,2 µm Porenweite, 25 mm Durchmesser) wurden mit Inkubationspuffer getränkt und der Schnellfiltrationsapparat vorbereitet. Die Transportassaymischung zur Untersuchung des ATP-abhängigen Transportes wurde in einem Endvolumen von 70 µl bei pH 7,4 für 1 min bei 37°C inkubiert; für die Bestimmung der Blindwerte wurde ebenso vorgegangen, wobei lediglich das ATP in der Mischung durch eine identische Konzentration von 5'-AMP ersetzt wurde.

Parallel dazu wurden die Membranvesikelsuspensionen der HEK K0- bzw. HEK Ca1-Zellen bei 37°C schnell aufgetaut und vor Versuchsbeginn etwa 40 min auf Eis gelagert. Gestartet wurden die Versuche durch Zugabe von Membranvesikelsuspension und ³⁵S-markiertem Oligonukleotid (n-ODN) zur Transportassaymischung. Dabei wurde der ATP-abhängige Transport bei 37°C unter folgenden Bedingungen untersucht:

- 1 pMol/µl ³⁵S-markiertes n-ODN sowie HEK K0- bzw. HEK Ca1-Vesikel mit einem Proteingehalt von 0,45 µg/µl (= 2,2 pmol n-ODN / µg Protein),
- 13 pMol/µl ³⁵S-markiertes n-ODN sowie HEK K0- bzw. HEK Ca1-Vesikel mit einem Proteingehalt von 0,90 µg/µl (= 14,4 pmol n-ODN / µg Protein),

jeweils in einem Endvolumen von 70 µl Transportassaymischung.

Nach 1, 5 und 10 min wurden 20µl-Aliquote entnommen, sofort mit 1 ml eiskaltem Inkubationspuffer verdünnt und bei 200 mbar durch die Cellulosefilter gesaugt. Anschließend wurden die Filter zweimal mit 5 ml kaltem Inkubationspuffer gewaschen, in 10 ml Szintillationsflüssigkeit gelöst und die Radioaktivität in einem Flüssigkeitsszintillationszähler bestimmt. Mit Hilfe der gemessenen Radioaktivität wurde der Transport des Oligonukleotids (pmol Oligonukleotid / µg Protein) in Gegenwart von ATP bzw. 5'-AMP (Blindwerte) errechnet; der ATP-abhängige Nettotransport ergab sich durch Differenzbildung.

3.4.2 Gelmatrix-Zentrifugation

NICK spin columns wurden durch zweimaliges Waschen mit Inkubationspuffer und Zentrifugation bei 400 g und 4°C für 4 min vorbereitet.

Die Transportassaymischung mit ATP bzw. 5'-AMP (Blindwerte), Vesikelsuspensionen und Oligonukleotidlösung wurden wie oben beschrieben vorbereitet. Der Start der Inkubation erfolgte durch Zugabe von 1 pM/ μ l 35 S-markiertem n-ODN und HEK K0- bzw. HEK Ca1-Vesikeln mit einem Proteingehalt von 0,45 μ g/ μ l zu einem Endvolumen von 70 μ l Transportassaymischung bei 37°C. Nach 1, 5 und 10 min wurden 20 μ l-Aliquote abpipettiert, mit 80 μ l eiskaltem Inkubationspuffer verdünnt und sofort auf die Säulen aufgetragen. Anschließend wurden diese mit 100 μ l Inkubationspuffer gewaschen und danach bei 400g und 4°C für 4 min zentrifugiert. Die auslaufende Flüssigkeit wurde gesammelt und mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt; Radioaktivitätsmessung und Versuchsauswertung erfolgten ebenso wie im Falle der Filtration durch Nitrocellulosefilter.

3.5 In situ-Galleausscheidung

3.5.1 Versuchsdurchführung

Die Ratten wurden mit 1,8 ml 20%iger Urethanlösung i.p. narkotisiert. Nach Erreichen des Toleranzstadiums wurde die Bauchhöhle mit einem 2 cm langen Schnitt caudal des Processus xiphoideus in der Linea alba eröffnet und das Duodenum vorgelagert. Der zwischen den Duodenalschlingen verlaufende Gallengang wurde mit einer Augenschere angeschnitten und mit einem PTFE-Schlauch katheterisiert. Der Katheter wurde mit Hilfe von Fibrinkleber am Mesenterium fixiert und die Duodenalschlinge anschließend reponiert.

Um die Substanzen in eine Jejunalvene zu injizieren, wurde eine Jejunumschlinge vorgelagert und die jeweilige Substanz mit einer Geschwindigkeit von etwa 25 μ l/s in eine Vena jejunalis appliziert. Unmittelbar danach wurde die Vene mit je einer Ligatur proximal und distal der Injektionsstelle verschlossen, damit die injizierte Lösung nicht zurückfließen konnte; dann wurde die Darmschlinge reponiert.

Sollten Substanzen in die Vena femoralis injiziert werden, so wurde diese Vene durch einen Hautschnitt freigelegt und die Faszie entfernt. Die Injektionsgeschwindigkeit war ebenso hoch wie bei der Injektion in eine Vena jejunalis. Nach der Injektion wurde die Vena femoralis mit Fibrinkleber verschlossen.

Bauchhöhle und freigelegte Vena femoralis wurden mit Zellstoff abgedeckt, der mit körperwarmer PBS-Lösung getränkt war. Die Ratte wurde in einen temperierten Kasten überführt, um die physiologische Körpertemperatur während des Zeitraums konstant zu halten, in dem die ausgeschiedene Galleflüssigkeit aufgefangen wurde.

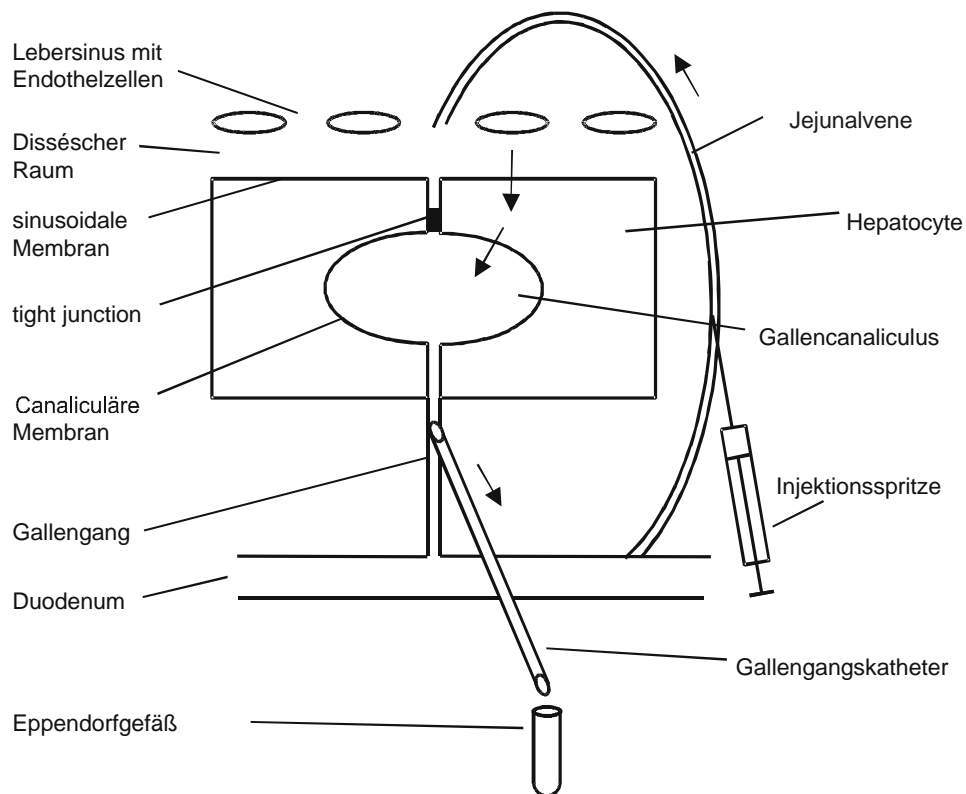


Abb. 3.4: In situ-Galleausscheidung: Schemata der anatomischen Verhältnisse und des Versuchsaufbaus. Die Pfeile symbolisieren den Verlauf der in eine Jejunalvene injizierten Substanz durch Hepatocyte, Gallengang und Gallengangskatheter in das Eppendorfgefäß.

3.5.1.1 *In vivo*-Stabilität der Oligonukleotide

Nach Einführen des Gallengangskatheters wurde zunächst für ca. 10 Minuten Prägalle aufgefangen, wobei das Eppendorfgefäß nach ca. 5 Minuten gewechselt wurde. Die erste Prägallefraktion wurde später wegen einer eventuellen Kontamination mit Blut verworfen. Anschließend wurden 10 nmol 2G-ODN bzw. 200 nmol n-ODN, gelöst in 400 µl physiologischer Kochsalzlösung, in eine Jejunalvene injiziert und die über den Katheter ausgeschiedene Galleflüssigkeit während einer Stunde nach Oligoapplikation aufgefangen. Dabei wurden die Eppendorfgefäße in 15min-Intervallen gewechselt. Eine Stunde nach Injektion des Oligonukleotids wurde das Tier getötet. Die vier erhaltenen Galleproben wurden mit gleichen Volumina eines Gemisches aus Chloroform/Isoamylalkohol/Phenol 24:1:25 (Vol/Vol/Vol) versetzt, 30 min bei Raumtemperatur geschüttelt und 15 min bei 14000 U/min zentrifugiert. Die oberen, wässrigen Phasen wurden abgenommen; dann wurden die wässrigen Phasen der ersten beiden sowie der letzten beiden Galleproben vereinigt. Die wässrigen Extrakte wurden anschließend einer

qualitativen Elektrophorese unterzogen (vgl. S.56), um zu untersuchen, ob während der Verweilzeit *in vivo* eine Degradation der Oligonukleotide stattgefunden hatte. Dabei wurden für jedes der beiden Oligonukleotide zwei Kontrollen verwendet: Prägalle wurde mit 15 µl Oligonukleotidlösung der injizierten Konzentration versetzt und wie oben beschrieben aufgearbeitet; zusätzlich wurden 10 µl der reinen Injektionslösung in eine weitere Geltasche pipettiert.

Es war nicht möglich, Serum oder Organe auf diese Weise zu untersuchen, da sich nach der Extraktion eine dicke Interphase bildete. Die verbleibende wässrige Phase war zu klein, um sauber abgenommen werden zu können.

3.5.1.2 Substrateigenschaften des Glukose-6-Phosphat-Translokase-Inhibitors S 3025

Chlorogensäurederivate sind potente und spezifische Inhibitoren der Glukose-6-Phosphat-Translokase; die Hemmung dieses Enzyms führt zu einer stark verminderten Gluconeogenese in Leber und Niere. Schwab et al. untersuchten die pharmakokinetischen Eigenschaften verschiedener Chlorogensäurederivate; dabei handelte es sich um die Monocarbonsäure S 4048 und die homologe Dicarbonsäure S 3025 (Schwab et al. 2001). Die hepatische Aufnahme von S 4048 erfolgte hauptsächlich über den basolateralen Transporter *oatp 1*. Für andere Chlorogensäurederivate ist dies wahrscheinlich, wobei der empirische Beweis noch aussteht. S 3025 weist bei Wistarratten eine hohe Plasmaclearance auf und wird von diesem Rattenstamm rasch hepatobiliär ausgeschieden. Bei TR⁻-Ratten sind beide Parameter gegenüber Wistarratten stark vermindert. Wistarratten scheiden nur 0,01% des applizierten S 3025 über den Urin aus, TR⁻-Ratten dagegen 18% (Herling et al. 2002). Auf Grund der verlangsamten Plasmaclearance der TR⁻-Ratten ist der Zeitraum der pharmakodynamischen Wirkung von S 3025 bei ihnen im Vergleich zu Wistarratten stark verlängert. Nach Bolusinjektion von 50 mg/kg S 3025 erzielten Herling et al. bei beiden Rattenstämmen eine deutliche Reduktion des Blutglucosespiegels, die jeweils eine Stunde nach Applikation des Substrates ihr Maximum erreichte; zu diesem Zeitpunkt war der Glucosespiegel im Vergleich zu den Kontrolltieren um rund 50% vermindert. Der Blutglucosespiegel erreichte bei Wistarratten binnen einer Stunde, bei TR⁻-Ratten jedoch erst fünf Stunden nach Erreichen der maximalen Reduktion des Blutglucosespiegels wieder den Wert der Kontrollen. In der Galle von Wistarratten wurde die maximale Konzentration an S 3025 etwa 10-15 min nach i.v.-Injektion dieser Substanz ermittelt, bei TR⁻-Ratten war dagegen kein scharfer Peak zu erkennen.

In der vorliegenden Arbeit wurde S 3025 in Konzentrationen von 5 bzw. 15 µmol pro Tier eingesetzt. Dabei entsprechen 15 µmol pro Tier etwa 50 mg/kg, wenn von einer Körpermasse von 200-250 g ausgegangen wird (vgl. 3.5.1.2, S. 64, und 4.4.3.2, S. 119).

BSP (Bromsulphthalein) dient zur Prüfung der exkretorischen Leberfunktion (Wheeler et al. 1960). Es ist ein Substrat der basolateralen Transporter oatp1, oatp2 und oatp3 der Ratte (Inui et al. 2000, Kullak-Ublick et al. 2001), wobei die Affinität zum oatp1 am größten, zum oatp3 am kleinsten ist. In der Leber von Ratten werden alle drei oatps exprimiert, in der Niere oatp1 und oatp3. Der oatp1 wird am stärksten in der Leber exprimiert, während in der Niere die höchste Expression beim oatp3 auftritt. Die Hauptmenge des applizierten BSP wird in vivo binnen weniger Minuten Glutathionkonjugiert (BSP-GS); BSP-GS und unkonjugiertes BSP werden größtenteils über den mrp2 in die Galle sezerniert (Snel et al. 1993, Jäger et al. 1997, Paulusma und Oude Elferink 1997). Dabei lässt sich die hepatobiliäre Elimination von konjugiertem und unkonjugiertem BSP durch die eintretende Blaufärbung der Galleflüssigkeit qualitativ leicht beobachten. Im Vergleich zu normalen Wistarratten scheiden TR⁻-Ratten wegen des fehlenden mrp2 deutlich weniger BSP in die Galle aus. Die Blaufärbung der Galle ist bei diesem Rattenstamm weniger intensiv, aber eindeutig vorhanden.

Um zu prüfen, wie viel BSP von Wistar- bzw. TR⁻-Ratten in die Galle ausgeschieden wird, wurden Tiere beider Stämme wie unter 3.5.1 beschrieben narkotisiert und der Gallengang kanüliert. Anschließend wurden Wistarratten 1 µmol bzw. 5 µmol BSP, gelöst in 500 µl PBS, in eine Vena femoralis injiziert. TR⁻-Ratten erhielten ausschließlich die höhere BSP-Dosis, da andernfalls die hepatobiliär eliminierten BSP-Mengen am unteren Rand der (photometrischen) Nachweisgrenze hätten liegen können. In weiteren Versuchen wurde geprüft, ob die BSP-Ausscheidung durch eine Präinjektion von S 3025 beeinflussbar ist. Hierzu erhielten alle Tiere 5 µmol S 3025, gelöst in 1 ml DMSO/Glycerin/PBS 15:15:70 (Vol/Vol/Vol) in eine Femoralvene; 2 min später wurden Wistarratten 1 µmol bzw. 5 µmol BSP und TR⁻-Ratten 5 µmol BSP in 500 µl PBS ebenfalls in eine Femoralvene. Bei allen Experimenten wurde die ausgeschiedene Galleflüssigkeit über einen Zeitraum von 2 Stunden in tarierten Eppendorfgefäßen aufgefangen, die in 10min-Intervallen gewechselt wurden. Danach wurden die Tiere getötet. Zwei Aliquote jeder Galleprobe wurden mit 0,05 M NaOH auf 500 µl aufgefüllt und bei 580 nm photometrisch bestimmt (Quale et al. 1988). Natronlauge wurde zugesetzt, um die fast farblose Säure quantitativ in das intensiv blau gefärbte BSP-Dinatriumsalz zu überführen. Die Berechnung des BSP-Gehaltes jeder Probe erfolgte mit Hilfe einer zuvor erstellten Kalibrierkurve.

Gallensäuren werden von Hepatozyten sowohl Natrium-abhängig als auch Natrium-unabhängig aufgenommen. Die Gallensäure Taurocholat wird sinusoidal zu mehr als 80% über den Natrium-abhängigen Ntcp aufgenommen; die übrigen knapp 20% werden über oatp1 und oatp2 aufgenommen (Kullak-Ublick et al. 2000). Sinusoidal wird Taurocholat vor allem über die Bsep in die Galle sezerniert; der mrp2 spielt hierbei eine sehr untergeordnete Rolle (Akita et al. 2001, Stieger et al. 2000). Nach Herling wird S 3025 über den mrp2 biliär sezerniert (Herling et al. 2002), sollte die Elimination von

Taurocholat also nicht beeinflussen. Um diese These zu überprüfen, wurden Wistar- und TR⁻-Ratten analog zu 3.5.1 und 3.5.2 behandelt: Zunächst wurden Wistarratten 1 μmol bzw. 5 μmol ³H-TC in eine Jejunalvene injiziert ($t = 0$ min); TR⁻-Ratten erhielten lediglich die Dosis von 5 μmol ³H-TC. 24 min später wurden 5 μmol S 3025, gelöst in DMSO/Glycerin/PBS 15:15:70 (Vol/Vol/Vol), in eine Femoralvene gespritzt. 30 min nach der ersten Applikation von ³H-TC wurde dieselbe Menge dieser Substanz (1 μmol bzw. 5 μmol) noch einmal in eine Jejunalvene injiziert. Die genannten Zeitpunkte wurden gewählt, weil die Maximalkonzentrationen von S 3025 und der zweiten TC-Gabe in der Galle im selben Zeitraum auftreten sollten, um den Einfluss einer eventuellen Inhibitorwirkung von S 3025 optimal erfassen zu können. Die ausgeschiedene Galle wurde über 120 min aufgefangen. Gewechselt wurden die Eppendorfgefäße 4, 8, 12, 16, 20, 25, 30, 34, 38, 42, 46, 50, 55 und 60 min nach der ersten TC-Injektion sowie in der zweiten Stunde nach dieser Injektion in 10min-Intervallen. Nach Ablauf von 120 min wurden die Tiere getötet; Aliquote jeder Galleprobe wurden wie unter 3.5.2 beschrieben mit Szintillatorflüssigkeit versetzt und die enthaltene Radioaktivität am Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen.

3.5.1.3 Applikation von Substraten canalikulärer Transporter

Vorausgegangene vorläufige Untersuchungen zur hepatobiliären Ausscheidung von Oligonukleotiden und Gallensäure-Oligonukleotid-Konjugaten ließen vermuten, dass der canalikuläre Transporter mrp2 maßgeblich an der Exkretion beteiligt ist (Starke 1999). Um dies zu untersuchen, wurden Wistarratten kurz vor der Injektion der Oligonukleotide verschiedene mrp2-Substrate appliziert und das Ausscheidungsverhalten der Oligonukleotide in Gegenwart und Abwesenheit dieser Substrate miteinander verglichen. Dabei wurde der Zeitpunkt der Präinjektion so gewählt, dass die maximalen Konzentrationen von Oligonukleotid und mrp2-Substrat in der Galle zeitgleich auftraten. Bei Oligonukleotiden und Gallensäure-Oligonukleotid-Konjugaten trat die Maximalkonzentration in der Galle ca. 8 min nach Injektion auf.

Es wurden grundsätzlich 0,8 nmol 2G-ODN bzw. n-ODN in 400 μl physiologischer Kochsalzlösung appliziert. Um den Einfluss des Applikationsortes bei Wistarratten zu untersuchen, wurde die in situ-Galleausscheidung im Falle beider Oligonukleotide sowohl nach Injektion in eine Vena jejunalis als auch in eine Vena femoralis bestimmt. Wurden TR⁻-Ratten eingesetzt und/oder zusätzlich mrp2-Substrate appliziert, so wurde das jeweilige Oligonukleotid immer in eine Vena jejunalis injiziert.

Bei den mrp2-Substraten, die in eine Vena femoralis injiziert wurden, handelte es sich um folgende Lösungen:

- 5 bzw. 15 μmol BSP-Natriumsalz in 500 μl PBS, 2 min vor der Oligoinjektion. Bei der hepatobiliären Ausscheidung von BSP wurde die höchste Substanzkonzentration in der Galle etwa 10 min nach der Injektion gefunden (Kurisu et al. 1991).
- 5 μmol MK 571 in 500 μl PBS, 2 min vor der Oligoinjektion. Die höchsten Konzentrationen an MK 571 in der Galle wurden 10 min nach der Injektion gefunden (Walle et al. 1999a).
- 5 bzw. 15 μmol S 3025 in 1 ml DMSO/Glycerin/PBS 15:15:70 (Vol/Vol/Vol), 2 min vor Applikation des Oligos. Die maximale Konzentration von S 3025 in der Galle wurde 10 min nach der Injektion gefunden (Herling et al. 2002).
- 5 μmol CDNB in 50 μl Ethanol, 5 min vor Applikation des Oligonukleotids. CDNB wird binnen 10 min nach Injektion quantitativ Glutathion-konjugiert; nach weiteren 5 min wird die maximale Konzentration in der Galle erreicht, die bis zur 30. Minute weitgehend konstant bleibt und danach langsam abfällt (oude Elferink et al. 1989a).

BSP und S 3025 wurden wegen des Exkretionsdefektes in der niedrigeren der beiden aufgeführten Konzentrationen zusätzlich TR⁻-Ratten verabreicht. Höhere Konzentrationen dieser mrp2-Substrate waren für TR⁻-Ratten offenbar zu toxisch; sie wurden von diesem Rattenstamm deutlich schlechter vertragen als von normalen Wistarratten.

An Wistarratten wurde außerdem der Einfluss von Sirolimus (Rapamune[®]) auf die hepatobiliäre Exkretion der Oligonukleotide untersucht. Die gebrauchsfertige Lösung enthielt 1 mg Sirolimus pro ml Fettgemisch. Pro Tier wurden 250 μl dieser Lösung i.p. appliziert; 30 min später wurden die Oligonukleotide injiziert.

3.5.2 Galleproben nach Applikation von Substraten canalikulärer Transporter

Die Galleflüssigkeit wurde über den Gallengangskatheter ausgeschieden und in tarierten Eppendorfgefäßen gesammelt. Die Messzeit betrug zwei Stunden, wobei $t=0$ demjenigen Zeitpunkt entsprach, ab dem das jeweilige Oligonukleotid vollständig injiziert war. In den ersten 20 Minuten nach Injektion des Oligonukleotids wurden die Eppendorfgefäße im Abstand von 4 Minuten gewechselt, von der 20. bis zur 60. Minute in 5-Minuten-Intervallen und in der zweiten Stunde des Messzeitraumes in 10-Minuten-Intervallen. Die ausgeschiedenen Gallemengen wurden durch Differenzwägung bestimmt, wobei eine spezifische Dichte der Galle von 1 g/ml angenommen wurde (Poupon et al. 1988). Von jeder Galleprobe wurden zwei Aliquote entnommen, mit 3 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt, zwei Stunden bei 37°C inkubiert, geschüttelt und die enthaltene Radioaktivität in einem Flüssigkeitsszintillationszähler bestimmt.

3.5.3 Organproben nach Applikation von Substraten canaliculärer Transporter

Nach Beendigung des zweistündigen Sammelns von Galleflüssigkeit wurde die Bauchhöhle bis zur Regio pubis eröffnet und zwei seitliche Entlastungsschnitte angebracht. Aus der Vena cava caudalis pars abdominalis wurden etwa 2 ml Blut entnommen, in ein Eppendorfgefäß überführt und 30 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wurde das Blut 5 min bei 14000 U/min zentrifugiert. Zwei Aliquote des Serums wurden abpipettiert und wie unter Galleproben beschrieben weiter behandelt. Die Harnblase wurde zur Uringewinnung punktiert, wobei nicht bei jedem Tier genügend Urin vorhanden war. Aliquote des Urins wurden ebenfalls wie unter Galleproben beschrieben weiter behandelt.

Anschließend wurden folgende Organe entnommen, gewogen und Teile von ihnen weiter untersucht: perirenales Fett, Nebennieren, Niere (caudaler Teil der linken Niere), Milz, Leber (caudales Stück aus dem Lobus sinister medialis), Darm (Stück aus dem Jejunum ohne Faeces und ohne Mesenterialplatte), Herz (Herzspitze), Lunge (caudales Stück aus dem Lobus sinister), Thymus, Haut (über Musculus vastus lateralis), Muskel (Stück aus dem Musculus vastus lateralis) und Gehirn (Rhombencephalon, Mesencephalon, Cerebellum sowie Teile des Telencephalons parallel zur Fissura longitudinalis cerebri). Die aufgeführten Organe bzw. Teilstücke wurden ausgewogen, mit je 500 µl 3M Kalilauge versetzt und über Nacht bei 40°C lysiert. Anderntags wurden die Lysate wie unter Galleproben beschrieben weiter behandelt. Bei der Berechnung der im gesamten Serum enthaltenen Menge an Oligonukleotid wurde davon ausgegangen, dass 4,3% der Gesamtkörpermasse auf das Serum entfallen (Schmidt und Thews 1997).

3.6 Antisense-Studien an *Xenopus laevis*-Oozyten

Um die Eigenschaften eines bestimmten Transportproteins untersuchen zu können, ist es sinnvoll, dieses Protein isoliert von anderen Transportern zu studieren, die normalerweise gemeinsam mit ihm in derselben Membran vorliegen. Hierfür stellen *Xenopus laevis*-Oozyten ein geeignetes Modell dar: Nach Injektion von mRNA oder cRNA des interessierenden Transportproteins in Oozyten exprimieren diese das Protein und ermöglichen die Untersuchung seiner Transporteigenschaften. Auf diese Weise wurden z.B. die beiden an der sinusoidalen Membran von Hepatocyten lokalisierten Transporter Ntcp und oatp charakterisiert (Hagenbuch et al. 1990). Das Modell eignet sich ebenfalls zur Überprüfung der Antisense-Wirkung von Oligonukleotiden. So konnte durch Coinjektion von cRNA des Ntcp oder oatp mit Phosphodiester-Antisense-Oligonukleotiden aus der codierenden Sequenz des jeweiligen Transportproteins und

anschließende Aufnahmemessungen mit Taurocholat gezeigt werden, dass geeignete Antisense-Oligonukleotide die Expression eines Transportproteins hemmen (Hagenbuch et al. 1996). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte festgestellt werden, ob diese Antisense-Wirkung auch dann eintritt, wenn das Grundgerüst der Antisense-Oligonukleotide vom Phosphodiester zum Phosphorothioat modifiziert wurde und / oder ein 3',5'-Bis-Gallensäurekonjugat des Antisense-Oligonukleotides zum Einsatz kam.

3.6.1 Präparation der Oozyten

Ein weiblicher afrikanischer Krallenfrosch (*Xenopus laevis*) wurde bei 18°C durch 15minütiges Eintauchen in eine 0,3%ige Lösung von 3-Aminobenzoessäure-ethylester narkotisiert. Die Oozyten wurden entfernt und bei Raumtemperatur für ca. 45 min in 10 ml Ca²⁺-freier OR2-Lösung inkubiert, der 2 mg/ml Collagenase D zugesetzt waren. Dann wurde das Inkubationsmedium erneuert und die Inkubation für ca. 15-30 min unter mikroskopischer Kontrolle der Oozyten bis zum vollständigen Verdau der Follikelhülle fortgesetzt. Nach mehrmaligem Waschen mit modifizierter Barth's-Lösung wurden Oozyten der Stadien V und VI selektioniert und über Nacht bei 18°C in frischer Barth's-Lösung inkubiert.

3.6.2 Injektion der Oligonukleotide

Die unter 2.3 (Oligonukleotide, S.44) aufgeführten Oligonukleotide wurden in Aqua bidest gelöst. Nach Kühlung auf Eis wurden Lösungen aus 50mM NaCl, 0,01 µg/µl Ntcp-cRNA und 8,2 pmol/µl des jeweiligen Oligonukleotids hergestellt und 1h auf Eis vorinkubiert. Anschließend wurden 50 nl jeder vorinkubierten Lösung injiziert; je Oligonukleotid wurden Gruppen von 7-17 Oozyten auf diese Weise behandelt. In 20-30 weitere Oozyten wurden je 50 nl einer eisgekühlten Lösung aus 50mM NaCl und 0,01 µg/µl Ntcp-cRNA injiziert (Positivkontrolle), außerdem dienten 7-17 nicht injizierte Oozyten als Negativkontrolle. Die Oozyten wurden bei 18°C zwei Tage in Barth's-Lösung inkubiert, wobei das Medium täglich gewechselt wurde.

3.6.3 Aufnahmemessungen

Die Oozyten wurden bei 25°C einmal mit Cholinlösung gewaschen und die Waschlösung danach weitgehend abgezogen. Im Stickstoffstrom wurden 10µM-Aliquote [³H]-Taurocholat (3-10 µCi) zur Trockene eingedampft und in 100 µl Natrium- oder Cholinlösung gelöst. Eine Hälfte jeder Oozytengruppe wurde mit 100 µl Natrium-Taurocholat-Lösung, die andere mit 100 µl Cholin-Taurocholat-Lösung versetzt und 30 min bei 25°C inkubiert. Die Taurocholataufnahme wurde durch Zugabe

von 1 ml eiskalter Stopplösung beendet und die Oozyten dreimal mit je 10 ml eiskalter Stopplösung gewaschen. Anschließend wurden die vereinzelt Oozyten in 1 ml SDS-Lösung lysiert. Die gelösten Oozyten wurden mit 3 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt, 2h bei 40°C inkubiert, geschüttelt und die Radioaktivität mit Hilfe eines Flüssigkeitsszintillationszählers bestimmt.

3.7 Statistische Methoden

Nach Abschluss der Untersuchungen zur hepatobiliären Elimination von BSP und Taurocholat unter Einfluss von S 3025, zum Transportverhalten der Oligonukleotide bei der in situ-Galleausscheidung sowie den Antisense-Studien an *Xenopus laevis*-Oozyten wurden jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen der Stichproben mit dem Programm Microsoft Excel 8.0 berechnet. Anschließend wurde die statistische Signifikanz für Galleausscheidungsversuche und Antisense-Studien ermittelt. Dies erfolgte in der AG Biomathematik und Datenverarbeitung der JLU Gießen unter Anleitung von Herrn Dr. Klaus Failing. Lineare und nichtlineare Regressionen sowie Varianzanalysen wurden mit dem Programm BDMP/Dynamic, Release 7.0 (Dixon 1993) durchgeführt.

Die statistische Auswertung der Galleausscheidungsversuche erfolgte durch nichtlineare oder - in Ausnahmefällen (s. S. 124) - lineare Regression. Die Signifikanz der Einflüsse der Parameter wurde bei den Experimenten zu BSP und Oligonukleotiden durch zwei- bzw. dreifaktorielle Varianzanalyse ermittelt; dabei wurde eine Signifikanz von $p \leq 0,05$ als signifikant und $p > 0,05$ als nicht signifikant bewertet. Bei den Taurocholatversuchen wurde im Anschluss an die Kurvenanpassung ein t-Test für verbundene Stichproben durchgeführt. Dabei wurde paarweise untersucht, ob die für die beiden Kurventeile (s.u.) bestimmten Parameter signifikante Unterschiede aufwiesen. Die Bewertung der ermittelten Signifikanzen erfolgte ebenso wie bei den BSP- und Oligonukleotid-Versuchen.

Mit Hilfe der kumulierten Daten wurde für jede einzelne Ausscheidungskurve von Oligonukleotiden, BSP und Taurocholat eine Kurvenanpassung durchgeführt. Für jeden Einzelversuch wurden die den Kurvenverlauf beschreibenden Parameter bestimmt; diese dienten nachfolgend den Varianzanalysen. Die Kurven ließen sich mit großer Näherung durch eine Exponentialfunktion nach Mitscherlich beschreiben. Diese Funktion wurde um einen linearen Term und eine Totzeit erweitert, da die injizierten Substanzen experimentell bedingt eine gewisse Zeitspanne benötigten, um in die Galle zu gelangen (Totzeit) und die kumulierte Ausscheidung sich nach dem anfangs exponentiellen Verlauf einem Sättigungswert näherte (linearer Term). Für die mathematische Beschreibung der biliären Elimination von BSP und Oligonukleotiden wurde folgendes Regressionsmodell verwendet:

$$y(t) = E \left(1 - e^{-k(t-t_{Zeit})} \right) + m(t - t_{Zeit}) + \varepsilon$$

Bedeutung der Prozessparameter:

$y(t)$: Messwert zum Zeitpunkt t

E : Endwert des exponentiellen Teils

k : Ausscheidungs- bzw. Geschwindigkeitskonstante des exponentiellen Teils

m : Steigung des linearen bzw. konstanten Teils

t : Zeit

t_{Zeit} : Totzeit

ε : Zufallsabweichung

Weitere, abgeleitete Prozessparameter:

$G_1 = E \cdot k$ maximale Steigung bzw. initiale Steigung des exponentiellen Teils, d.h. für $t=t_{Zeit}$

$G_2 = G_1 + m$ gesamte initiale Steigung, d.h. Steigung des exponentiellen und des linearen Teils

$G_3 = \ln 2 / k$ Zeit, in der die Hälfte des Endwertes des exponentiellen Teils erreicht wird

Bei den Versuchen zur biliären Elimination von Taurocholat (vgl. Kap. 3.5.1.2, S. 64) wurde jedem untersuchten Tier zweimal TC injiziert. Die Ausscheidungskurven wurden durch ein zusammengesetztes Regressionsmodell nach Mitscherlich *ohne* linearen Term angepasst:

$$f = y_1 + y_2$$

mit

$$y_1 = E_1 \left(e^{-k_1(t-t_{Zeit_1})} \right)$$

wenn $t < t_{Zeit_1}$, dann $y_1 = 0$

$$y_2 = E_2 \left(1 - e^{-k_2(t-t_{Zeit_2}-30)} \right)$$

wenn $Zeit < (t_{Zeit_2} + 30)$, dann $y_2 = 0$

Bedeutung der Prozessparameter:

y_1, y_2 : Messwert zum Zeitpunkt t für den 1. bzw. 2. Kurventeil

E_1, E_2 : Endwert des 1. bzw. 2. exponentiellen Kurventeils

k_1, k_2 : Ausscheidungs- bzw. Geschwindigkeitskonstante der exponentiellen Teile

t : Zeit

t_{Zeit_1}, t_{Zeit_2} : Totzeit des 1. bzw. 2. Kurventeils

Weitere, abgeleitete Prozessparameter:

$G_1 = E_1 \cdot k_1$ initiale Steigung des 1. exponentiellen Anstiegs

$G_2 = E_2 \cdot k_2$ initiale Steigung des 2. exponentiellen Anstiegs

$G_3 = \ln 2 / k_1$ Zeit, in der die Hälfte des Endwertes des 1. exponentiellen Teils erreicht wird

$G_4 = \ln 2 / k_2$ Zeit, in der die Hälfte des Endwertes des 2. exponentiellen Teils erreicht wird

Für den Gallefluss während der Ausscheidung von Oligonukleotiden, BSP und Taurocholat erwies sich ebenfalls ein Regressionsmodell nach Mitscherlich als geeignet:

$$z(t) = E \left(1 - e^{-b \cdot t} \right) + \varepsilon$$

Dabei bedeuten die Prozessparameter:

$z(t)$: Messwert zum Zeitpunkt t

E : Endwert der ausgeschiedenen Gallemasse

b : Exkretionskonstante des Galleflusses

ϵ : Zufallsabweichung

Weiterer, abgeleiteter Prozessparameter:

$G_1 = -E \cdot b$ initiale Steigung, d.h. Steigung bei $t=0$

Zur Berechnung der Signifikanz der Unterschiede zwischen den Ausscheidungskurven gleicher Versuchsparemeter wurden deren Mittelwerte und Standardabweichungen verglichen. Dabei wurden alle für die hepatobiliäre Ausscheidung ermittelten Parameter und der Endwert des Galleflusses logarithmiert. Signifikanzberechnungen wurden für die jeweils angegebenen Prozessparameter durchgeführt.

Im Falle der Untersuchungen zum Transportverhalten der Oligonukleotide wurden nach der *in situ*-Galleausscheidung Organproben entnommen und für jede Stichprobe Mittelwerte und Standardabweichungen der Konzentrationen und absoluten Mengen der in den Organen enthaltenen Oligonukleotide bestimmt. Danach wurde die statistische Signifikanz der enthaltenen Werte mittels zwei- bzw. dreifaktorieller Varianzanalyse bestimmt. Als Prozessparameter dienten dabei die Konzentrationen bzw. absoluten Mengen der Oligonukleotide.

Die Antisense-Studien an *Xenopus laevis*-Oozyten wurden nur einmal mit Eiern eines einzigen Frosches durchgeführt; die statistische Auswertung erlaubte daher lediglich qualitative Aussagen. Für die zwei- bzw. dreifaktorielle Varianzanalyse wurden die gemeinsam mit der Ntcp-cRNA (vgl. 2.3, S. 43 f.) in die Oozyten injizierten Oligonukleotide entsprechend ihrer chemischen Struktur in Gruppen zusammengefasst: In einer dreifaktoriellen Varianzanalyse wurden die Einflüsse der vier verschiedenen Antisense-Oligonukleotide auf die Expression des Ntcp untersucht; Prozessparameter waren dabei Backbone-Modifikation, Gallensäure-Konjugation sowie das Vorliegen von Natriumionen im Medium während des Aufnahmeversuches. Eine zweite dreifaktorielle Varianzanalyse gab Aufschluss über die Wirkung der Phosphorothioat-Oligonukleotide; hierbei dienten Sequenz, Gallensäure-Konjugation und Natriumhaltiges Medium als Prozessparameter. Schließlich wurden die Einflüsse der beiden 20mer-Oligonukleotide ohne Gallensäure-Konjugation in einer zweifaktoriellen Varianzanalyse geprüft, wobei „Sequenz“ und „Natriumhaltiges Medium“ die Prozessparameter waren. Positiv- und Negativ-Kontrollen konnten nicht in die Varianzanalyse einbezogen werden, da bei ihnen im Gegensatz zu den anderen Versuchsreihen keines der unter 2.3 aufgeführten Oligonukleotide zusätzlich zur Ntcp-cRNA (Positiv-Kontrolle) bzw. zum Wasser (Negativ-Kontrolle) injiziert wurde.

4 Ergebnisse

4.1 Chemisch-physikalische Analytik der Oligonukleotide

4.1.1 Dünnschichtchromatographie

Über eine Mehrstufensynthese wurde der GS-C₂-Alkohol zum GS-C₂-Amin umgesetzt; letzteres war bei 4°C unter Lichtabschluss unzersetzt lagerfähig. Die Stabilität des für die Kopplung an Oligonukleotide benötigten GS-C₂-Amids erwies sich als begrenzt, weshalb Aliquote des GS-C₂-Amins unmittelbar vor geplanten Gallensäure-Oligonukleotid-Kopplungen mit Bernsteinsäureanhydrid zum GS-C₂-Monoamid umgesetzt wurden. Identität und Reinheit aller Gallensäurederivate wurden dünnschichtchromatographisch bestimmt (vgl. Kap. 3.1.3, S. 54).

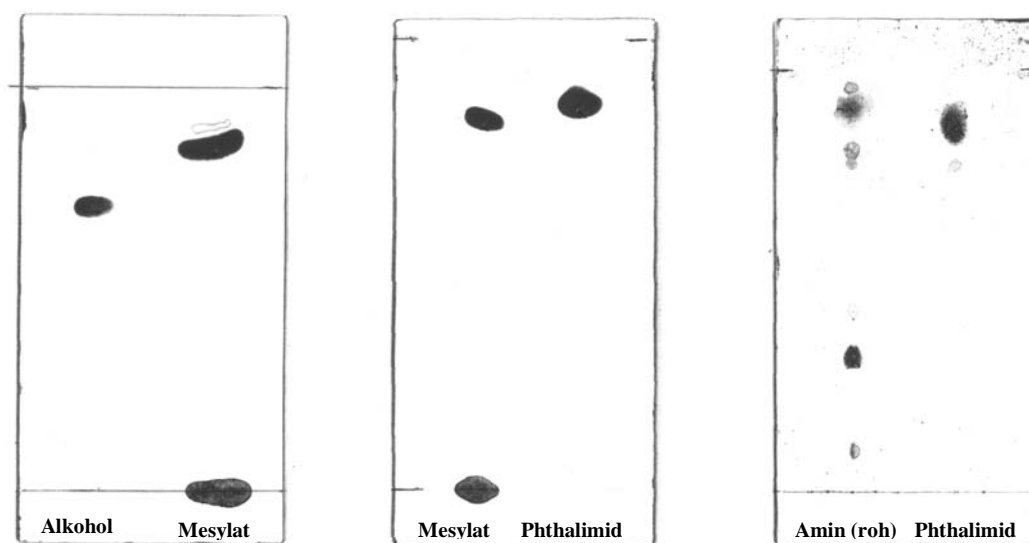


Abb. 4.1: Dünnschichtchromatogramme: Umsetzung des GS-C₂-Alkohols zum GS-C₂-Amin über die Zwischenstufen GS-C₂-Mesylat und GS-C₂-Phthalimid

Die zu untersuchenden Substanzen wurden auf der Linie im unteren Bereich der Chromatogramme aufgetragen, die obere Linie markiert das Ende der Laufmittelfront. Beim Auftragen des GS-C₂-Mesylates wurde versehentlich die Kieselgelschicht beschädigt, so dass ein Teil der Substanz am Start liegen blieb (linkes und mittleres Chromatogramm). Die Auswertung der Chromatogramme ergab eine vollständige Umsetzung des GS-C₂-Alkohols zum GS-C₂-Mesylat bzw. des GS-C₂-Mesylats zum

GS-C₂-Phthalimid. Bei der Umsetzung des GS-C₂-Phthalimids zum GS-C₂-Amin entstanden Nebenprodukte in geringen Mengen, die nicht charakterisiert wurden (rechtes Chromatogramm).

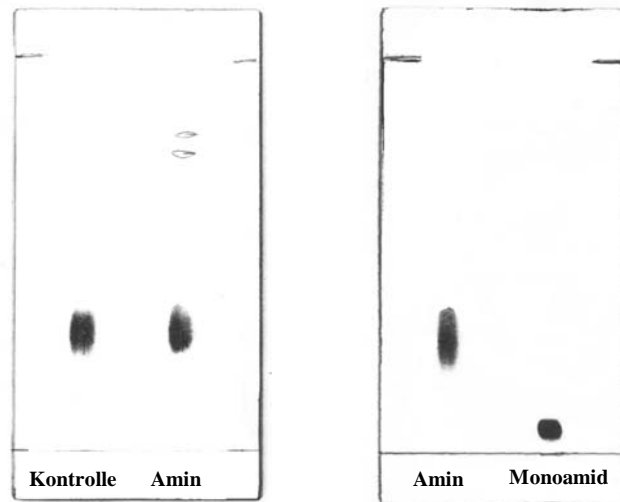


Abb. 4.2: Dünnschichtchromatogramme: Vergleich des synthetisierten GS-C₂-amins mit Reinsubstanz und Kontrolle der Umsetzung zum GS-C₂-Monoamid

Das rohe Amin wurde mittels Säulenchromatographie gereinigt; anschließend erfolgte der chromatographische Vergleich mit der Reinsubstanz. Auf diesem Chromatogramm (unten links) waren nur zwei Verunreinigungen des selbst synthetisierten Amins in sehr geringen Mengen zu sehen. Auf dem Chromatogramm, mit dem die Reaktion von GS-C₂-Amin und Bernsteinsäureanhydrid zum Amid überprüft werden sollte, waren diese Verunreinigungen nicht zu sehen.

Tab. 4.1: Ergebnisse der Dünnschichtchromatographie von Gallensäurederivaten

Bezeichnung in den Abbildungen	Substanz	Laufmittelgemisch	R _F -Wert
Alkohol	GS-C ₂ -Alkohol	Essigsäureethylester / Methanol 10:1 (Vol/Vol)	0,71
Mesylat	GS-C ₂ -Mesylat		0,82
Phthalimid	GS-C ₂ -Phthalimid		0,87
Amin (roh)	GS-C ₂ -Amin (roh)		0,32
Amin	GS-C ₂ -Amin (eigene Synthese)	Essigsäureethylester / Methanol / Triethylamin 5:1:1 (Vol/Vol/Vol)	0,29
Kontrolle	GS-C ₂ -Amin (Reinsubstanz, Aventis)		0,29
Monoamid	GS-C ₂ -Monoamid		0,06

Bei allen detektierten Gallensäurederivaten wurden die R_f -Werte ermittelt, indem die Laufstrecke jeder Substanz durch die Laufstrecke der Lösungsmittelfront dividiert wurde. Die Ergebnisse der Dünnschichtchromatographie sind in Tab. 4.1 zusammengefasst.

4.1.2 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Die Reinheit der für die in situ-Galleausscheidungsversuche eingesetzten Oligonukleotide wurde mittels HPLC überprüft. Dabei wurden folgende Retentionszeiten (R_t) ermittelt:

Tab. 4.2: Retentionszeiten der Oligonukleotide (HPLC)

Substanz (vgl. Abb. 2.3)	R_t [min]
n-ODN (15mer)	30.38
3',5'-modifiziertes 15mer	27.35 (besitzt Linker am 3'- und am 5'-Ende)
2G-ODN (15mer)	29.85 (2G-ODN mit 8 S-Atomen) 28.92 (Verunreinigung: 2G-ODN mit 7 S-Atomen, d.h. ein Sauerstoff- wurde durch ein Schwefelatom ausgetauscht) Schulter vor dem Peak mit $R_t=28.92$: 2G-ODN mit 6 S-Atomen

Nachfolgend sind die Chromatogramme der drei untersuchten Oligonukleotide abgebildet.

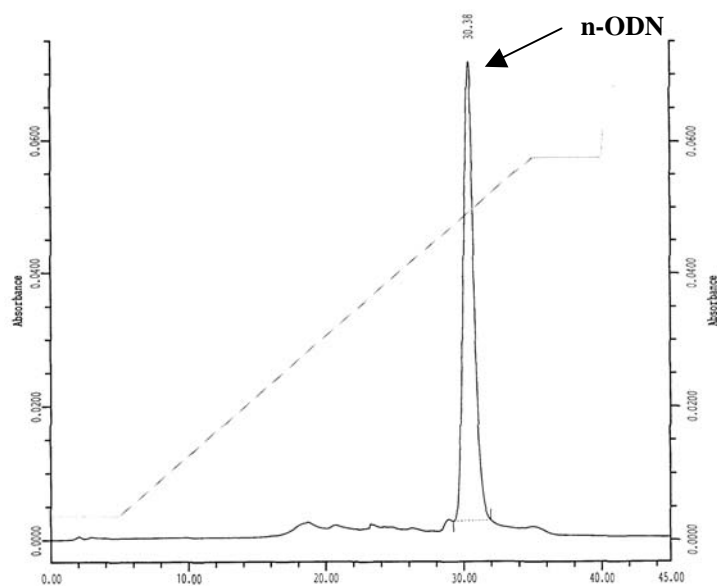


Abb. 4.3: HPLC-Diagramm des n-ODN nach Gradientenelution

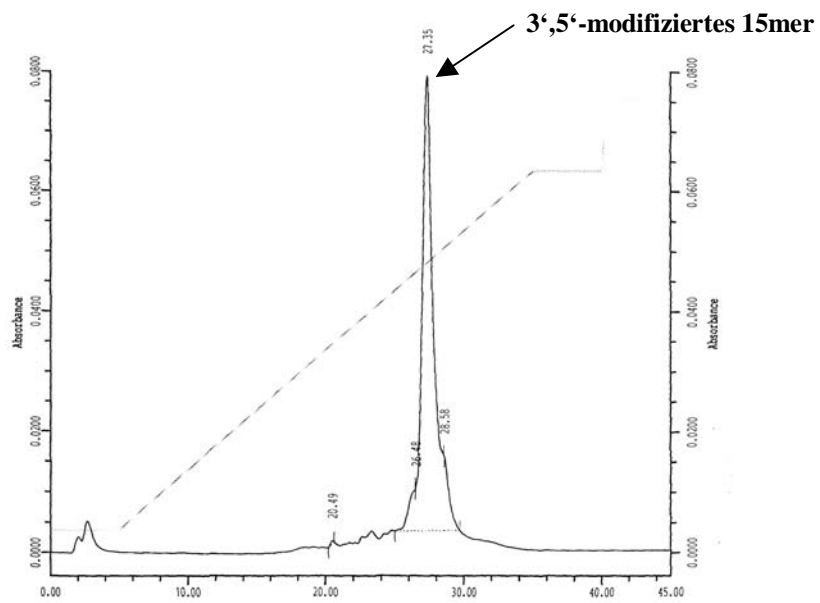


Abb. 4.4: HPLC-Diagramm des 3',5'-modifizierten 15mers nach Gradientenelution

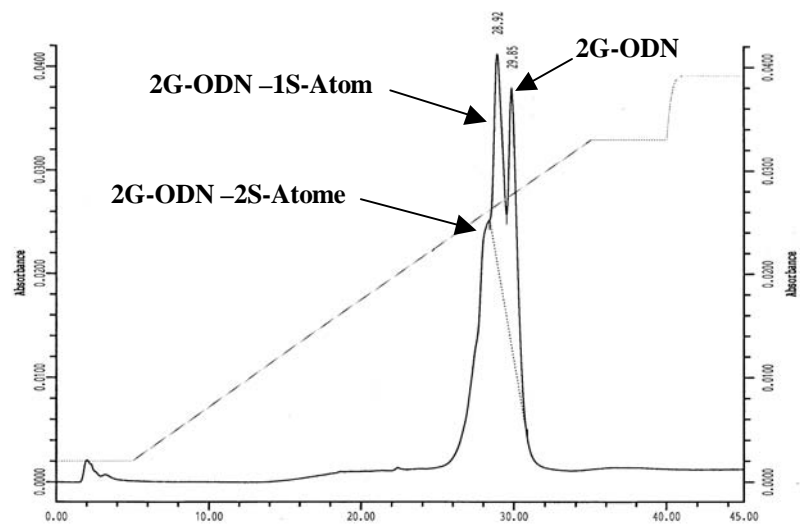


Abb. 4.5: HPLC-Diagramm des 2G-ODN nach Gradientenelution

4.1.3 Massenspektrometrie

Für die Galleausscheidungsversuche an Ratten wurden n-ODN und 2G-ODN verwendet, wobei das 2G-ODN aus dem 3',5'-modifizierten 15mer synthetisiert wurde. Die Identität der drei genannten Oligonukleotide wurde massenspektrometrisch überprüft. Bedingt durch den Herstellungsprozess lagen n-ODN und 3',5'-modifiziertes 15mer als Natriumsalze vor; sie wurden vor der massenspektroskopischen Analyse über eine Festphasenextraktionssäule entsalzt, um die freien Säuren zu erhalten. Das selbst synthetisierte 2G-ODN wurde im Verlaufe der Synthese ebenso behandelt (s. Festphasenextraktion, S. 58).

Die in Massenspektren aufgeführten Signale geben stets das Verhältnis aus Masse und Ladung des Teilchens wieder (m/z); die Masse des entsprechenden Moleküls ergibt sich demnach aus der Multiplikation des Signalwertes mit der Ladung z .

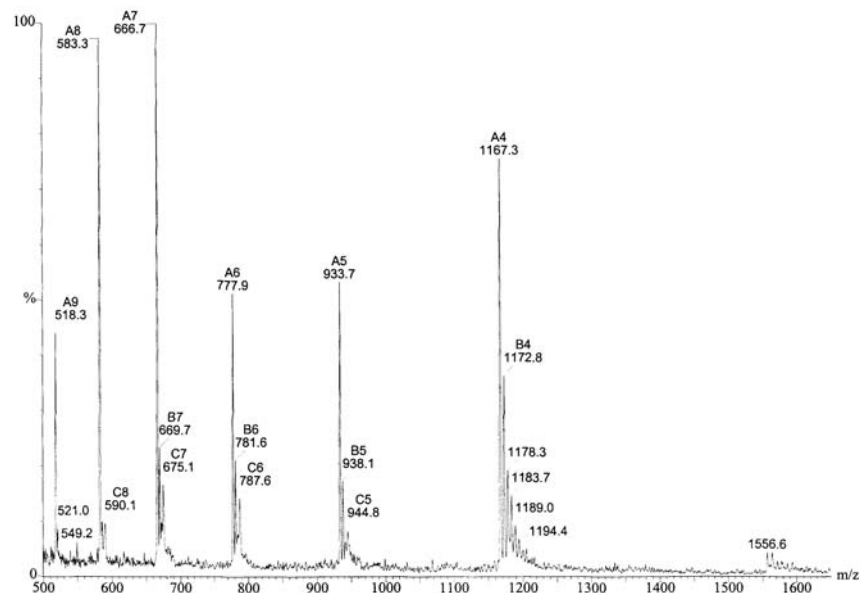


Abb. 4.6: Massenspektrum des n-ODN

Hauptpeak im Spektrum des n-ODN war das Molekülion der vollständig entsalzten Verbindung. Daneben traten Molekülionen-Peaks auf, die n-ODN-Natriumsalzen mit einem bzw. zweieinhalb Natriumionen pro Molekül zuzuordnen waren, wobei 2,5 Natriumionen für einen schnellen Austausch zwischen Bis- und Trinatriumsalz sprachen, so dass diese beiden Natriumsalze massenspektrometrisch nicht unterscheidbar waren. Vermutlich war die Entsalzung des gelieferten n-ODN-Natriumsalzes nicht vollständig gelungen. Aus der massenspektrometrischen Analyse des n-ODN wurden folgende Daten ermittelt:

Tab. 4.3: Massenspektrometrische Daten des n-ODN

Summenformel		$C_{144}H_{184}N_{54}O_{82}P_{14}S_8$		
M _{berechnet} [g/mol]		4673,5		
M _{gefunden} [g/mol]		4673,66		
Peak	Signal	z	Molekülmasse [g/mol]	Bemerkungen
A4	1167,3	4	4673,66	freie Säure
B4	1172,8	4	4695,72	1 Na
C4	1178,3	4	4730,36	2,5 Na

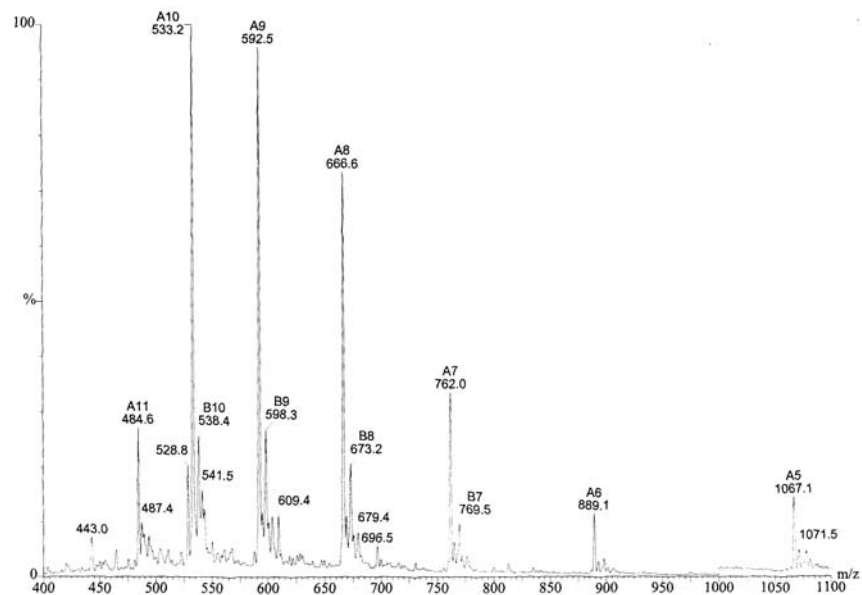


Abb. 4.7: Massenspektrum des 3',5'-modifizierten 15mers

Im Massenspektrum des 3',5'-modifizierten 15mers wurden zwei Moleküllionen-Peaks gefunden: ein Moleküllionen-Peak der freien Säure sowie ein zweiter, der einem Natriumsalz mit zweieinhalb Natriumionen pro Formeleinheit entsprach (s.o.).

Tab. 4.4: Massenspektrometrische Daten des 3',5'-modifizierten 15mers

Summenformel		C ₁₆₉ H ₂₂₇ N ₅₉ O ₉₄ P ₁₆ S ₈		
M _{berechnet} [g/mol]		5341,1		
M _{gefunden} [g/mol]		5341,20		
Peak	Signal	z	Molekülmasse [g/mol]	Bemerkungen
A5	1067,1	5	5341,20	freie Säure
B5	1071,5	5	5394,01	2,5 Na

Ebenso wie im HPLC-Diagramm zeigten sich auch im Massenspektrum des 2G-ODN neben der freien Säure der gewünschten Verbindung Peaks teilweise entschwefelter 2G-ODN-Homologe. Es handelte sich dabei um die Peaks A8 und B8, die einem Austausch von einem bzw. zwei Schwefelatomen gegen Sauerstoff im Phosphatgerüst des Oligonukleotids gegenüber dem Ausgangsprodukt entsprechen. Des weiteren wurden zwei Molekulationen-Peaks gefunden, die für eine unvollständige Entsalzung des Bis-Gallensäure-Oligonukleotids sprechen: Bei den Peaks D8 und E8 handelte es sich vermutlich um Mono-Natrium- bzw. Mono-Kalium-Salze.

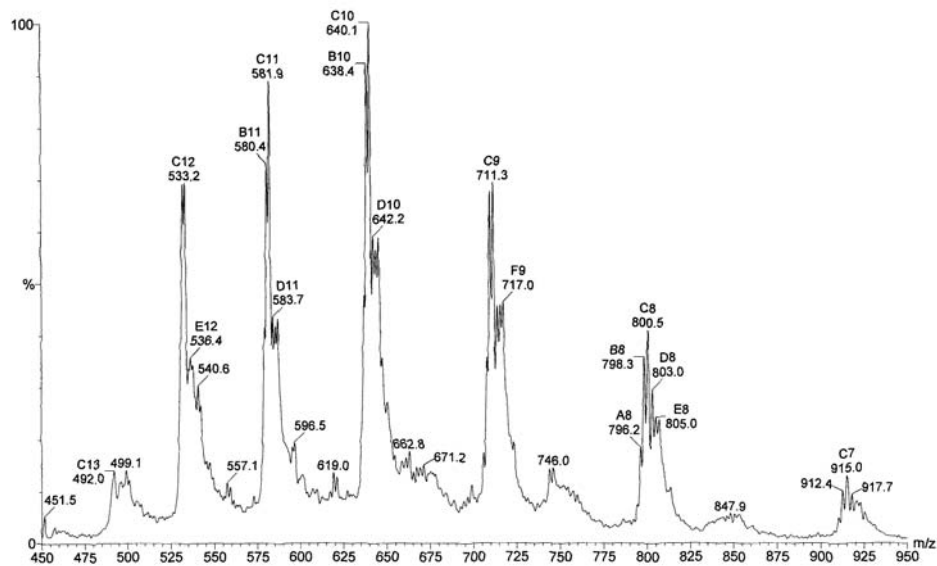


Abb. 4.8: Massenspektrum des 2G-ODN

Tab. 4.5: Massenspektrometrische Daten des 2G-ODN

Summenformel		$C_{231}H_{325}N_{61}O_{102}P_{16}S_8$		
$M_{\text{berechnet}}$ [g/mol]		6409,1		
M_{gefunden} [g/mol]		6411,15		
Peak	Signal	z	Molekülmasse [g/mol]	Bemerkungen
A8	796,2	8	6378,56	1 S gegen O ausgetauscht
B8	798,3	8	6394,80	2 S gegen O ausgetauscht
C8	800,5	8	6411,15	freie Säure
D8	803,0	8	6432,81	Mono-Natrium-Salz
E8	805,0	8	6448,08	Mono-Kalium-Salz

4.1.4 Strukturmodell

Die Minima der potenziellen Energie der drei Oligonukleotide n-ODN, 3',5'-gelinktes 15mer Phosphorothioat und 2G-ODN wurden mit der MM2-Methode des Programms Chem 3D Pro 5.0 berechnet (vgl. Kap. 3.3.2, S. 59). Nachfolgend sind die 3D-Strukturen dieser Oligonukleotide in der jeweils energieärmsten Konformation ohne (s. Abb. 4.9) und mit (s. Abb. 4.10) Hydrathülle angegeben. Wasserstoffatome und freie Elektronenpaare wurden aus Gründen der besseren Übersichtlichkeit nicht mit eingezeichnet.

Alle drei Oligonukleotide weisen eine helicale Struktur auf. Die Ausbildung der Helix wird durch Linker und Gallensäuremoleküle offensichtlich nicht beeinträchtigt. Durch die Einführung der Linker am 3'- und am 5'-Ende des n-ODN verkürzen sich wahrscheinlich die Abstände zwischen der ersten bzw. letzten Nukleotidbase der Sequenz und den in der xz-Ebene darunter bzw. darüber liegenden Nukleotidbasen geringfügig. Alle anderen Nukleotidbasen nehmen bei allen drei hier betrachteten Oligonukleotid-Derivaten vermutlich die selbe sterische Position ein. Beim Übergang vom 3',5'-gelinkten 15mer Phosphorothioat zum 2G-ODN tritt wahrscheinlich keine zusätzliche Konformationsänderung des Oligonukleotid-Gerüsts auf. Diese Aussagen sind rein qualitativ zu betrachten: Genaue Berechnungen der Abstände zwischen einzelnen Atomen und Molekülgruppen sind bei den hier betrachteten Oligonukleotiden auf Grund der Vielzahl der Atome nicht möglich. Innerhalb des Programms Chem 3D lassen sich Moleküle beliebig drehen; eine schrittweise Wiedergabe der Drehoperationen ist an dieser Stelle jedoch nicht möglich. Die oben angegebenen qualitativen Aussagen über vermutlich veränderte Abstände einzelner funktioneller Gruppen beim Übergang vom n-ODN zum 3',5'-gelinkten 15mer Phosphorothioat bzw.

2G-ODN wurden getroffen, nachdem die Moleküle in Chem 3D um die verschiedenen Achsen gedreht wurden.

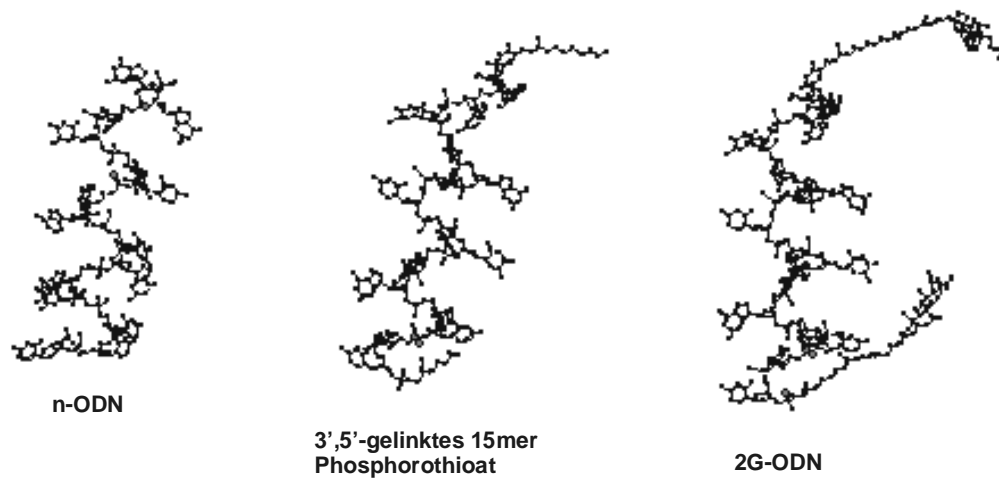


Abb. 4.9: Strukturmodelle von n-ODN, 3',5'-gelinktem 15mer Phosphorothioat und 2G-ODN ohne Hydrathüllen

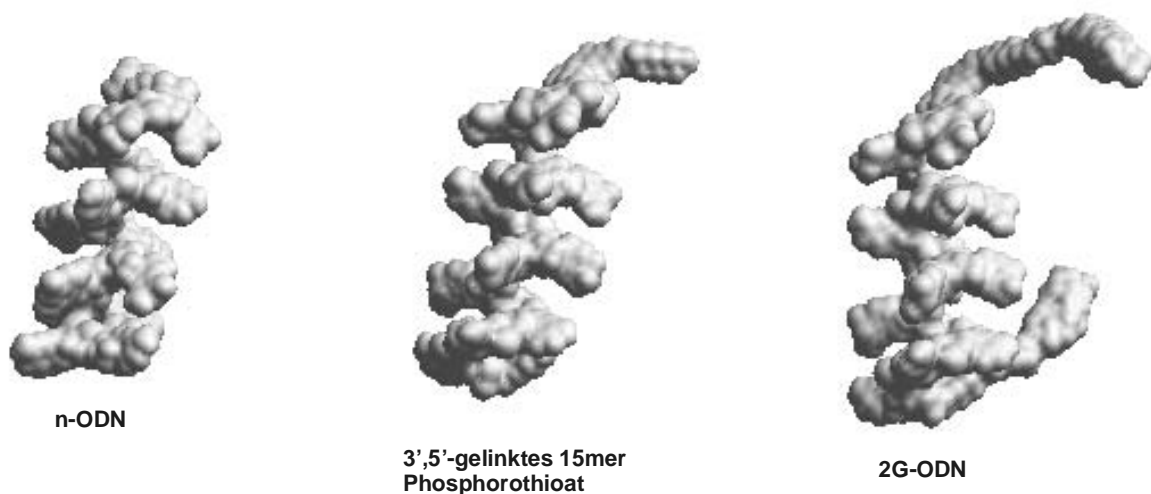


Abb. 4.10: Strukturmodelle von n-ODN, 3',5'-gelinktem 15mer Phosphorothioat und 2G-ODN mit Hydrathüllen

Die mit Hilfe des Programms Chem 3D ermittelten potenziellen Energien der drei Oligonukleotid-Derivate sind in Tab. 4.6 zusammengestellt.

Die potenzielle Energie des 3',5'-gelinkten 15mer Phosphorothioats ist um rund 25%, die des 2G-ODN um etwa 48% höher als die des n-ODN. Dies ist auf die Zunahme der

Anzahl der Atome und reaktiven funktionellen Gruppen sowie auf die eingeführten, sterisch anspruchsvollen Gruppen (Linker und Gallensäuren) zurückzuführen.

Tab. 4.6: Potenzielle Energien von n-ODN, 3',5'-gelinktem 15mer Phosphorothioat und 2G-ODN

Oligonukleotid	E_{pot} [kJ/mol]
n-ODN	2.631,6
3',5'-gelinktes 15mer Phosphorothioat	3.292,7
2G-ODN	3.861,9

4.2 Transportstudien an Membranvesikeln

Die ATP-abhängige Aufnahme des n-ODN durch canaliculäre inside-out Membranvesikel wurde mit Hilfe zweier Methoden untersucht. Dabei kamen Vesikel aus HEK K0- und HEK Ca1-Zellen zum Einsatz. Bei HEK Ca1-Zellen handelt es sich um stabil MRP2-transfizierte HEK-Zellen, bei HEK K0-Zellen um den Wildtyp.

4.2.1 Filtration durch Nitrocellulosefilter

Das n-ODN wurde in Konzentrationen von 2,2 pmol/ μ l Protein und 14,4 pmol/ μ l Protein eingesetzt. Die Vesikel beider Zelltypen transportierten nur wenig Oligonukleotid, wobei die Ergebnisse der Messungen an HEK K0-Vesikeln mit denen der Messungen an HEK Ca1-Vesikeln fast identisch waren. Des Weiteren konnten keine signifikanten Unterschiede nach Zusatz von ATP oder AMP in der Transportassaymischung beobachtet werden.

Die Ergebnisse sind im folgenden graphisch dargestellt. In der Regel wird der ATP-abhängige Nettotransport angegeben: Er ist die Differenz aus dem Transport in Gegenwart von ATP minus dem Transport in Gegenwart von AMP. Im vorliegenden Fall wurde auf die Darstellung des Nettotransportes verzichtet, da die Ergebnisse in Gegenwart beider Adenosin-Derivate fast identisch waren. Bei Verwendung einer höheren Oligonukleotid-Konzentration ergab sich daher auch nur scheinbar ein höherer Transport; die Differenz aus ATP- und AMP-abhängigem Transport war auch in diesem Fall fast gleich Null. Bei allen Versuchen wurden sehr geringe Standardabweichungen ermittelt.

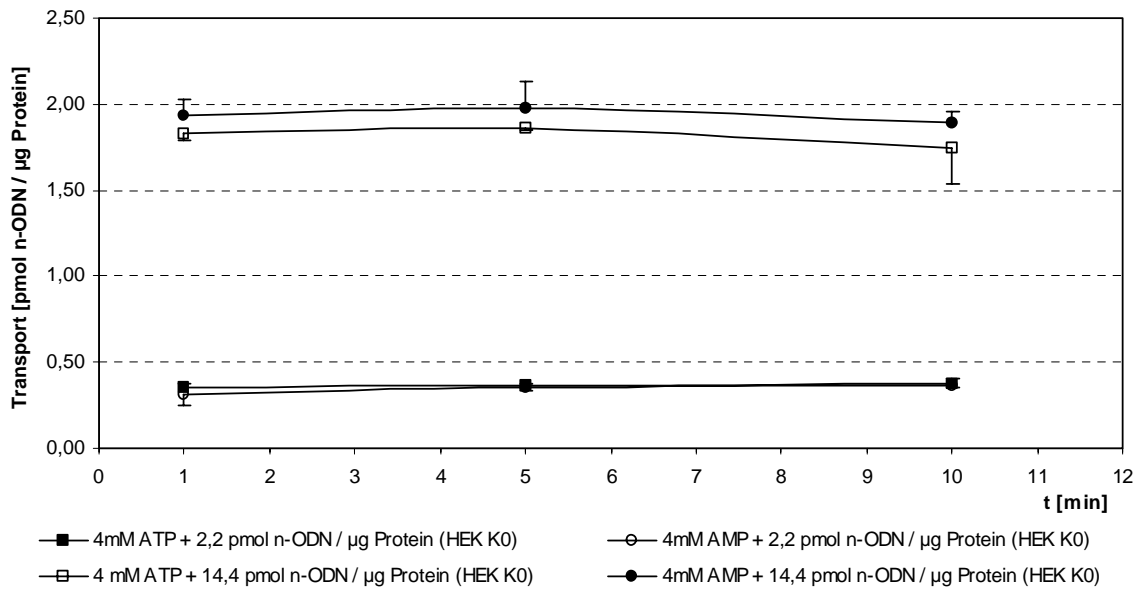


Abb. 4.11: Aufnahmemessung des n-ODN mit HEK K0-Vesikeln (Filtermethode)

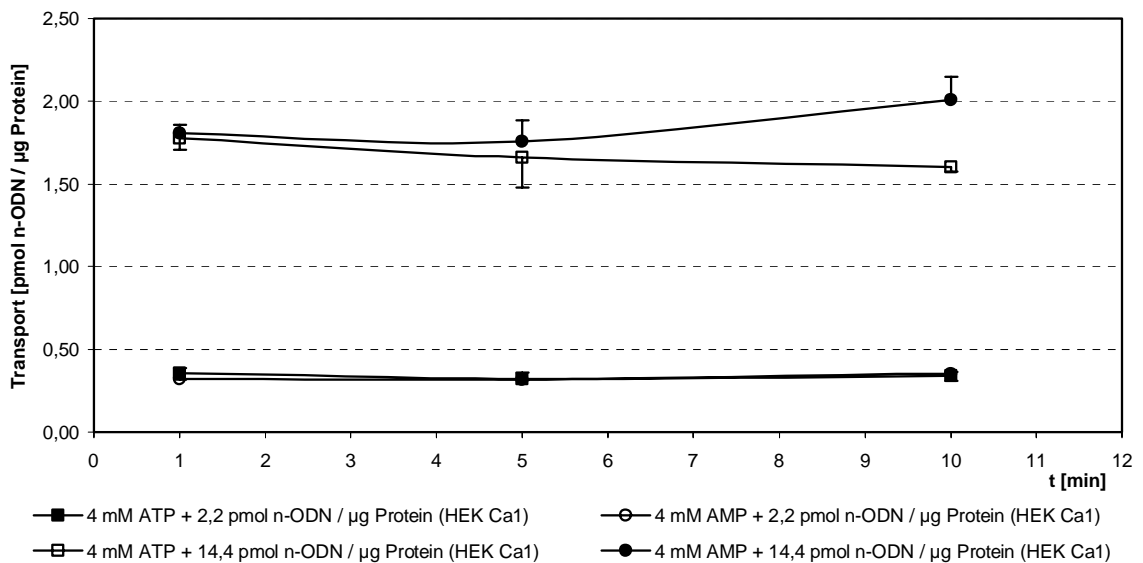


Abb. 4.12: Aufnahmemessung des n-ODN HEK mit Ca1-Vesikeln (Filtermethode)

4.2.2 Gelmatrix-Zentrifugation

Die für die Transportstudien am besten geeignete Methode hängt davon ab, wie gut die Membranvesikel vom extravesikulären Substrat getrennt werden (Keppler et al. 1998). Fast alle bekannten Substrate werden am besten mit Hilfe der Filtration durch Nitrocellulosefilter von den Vesikeln getrennt; Substrate, die hydrophober sind als

LTC₄, werden jedoch fest an Filter und Vesikel gebunden, so dass diese Methode nicht das Mittel der Wahl ist.

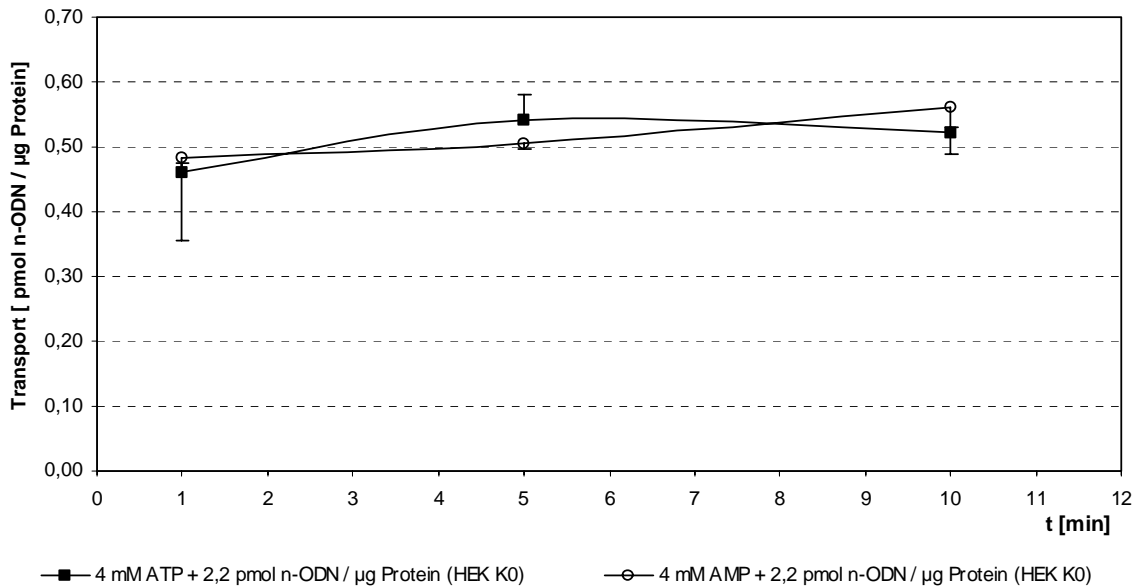


Abb. 4.13: Aufnahmemessung des n-ODN mit HEK K0-Vesikeln (Säulchenmethode)

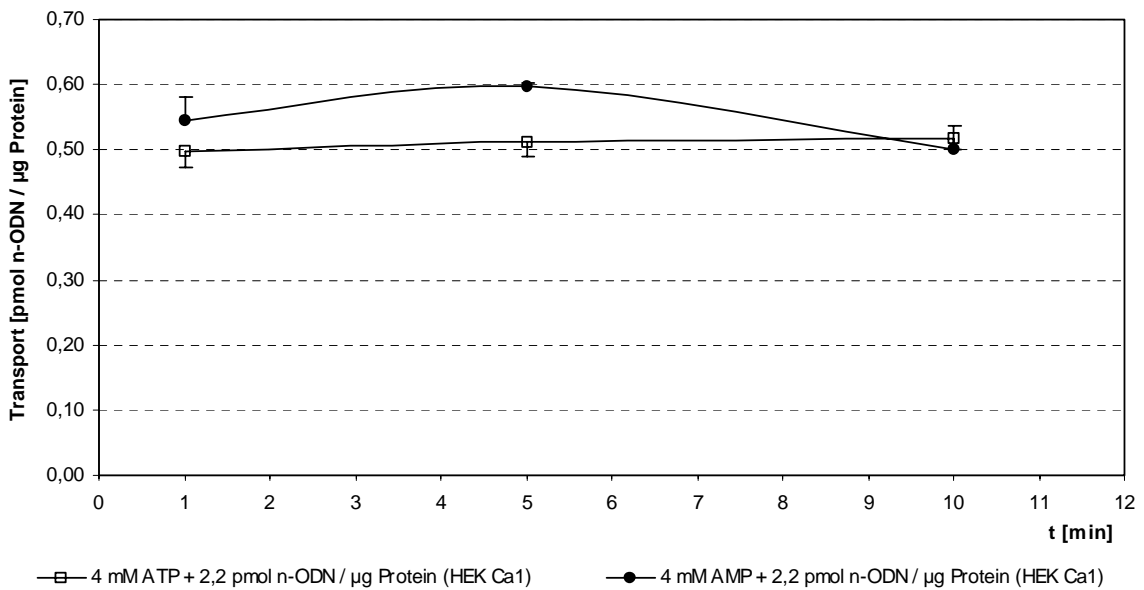


Abb. 4.14: Aufnahmemessung des n-ODN mit HEK Ca1-Vesikeln (Säulchenmethode)

Um auszuschließen, dass das mit Hilfe der Filtration durch Nitrocellulosefilter erhaltene negative Transportergebnis auf solche Bindungseffekte zurückzuführen war, wurde die ATP-Abhängigkeit des Oligonukleotid-Transportes zusätzlich nach der Gelmatrix-Zentrifugationsmethode untersucht.

Vesikel aus HEK K0- bzw. HEK Ca1-Zellen wurden mit 2,2 pmol n-ODN pro µg Protein versetzt und der Transport des Substrates in Gegenwart von ATP bzw. AMP

gemessen. Die Transportraten waren bei den Vesikeln beider Zelltypen fast identisch und sehr gering. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Transportraten in Gegenwart von ATP bzw. AMP konnte nicht festgestellt werden, weshalb in den graphischen Darstellungen auf die Angabe des ATP-abhängigen Nettotransportes verzichtet wurde.

Für die Transportstudien an Membranvesikeln mussten grosse Mengen an n-ODN eingesetzt werden; ein nennenswerter ATP-abhängiger Transport konnte jedoch nicht festgestellt werden. Deshalb wurde auf die Wiederholung der Versuche mit 2G-ODN verzichtet.

4.3 In situ-Galleausscheidung I: Vorversuche

4.3.1 In vivo-Stabilität der Oligonukleotide

Nach Injektion von 10 nmol 2G-ODN bzw. 200 nmol n-ODN in eine Jejunalvene einer anästhesierten Ratte wurde eine Stunde lang Galleflüssigkeit aufgefangen (30 min-Intervalle), die Oligonukleotide extrahiert und mittels Gelelektrophorese analysiert:

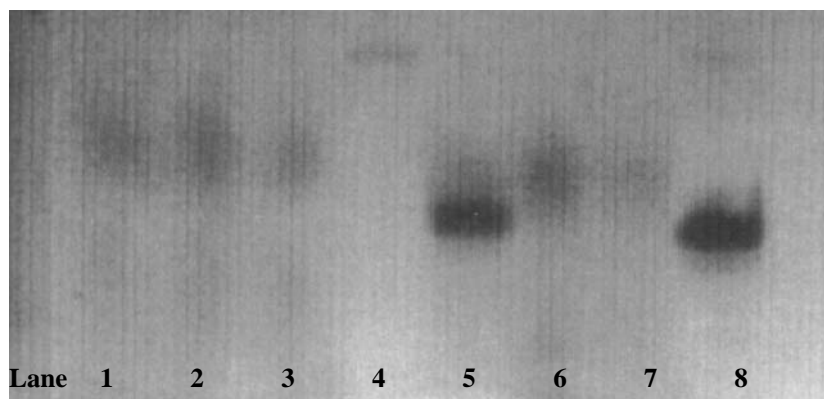


Abb. 4.15: Gelelektrophoretischer Nachweis der in vivo-Stabilität der Oligonukleotide

Lane 1:	Prägalie + 0,375 nmol 2G-ODN
Lane 2:	30 min-Probe 2G-ODN
Lane 3:	60 min-Probe 2G-ODN
Lane 4:	0,5 nmol 2G-ODN
Lane 5:	Prägalie + 7,5 nmol n-ODN
Lane 6:	30 min-Probe n-ODN
Lane 7:	60 min-Probe n-ODN
Lane 8:	5 nmol n-ODN

Die Spots des 2G-ODN sind nur schwach zu sehen; dennoch wird deutlich, dass diese Verbindung in vivo stabil ist, da die Substanzflecke der beiden aus dem in vivo-Versuch

gewonnenen und aufgearbeiteten Proben (Lane 2 und 3) auf der selben Höhe liegen wie die Kontrolle, für die Prägalle *in vitro* mit 2G-ODN versetzt wurde (Lane 1). In Lane 4 ist nichts zu sehen; die eingesetzte Substanzmenge an 2G-ODN liegt offensichtlich unterhalb der Nachweisgrenze bzw. unter der berechneten Menge von 0,5 nmol.

Die *in vivo*-Stabilität konnte auch für das n-ODN gezeigt werden. Die Spots der beiden *in vivo* erhaltenen Proben (Lane 6 und 7) liegen geringfügig über denen der beiden Kontrollen (Lane 5 und 8). Möglicherweise konnten die *in vivo* gewonnenen Proben bei der Aufarbeitung nicht vollständig von anderen in der Galle vorhandenen Substanzen getrennt werden.

Bei beiden *in vivo* untersuchten Oligonukleotiden sind am unteren Ende des Gels sehr schwache Banden zu erkennen, die das Vorliegen kürzerkettiger Oligonukleotide andeuten. Aus der geringen Intensität dieser Signale kann vermutet werden, dass die untersuchten Oligonukleotide *in vivo* stabil sind und eine mögliche Degradation durch Nukleasen lediglich eine untergeordnete Rolle spielt.

4.3.2 Substrateigenschaften des Glucose-6-Phosphat-Translokase-Inhibitors S 3025

Das Chlorogensäurederivat S 3025 wird von Wistarratten rasch und in großen Mengen, von TR⁻-Ratten jedoch kaum in die Galle ausgeschieden. Deshalb wird vermutet, dass es sich bei dieser Substanz um ein spezifisches mrp2-Substrat handelt (Herling et al. 2002).

4.3.2.1 Einfluss von S 3025 auf die hepatobiliäre Elimination von BSP

Um zu untersuchen, ob S 3025 die hepatobiliäre Elimination des oatp1- und mrp2-Substrates BSP beeinflusst, wurden Wistarratten zunächst 1 bzw. 5 μmol BSP und TR⁻-Ratten 5 μmol BSP, gelöst in 500 μl PBS, in eine Femoralvene injiziert (Kontrollen), die Galle über zwei Stunden aufgefangen und das enthaltene BSP photometrisch bestimmt. In weiteren Versuchen wurden beiden Rattenstämmen 5 μmol S 3025, gelöst in 1 ml DMSO/Glycerin/PBS 15:15:70 (Vol/Vol/Vol) in eine V. femoralis appliziert, 2 min später wurden 1 μmol BSP (nur Wistarratten) oder 5 μmol BSP (beide Rattenstämme) in 500 μl PBS in eine Femoralvene injiziert und der BSP-Gehalt in der Galle wie bei den Kontrollen ermittelt (vgl. Kap. 3.5.1.2, S. 64).

In der fraktionierten Darstellung der BSP-Ausscheidung durch Wistarratten zeigte sich, dass die Injektion von 5 μmol BSP zu einem raschen Anfluten dieser Substanz in der Galle führte (s. Abb. 4.16, S. 87). Die höchsten BSP-Konzentration wurde nach 10 bzw. 20 min ermittelt, wobei diese beiden Werte fast identisch waren. Danach fielen die BSP-Konzentrationen bis 60 min nach der Injektion rasch ab und blieben in der zweiten

Stunde des Messzeitraumes fast konstant. In der Kombination 5 μmol S 3025 / 5 μmol BSP wurde die höchste biliäre BSP-Konzentration 20 min nach der BSP-Injektion erreicht; die nach 10 und 30 min vorliegenden BSP-Konzentrationen waren deutlich geringer. Auch bei diesen Versuchen fiel die BSP-Konzentration nach Erreichen des Maximums bis zur 60. min stark ab und blieb danach bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes fast unverändert.

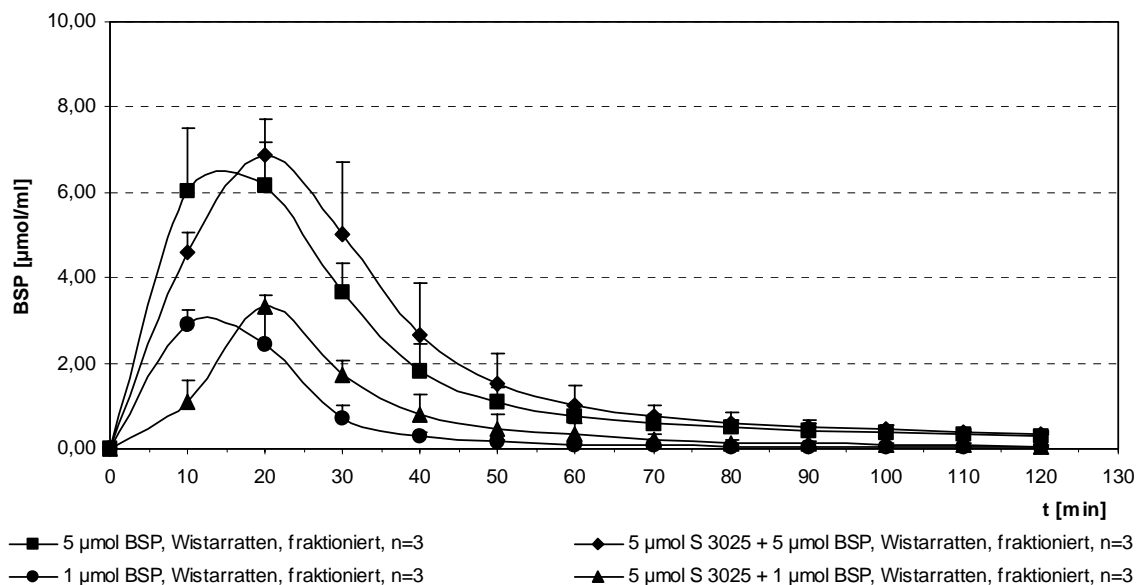


Abb. 4.16: Einfluss von 5 μmol S 3025 auf die fraktionierte Ausscheidung von BSP in die Galle von Wistarratten

Nach Injektion von 1 μmol BSP wurde die höchste BSP-Konzentration in der Galle nach 10 min erreicht; anschließend nahm die BSP-Konzentration rasch ab und blieb ab der 60. Minute weitgehend konstant. Wurden jedoch vor Injektion von 1 μmol BSP 5 μmol S 3025 appliziert, so verschob sich das Maximum der BSP-Konzentration in der Galle gegenüber den Kontrollen um 10 min nach hinten. Auch nach S 3025-Präinjektion nahm die BSP-Konzentration in der Galle nach Erreichen des Maximums bis zur 60. Minute rasch ab und blieb danach bis zum Ende des Messzeitraumes auf niedrigem Niveau konstant.

In der kumulierten Darstellung waren die Graphen für die Ausscheidung von 5 μmol BSP mit und ohne Präinjektion von 5 μmol S 3025 in den ersten 20 min fast deckungsgleich; danach ergaben sich für die Kurve der S 3025-Präinjektion scheinbar höhere Werte (s. Abb. 4.17, S. 88). Auf Grund der relativ hohen Standardabweichungen war dieser Befund jedoch nicht signifikant. Dagegen zeigte sich, dass 5 μmol S 3025 die Elimination von 1 μmol BSP signifikant beeinflussten: Die Präinjektion des Glucose-6-Phosphat-Translokase-Inhibitors resultierte in einer stark verringerten initialen Steigung. Ab der 60. Minute waren die beiden Graphen deckungsgleich. Für

beide Versuchsreihen ergaben sich insgesamt ausgeschiedene BSP-Mengen, die leicht über den injizierten lagen. Dies ist auf die Summation von Messfehlern zurückzuführen.

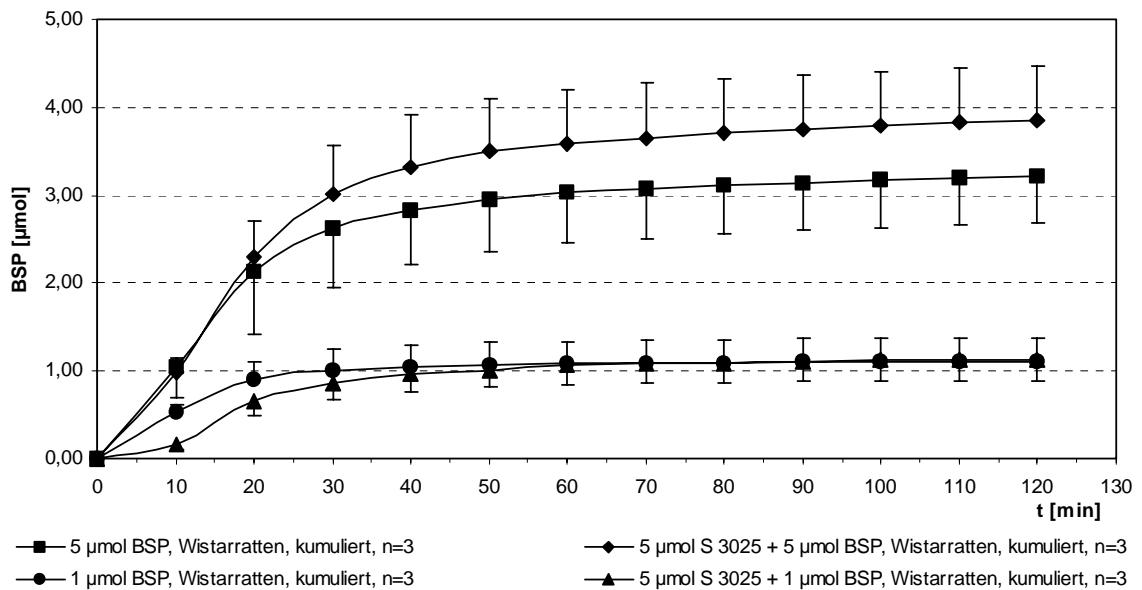


Abb. 4.17: Einfluss von 5 µmol S 3025 auf die kumulierte Ausscheidung von BSP in die Galle von Wistarratten

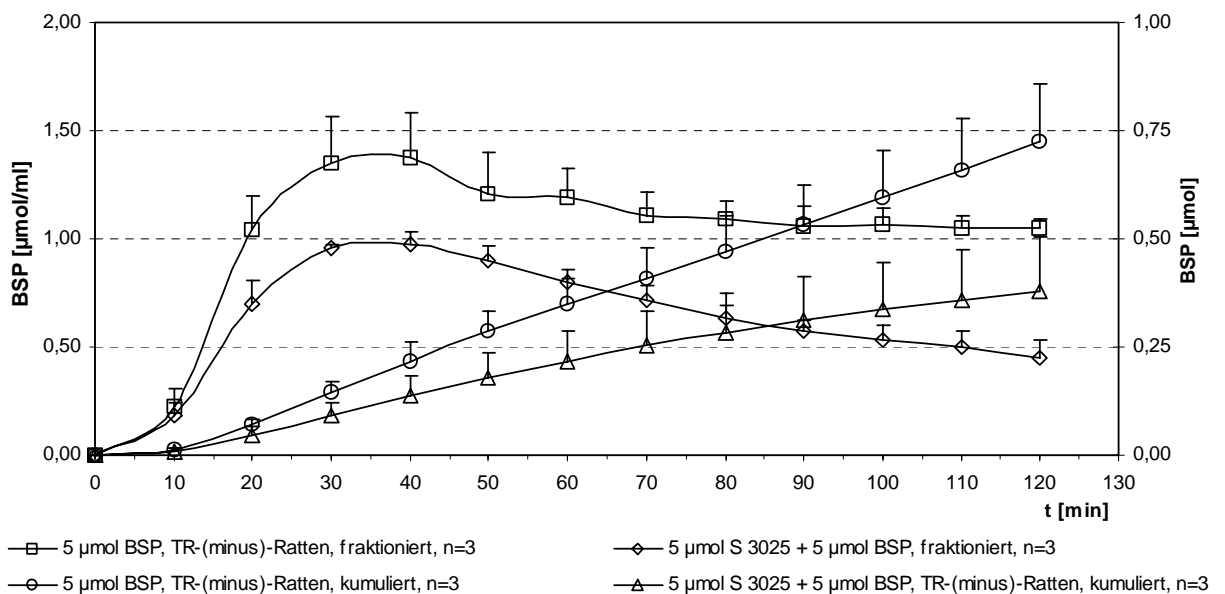


Abb. 4.18: Einfluss der Präinjektion von 5 µmol S 3025 auf die Ausscheidung von 5 µmol BSP bei TR⁻-Ratten

Bei TR⁻-Ratten zeigte sich in der fraktionierten Darstellung der hepatobiliären Elimination von 5 µmol BSP kein scharfes Maximum, wobei es keine Rolle spielte, ob eine Präinjektion von 5 µmol S 3025 stattgefunden hatte oder nicht (Abb. 4.18). Mit und ohne Präinjektion stieg die BSP-Konzentration in der Galle nur langsam an und

erreichte im Zeitraum von 30-60 min nach BSP-Injektion die höchsten Werte. Die Präinjektion von S 3025 führte zu jedem Zeitpunkt zu niedrigeren BSP-Konzentrationen in der Galle, als dies bei den Kontrollen der Fall war. In der kumulativen Darstellung wurden für die BSP-Ausscheidung nach Applikation von 5 μmol S 3025 zu jedem Messzeitpunkt signifikant niedrigere Werte gefunden als bei den Kontrolltieren. Die Präinjektion von S 3025 führte bei den TR⁻-Ratten zu einem um etwa 48% reduzierten Endwert der Ausscheidung von BSP.

Bei allen Wistarratten nahm die Gallenmenge von 30min-Intervall zu 30min-Intervall kontinuierlich ab (s. Abb. 9.1, S. 201). Diese Abnahme der Gallenmenge fiel beim Übergang vom ersten zum zweiten 30min-Intervall am deutlichsten aus und verlangsamte sich dann. Dieser Effekt dürfte auf die choleretische Wirkung und die rasche Elimination von BSP zurückzuführen sein. Die Präinjektion von S 3025 hatte keinen Einfluss auf die ausgeschiedene Gallenmenge; nach Applikation von 1 μmol BSP wurde jedoch insgesamt mehr Galle sezerniert als nach Injektion von 5 μmol BSP (s. Tab. 9.1, S. 202), wobei Exkretionskonstante und initiale Steigung des Galleflusses im Falle der niedrigeren BSP-Konzentration kleinere Werte annahmen.

Bei den TR⁻-Ratten war im Gegensatz zu den Wistarratten im Verlauf des 120minütigen Messzeitraumes keine Abnahme der Gallenmenge zu beobachten; es wurden jedoch insgesamt signifikant geringere Gallenmengen sezerniert (s. Tab. 9.2, S. 202), und Exkretionskonstante und initialer Gallefluss waren bei den Wistarratten höher.

Tab. 4.7 zeigt die im 120-minütigen Messzeitraum ausgeschiedenen BSP- und Gallenmengen.

Tab. 4.7: Nach Präinjektion von 5 μmol S 3025 erhielten Wistarratten 1 bzw. 5 μmol BSP; TR⁻-Ratten wurden 5 μmol BSP injiziert. Es sind Mittelwerte und Standardabweichungen des im 120-minütigen Messzeitraums insgesamt in die Galle ausgeschiedenen BSP sowie die in diesem Zeitraum aufgefangene Gallenmenge dargestellt.

Präinjektion / Rattenstamm	ausgeschiedene Menge BSP		ausgeschiedene Gallenmenge [g]
	[μmol]	[%]	
5 μmol BSP / Wistarratte	3,2091 \pm 0,5246	64,18 \pm 10,49	1,2670 \pm 0,1939
5 μmol S 3025 +5 μmol BSP / Wistarratte	3,8468 \pm 0,6202	76,94 \pm 12,40	1,4390 \pm 0,3192
1 μmol BSP / Wistarratte	1,1105 \pm 0,2663	111,05 \pm 26,63	1,5821 \pm 0,2305
5 μmol S 3025 +1 μmol BSP / Wistarratte	1,1291 \pm 0,2418	112,91 \pm 24,18	1,5140 \pm 0,2753
5 μmol BSP / TR ⁻ -Ratte	0,7270 \pm 0,1331	14,54 \pm 2,66	0,6853 \pm 0,1233
5 μmol S 3025 + 5 μmol BSP / TR ⁻ -Ratte	0,3806 \pm 0,1238	7,61 \pm 2,48	0,5765 \pm 0,1695

Die experimentell gefundenen Unterschiede wurden mittels zweifaktorieller Varianzanalysen hinsichtlich ihrer Signifikanz untersucht. Hierfür wurden zunächst Kurvenanpassungen für die kumulierten Ausscheidungen durchgeführt (vgl. Kap. 3.7 ,

S. 70 ff.) und anschließend die statistischen Irrtumswahrscheinlichkeiten p bzw. Signifikanzen der ermittelten Prozessparameter berechnet.

Der Parameter „E“ stellt dabei den Endwert des exponentiellen Teils dar, „k“ ist die Ausscheidungs- bzw. Geschwindigkeitskonstante des exponentiellen Teils, „tZeit“ die Totzeit zwischen der Injektion des Substrates und seinem erstmaligen Erscheinen in der Galle, „m“ die Steigung des linearen bzw. konstanten Teils der Ausscheidung, „G₁“ die maximale bzw. initiale Steigung des exponentiellen Anstiegs, „G₂“ die gesamte initiale Steigung, d.h. die Steigung des exponentiellen und des linearen Teils und „G₃“ die Zeit, in der die Hälfte des Endwertes des exponentiellen Teils erreicht wird. Für die statistische Berechnung wurden die logarithmierten Werte der Prozessparameter herangezogen.

Zunächst wurde eine Varianzanalyse für die an Wistarratten durchgeführten Experimente durchgeführt. Haupteffekte waren hierbei „5 μmol S 3025“ und „1 bzw. 5 μmol BSP“. In Tab. 4.8 sind die ermittelten Signifikanzen und statistischen Irrtumswahrscheinlichkeiten p aufgeführt.

Tab. 4.8: Ergebnisse der zweifaktoriellen Varianzanalyse zur Untersuchung des Einflusses von 5 μmol S 3025 auf die hepatobiliäre Ausscheidung von 1 bzw. 5 μmol BSP bei Wistarratten

Parameter	Haupteffekte		Wechselwirkung
	5 μmol S 3025	1 bzw. 5 μmol BSP	
log(E)	n.s. ($p=0,2914$)	$p<0,0001$	n.s. ($p=0,2694$)
log(k)	n.s. ($p=0,0872$)	n.s. ($p=0,0866$)	n.s. ($p=0,03466$)
log(tZeit)	$p=0,0062$	n.s. ($p=0,2508$)	$p=0,0354$
log(m)	n.s. ($p=0,2120$)	$p=0,0058$	n.s. ($p=0,7344$)
log(G ₁)	n.s. ($p=0,6525$)	$p=0,0354$	n.s. ($p=0,6353$)
log(G ₂)	n.s. ($p=0,6606$)	$p=0,0366$	n.s. ($p=0,6350$)
log(G ₃)	n.s. ($p=0,2293$)	n.s. ($p=0,2411$)	n.s. ($p=0,4132$)

Die Gabe von 5 μmol S 3025 hatte nur auf die Totzeit bis zum erstmaligen Erscheinen von BSP in der Galle einen signifikanten Einfluss; sie verlängerte sich nach Präinjektion von S 3025 unabhängig von der Konzentration des anschließend applizierten BSP. Dagegen beeinflusste die BSP-Konzentration den Endwert E, die lineare Steigung m, die maximale Steigung des exponentiellen Kurventeils (G₁) und die gesamte initiale Steigung (G₂), indem diese Werte bei der niedrigeren BSP-Konzentration signifikant geringer ausfielen als bei der höheren. Im Hinblick auf die Totzeit (tZeit) trat eine Wechselwirkung zwischen der Applikation von 5 μmol S 3025 und der BSP-Konzentration auf: Bei Injektion von 1 μmol BSP verlängerte S 3025 die Zeit bis zum erstmaligen Erscheinen dieses Farbstoffes in der Galle mehr als bei Applikation von 5 μmol .

Eine zweite, ebenfalls zweifaktorielle Varianzanalyse hatte zum Ziel, die Stichhaltigkeit der Einflüsse von 5 $\mu\text{mol S 3025}$ und des Rattenstammes auf die hepatobiliäre Elimination von 5 $\mu\text{mol BSP}$ zu untersuchen. Die dabei erhaltenen statistischen Irrtumswahrscheinlichkeiten p bzw. Signifikanzen sind in Tab. 4.9 aufgeführt. Untersuchte Haupteffekte waren „5 $\mu\text{mol S 3025}$ “ und „Rattenstamm“.

Tab. 4.9: Ergebnisse der zweifaktoriellen Varianzanalyse zur Untersuchung des Einflusses von 5 $\mu\text{mol S 3025}$ auf die hepatobiliäre Ausscheidung von 5 $\mu\text{mol BSP}$ bei Wistar- und TR⁻-Ratten

Parameter	Haupteffekte		Wechselwirkung
	5 $\mu\text{mol S 3025}$	Rattenstamm	
log(E)	n.s. (p=0,0592)	p<0,0001	n.s. (p=0,8829)
log(k)	n.s. (p=0,2175)	n.s. (0,4244)	n.s. (p=0,2421)
log(tZeit)	n.s. (p=0,9954)	knapp n.s. (p=0,0544)	n.s. (p=0,7143)
log(m)	p<0,0001	n.s. (p=0,2456)	p=0,0010
log(G ₁)	n.s. (p=0,9424)	p=0,0003	n.s. (p=0,9232)
log(G ₂)	n.s. (p=0,8846)	p=0,0090	n.s. (p=0,8550)
log(G ₃)	n.s. (p=0,6502)	n.s. (p=0,1611)	n.s. (p=0,6617)

Die Gabe von S 3025 führte bei beiden Rattenstämmen zu einer signifikanten Verringerung des Anstiegs des linearen Kurventeils, hatte aber keinen Einfluss auf die übrigen Prozessparameter. Für die Wistarratten ergaben sich ein höherer Endwert und größere initiale Steigungen des linearen Kurventeils (G₁) sowie der gesamten Kurve (G₂) als bei den TR⁻-Ratten. Die Totzeit bis zum erstmaligen Auftreten von BSP in der Galle war bei TR⁻-Ratten gegenüber den Wistarratten verlängert; dieser Wert war jedoch knapp nicht signifikant.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass S 3025 die hepatobiliäre Ausscheidung von BSP bei Wistar- und TR⁻-Ratten verzögert. Die Gesamtausscheidung des BSP wird bei Wistarratten nicht beeinflusst, wobei sowohl BSP als auch S 3025 rasch hepatobiliär eliminiert werden und der beobachtete Messzeitraum von 120 min vermutlich ausreichte, um beide Substanzen fast quantitativ in die Galle zu sezernieren. Dagegen führt die Applikation von S 3025 bei TR⁻-Ratten innerhalb von 120 Minuten zu einem geringeren Endwert der Ausscheidung von BSP.

Es konnte nicht abschließend geklärt werden, warum TR⁻-Ratten nach Präinjektion von S 3025 weniger BSP ausschieden. Sowohl S 3025 als auch BSP werden bevorzugt über den mrp2 biliär sezerniert. Da TR⁻-Ratten keinen mrp2 besitzen, BSP aber dennoch - wenn auch in geringen Mengen - in die Galle ausgeschieden wird, ist vermutlich mindestens ein weiterer canaliculärer Transporter an der Ausscheidung beteiligt. Möglicherweise wird auch S 3025 nicht ausschließlich über den mrp2 in die Galle

ausgeschieden. Sollten S 3025 und BSP in Abwesenheit des mrp2 über denselben canaliculären Transporter ausgeschieden werden, wäre die Hemmung der BSP-Ausscheidung durch S 3025 bei TR⁻-Ratten einleuchtend.

4.3.2.2 Einfluss von S 3025 auf die hepatobiliäre Elimination von Taurocholat

Die natürliche Gallensäure Taurocholat wird von Hepatozyten zu 80% über den Ntcp und zu 20% über den oatp1 aufgenommen und über die Bsep biliär sezerniert (vgl. Kap. 1.3.1, S. 13). Dagegen erfolgen Aufnahme und Ausscheidung von S 3025 wahrscheinlich über oatp1 und mrp2 (vgl. Kap. 1.3.3, S. 18). Um festzustellen, ob S 3025 die in situ-Galleausscheidung von Taurocholat beeinflusst, erhielten Wistarratten zweimal im Abstand von 30 min 1 bzw. 5 µmol Taurocholat; TR⁻-Ratten erhielten zweimal zu denselben Zeitpunkten 5 µmol TC (vgl. Kap. 3.5.1.2, S. 64). In der 24. min der Versuche wurden 5 µmol S 3025 i.v. appliziert.

Bei Wistarratten wurde in der fraktionierten Darstellung nach Injektion von 5 µmol Taurocholat unabhängig von einer Präinjektion von S 3025 jeweils 4 min nach TC-Injektion ein Peak erreicht (s. Abb. 4.19, S. 93). Die erste TC-Dosis war nach 30 min vollständig biliär sezerniert, da die Kurve zu diesem Zeitpunkt auf die Nulllinie abgefallen war. Nach der zweiten TC-Injektion war die Konzentration dieser Substanz am Maximum etwas geringer als nach der ersten Gabe. Auch nach dieser zweiten TC-Gabe fiel die Kurve schnell ab, und am Ende der Messzeit war die Gesamtmenge des applizierten Substrates über die Galle ausgeschieden. Wurde den Wistarratten zweimal innerhalb von 30 min 1 µmol Taurocholat verabreicht, so erschien der erste Peak nach 4 min; nach der zweiten Injektion waren die 4 bzw. 8 min nach Applikation gefundenen TC-Konzentrationen fast gleich (s. Abb. 4.19, S. 93). Die Ausscheidung erfolgte auch bei dieser Dosierung sehr rasch; je 30 min nach Injektion war das Substrat bereits vollständig über die Galle ausgeschieden.

Bei TR⁻-Ratten trat die maximale TC-Konzentration in der Galle nach Injektion von 5 µmol dieses Substrates jeweils 8 min nach Injektion auf (s. Abb. 4.19, S. 93). Die erste Dosis wurde innerhalb von 30 min nicht quantitativ in die Galle ausgeschieden. Der nach der zweiten Injektion auftretende Peak war deshalb scheinbar höher als der erste; bezogen auf die kurz vor der zweiten Injektion in der Galle vorhandene TC-Konzentration war seine hohe Konzentration jedoch fast identisch mit derjenigen des ersten Peaks. Nach der zweiten TC-Applikation war der Kurvenabfall etwas weniger steil als nach der ersten: Da die Exkretion der ersten TC-Gabe zu diesem Zeitpunkt noch nicht abgeschlossen war, wurde nach der zweiten Taurocholat-Injektion Substrat aus beiden Applikationen sezerniert. Gegen Ende des 120-minütigen Messzeitraumes war die Sekretion von Taurocholat bei TR⁻-Ratten fast abgeschlossen.

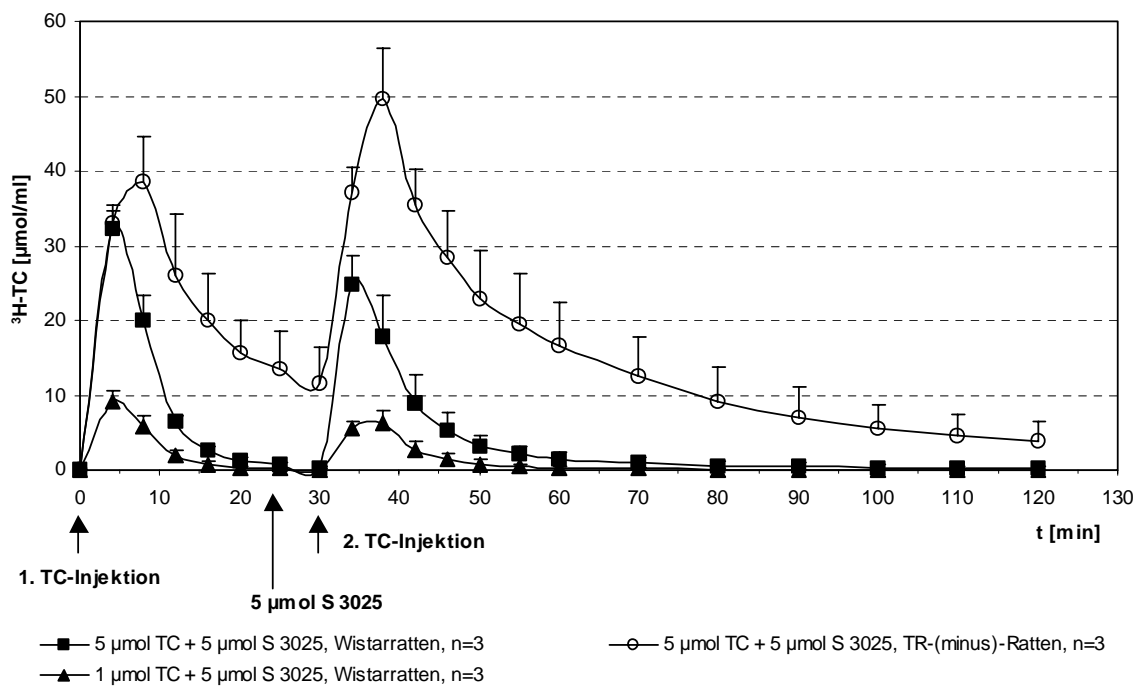


Abb. 4.19: Fraktionierte Ausscheidung von Taurocholat durch Wistar- und TR⁻-Ratten mit und ohne Präinjektion von 5 µmol S 3025

Die kumulative Darstellung zeigte, dass Wistarratten beide Taurocholat-Dosen unabhängig von einer Präinjektion von S 3025 innerhalb von 30 min quantitativ in die Galle ausschieden (s. Abb. 4.20, S. 94). Sowohl bei Applikation von 1 µmol als auch nach Injektion von 5 µmol waren die Kurventeile mit und ohne Gabe von S 3025 nahezu deckungsgleich. Bei TR⁻-Ratten stieg die Kurve dagegen nach der zweiten Injektion von 5 µmol Taurocholat steiler an als nach der ersten (s. Abb. 4.20, S. 94). Zum Zeitpunkt der zweiten Injektion war die Ausscheidung der ersten TC-Dosis noch nicht vollständig abgeschlossen, so dass nach der zweiten Injektion mehr sezernierbares TC zur Verfügung stand als nach der ersten.

Bei Wistarratten, die zweimal 5 µmol Taurocholat erhalten hatten, nahm die Gallmenge von 30min-Intervall zu 30min-Intervall ständig ab, wobei die Abnahme zwischen dem ersten und dem zweiten Intervall am größten war (s. Abb. 9.2, S. 202). Nach zweimaliger Applikation von 1 µmol Taurocholat blieben die Gallmengen in der ersten Stunde des Messzeitraumes annähernd konstant, fielen dann leicht ab und blieben bis zum Ende der 120-minütigen Messzeit auf diesem Niveau. Die Konzentration des injizierten Taurocholats hatte keine signifikante Wirkung auf den Gallefluss (s. Tab. 9.3, S. 203). Der Gallefluss der TR⁻-Ratten war über den gesamten Messzeitraum weitgehend konstant und bedeutend niedriger als bei den Wistarratten (s. Abb. 9.2, S. 202). Signifikante Unterschiede des Galleflusses bei den beiden Rattenstämmen

existierten im Hinblick auf die initiale Steigung und die Exkretionskonstante (s. Tab. 9.4, S. 203).

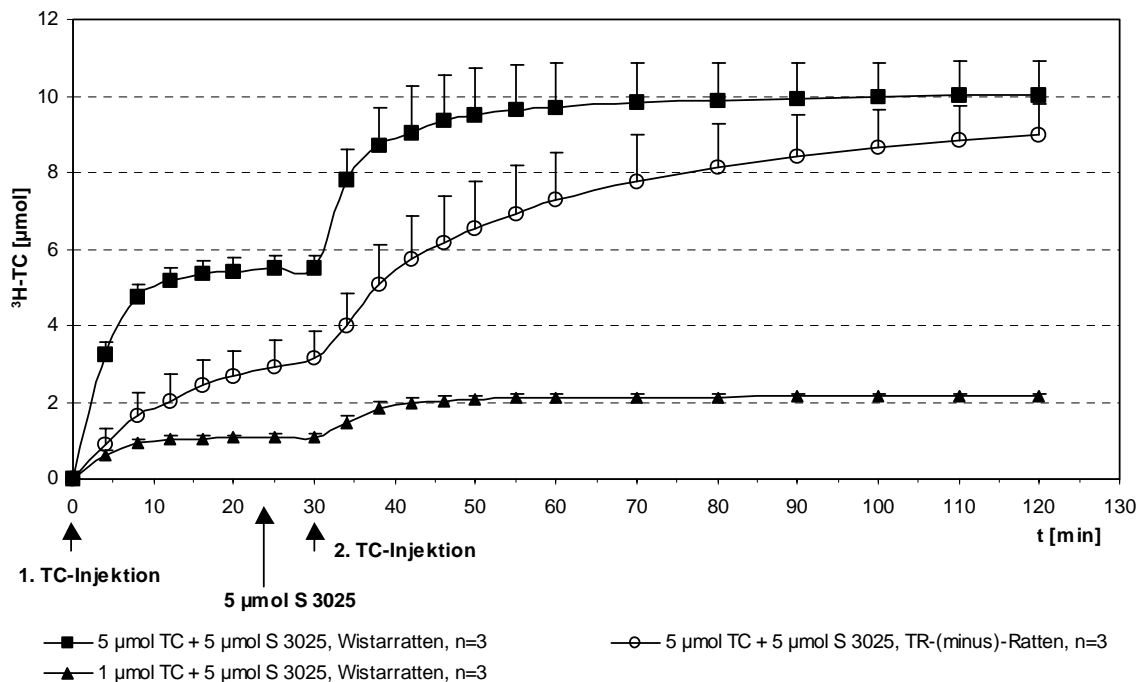


Abb. 4.20: Kumulierte Ausscheidung von Taurocholat durch Wistar- und TR⁻-Ratten mit und ohne Präinjektion von 5 µmol S 3025

Die im 120minütigen Messzeitraum ausgeschiedenen Taurocholat- und Gallenmengen sind in Tab. 4.10 zusammengefasst.

Tab. 4.10: Wistar- und TR⁻-Ratten erhielten zweimal im Abstand von 30 min 1 bzw. 5 µmol Taurocholat. 8 min vor der zweiten TC-Injektion wurden 5 µmol S 3025 appliziert. Aufgeführt sind die im 120minütigen Messzeitraum ausgeschiedenen Mengen an TC und Galle.

Injektion / Rattenstamm	ausgeschiedene Menge TC		ausgeschiedene Gallenmenge [g]
	[µmol]	[%]	
2 x 5 µmol TC / Wistarratte	10,04 ± 0,86	100,4 ± 8,6	1,7482 ± 0,2962
2 x 1 µmol TC / Wistarratte	2,15 ± 0,08	107,5 ± 4,0	1,4430 ± 0,3439
2 x 5 µmol TC / TR ⁻ -Ratte	8,99 ± 0,82	89,9 ± 8,2	0,5556 ± 0,1836

Die experimentell gefundenen Unterschiede wurden mit Hilfe von t-Tests für verbundene Stichproben hinsichtlich ihrer Signifikanz untersucht. Hierfür wurden zunächst Kurvenanpassungen für die kumulierten Ausscheidungen durchgeführt (vgl.

Kap. 3.7 , S. 70 ff.) und anschließend die statistischen Irrtumswahrscheinlichkeiten p bzw. Signifikanzen der ermittelten Prozessparameter berechnet. Verglichen wurden dabei jeweils die Prozessparameter für die erste und zweite Injektion einer bestimmten TC-Konzentration bei einem gegebenen Rattenstamm, wobei die zweite TC-Injektion immer kurz nach der Applikation von $5 \mu\text{mol S 3025}$ erfolgte.

Der Parameter „E“ stellt dabei den Endwert des exponentiellen Teils dar, „k“ ist die Ausscheidungs- bzw. Geschwindigkeitskonstante des exponentiellen Teils, „tZeit“ die Totzeit zwischen der Injektion von Taurocholat und seinem erstmaligen Erscheinen in der Galle. Bei diesen Parameter steht der Index 1 für die erste, 2 für die zweite TC-Applikation. „G₁“ („G₂“) ist die maximale bzw. initiale Steigung des ersten (zweiten) exponentiellen Anstiegs und „G₃“ („G₄“) die Zeit, in der die Hälfte des Endwertes des ersten (zweiten) exponentiellen Teils erreicht wird. Für die statistische Berechnung wurden jeweils die Differenzen der Prozessparameter beider Kurventeile herangezogen. Tab. 4.11 zeigt die ermittelten p -Werte für alle drei durchgeführten t-Tests.

Tab. 4.11: Ergebnisse der t-Tests für verbundene Stichproben bezüglich des Einflusses einer Präinjektion von S 3025 auf die hepatobiliäre Elimination von Taurocholat bei Wistar- und TR⁻-Ratten.

Parameter-Differenz	p-Wert für		
	2 x 5 $\mu\text{mol TC}$, Wistar	2 x 1 $\mu\text{mol TC}$, Wistar	2 x 5 $\mu\text{mol TC}$, TR ⁻ -Ratten
E ₁ -E ₂	n.s. (p=0,2727)	n.s.(p=0,8602)	p=0,0158
k ₁ -k ₂	n.s. (p=0,0825)	n.s. (p=0,0596)	p=0,0231
tZeit ₁ -tZeit ₂	n.s. (p=0,1459)	n.s. (p=0,2560)	n.s. (p=0,4226)
G ₁ -G ₂	n.s. (p=0,0886)	n.s. (p=0,0904)	n.s. (p=0,1970)
G ₃ -G ₄	n.s. (p=0,1932)	n.s. (p=0,1709)	p=0,0457

Bei den Wistarratten hatte S 3025 unabhängig von der Konzentration des injizierten Taurocholats keinen Einfluss auf die hepatobiliäre Elimination dieser Gallensäure. Dagegen ergaben sich bei den TR⁻-Ratten nach Präinjektion von S 3025 höhere Werte für Endwert E₂ und Halbwertszeit G₄ sowie eine kleinere Geschwindigkeitskonstante k₂. Hauptursache für diesen Befund dürfte sein, dass die Ausscheidung der ersten TC-Injektion zum Zeitpunkt der zweiten Gabe noch nicht abgeschlossen war. In den Endwert der zweiten Injektion floss somit ein Teil der ersten TC-Dosis ein. Die Geschwindigkeitskonstante nahm gegenüber der ersten Injektion ab, was möglicherweise auf ein Sättigungsphänomen zurückzuführen sein könnte. Da $G_4 = \ln 2/k_2$, nahm die Halbwertszeit durch den kleineren Nenner k₂ im Vergleich zu G₃ zu.

Es ist abschließend festzuhalten, dass S 3025 die hepatobiliäre Elimination des Ntcp- und Bsep-Substrates Taurocholat bei Wistarratten nicht signifikant beeinflusst. Die bei

TR⁻-Ratten beobachteten Unterschiede zwischen den TC-Ausscheidungen mit und ohne Präinjektion von S 3025 waren wahrscheinlich auf die zum Zeitpunkt der zweiten Injektion noch nicht abgeschlossene Ausscheidung der ersten TC-Dosis zurückzuführen.

4.4 In situ-Galleausscheidung II: Transportverhalten der Oligonukleotide

Da eine Beteiligung des canaliculären Transporters mrp2 an der hepatobiliären Elimination der Oligonukleotide zu vermuten war (Starke 1999), wurden in situ-Galleausscheidungsversuche von ³⁵S-markiertem n-ODN bzw. 2G-ODN in Gegenwart von Substraten dieses Transporters durchgeführt. Dabei wurden die Einflüsse des Rattenstammes, der Art des Oligonukleotids und der Eigenschaften des jeweiligen mrp2-Substrates miteinander verglichen. In Vorversuchen wurde ermittelt, ob die Applikation der Oligonukleotids in Jejunal- oder Femoralvene das Ausscheidungsverhalten beeinflusst.

Bei allen Versuchen wurden 0,8 nmol radioaktiv markiertes Oligonukleotid eingesetzt; mit Ausnahme des Applikationsvergleiches erfolgte die Injektion in eine Jejunalvene. Die mrp2-Substrate BSP, MK 571, S 3025 und CDNB wurden in eine Femoralvene gespritzt. Lediglich bei Sirolimus erfolgte eine i.p.-Applikation.

Graphisch wurde die hepatobiliäre Elimination der Oligonukleotide sowohl fraktioniert als auch kumuliert dargestellt. Die fraktionierte Darstellung gibt die Konzentration des Oligonukleotids in pmol pro ml Galleflüssigkeit zu jedem Messzeitpunkt an, während bei der kumulativen Graphik die zu jedem Zeitpunkt absolut ausgeschiedene Menge an Oligonukleotid gegen die Zeit aufgetragen wird. Daher geht bei der kumulativen Darstellung im Gegensatz zur fraktionierten die zu jedem Zeitpunkt ausgeschiedene Gallenmenge gleichzeitig mit ein. In den Graphiken sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen einer Stichprobe dargestellt.

4.4.1 Einfluss des Applikationsortes

Der Einfluss des für die Injektion des Oligonukleotids gewählten Applikationsortes auf die hepatobiliäre Elimination wurde nur an Wistarratten untersucht. Wurde das 2G-ODN in die Vena femoralis injiziert, so trat die höchste Oligonukleotidkonzentration in pmol/ml Galleflüssigkeit nach 12 min auf; bei Injektion in die Vena jejunalis wurde dieser Peak nach 8 min ermittelt. Bei beiden Venen unterschieden sich die nach 8 bzw. 12 min gefundenen Oligonukleotidkonzentrationen jedoch nur geringfügig voneinander. In der kumulativen Darstellung der Ausscheidung des 2G-ODN in die Galle sind die Graphen für die Injektionen in beide Venen fast deckungsgleich. Die während der

Messzeit von 120 min ausgeschiedenen Galle $mengen$ waren in beiden Fällen annähernd gleich (s. Tab. 4.12, S. 98 und Abb. 9.3, S. 204); es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Applikationsorten ermittelt (s. Tab. 9.5, S. 204). Im Falle des 2G-ODN hat der für die Injektion gewählte Applikationsort demnach keinen signifikanten Einfluss auf das Ausmaß der hepatobiliären Elimination (s. Tab. 4.13, S. 99).

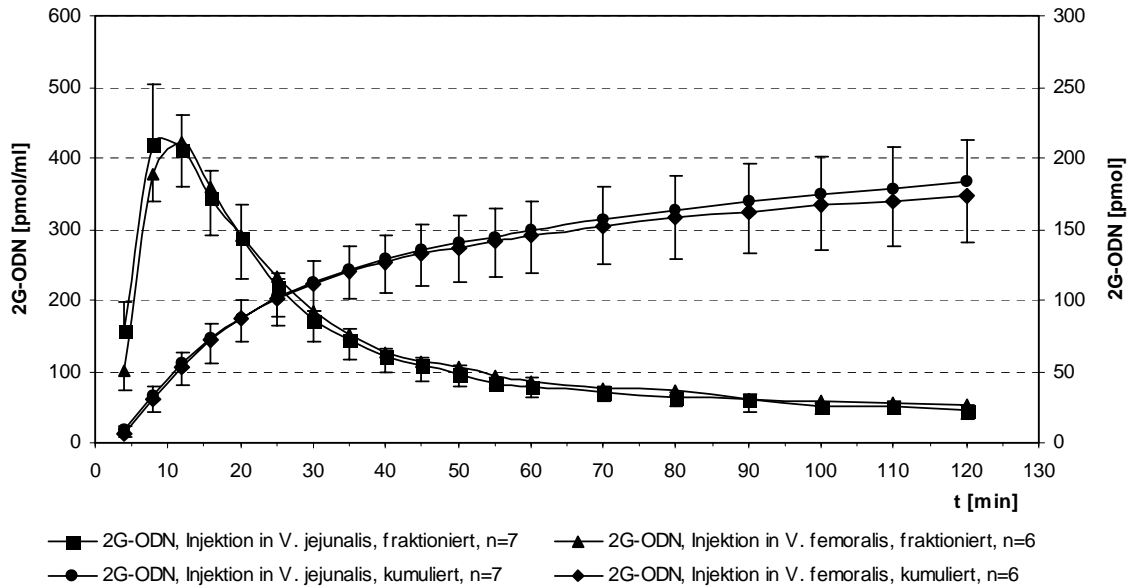


Abb. 4.21: Biliäre Ausscheidung nach Applikation des 2G-ODN in eine Jejunal- bzw. Femoralvene

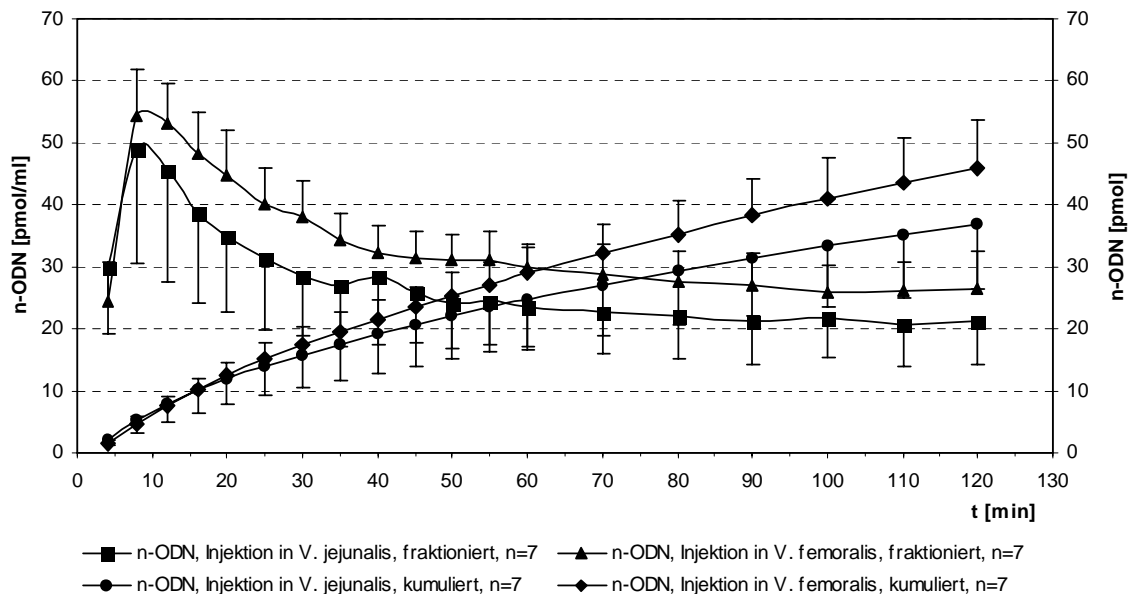


Abb. 4.22: Biliäre Ausscheidung nach Applikation des n-ODN in eine Jejunal- bzw. Femoralvene

Nach Injektion des n-ODN wurde die höchste Oligonukleotidkonzentration in pmol/ml in der Galleflüssigkeit unabhängig von der für die Applikation benutzten Vene nach 8 min. gefunden. Die Graphen der fraktionierten und der kumulierten Darstellung liegen

nach Applikation in eine Jejunalvene jeweils unter denen der Injektion in eine Vena femoralis. Dagegen wurden unabhängig vom gewählten Injektionsort beinahe identische Galle m engen ausgeschieden (s. Tab. 4.12, S. 98); es wurde kein signifikanter Einfluss des Applikationsortes auf die ausgeschiedene Galle m enge ermittelt (s. Tab. 9.5, S. 204). Alle nach Applikation des n-ODN in eine Femoral- oder Jejunalvene ermittelten Werte – fraktionierte und kumulierte Darstellung des ausgeschiedenen n-ODN sowie die Galle m enge – wiesen hohe Standardabweichungen auf. Deshalb wurde nur scheinbar nach Injektion des n-ODN in eine Femoralvene mehr Oligonukleotid hepatobiliär ausgeschieden als nach Injektion in eine Jejunalvene; die statistische Überprüfung ergab keine signifikanten Unterschiede (s. Tab. 4.13, S. 99).

In Tab. 4.12 sind die in der 120-minütigen Messzeit aufgefangene Galle m engen sowie die in diesem Zeitraum hepatobiliär eliminierten Mengen der Oligonukleotide nach Injektion in eine Femoral- oder Jejunalvene aufgeführt.

Tab. 4.12: Innerhalb von 120 min ausgeschiedene Galle m enge und hepatobiliär eliminiertes Oligonukleotid nach Applikation in eine Jejunal- bzw. Femoralvene. Angegeben sind die Mittelwerte mit den zugehörigen Standardabweichungen. Injiziert wurden 0,8 nmol des jeweiligen Oligonukleotids.

Oligonukleotid	Vene	ausgeschiedene Substanzmenge		ausgeschiedene Galle m enge [g]
		[pmol]	[%]	
2G-ODN	V. jejunalis	183,09 ± 29,02	22,99 ± 3,63	1,3315 ± 0,2672
2G-ODN	V. femoralis	173,47 ± 33,01	21,68 ± 4,13	1,1901 ± 0,3948
n-ODN	V. jejunalis	37,03 ± 10,71	4,63 ± 1,34	1,4272 ± 0,5408
n-ODN	V. femoralis	45,94 ± 7,75	5,74 ± 0,97	1,4265 ± 0,3543

Mit Hilfe einer zweifaktoriellen Varianzanalyse wurde die Signifikanz der experimentell gefundenen Unterschiede geprüft. Untersucht wurden dabei die beiden Einflussfaktoren „Oligonukleotid“ (2G-ODN bzw. n-ODN) und „Vene“ (V. jejunalis bzw. V. femoralis) als Haupteffekte sowie eine mögliche Wechselwirkung der beiden. Die ermittelten Signifikanzgrade bzw. die statistische Irrtumswahrscheinlichkeit p der Prozessparameter sind in Tab. 4.13 dargestellt (vgl. S. 90).

Es zeigte sich, dass sich alle Prozessparameter für den Haupteffekt „Oligonukleotid“ signifikant unterschieden. Für den Einfluss des Applikationsortes ergab sich dagegen nur im Falle des Parameters „tZeit“ ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Injektionsorten. Dieser Unterschied dürfte im längeren Weg und damit auch der längeren Zeitspanne begründet sein, die die Oligonukleotide von der Femoralvene bis zur Elimination in die Galle benötigen. Eine Wechselwirkung, d.h. gegenseitige Beeinflussung der beiden Hauptfaktoren „Oligonukleotid“ und „Vene“ trat nicht auf.

Tab. 4.13: Ergebnisse der zweifaktoriellen Varianzanalyse zur Überprüfung des Einflusses des Applikationsortes auf die hepatobiliäre Ausscheidung der Oligonukleotide

Parameter	Haupteffekte		Wechselwirkung
	Vene	Oligonukleotid	
log(E)	n.s. (p=0,6130)	p<0,0001	n.s. (p=0,6708)
log(k)	n.s. (p=0,8679)	p=0,0228	n.s. (p=0,7349)
log(tZeit)	p=0,0061	p<0,0001	n.s. (p=0,2207)
log(m)	n.s. (p=0,8352)	p<0,0001	n.s. (p=0,0617)
log(G ₁)	n.s. (p=0,7693)	p<0,0001	n.s. (p=0,9403)
log(G ₂)	n.s. (p=0,6235)	p<0,0001	n.s. (p=0,7877)
log(G ₃)	n.s. (p=0,8679)	p=0,0228	n.s. (p=0,7349)

4.4.2 Einfluss des Lösungsmittels

Die hepatobiliäre Elimination der Oligonukleotide wurde in Gegenwart verschiedener mrp2-Substrate untersucht. Dabei wurden BSP und MK 571 in PBS, CDNB in Ethanol und S 3025 in DMSO/Glycerin/PBS 15:15:70 (Vol/Vol/Vol) gelöst. Zuvor musste untersucht werden, ob die Lösungsmittel die Galleausscheidung von n-ODN und 2G-ODN beeinflussten.

Die kumulative Darstellung der hepatobiliären Exkretion des 2G-ODN in Gegenwart und Abwesenheit der Lösungsmittel lieferte bei der Wistarratten Graphen, die fast deckungsgleich waren (Abb. 4.24). Wurde die Konzentration des Oligonukleotids in pmol/ml Galleflüssigkeit aufgetragen, so wurden im Falle der Präinjektion von Ethanol und PBS etwas geringere, nach Präinjektion von DMSO/Glycerin/PBS etwas höhere Oligonukleotidkonzentrationen gefunden als bei der ausschließlichen Injektion des 2G-ODN. Wurde vor dem 2G-ODN Ethanol oder PBS injiziert, so wurde die höchste Konzentration des 2G-ODN in der Galle wie im Falle der alleinigen Applikation des Oligonukleotids nach 8 min gefunden, wobei diese Konzentrationen niedriger ausfielen als bei den Tieren, die keines dieser beiden Lösungsmittel erhalten hatten. Ohne Präinjektion sowie nach Applikation von Ethanol oder PBS waren die nach 12 min ermittelten Konzentrationen des 2G-ODN nur wenig niedriger als die jeweiligen 8min-Werte (Abb. 4.23). Nach Präinjektion von DMSO/Glycerin/PBS wurde der Peak nach 12 min ermittelt, wobei die Konzentration des 2G-ODN bei dieser Messanordnung nach 8 und 16 min nur wenig kleiner waren.

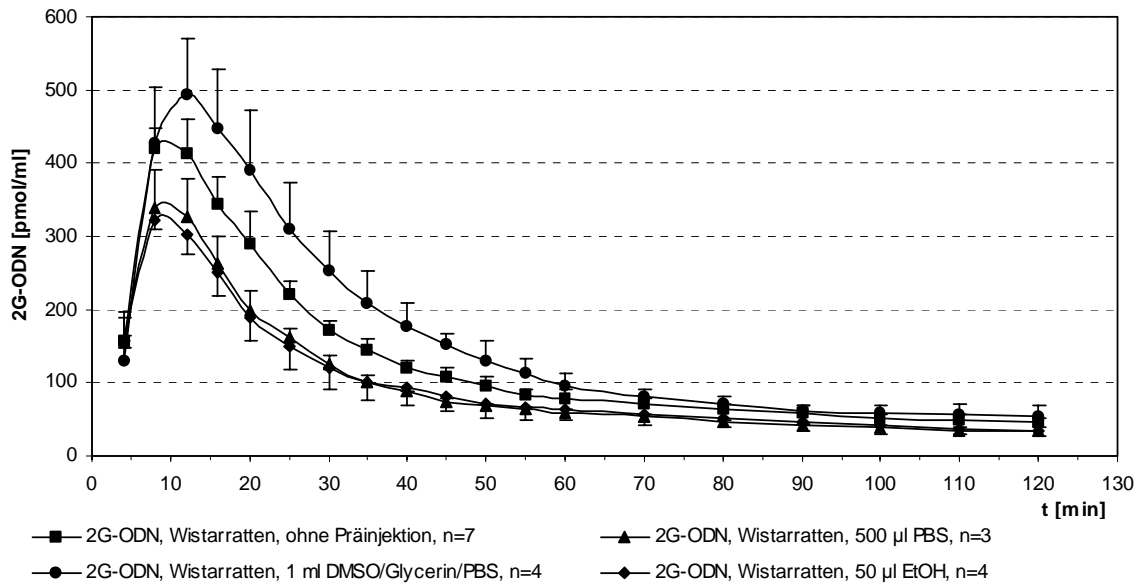


Abb. 4.23: Einfluss von Lösungsmitteln auf die fraktionierte Galleausscheidung des 2G-ODN bei Wistarratten

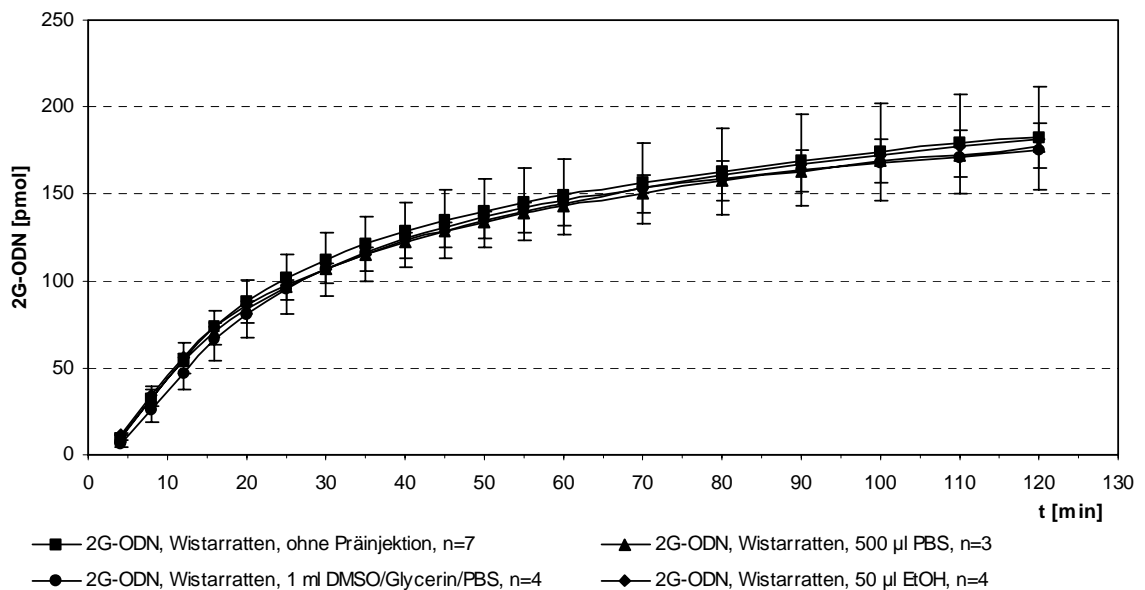


Abb. 4.24: Einfluss von Lösungsmitteln auf die kumulierte Gesamtausscheidung des 2G-ODN in die Galle von Wistarratten

Die Gallemengen, die während der 120-minütigen Messzeit aufgefangen wurden, waren abhängig von der Art des präinjizierten Lösungsmittels. Grundsätzlich nahm die pro 30min-Intervall ausgeschiedene Gallemenge jedoch bei jeder der betrachteten

Versuchsreihen während des Messzeitraumes ab (s. Abb. 9.4, S. 205). Alle berechneten Mittelwerte der Gallenmengen waren mit hohen Standardabweichungen behaftet (Tab. 4.14). Nach Applikation von Ethanol bzw. PBS wurden annähernd gleich große Gallenmengen ermittelt; sie waren höher als die bei ausschließlicher Injektion des 2G-ODN aufgefangene Gallenmenge. Dagegen führte die Präinjektion von DMSO/Glycerin/PBS zu einer geringfügigen Abnahme der Gallenmenge. Auf Grund dieser Effekte ergaben sich je nach präinjiziertem Lösungsmittel unterschiedliche *Konzentrationen* des 2G-ODN. Die pro Zeiteinheit ausgeschiedene Stoffmenge des 2G-ODN war jedoch unabhängig davon, ob und welches Lösungsmittel präinjiziert worden war, so dass sich in der kumulativen Darstellung annähernd deckungsgleiche Kurven ergaben. Die Signifikanz der empirisch ermittelten unterschiedlichen Gallenmengen wurde mit Hilfe einer zwei- bzw. dreifaktoriellen Varianzanalyse untersucht (s. Tab. 9.7, S. 208). Die Gabe von PBS bzw. Ethanol beeinflusste die Menge des von den Wistarratten hepatobiliär ausgeschiedenen 2G-ODN nicht signifikant; eine Präinjektion von DMSO/Glycerin/PBS verminderte jedoch die initiale Steigung des Galleflusses bei diesem Rattenstamm (s. Abb. 9.4, S. 205).

Präinjektion von Ethanol, PBS bzw. DMSO/Glycerin/PBS und anschließende Applikation des 2G-ODN resultierten bei Wistarratten während der 120-minütigen Messzeit in folgenden Mengen aufgefangener Galle und hepatobiliär ausgeschiedenen Oligonukleotids:

Tab. 4.14: Wistarratten wurde Ethanol, PBS bzw. DMSO/Glycerin/PBS präinjiziert, anschließend 0,8 nmol 2G-ODN appliziert. Aufgeführt sind die Mittelwerte der im Messzeitraum von 120min aufgefangenen Gallenmengen sowie die Mengen die in die Galle eliminierten Oligonukleotids mit den zugehörigen Standardabweichungen.

Präinjektion	ausgeschiedene Menge 2G-ODN		ausgeschiedene Gallenmenge [g]
	[pmol]	[%]	
-	183,09 ± 29,02	22,89 ± 3,63	1,3315 ± 0,2672
PBS	177,02 ± 12,46	22,13 ± 1,56	1,7813 ± 0,2319
DMSO/Glycerin/PBS	175,26 ± 22,94	21,91 ± 2,87	1,0417 ± 0,2029
Ethanol	181,34 ± 10,00	22,67 ± 1,25	1,8486 ± 0,4403

In der fraktionierten Darstellung der Galleausscheidung des n-ODN ergaben sich bei Wistarratten für die verschiedenen Lösungsmittel sehr unterschiedliche Graphen (Abb. 4.25). Nach Präinjektion von PBS und Ethanol wurde die höchste Oligonukleotidkonzentration ebenso wie bei alleiniger Injektion des n-ODN nach 8 min gefunden. Dabei war die Konzentration des n-ODN nach Präinjektion von Ethanol nach 8 min etwa 60% und nach Präinjektion von PBS etwa 40% höher als ohne Präinjektion. Wurde DMSO/Glycerin/PBS präinjiziert, so trat der Peak nach 12 min auf; die nach 8

bzw. 16 min gefundenen Konzentrationen des n-ODN waren jedoch nur wenig geringer. Die für die Präinjektion von DMSO/Glycerin/PBS berechnete Kurve lag zu jedem Messzeitpunkt über denjenigen der Kontrollen und unter denen, die für die Applikation von Ethanol und PBS errechnet wurden. Dabei war zu beachten, dass die Mittelwerte aller Graphen zu allen Messzeitpunkten hohe Standardabweichungen aufwiesen.

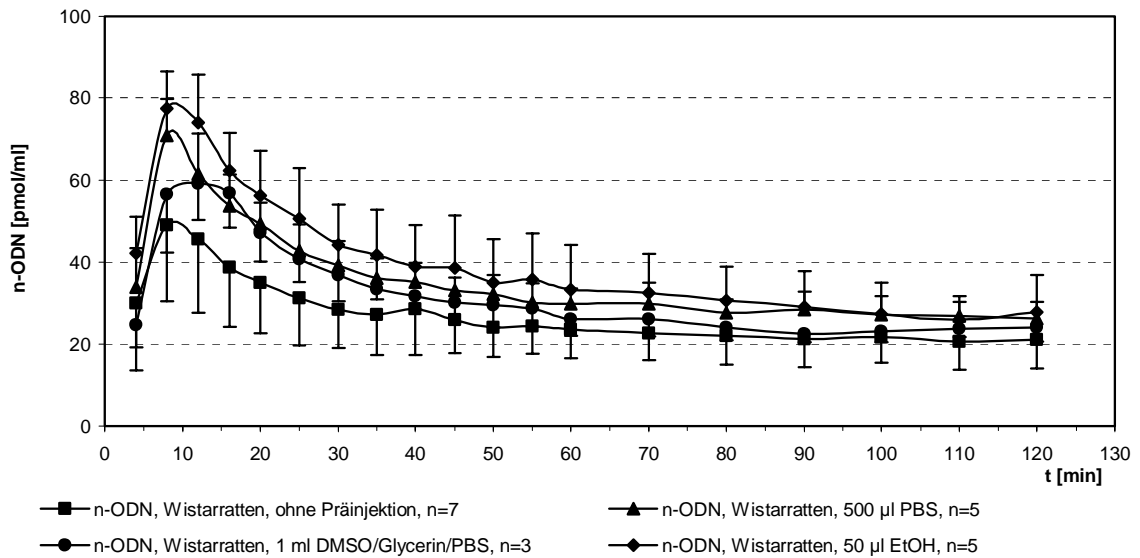


Abb. 4.25: Einfluss von Lösungsmitteln auf die fraktionierte Galleausscheidung des n-ODN bei Wistarratten

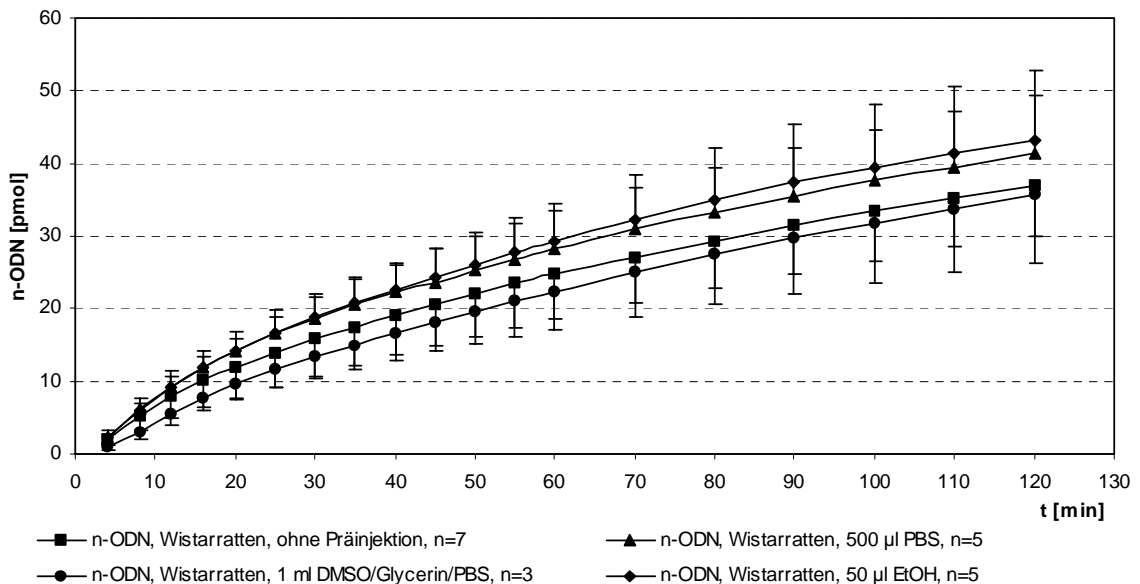


Abb. 4.26: Einfluss von Lösungsmitteln auf die kumulierte Galleausscheidung des n-ODN bei Wistarratten

In der kumulativen Darstellung lieferten die Präinjektionen von PBS und Ethanol Graphen, die annähernd deckungsgleich waren. Nach Applikation dieser beiden Lösungsmittel wurden die höchsten Gesamtmengen an n-ODN in der Galle gefunden (Abb. 4.26). Die Kurven, die der Präinjektion von DMSO/Glycerin/PBS bzw. der ausschließlichen Injektion des n-ODN zuzuordnen sind, lagen geringfügig unter den beiden anderen. Die initiale Steigung der Kurve war nach Präinjektion von DMSO/Glycerin/PBS am kleinsten von allen hier betrachteten Kurven. Allerdings wiesen die Mittelwerte aller Graphen zu jedem Zeitpunkt sehr hohe Standardabweichungen auf.

Nach Präinjektion von PBS, Ethanol und DMSO/Glycerin/PBS und anschließender Applikation des n-ODN wurden bei Wistarratten im 120-minütigen Messzeitraum fast identische Galle*mengen* aufgefangen (s. Abb. 9.5, S. 205). Diese waren rund 15% geringer als die nach alleiniger Injektion des n-ODN aufgefangene Galle*menge* (Tab. 4.15). Die Präinjektion von DMSO/Glycerin/PBS führte in den ersten 90 Minuten des Messzeitraumes zu einem leichten Anstieg der Galle*mengen* von 30min-Intervall zu 30min-Intervall; danach fiel die Galle*menge* ab. Bei allen anderen Versuchsreihen nahm die Galle*menge* von 30min-Intervall zu 30min-Intervall ab. Mit Ausnahme der Präinjektion von DMSO/Glycerin/PBS waren die Mittelwerte des Galle*flusses* bei allen Versuchsreihen und bei jedem 30min-Intervall sehr hoch. Mittels einer zwei- bzw. dreifaktoriellen Varianzanalyse wurde berechnet, ob die experimentell gefundenen unterschiedlichen Galle*mengen* die hepatobiliäre Elimination des n-ODN durch Wistarratten signifikant beeinflussten. Nach Präinjektion von DMSO/Glycerin/PBS wurde die initiale Steigung des Galle*flusses* signifikant verändert, die insgesamt ausgeschiedene Galle*menge* jedoch nicht; die Applikation von Ethanol und PBS führte zu keiner signifikanten Veränderung (s. Tab. 9.7, S. 208).

In Tab. 4.15 ist zusammengefasst, welche Mengen an aufgefangener Galle und hepatobiliär ausgeschiedenem n-ODN bei Wistarratten nach Präinjektion von Ethanol, PBS oder DMSO/Glycerin/PBS ermittelt wurden.

Tab. 4.15: Wistarratten wurde Ethanol, PBS bzw. DMSO/Glycerin/PBS präinjiziert, danach wurden 0,8 nmol n-ODN appliziert. Es sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der im Messzeitraum von 120 min aufgefangenen Galle*menge* und die Mengen des hepatobiliär eliminierten n-ODN angegeben.

Präinjektion	ausgeschiedene Menge n-ODN		ausgeschiedene Galle <i>menge</i> [g]
	[pmol]	[%]	
-	37,03 ± 10,71	4,63 ± 1,34	1,4272 ± 0,5408
PBS	41,41 ± 7,95	5,18 ± 0,99	1,1688 ± 0,3345
DMSO/Glycerin/PBS	35,60 ± 5,49	4,45 ± 0,69	1,1524 ± 0,1380
Ethanol	43,25 ± 9,54	5,41 ± 1,19	1,1617 ± 0,4116

In der fraktionierten Darstellung der hepatobiliären Elimination des 2G-ODN war bei TR-Ratten weder nach der Präinjektion eines Lösungsmittels noch nach ausschließlicher Applikation des Oligonukleotids ein Peak zu sehen (Abb. 4.27). Die Kurve, die der Präinjektion von DMSO/Glycerin/PBS entsprach, wies die höchsten Konzentrationen des Oligonukleotids auf. Erfolgte die Auftragung kumuliert, so waren die Graphen, die der ausschließlichen Injektion des 2G-ODN entsprachen, fast deckungsgleich, während sich für die Präinjektion von DMSO/Glycerin/PBS zu jedem Zeitpunkt etwas geringere Werte ergaben. Allerdings waren die Mittelwerte aller Graphen sowohl in der fraktionierten als auch in der kumulativen Darstellung mit hohen Standardabweichungen behaftet.

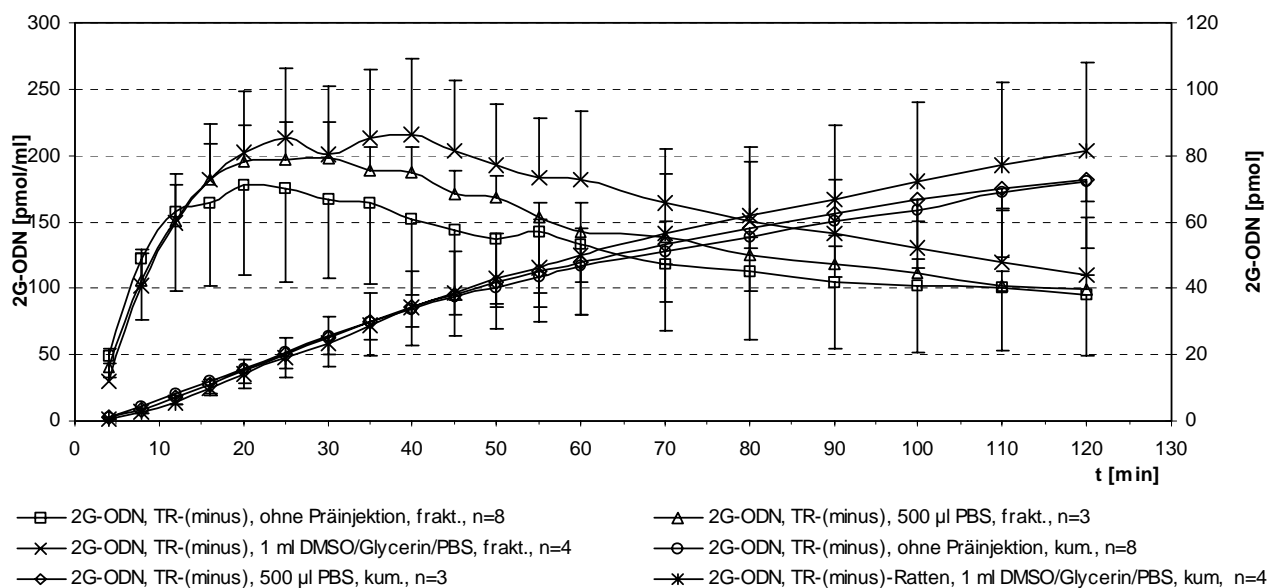


Abb. 4.27: Einfluss von Lösungsmitteln auf die Galleausscheidung des 2G-ODN bei TR-Ratten

Die nach Präinjektion von PBS bzw. DMSO/Glycerin/PBS und Applikation von 2G-ODN insgesamt aufgefangenen Galle $mengen$ waren fast identisch und etwa 15% niedriger als die nach alleiniger Injektion des 2G-ODN aufgefangene Galle $menge$ (Tab. 4.16). Die Galle $mengen$ wurden in 30min-Intervallen aufgetragen (s. Abb. 9.6, S. 206), im Falle der alleinigen Applikation von 2G-ODN bzw. der Präinjektion von PBS nahmen die Galle $mengen$ von 30min-Intervall zu 30min-Intervall kontinuierlich ab. Nach Präinjektion von DMSO/Glycerin/PBS nahm die Galle $menge$ bis zur 90. Minute kontinuierlich ab, um dann bis zum Ende des Messzeitraumes wieder leicht anzusteigen. Mittelwerte und Standardabweichungen der 30min-Intervalle waren bei den Kontrollen (alleinige Gabe von 2G-ODN) und nach Präinjektion von DMSO/Glycerin/PBS sehr hoch. Die empirisch ermittelten Parameter wurden über eine dreifaktorielle Varianzanalyse auf ihre Signifikanz überprüft (s. Tab. 9.7, S. 208). Dabei ergab sich, dass sich die initiale Steigung des Galleflusses nach Präinjektion von

DMSO/Glycerin/PBS signifikant gegenüber den Kontrollen veränderte, nicht aber die insgesamt ausgeschiedene Gallmenge. Die Präinjektion von PBS führte zu keinen signifikanten Veränderungen der Gallmenge bzw. des Galleflusses im Vergleich zu den Kontrollen.

Im 120-minütigen Messzeitraum wurden für TR⁻-Ratten nach Präinjektion von PBS bzw. DMSO/Glycerin/PBS und anschließender Applikation des 2G-ODN folgende Oligonukleotid- und Gallmengen ermittelt:

Tab. 4.16: TR⁻-Ratten wurde PBS bzw. DMSO/Glycerin/PBS appliziert. Anschließend wurden 0,8 nmol 2G-ODN injiziert. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen des im Messzeitraum von 120 min insgesamt hepatobiliär eliminierten Oligonukleotids sowie die im entsprechenden Zeitraum aufgefangene Gallmenge für die beiden Lösungsmittel sowie für die Kontrolle.

Präinjektion	ausgeschiedene Menge 2G-ODN		ausgeschiedene Gallmenge [g]
	[pmol]	[%]	
-	95,31 ± 46,12	11,91 ± 5,77	0,6049 ± 0,2030
PBS	99,17 ± 10,59	12,40 ± 1,32	0,5137 ± 0,0484
DMSO/Glycerin/PBS	110,20 ± 43,48	13,78 ± 5,44	0,5067 ± 0,1273

Bei TR⁻-Ratten waren in der fraktionierten Darstellung der hepatobiliären Elimination des n-ODN weder nach Präinjektion eines Lösungsmittels noch nach alleiniger Injektion des Oligonukleotids deutliche Peaks erkennbar (Abb. 4.28). Die Konzentrationen des n-ODN waren nach beiden Lösungsmittel-Präinjektionen zu jedem Zeitpunkt leicht erhöht; Gleiches galt für die kumulative Darstellung. Für alle Messreihen mit Ausnahme der kumulativen Darstellung nach Präinjektion von PBS wurden relativ große Standardabweichungen errechnet.

Die insgesamt aufgefangene Gallmenge war nach Präinjektion von PBS am niedrigsten und bei den Kontrollen am höchsten, wobei alle Werte hohe Standardabweichungen aufwiesen (s. Tab. 4.17, S. 106). Bei allen Messreihen nahm die Gallmenge von 30min-Intervall zu 30min-Intervall kontinuierlich ab (s. Abb. 9.7, S. 206). Mit Hilfe einer dreifaktoriellen Varianzanalyse wurde berechnet, ob die Präinjektion von PBS bzw. DMSO/Glycerin/PBS einen signifikanten Einfluss auf die ausgeschiedene Gallmenge ausübte (s. Tab. 9.7, S. 208). Die Präinjektion von DMSO/Glycerin/PBS führte zu einer signifikanten Veränderung des initialen Galleflusses gegenüber den Kontrollen; die insgesamt ausgeschiedene Gallmenge wurde durch dieses Lösungsmittel aber nicht signifikant verändert.

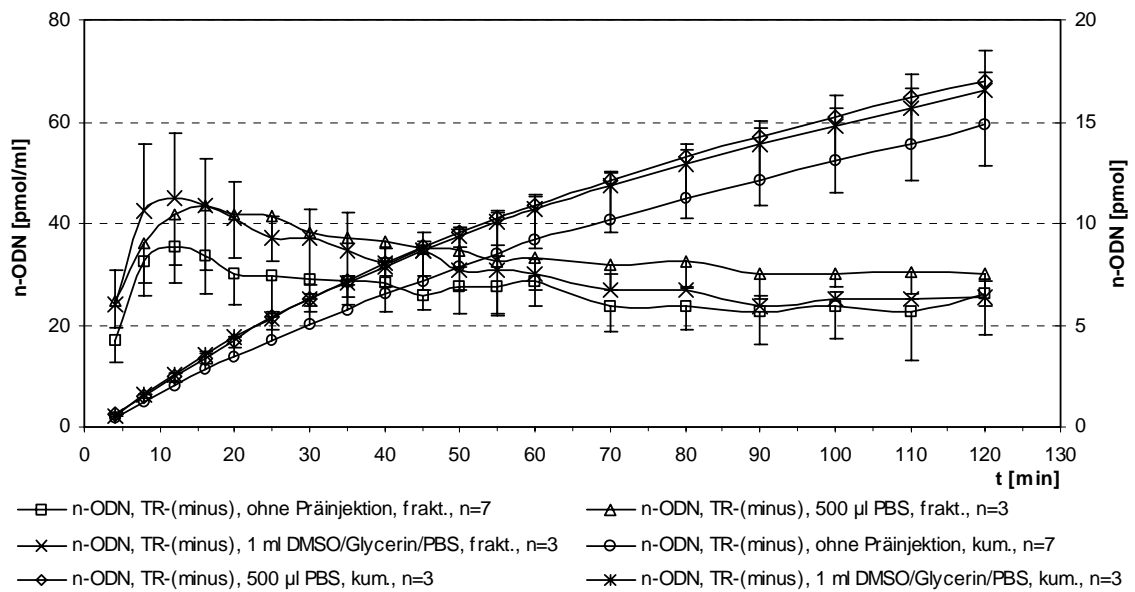


Abb. 4.28: Einfluss von Lösungsmitteln auf die Galleausscheidung des n-ODN bei TR⁻Ratten

Nachfolgend sind die Mengen von hepatobiliär ausgeschiedenem Oligonukleotid und Galle aufgeführt, die nach Präinjektion von PBS bzw. DMSO/Glycerin/PBS und darauf folgende Injektion des n-ODN in TR⁻Ratten aufgefangen wurden.

Tab. 4.17: Nach Präinjektion von PBS bzw. DMSO/Glycerin/PBS wurde TR⁻Ratten 0,8 nmol n-ODN injiziert. Das im Messzeitraum von 120 min insgesamt hepatobiliär eliminierte Oligonukleotid sowie die in diesem Zeitraum aufgefangene Gallenmenge sind für beide Lösungsmittel sowie die Kontrollen aufgeführt. Angegeben sind die jeweiligen Mittelwerte mit den zugehörigen Standardabweichungen.

Präinjektion	ausgeschiedene Menge n-ODN		ausgeschiedene Gallenmenge [g]
	[pmol]	[%]	
-	14,83 ± 3,64	1,85 ± 0,46	0,5722 ± 0,1657
PBS	17,03 ± 0,40	2,13 ± 0,05	0,5098 ± 0,1187
DMSO/Glycerin/PBS	16,57 ± 3,75	2,07 ± 0,47	0,5398 ± 0,1807

Die Signifikanz der experimentell gefundenen Unterschiede wurde im Falle der Präinjektion von Ethanol mittels einer zweifaktoriellen Varianzanalyse berechnet; dabei wurden die beiden Haupteffekte „Ethanol“ und „Oligonukleotid“ und eine mögliche Wechselwirkung der beiden untersucht. Tab. 4.18 zeigt die ermittelten Signifikanzgrade bzw. die statistische Irrtumswahrscheinlichkeit p der Prozessparameter (vgl. S. 90):

Tab. 4.18: Ergebnisse der zweifaktoriellen Varianzanalyse zur Untersuchung des Einflusses der Präinjektion von Ethanol auf die hepatobiliäre Ausscheidung der Oligonukleotide bei Wistarratten.

Parameter	Haupteffekte		Wechselwirkung
	Ethanol	Oligonukleotid	
log(E)	n.s. (p=0,9041)	p<0,0001	n.s. (p=0,2477)
log(k)	n.s. (p=0,6557)	p=0,0422	n.s. (p=0,8353)
log(tZeit)	n.s. (p=0,3408)	p=0,0110	n.s. (p=0,8993)
log(m)	n.s. (p=0,4090)	p<0,0001	n.s. (p=0,2180)
log(G ₁)	n.s. (p=0,5340)	p<0,0001	n.s. (p=0,4438)
log(G ₂)	n.s. (p=0,4808)	p<0,0001	n.s. (p=0,3548)
log(G ₃)	n.s. (p=0,6557)	p=0,0422	n.s. (p=0,8353)

Alle Prozessparameter für den Haupteffekt „Oligonukleotid“ unterschieden sich in statistisch signifikanter Weise; es war also für jeden dieser Parameter ausschlaggebend, ob n-ODN oder 2G-ODN eingesetzt wurde. Der Haupteffekt „Ethanol“ hatte keine statistisch signifikanten Auswirkungen auf die hepatobiliäre Elimination des Oligonukleotids.

Die beiden Haupteffekte „Oligonukleotid“ und „Ethanol“ hatten - jeweils für sich allein betrachtet - keine Auswirkungen auf den Gallefluss. Es trat jedoch eine Wechselwirkung der beiden im Hinblick auf den initialen Anstieg des Galleflusses auf (s. Tab. 9.6, S. 207): Beim 2G-ODN führte die Präinjektion von Ethanol zu einer vergrößerten initialen Steigung, beim n-ODN jedoch zu einer verringerten im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen ohne Präinjektion.

Für die Lösungsmittel PBS und DMSO/Glycerin/PBS wurde die statistische Signifikanz der beiden Haupteffekte „Oligonukleotid“ und „Lösungsmittel“ mittels einer dreifaktoriellen Varianzanalyse berechnet. Auswirkungen auf die hepatobiliäre Elimination der Oligonukleotide und den Gallefluss wurden bei diesen beiden Lösungsmitteln sowohl an Wistar- als auch an TR⁻-Ratten untersucht. Daher ging der Haupteffekt „Rattenstamm“ als dritter Faktor in die Varianzanalyse ein. Die berechneten Signifikanzgrade bzw. die statistische Irrtumswahrscheinlichkeit p der Prozessparameter (vgl. S. 90) sind für die Haupteffekte und ihre Wechselwirkungen in Tab. 4.19 dargestellt.

Im Falle der PBS-Präinjektion hatte der Rattenstamm bezüglich aller Prozessparameter einen signifikanten Einfluss auf die Ausscheidungscharakteristik der Oligonukleotide: Bei beiden Oligonukleotiden ergaben sich für alle im Zusammenhang mit der

hepatobiliären Elimination ermittelten Parameter unabhängig von einer eventuellen PBS-Präinjektion bei TR⁻-Ratten niedrigere Werte als bei Wistarratten. Auch die Art des Oligonukleotids (n-ODN bzw. 2G-ODN) beeinflusste den Verlauf der Elimination signifikant; lediglich für die Geschwindigkeitskonstante k des exponentiellen Teils und die Steigung m des linearen Teils konnte keine statistisch signifikante Wirkung der Art des Oligonukleotids festgestellt werden. Ob bei einer gegebenen Kombination von Rattenstamm und Oligonukleotid eine PBS-Präinjektion erfolgte oder nicht, hatte keinen Einfluss auf die Ausscheidungscharakteristik. Wechselwirkungen der drei untersuchten Haupteffekte traten nicht auf.

Die Präinjektion von PBS hatte keinen signifikanten Einfluss auf die im Messzeitraum ausgeschiedene Gallenmenge; Wechselwirkungen mit den beiden anderen Haupteffekten traten ebenfalls nicht auf (s. Tab. 9.7, S. 208).

Die Auswertung der dreifaktoriellen Varianzanalyse bezüglich eines möglichen Einflusses von DMSO/Glycerin/PBS auf die Galleausscheidung der Oligonukleotide zeigte, dass sich die TR⁻-Ratten in allen ermittelten Parametern signifikant von den Wistarratten unterschieden. Ähnliches galt für den Haupteffekt „Oligonukleotid“, wobei die Konstanten k , m und G_3 nicht durch die Art des Oligonukleotids beeinflusst wurden, wohl aber der Endwert E , die Totzeit (t_{Zeit}) und die Steigungen G_1 und G_2 . Das Lösungsmittelgemisch DMSO/Glycerin/PBS hatte nur auf die Totzeit einen signifikanten Einfluss; diese Zeit vergrößerte sich nach Präinjektion des Gemisches. Wechselwirkungen zwischen Lösungsmittelgemisch und Rattenstamm traten nicht auf. Dagegen gab es Wechselwirkungen zwischen dem Lösungsmittelgemisch und der Art des Oligonukleotids im Hinblick auf die Geschwindigkeitskonstante k des exponentiellen Teils der Ausscheidung und die Zeit, in der die Hälfte des Anstiegs des exponentiellen Teils erreicht wurde (G_3): Im Gegenwart von DMSO/Glycerin/PBS war k kleiner und G_3 größer als in dessen Abwesenheit; dieser Effekt war bei anschließender Injektion des 2G-ODN ausgeprägter als bei der Injektion des n-ODN. Die Art des Oligonukleotids und die Art des Rattenstammes beeinflussten sich ebenfalls gegenseitig; und zwar im Hinblick auf die Prozessparameter k , G_1 , G_2 und G_3 . Diese Parameter beschreiben den Anstieg des exponentiellen (k , G_1 , G_2) und des linearen Teils (G_2) der Galleausscheidung des Oligonukleotids sowie die Zeitspanne, die benötigt wird, um die Hälfte des Endwertes des exponentiellen Teils zu erreichen (G_3). Beim 2G-ODN verlief der Kurvenanstieg steiler, und die Hälfte des Endwertes des exponentiellen Teils wurde schneller erreicht als beim n-ODN; außerdem wurden diese Werte bei Wistarratten schneller erzielt als bei TR⁻-Ratten. Schließlich beeinflussten sich die untersuchten Haupteffekte - Lösungsmittel(gemisch), Oligonukleotid und Rattenstamm - gegenseitig in Bezug auf die Konstanten k , t_{Zeit} , G_2 und G_3 : zusätzlich zu dem für die Wechselwirkungen von je zwei dieser Hauptwirkungen Gesagten

verlängerte sich nach Präinjektion von DMSO/Glycerin/PBS die Totzeit (t_{Zeit}) bis zum erstmaligen Erscheinen des Oligonukleotids in der Galle, die Ausscheidungskonstante k des exponentiellen Teils sowie die gesamte initiale Steigung G_2 wurden kleiner, und es verlängerte sich die Zeit bis zum Erreichen der Hälfte des Endwertes des exponentiellen Teils (G_3).

Das Lösungsmittelgemisch DMSO/Glycerin/PBS beeinflusste lediglich den initialen Anstieg des Galleflusses; unabhängig von Rattenstamm und Oligonukleotid war dieser in Gegenwart von DMSO/Glycerin/PBS geringer als in Abwesenheit. Wechselwirkungen der Haupteffekte traten in Bezug auf den Gallefluss nicht auf (s. Tab. 9.7, S. 208).

Eine Präinjektion von Ethanol hatte keinen signifikanten Einfluss auf die hepatobiliäre Elimination eines Oligonukleotids (vgl. Tab. 4.18, S. 107), veränderte jedoch die initiale Steigung des Galleflusses (s. Tab. 9.6, S. 207). Die Präinjektion von DMSO/Glycerin/PBS führte zu zahlreichen Wechselwirkungen sowohl bei der hepatobiliären Ausscheidung der Oligonukleotide (vgl. Tab. 4.19, S. 110) als auch in Bezug auf den im Messzeitraum beobachteten Gallefluss (s. Tab. 9.7, S. 208).

Für die Präinjektion von PBS ergaben sich weder bei der Galleausscheidung der Oligonukleotide (vgl. Tab. 4.19, S. 208) noch bei den aufgefangenen Gallenmengen (s. Tab. 9.7, S. 208) signifikante Einflüsse des Lösungsmittels oder Wechselwirkungen mit den anderen untersuchten Haupteffekten „Oligonukleotid“ und „Rattenstamm“. In der fraktionierten Darstellung der Galleausscheidung der Oligos unterschieden sich die Kurven für die PBS-Präinjektion deutlich von denjenigen, bei denen keinerlei Präinjektion stattgefunden hatte (vgl. Abb. 4.23, S. 100, Abb. 4.25, S. 102, Abb. 4.27, S. 104 und Abb. 4.28, S. 106).

Die Experimente zur Untersuchung des Lösungsmiteleinflusses auf die hepatobiliäre Elimination der Oligonukleotide zeigten, dass bei den nachfolgenden Versuchen mit mrp2-Substraten jeweils die Injektion des Lösungsmittels die Bezugsgröße sein musste.

Tab. 4.19: Einflüsse der Art des Oligonukleotids (n-ODN bzw. 2G-ODN), des Rattenstammes (Wistar- bzw. TR-Ratte) sowie der Präinjektion von PBS (links) bzw. DMSO/Glycerin/PBS (rechts) auf die hepatobiliäre Elimination der Oligonukleotide. Dargestellt sind die Signifikanzen der Haupteffekte "Oligonukleotid", "Rattenstamm" und "Lösungsmittel" mit den Irrtumswahrscheinlichkeiten p der Prozessparameter.

Präinjektion von PBS							
Variable	Hauptwirkungen			Wechselwirkungen			
	PBS-Gabe	Oligonukleotid	Rattenstamm	WW PBS-Oligo	WW PBS-RStamm	WW Oligo-RStamm	WW alle
log(E)	n.s. (p=0,2108)	p<0,0001	p=0,0107	n.s. (p=0,6174)	n.s. (p=0,2104)	n.s. (p=0,5117)	n.s. (p=0,4390)
log(k)	n.s. (p=0,2194)	n.s. (p=0,8192)	p<0,0001	n.s. (p=0,2879)	n.s. (p=0,2046)	n.s. (p=0,3953)	n.s. (p=0,3491)
log(tZeit)	n.s. (p=0,5748)	p<0,0001	p<0,0001	n.s. (p=0,9378)	n.s. (p=0,6574)	n.s. (p=0,9061)	n.s. (p=0,2137)
log(m)	n.s. (p=0,4296)	n.s. (p=0,5506)	p=0,0010	n.s. (p=0,3644)	n.s. (p=0,4138)	n.s. (p=0,1059)	n.s. (p=0,3414)
log(G ₁)	n.s. (p=0,4761)	p<0,0001	p<0,0001	n.s. (p=0,7169)	n.s. (p=0,5037)	p=0,0494	n.s. (p=0,8112)
log(G ₂)	n.s. (p=0,9535)	p<0,0001	p<0,0001	n.s. (p=0,2133)	n.s. (p=0,9322)	p=0,0175	n.s. (p=0,6076)
log(G ₃)	n.s. (p=0,2194)	n.s. (p=0,8192)	p<0,0001	n.s. (p=0,2879)	n.s. (p=0,2046)	n.s. (p=0,3953)	n.s. (p=0,3491)

Präinjektion von DMSO/Glycerin/PBS							
Variable	Hauptwirkungen			Wechselwirkungen			
	Lsm.-Gabe	Oligonukleotid	Rattenstamm	WW Lsm.-Oligo	WW Lsm.-RStamm	WW Oligo-RStamm	WW alle
log(E)	n.s. (p=0,8478)	p<0,0001	p=0,0064	n.s. (p=0,1426)	n.s. (p=0,5966)	n.s. (p=0,6841)	n.s. (p=0,4042)
log(k)	n.s. (p=0,4003)	n.s. (p=0,3735)	p<0,0001	p=0,0448	n.s. (p=0,5297)	p=0,0208	p=0,0173
log(tZeit)	p=0,0002	p<0,0001	p<0,0001	n.s. (p=0,7613)	n.s. (p=0,2845)	n.s. (p=0,1884)	p=0,0084
log(m)	n.s. (p=0,7090)	n.s. (p=0,7078)	p=0,0094	n.s. (p=0,4998)	n.s. (p=0,9420)	n.s. (p=0,2765)	n.s. (p=0,6666)
log(G ₁)	n.s. (p=0,5661)	p<0,0001	p<0,0001	n.s. (p=0,7850)	n.s. (p=0,1315)	p=0,0030	n.s. (p=0,2130)
log(G ₂)	n.s. (p=0,2917)	p<0,0001	p<0,0001	n.s. (p=0,6422)	n.s. (p=0,1183)	p=0,0008	p=0,0484
log(G ₃)	n.s. (p=0,4003)	n.s. (p=0,3735)	p<0,0001	p=0,0448	n.s. (p=0,5297)	p=0,0208	p=0,0173

4.4.3 Effekte verschiedener Substrate canaliculärer Transporter

4.4.3.1 Bromsulphthalein (BSP)

Bromsulphthalein (BSP) wurde Wistarratten 2 min vor Injektion des jeweiligen Oligonukleotids in Konzentrationen von 5 bzw. 15 μmol / 500 μl PBS in die Femoralvene injiziert. TR⁻-Ratten erhielten lediglich die geringere der beiden genannten BSP-Konzentrationen, da die höhere Dosis bei ihnen zu toxisch wirkte (vgl. S. 67).

Wurden Wistarratten 5 μmol BSP vor der Gabe des 2G-ODN appliziert, so trat in der fraktionierten Darstellung der Galleausscheidung der Peak der höchsten ermittelten Oligonukleotidkonzentration erst nach 12 min auf; bei der Kontrolle war dies nach 8 min der Fall. Nach Applikation von 15 μmol BSP verlief die fraktionierte Elimination des 2G-ODN ohne erkennbaren Peak; die höchsten errechneten Konzentrationen traten zwischen 20 und 30 min nach Injektion des Oligonukleotids auf (Abb. 4.29).

Bei TR⁻-Ratten waren nach Applikation von 5 μmol BSP keine signifikanten Veränderungen der fraktionierten Ausscheidung zu beobachten. Bis zur 60. Minute wurden in Gegenwart von BSP jedoch geringfügig kleinere Konzentrationen von 2G-ODN gefunden. Nachdem Wistarratten 15 μmol BSP präinjiziert worden waren, verlief die Ausscheidung des 2G-ODN in der fraktionierten Darstellung wie die bei den TR⁻-Ratten durchgeführten Kontrollversuchen.

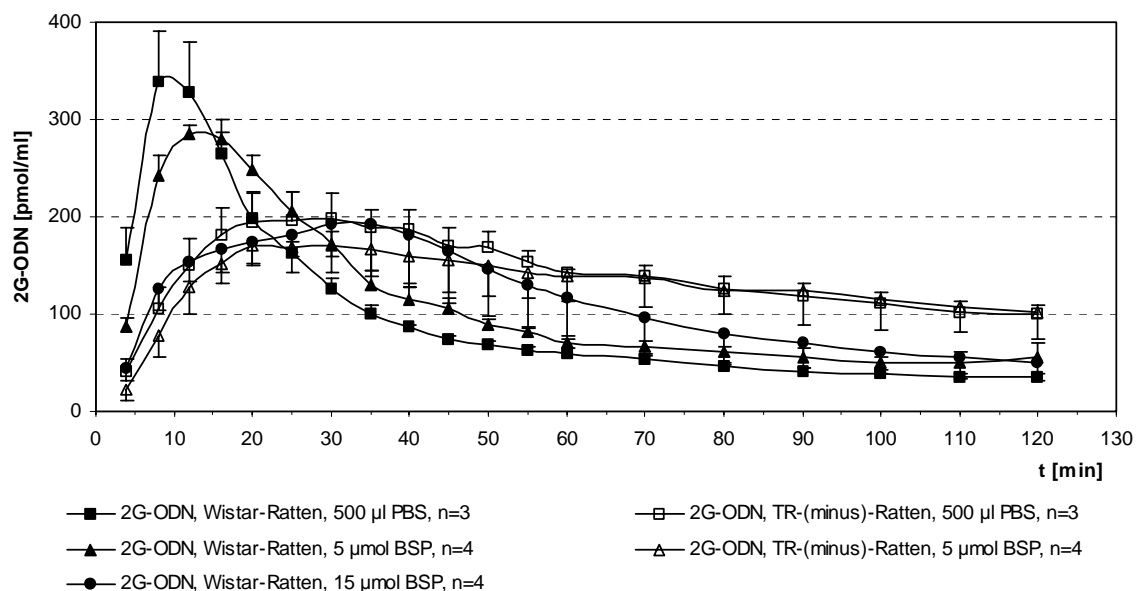


Abb. 4.29: Darstellung der fraktionierten Galleausscheidung des 2G-ODN in Gegenwart von BSP

Die Gesamtausscheidung des 2G-ODN war bei Wistarratten unabhängig von der Menge des präinjizierten BSP und ebenso hoch wie bei den Kontrollversuchen ohne BSP; die

initiale Steigung der Kurve war bei der kumulativen Darstellung jedoch umso kleiner, je mehr BSP appliziert worden war (Abb. 4.30).

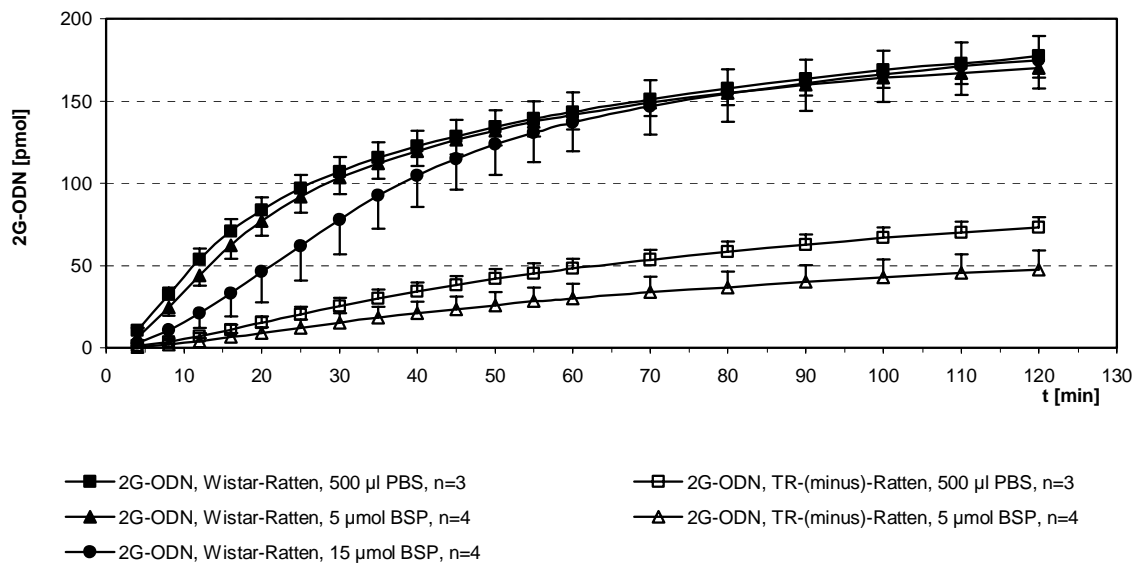


Abb. 4.30: Kumulierte Galleausscheidung des 2G-ODN in Gegenwart von BSP

Dagegen war bei TR⁻-Ratten nach Präinjektion von BSP eine signifikant geringere Gesamtausscheidung des 2G-ODN zu verzeichnen, und die Steigung der kumulativen Kurve war über den gesamten Messzeitraum geringer als bei den Kontrollen.

Bei allen Versuchen, die zum Einfluss des BSP auf die hepatobiliäre Elimination des 2G-ODN durchgeführt wurden, ergaben sich sowohl in der fraktionierten als auch in der kumulativen Auftragung der Versuchsergebnisse vergleichsweise kleine Standardabweichungen (Tab. 4.20).

Im 120 minütigen Messzeitraum wurden nach Präinjektion von 5 bzw. 15 µmol BSP bei den beiden Rattenstämmen folgende Mengen an Oligonukleotid und Galle ermittelt:

Tab. 4.20: 5 bzw. 15 µmol BSP wurden Wistar- bzw. TR⁻-Ratten präinjiziert, danach 0,8 nmol 2G-ODN appliziert. Es sind Mittelwerte und Standardabweichungen des im 120-minütigen Messzeitraums insgesamt in die Galle ausgeschiedenen Oligonukleotids sowie die in diesem Zeitraum aufgefangene Gallenmenge dargestellt.

Präinjektion / Rattenstamm	ausgeschiedene Menge 2G-ODN		ausgeschiedene Gallenmenge [g]
	[pmol]	[%]	
PBS / Wistarratte	177,02 ± 12,46	22,13 ± 1,56	1,7813 ± 0,2319
5 µmol BSP / Wistarratte	169,94 ± 5,93	21,24 ± 0,74	1,3870 ± 0,2205
15 µmol BSP / Wistarratte	174,70 ± 17,15	21,84 ± 2,14	1,4550 ± 0,3175
PBS / TR ⁻ -Ratte	72,91 ± 6,45	9,11 ± 0,81	0,5137 ± 0,0484
5 µmol BSP / TR ⁻ -Ratte	47,41 ± 11,51	5,93 ± 1,44	0,3785 ± 0,1564

Im beobachteten Messzeitraum von 120 min nahm die *Gallemenge* bei allen zum System BSP/2G-ODN untersuchten Versuchsreihen von 30min-Intervall zu 30min-Intervall kontinuierlich ab (s. Abb. 9.8, S. 209). Wistarratten schieden sowohl insgesamt als auch zu jedem einzelnen Zeitpunkt signifikant mehr Galle aus als TR⁻-Ratten (s. Tab. 9.10, S. 212). Die insgesamt ausgeschiedene Gallemenge war bei beiden Rattenstämmen nach Applikation von BSP geringer als bei den jeweiligen Kontrollen (Tab. 4.20).

Die fraktionierte Darstellung der hepatobiliären Elimination des n-ODN wies bei Wistarratten bei keiner der beiden präinjizierten BSP-Konzentrationen einen Peak auf (Abb. 4.31). Im Falle der Applikation von 15 μmol BSP wurde die maximale Konzentration des n-ODN in der Galle erst nach 40 min erreicht, blieb dann aber für etwa 20 min weitgehend konstant. Sie war jedoch in jedem Falle geringer als die n-ODN-Konzentration in der Galle aller unter diesen Messbedingungen untersuchten TR⁻-Ratten. Dies dürfte auch darauf zurückzuführen sein, dass die beiden Rattenstämme sehr unterschiedliche Gallemengen ausschieden (s. Tab. 4.21, S. 114). In der kumulativen Darstellung der Ergebnisse zeigte sich nämlich, dass nach Präinjektion von 5 μmol BSP 1% weniger n-ODN in die Galle sezerniert wurde als bei den Kontrolltieren, wohingegen die Gesamtausscheidung nach Applikation von 15 μmol BSP um 10% gegenüber den Kontrollversuchen zurückging (Abb. 4.32).

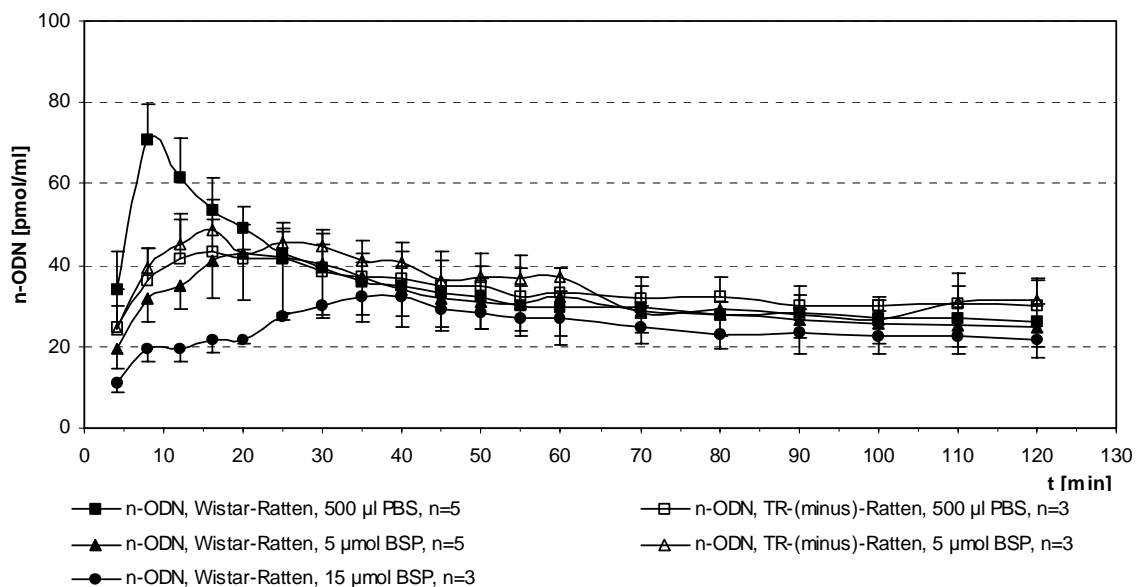


Abb. 4.31: Fraktionierte Galleausscheidung des n-ODN in Gegenwart von BSP

Bei TR⁻-Ratten waren in der fraktionierten Darstellung unter Berücksichtigung der Standardabweichungen keine Unterschiede zwischen den Ergebnissen nach Applikation von BSP und den Kontrollen feststellbar. Dagegen war die Gesamtausscheidung nach

Präinjektion von BSP signifikant geringer als bei den Kontrollen; die Steigung der für die BSP-Versuche an TR⁻-Ratten ermittelten kumulativen Kurve war über den gesamten Messzeitraum ebenfalls kleiner.

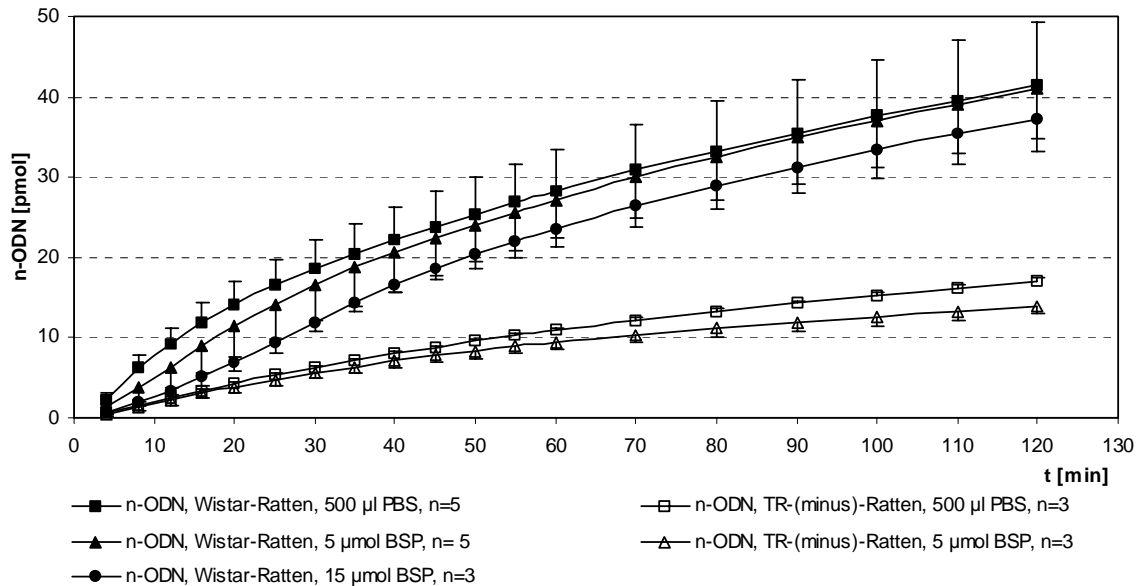


Abb. 4.32: Kumulierte Galleausscheidung des n-ODN in Gegenwart von BSP

In Tab. 4.21 sind die Ergebnisse der Versuche zur Wirkung von BSP auf die Galleausscheidung des n-ODN bei Wistar- und TR⁻-Ratten zusammengefasst.

Tab. 4.21: Wistar- bzw. TR⁻-Ratten erhielten eine Präinjektion von 5 bzw. 15 µmol BSP.

Anschließend wurden 0,8 nmol n-ODN appliziert. Die im 120-minütigen Messzeitraum insgesamt hepatobiliär ausgeschiedenen Mengen an Oligonukleotid sowie die Gallenmengen sind in Form ihrer Mittelwerte mit den zugehörigen Standardabweichungen dargestellt.

Präinjektion / Rattenstamm	ausgeschiedene Menge n-ODN		ausgeschiedene Gallenmenge [g]
	[pmol]	[%]	
PBS / Wistarratte	41,41 ± 7,95	5,18 ± 0,99	1,1688 ± 0,3345
5 µmol BSP / Wistarratte	40,97 ± 7,88	5,12 ± 0,99	1,3275 ± 0,2959
15 µmol BSP / Wistarratte	37,14 ± 2,32	4,64 ± 0,29	1,5293 ± 0,1492
PBS / TR ⁻ -Ratte	17,03 ± 0,40	2,13 ± 0,05	0,5098 ± 0,1181
5 µmol BSP / TR ⁻ -Ratte	13,93 ± 1,01	1,74 ± 0,13	0,3930 ± 0,0481

Mit Ausnahme der fraktionierten Darstellung der Kontrollen bei den Wistarratten (Präinjektion von PBS, anschließende Applikation von n-ODN) wurden für alle im

Zusammenhang mit der Ausscheidung des n-ODN unter Einfluss von BSP ermittelten Graphen vergleichsweise kleine Standardabweichungen errechnet.

Die Galle *mengen* nahmen im Messzeitraum von 120 min bei allen zum System BSP/n-ODN untersuchten Versuchsreihen von 30min-Intervall zu 30min-Intervall kontinuierlich ab (s. Abb. 9.9, S. 210). Bei den TR⁻-Ratten waren sowohl die insgesamt als auch die zu jedem einzelnen Zeitpunkt aufgefangenen Galle *mengen* immer signifikant geringer als bei den Wistarratten (s. Tab. 9.10, S. 212). Wistarratten schieden umso mehr Galle aus, je mehr BSP präinjiziert worden war; bei TR⁻-Ratten nahm die Galle *menge* nach BSP-Applikation jedoch im Vergleich zu den Kontrollen ab (Tab. 4.21).

Die Klärung der Signifikanz der experimentell gefundenen Unterschiede wurde zunächst nur für die Wistarratten durchgeführt, da nur diesem Rattenstamm beide BSP-Konzentrationen (5 und 15 μmol) verabreicht wurden. Untersucht wurde dabei die statistische Signifikanz der beiden Hauptwirkungen „BSP-Präinjektion“ (5 bzw. 15 μmol BSP) und „Oligonukleotid“ (n-ODN bzw. 2G-ODN).

Im Falle der Präinjektion von 5 μmol BSP wurden folgende statistische Irrtumswahrscheinlichkeiten p bzw. Signifikanzgrade der Prozessparameter errechnet (vgl. S. 90):

Tab. 4.22: Einflüsse der Art des Oligonukleotids (n-ODN bzw. 2G-ODN) und der Präinjektion von 5 μmol BSP auf die hepatobiliäre Elimination des Oligonukleotids bei Wistarratten. Angegeben sind die Signifikanzen der beiden Hauptwirkungen "Oligonukleotid" und "5 μmol BSP" mit den Irrtumswahrscheinlichkeiten p der Prozessparameter sowie die Wechselwirkungen der beiden Haupteffekte.

Parameter	Haupteffekte		Wechselwirkung
	5 μmol BSP	Oligonukleotid	
log(E)	n.s. ($p=0,0883$)	$p<0,0001$	n.s. ($p=0,3726$)
log(k)	$p=0,0296$	n.s. ($p=0,0627$)	n.s. ($p=0,2633$)
log(tZeit)	$p=0,0015$	$p=0,0111$	n.s. ($p=0,0600$)
log(m)	$p=0,0473$	$p=0,0002$	n.s. ($p=0,1416$)
log(G ₁)	n.s. ($p=0,1699$)	$p<0,0001$	n.s. ($p=0,5944$)
log(G ₂)	n.s. ($p=0,1335$)	$p<0,0001$	n.s. ($p=0,5881$)
log(G ₃)	$p=0,0277$	n.s. ($p=0,0627$)	n.s. ($p=0,2633$)

Die Auswertung zeigte, dass die Art des Oligonukleotids fast alle Prozessparameter signifikant beeinflusste (Tab. 4.22), Ausnahmen bildeten die Geschwindigkeitskonstante k des exponentiellen Anstiegs der Kurve und die Zeit, in der die Hälfte des exponentiellen Anstiegs erreicht wurde (G_3). Die Präinjektion von 5 μmol BSP hatte keine signifikante Wirkung auf den Endwert der ausgeschiedenen

Oligonukleotidmenge, die initiale Steigung des exponentiell ansteigenden Kurvenabschnittes und die gesamte initiale Steigung (G_2). Die Totzeit bis zum erstmaligen Auftreten eines Oligonukleotids in der Galle, die Geschwindigkeitskonstante k des exponentiellen, die Steigung m des linearen Kurventeils und die Zeit bis zum Erreichen des halben Endwertes des exponentiellen Teils G_3 wurden jedoch durch die BSP-Applikation verändert: Nach Injektion von 5 μmol BSP verzögerte sich die Oligonukleotidausscheidung, und Kurvenanstieg und -abfall verlangsamten sich im Vergleich zu den Kontrollen. Eine Wechselwirkung der beiden Haupteffekte „5 μmol BSP“ und „Oligonukleotid“ trat bei den Wistar-Ratten nicht auf.

Tab. 4.23: Ergebnisse der statistischen Untersuchung der Einflüsse, die die beiden Hauptwirkungen "15 μmol BSP" und "Oligonukleotid" auf die hepatobiliäre Ausscheidung von n-ODN und 2G-ODN ausübten. Es sind die Signifikanzen bzw. Irrtumswahrscheinlichkeiten p der beiden Hauptwirkungen sowie deren Wechselwirkungen angegeben.

Parameter	Haupteffekte		Wechselwirkung
	15 μmol BSP	Oligonukleotid	
$\log(E)$	$p=0,0024$	$p<0,0001$	$p=0,0026$
$\log(k)$	$p=0,0005$	$p=0,0047$	$p=0,0317$
$\log(t_{\text{Zeit}})$	$p<0,0001$	$p=0,0036$	n.s. ($p=0,4060$)
$\log(m)$	n.s. ($p=0,3832$)	n.s. ($p=0,7539$)	n.s. ($p=0,5409$)
$\log(G_1)$	$p=0,0036$	$p<0,0001$	n.s. ($p=0,8506$)
$\log(G_2)$	$p=0,0006$	$p<0,0001$	n.s. ($p=0,4513$)
$\log(G_3)$	$p=0,0005$	$p=0,0047$	$p=0,0317$

Sowohl die Art des applizierten Oligonukleotids - n-ODN oder 2G-ODN - als auch die Präinjektion von 15 μmol BSP beeinflussten alle untersuchten Prozessparameter außer der Steigung m des linearen Kurventeils (Tab. 4.23): Unabhängig von einer BSP-Applikation war die Totzeit nach Injektion des 2G-ODN geringer, die Kurve stieg schneller an, und es wurde ein höherer Endwert der Oligonukleotidausscheidung erreicht als beim n-ODN. Lediglich die Steigung des linearen Kurventeils zeigte keine Abhängigkeit von der Art des Oligonukleotids. Umgekehrt nahmen diese Parameter bei gegebenem Oligonukleotid kleinere Werte an, wenn statt PBS (Kontrolle) 15 μmol BSP appliziert wurden. Außerdem wechselwirkten die beiden Haupteffekte im Hinblick auf die insgesamt ausgeschiedene Menge an Oligonukleotid ($\log(E)$), die Ausscheidungskonstante k des exponentiellen Kurvenanstiegs und die Zeit, in der die Hälfte des Endwertes des exponentiellen Teils erreicht wurde (G_3): Die Präinjektion von 15 μmol BSP verzögerte den Kurvenanstieg des exponentiellen Teils und die Halbwertszeit beim 2G-ODN stärker als beim n-ODN, verminderte den Endwert der

Ausscheidung des n-ODN aber um 10%, den des 2G-ODN dagegen nur um 1% gegenüber den jeweiligen Kontrollen.

Da die Auswirkung einer Präinjektion von 5 μmol BSP an Wistar- und an TR⁻-Ratten getestet wurde und die Befunde für beide Rattenstämme stark differierten, wurde die Signifikanz der experimentell gefundenen Unterschiede mit Hilfe einer dreifaktoriellen Varianzanalyse überprüft. Untersucht wurden dabei die drei Hauptwirkungen „Oligonukleotid“, „Präinjektion von 5 μmol BSP“ und „Rattenstamm“. Die ermittelten statistischen Irrtumswahrscheinlichkeiten p bzw. Signifikanzen sowie die Wechselwirkungen der Haupteffekte sind in Tab. 4.24 aufgeführt.

Tab. 4.24: Ergebnisse der dreifaktoriellen Varianzanalyse zur Überprüfung des Einflusses einer Präinjektion von 5 μmol BSP auf die hepatobiliäre Elimination von Oligonukleotiden. Neben den Signifikanzen der Hauptwirkungen "5 μmol BSP", "Oligonukleotid" und "Rattenstamm" mit den statistischen Irrtumswahrscheinlichkeiten p der Prozessparameter sind die Wechselwirkungen dieser Hauptwirkungen angegeben.

Parameter	Hauptwirkungen		
	5 μmol BSP	Oligonukleotid	Rattenstamm
log(E)	n.s. ($p=0,1568$)	$p<0,0001$	$p<0,0001$
log(k)	n.s. ($p=0,8841$)	n.s. ($p=0,4838$)	$p<0,0001$
log(tZeit)	$p=0,0043$	$p<0,0001$	$p=0,0030$
log(m)	n.s. ($p=0,1775$)	n.s. ($p=0,3458$)	$p<0,0001$
log(G ₁)	n.s. ($p=0,0833$)	$p<0,0001$	$p<0,0001$
log(G ₂)	n.s. ($p=0,1027$)	$p<0,0001$	$p<0,0001$
log(G ₃)	n.s. ($p=0,8841$)	n.s. ($p=0,4838$)	$p<0,0001$

Parameter	Wechselwirkung je zweier Hauptwirkungen			Wechselwirkung alle
	WW BSP-Oligo	WW BSP-RStamm	WW Oligo-RStamm	
log(E)	n.s. ($p=0,4515$)	$p=0,0072$	n.s. ($p=0,8676$)	n.s. ($p=0,6765$)
log(k)	n.s. ($p=0,6699$)	$p=0,0170$	$p=0,0160$	n.s. ($p=0,8243$)
log(tZeit)	n.s. ($p=0,2277$)	n.s. ($p=0,1469$)	$p=0,0397$	n.s. ($p=0,2154$)
log(m)	n.s. ($p=0,1621$)	n.s. ($p=0,0641$)	$p=0,0322$	n.s. ($p=0,0788$)
log(G ₁)	n.s. ($p=0,7294$)	n.s. ($p=0,7719$)	$p=0,0037$	n.s. ($p=0,4668$)
log(G ₂)	n.s. ($p=0,7563$)	n.s. ($p=0,9031$)	$p=0,0033$	n.s. ($p=0,6397$)
log(G ₃)	n.s. ($p=0,6699$)	$p=0,0170$	$p=0,0160$	n.s. ($p=0,8243$)

Wie aus oben stehender Tabelle abzulesen ist, unterschieden sich die beiden Rattenstämme in allen untersuchten Prozessparametern. Bei TR⁻-Ratten war die Totzeit bis zum erstmaligen Erscheinen eines Oligonukleotids in der Galle verlängert, es wurde

ein kleinerer Endwert der Ausscheidung erreicht, und die Steigung der Ausscheidungskurve war über den gesamten Bereich niedriger als bei Wistarratten. Welches der beiden Oligonukleotide (n-ODN oder 2G-ODN) eingesetzt wurde, beeinflusste signifikant den Endwert des insgesamt ausgeschiedenen Oligonukleotidderivates, die Totzeit sowie die Konstanten für die initiale Steigung (G_1 und G_2). Die Totzeit war beim n-ODN gegenüber dem 2G-ODN verlängert, alle anderen Parameter waren gegenüber dem Gallensäure-gekoppelten Oligonukleotid vermindert. Dagegen verlängerte eine Präinjektion von 5 μmol BSP lediglich die Totzeit in signifikanter Weise, hatte jedoch keinen weiteren Einfluss auf die weiteren Prozessparameter. Wechselwirkungen zwischen der BSP-Präinjektion und der Art des Oligonukleotids konnten nicht festgestellt werden. Im Gegensatz dazu wurden signifikante Wechselwirkungen zwischen BSP-Präinjektion und Rattenstamm in Bezug auf den Endwert ($\log(E)$), die Geschwindigkeitskonstante k des exponentiellen Kurventeils und die Zeit bis zum Erreichen der Hälfte des Endwertes des exponentiellen Teils (G_3) gefunden: Bei beiden Rattenstämmen führte die Applikation von 5 μmol BSP zu einem niedrigeren Endwert der Oligoausscheidung und kleineren Werten von k und G_3 . Bei TR^- -Ratten war dieser Effekt jedoch im Gegensatz zu Wistarratten signifikant stärker. Die beiden Haupteffekte „Oligonukleotid“ und „Rattenstamm“ wechselwirkten in Bezug auf die ermittelte Totzeit und alle für den Kurvenanstieg herangezogenen Parameter. Der „Übergang“ vom n-ODN zum 2G-ODN beschleunigte bei beiden Rattenstämmen die hepatobiliäre Elimination des Oligonukleotids, und bei beiden Oligonukleotiden verzögerte sich die Galleausscheidung, wenn TR^- an Stelle von Wistarratten eingesetzt wurden. Dagegen war keine signifikante Wechselwirkung von „Oligonukleotid“ und „Rattenstamm“ auf den Endwert der Oligonukleotidausscheidung festzustellen. Sowohl ein „Verzicht“ auf die Gallensäure-Konjugation des Oligonukleotids (n-ODN) als auch ein „Verzicht“ auf den canalikulären Transporter mrp2 (TR^- -Ratte) verringerte den Endwert der Oligonukleotidelimination. Beide Effekte waren jedoch gleichläufig; sie verstärkten sich weder gegenseitig, noch hoben sie sich auf. Eine Wechselwirkung aller drei untersuchten Haupteffekte trat nicht auf.

Nur bei Wistarratten kamen - wie bereits angeführt - zwei verschiedene BSP-Konzentrationen zum Einsatz. Der Einfluss von 5 bzw. 15 μmol BSP auf den Gallefluss wurde mittels zweifaktorieller Varianzanalysen untersucht (s. Tab. 9.8, S. 211 und Tab. 9.9, S. 211). Hauptwirkungen waren hierbei jeweils „Oligonukleotid“ und „BSP-Präinjektion“. Die Präinjektion von 5 μmol BSP beeinflusste initiale Steigung, Exkretionskonstante und Endwert des Galleflusses; bei Applikation von 15 μmol BSP ergab sich lediglich im Hinblick auf die Exkretionskonstante eine signifikante Wirkung. Mit Hilfe einer dreifaktoriellen Varianzanalyse wurde außerdem berechnet, welche Einflüsse die Hauptwirkungen „Oligonukleotid“, „Präinjektion von 5 μmol BSP“ und „Rattenstamm“ auf den Gallefluss hatten (s. Tab. 9.10, S. 212). Unter Einbeziehung des

Einfluss des Rattenstammes ergab sich keine signifikante Wirkung der Präinjektion von 5 μmol BSP auf die insgesamt ausgeschiedene Gallenmenge.

Es ist zusammenfassend festzuhalten, dass BSP dosisabhängig sowohl bei TR⁻- als auch normalen Wistarratten sowohl die Ausscheidung des unmodifizierten als auch des Gallensäure-gekoppelten Oligonukleotids hemmt.

4.4.3.2 S 3025

Der Glucose-6-Phosphatase-Inhibitor S 3025 wurde Wistarratten 2 min vor Injektion des jeweiligen Oligonukleotids in Konzentrationen von 5 bzw. 15 $\mu\text{mol/ml}$ DMSO/Glycerin/PBS 15:15:70 (Vol/Vol/Vol) in die Femoralvene injiziert. TR⁻-Ratten erhielten lediglich die geringere der beiden genannten Konzentrationen an S 3025, da die höhere Dosis bei ihnen zu toxisch wirkte (vgl. S. 67).

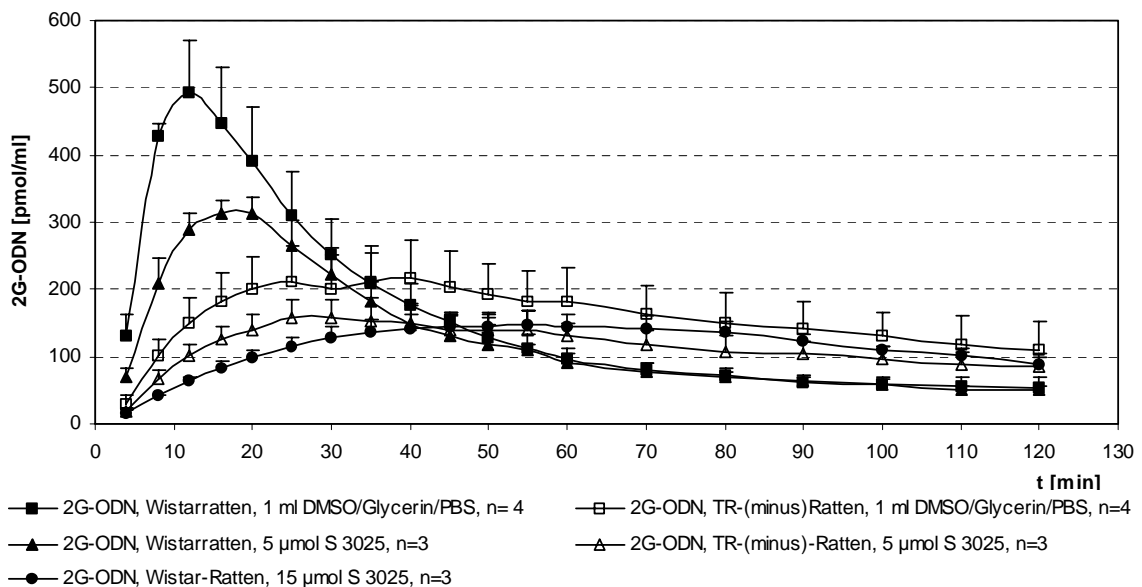


Abb. 4.33: Fraktionierte Galleausscheidung des 2G-ODN in Gegenwart von S 3025

In der fraktionierte Darstellung der Ausscheidung des Bis-Gallensäure-konjugierten Oligonukleotids zeigte sich bei den Kontrollversuchen der Wistarratten nach 12 min ein Peak (Abb. 4.33). Dagegen wurde bei diesem Rattenstamm nach Präinjektion der niedrigeren Dosis des S 3025 und anschließender Applikation des 2G-ODN kein scharfer Peak gefunden. Die höchste Konzentration an Oligonukleotid in der Galle wurde in diesem Fall nach 16 bis 20 min erhalten. Die nach Präinjektion von 5 μmol S 3025 ermittelten Oligonukleotidkonzentrationen waren bei beiden Rattenstämmen zu jedem Zeitpunkt niedriger als die der entsprechenden Kontrollen. Wurden Wistarratten 15 μmol S 3025 injiziert, so ergab sich eine fraktionierte Darstellung, die derjenigen von TR⁻-Ratten ähnelte, wobei auf Grund der höheren Gallenmengen bei Wistarratten

sogar niedrigere Konzentrationen an 2G-ODN resultierten. Bei TR⁻-Ratten trat in der fraktionierten Darstellung der Oligonukleotidausscheidung weder bei den Kontrollversuchen noch nach Applikation von 5 μmol S 3025 ein Peak auf. Während der ersten Stunde des Messzeitraumes waren die Oligonukleotidkonzentrationen, die für die beiden an TR⁻-Ratten durchgeführten Versuchen ermittelt wurden, höher als bei Wistarratten, denen 15 μmol S 3025 appliziert worden waren.

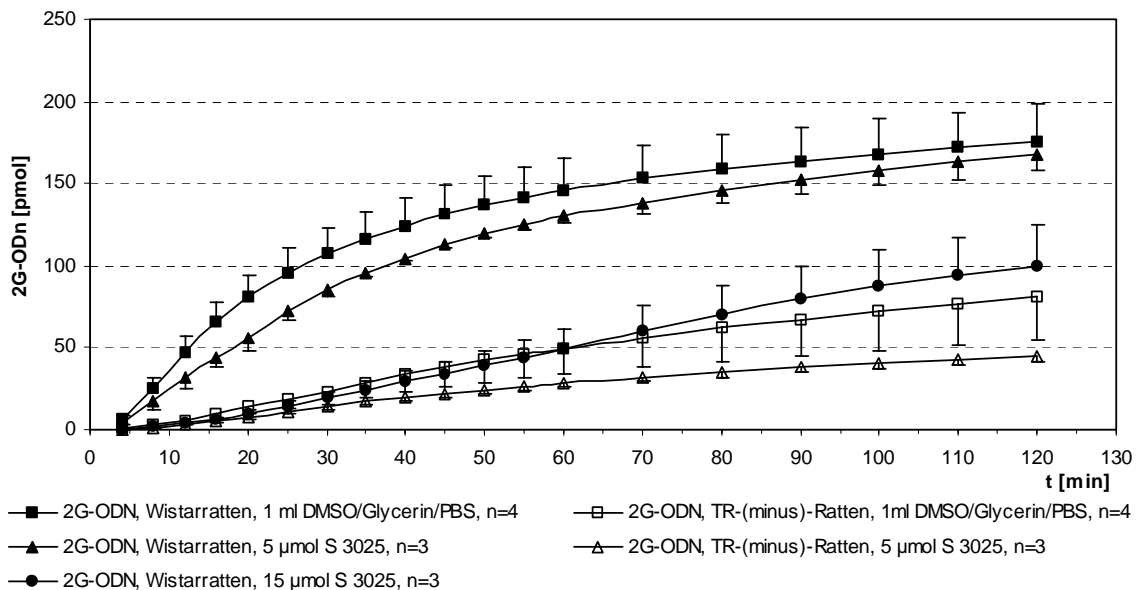


Abb. 4.34: Kumulative Galleausscheidung des 2G-ODN in Gegenwart von S 3025

Bei der Kombination 5 μmol S 3025 / 2G-ODN resultierte für Wistarratten eine Gesamtausscheidung an Oligonukleotid, die nur um 4% unter derjenigen der Kontrollen lag; die initiale Steigung der Kurve war nach Applikation des mrp2-Substrates jedoch geringer (Tab. 4.25 und Tab. 4.29). Wurden stattdessen 15 μmol S 3025 eingesetzt, so wurden insgesamt nur 57% der bei den Kontrolltieren ermittelten Oligonukleotidmenge ausgeschieden. Im Vergleich dazu schieden die TR⁻-Kontrollratten 46% der für die Wistarkontrollen ermittelten Oligonukleotidmenge aus. Die Steigung der für die Applikation von 15 μmol S 3025 bei Wistarratten errechneten Kurve war erst nach 60 min höher als bei den TR⁻-Kontrollen (Abb. 4.34). TR⁻-Ratten, die vor Injektion des 2G-ODN eine Dosis von 5 μmol S 3025 erhalten hatten, schieden insgesamt 45% weniger Oligonukleotid in die Galle aus als die Kontrolltiere desselben Rattenstammes.

Die Gallenmengen nahmen bei allen Versuchsreihen im Verlauf des 120-minütigen Messzeitraumes ab (s. Abb. 9.10, S. 213). Bei allen an Wistarratten durchgeführten Versuchen wurden sowohl insgesamt als auch in jedem einzelnen 30min-Intervall signifikant höhere Gallenmengen sezerniert als bei den beiden an TR⁻-Ratten durchgeführten Versuchsreihen. Nach Präinjektion von 15 μmol S 3025 wurden bei den Wistarratten in jedem Zeitintervall signifikant geringere Gallenmengen ausgeschieden als

bei den entsprechenden Kontrollen (s. Tab. 9.13, S. 215). Alle im Zusammenhang mit den ausgeschiedenen Gallemengen betrachteten Werte wiesen vergleichsweise hohe Standardabweichungen auf.

Nach Präinjektion von 5 bzw. 15 μmol S 3025 wurden bei den beiden Rattenstämmen im beobachteten Messzeitraum von 120 min die nachfolgend angegebenen Mengen an Galle und 2G-ODN ermittelt:

Tab. 4.25: 5 bzw. 15 μmol S 3025 wurden Wistar- bzw. TR⁻-Ratten präinjiziert, danach 0,8 nmol 2G-ODN appliziert. Es sind Mittelwerte und Standardabweichungen des im 120-minütigen Messzeitraums insgesamt in die Galle ausgeschiedenen Oligonukleotids sowie die in diesem Zeitraum aufgefangene Gallmenge dargestellt.

Präinjektion / Rattenstamm	ausgeschiedene Menge 2G-ODN		ausgeschiedene Gallmenge [g]
	[pmol]	[%]	
DMSO/Glycerin/PBS / Wistarratte	175,26 \pm 22,94	21,91 \pm 2,89	1,0417 \pm 0,2029
5 μmol S 3025 / Wistarratte	168,22 \pm 10,79	21,03 \pm 1,35	1,3230 \pm 0,1771
15 μmol S 3025 / Wistarratte	99,95 \pm 25,59	12,49 \pm 3,20	0,8725 \pm 0,1811
DMSO/Glycerin/PBS / TR ⁻ -Ratte	81,24 \pm 26,74	10,16 \pm 3,34	0,5067 \pm 0,1237
5 μmol S 3025 / TR ⁻ -Ratte	44,64 \pm 3,06	5,58 \pm 0,38	0,3884 \pm 0,0702

Nach Präinjektion von S 3025 und anschließender Applikation von n-ODN war bei Wistarratten in der fraktionierten Darstellung kein Peak zu sehen (Abb. 4.35). Wurden 5 μmol S 3025 injiziert, so resultierte eine Oligonukleotidkonzentration in der Galle, die in etwa der bei TR⁻-Ratten gefundenen entsprach. Die Applikation von 15 μmol S 3025 führte nach 12 min sogar zu einer konstanten Konzentration des n-ODN, wobei die in diesem Fall gefundenen Konzentrationswerte die niedrigsten aller bei der Kombination S 3025 / n-ODN ermittelten waren.

Unter Berücksichtigung der Standardabweichungen ergab sich bei Präinjektion von 5 μmol S 3025 und Applikation von n-ODN bei TR⁻-Ratten keine Veränderung der Oligonukleotidkonzentration in der Galle im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen.

Bei den Wistarratten lag die insgesamt in die Galle sezernierte Menge an n-ODN nach Präinjektion von 5 μmol S 3025 um 10% und nach Injektion von 15 μmol S 3025 um etwa 30% unter dem für die Kontrolltiere ermittelten Wert (Tab. 4.26). Die Steigungen der beiden Kurven lagen über den gesamten Messzeitraum unter denen der Wistarratten, die ausschließlich n-ODN erhalten hatten. Dagegen reduzierte die Injektion von 5 μmol S 3025 die Gesamtausscheidung bei TR⁻-Ratten um 15% gegenüber den Kontrollen. Auch in diesem Fall war die Steigung der Kurve grundsätzlich kleiner als die der Kurve der Kontrolltiere (Abb. 4.36).

Die Kontrollversuche bei Wistarratten zeigten innerhalb der ersten 90 min des Messzeitraumes einen leichten Anstieg der Gallemenge; bei allen Versuchsreihen nahm die Gallemenge im gesamten Beobachtungszeitraum kontinuierlich ab (s. Abb. 9.11, S. 214). TR⁻-Ratten schieden zu jedem Zeitpunkt signifikant weniger Galle aus als Wistarratten. Nach Applikation von 15 μmol S 3025 sezernierten Wistarratten signifikant mehr Galle als die Kontrolltiere dieses Rattenstammes (s. Tab. 9.13, S. 215).

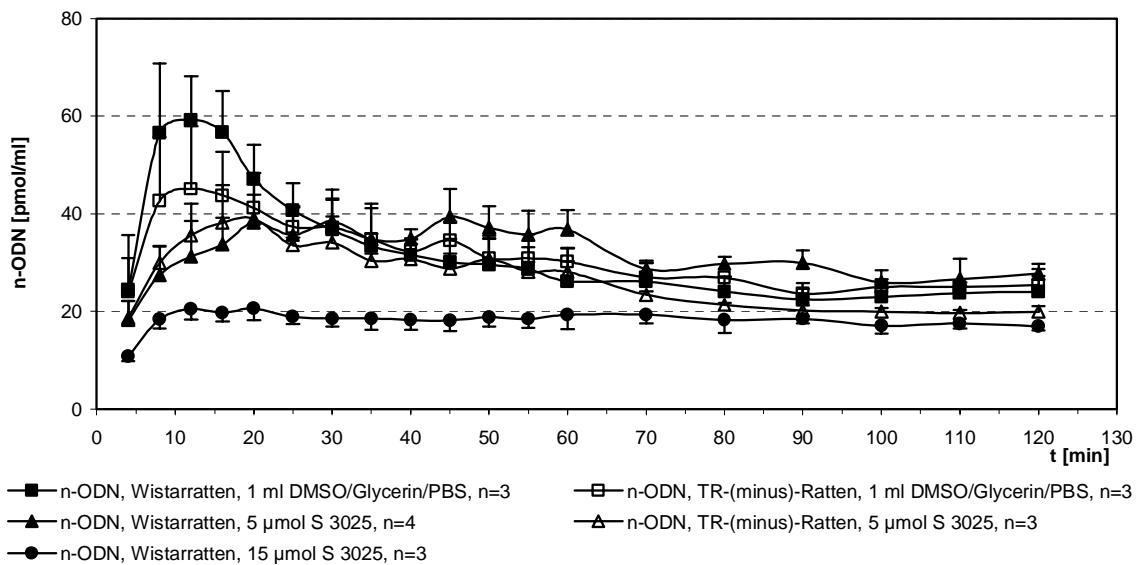


Abb. 4.35: Fraktionierte Galleausscheidung des n-ODN in Gegenwart von S 3025

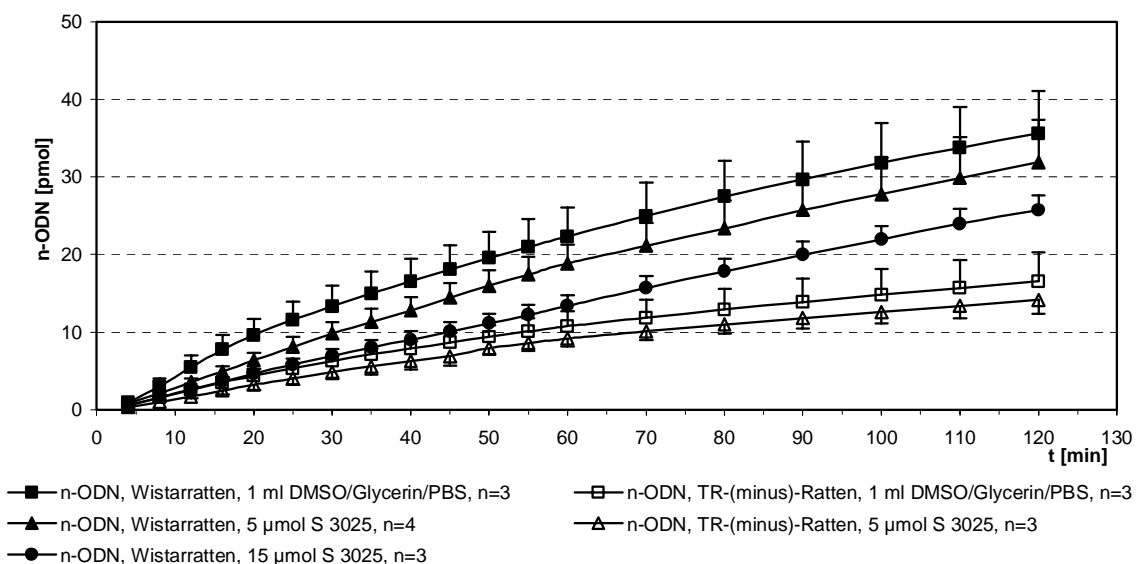


Abb. 4.36: Kumulierte Galleausscheidung des n-ODN in Gegenwart von S 3025

Die Ergebnisse der Experimente zum Einfluss von S 3025 auf ausgeschiedenen Mengen an Galle und n-ODN bei Wistar- und TR⁻-Ratten sind nachfolgend zusammengefasst.

Tab. 4.26: 5 bzw. 15 μmol S 3025 wurden Wistar- bzw. TR⁻-Ratten präinjiziert, danach 0,8 nmol n-ODN appliziert. Es sind Mittelwerte und Standardabweichungen des im 120-minütigen Messzeitraums insgesamt in die Galle ausgeschiedenen Oligonukleotids sowie die in diesem Zeitraum aufgefangene Gallenmenge dargestellt.

Präinjektion / Rattenstamm	ausgeschiedene Menge n-ODN		ausgeschiedene Gallenmenge [g]
	[μmol]	[%]	
DMSO/Glycerin/PBS / Wistarratte	35,60 \pm 5,49	4,45 \pm 0,69	1,1524 \pm 0,1380
5 μmol S 3025 / Wistarratte	31,87 \pm 5,50	3,98 \pm 0,69	1,0238 \pm 0,1647
15 μmol S 3025 / Wistarratte	25,72 \pm 1,86	3,22 \pm 0,23	1,4238 \pm 0,1780
DMSO/Glycerin/PBS / TR ⁻ -Ratte	16,57 \pm 3,75	2,07 \pm 0,47	0,5398 \pm 0,1807
5 μmol S 3025 / TR ⁻ -Ratte	14,16 \pm 1,75	1,77 \pm 0,22	0,5338 \pm 0,1100

Um die Signifikanz der empirisch ermittelten Unterschiede bei der hepatobiliären Elimination der Oligonukleotide zu ermitteln, wurden die Varianzanalysen zunächst ausschließlich für Wistarratten durchgeführt, da nur diesem Rattenstamm zwei verschiedene Konzentrationen an S 3025 präinjiziert wurden.

Für die Präinjektion von 5 μmol S 3025 bei Wistarratten wurden unter Berücksichtigung der beiden Hauptwirkungen „Oligonukleotid“ und „5 μmol S 3025“ folgende Signifikanzen bzw. statistische Irrtumswahrscheinlichkeiten p der Prozessparameter errechnet (vgl. S. 90):

Tab. 4.27: Einflüsse der Art des Oligonukleotids (n-ODN bzw. 2G-ODN) und der Präinjektion von 5 μmol S 3025 auf die hepatobiliäre Elimination des Oligonukleotids bei Wistarratten. Angegeben sind die Signifikanzen der beiden Hauptwirkungen "Oligonukleotid" und "5 μmol S 3025" mit den Irrtumswahrscheinlichkeiten p der Prozessparameter sowie die Wechselwirkungen der beiden Haupteffekte.

Parameter	Haupteffekte		Wechselwirkung
	5 μmol S 3025	Oligonukleotid	
log(E)	p<0,0001	p<0,0001	p<0,0001
log(k)	p<0,0001	p<0,0001	p=0,0019
log(tZeit)	n.s. (p=0,4796)	p=0,0024	n.s. (p=0,2765)
log(m)	n.s. (p=0,2164)	n.s. (p=0,2062)	n.s. (p=0,5529)
log(G ₁)	p=0,0171	p<0,0001	n.s. (p=0,4608)
log(G ₂)	p=0,0010	p<0,0001	n.s. (p=0,5183)
log(G ₃)	p<0,0001	p<0,0001	p=0,0019

Es zeigte sich, dass die Art des Oligonukleotids alle Prozessparameter mit Ausnahme der Steigung m des linearen Teils der Kurve signifikant beeinflusste: Beim 2G-ODN war die Totzeit geringer, die Steigung des exponentiellen Kurventeils steiler, und es wurde ein höherer Endwert der Oligonukleotidausscheidung erreicht als im Falle des n-ODN. Auch die Präinjektion von 5 μmol S 3025 veränderte alle bestimmten Prozessparameter mit Ausnahme der Totzeit (t_{Zeit}) und der Steigung m des linearen Kurventeils signifikant; in Gegenwart dieses Substrates stieg die Ausscheidungskurve jedes Oligonukleotids langsamer an und führte zu einem geringeren Endwert. Präinjektion von 5 μmol S 3025 und Art des Oligonukleotids übten signifikante Wechselwirkungen aufeinander aus, was den erreichten Endwert (E), die Steigung des exponentiellen Teils der Ausscheidungskurve (k) sowie die Zeit bis zum Erreichen der Hälfte des Endwertes des exponentiellen Teils (G_3) betraf: Die Präinjektion von 5 μmol S 3025 verminderte k und E und vergrößerte G_3 , beim n-ODN wirkte sich dieser Effekt jedoch stärker aus als beim 2G-ODN.

Für alle kumulierten Daten der hepatobiliären Elimination der Oligonukleotide wurde eine Kurvenanpassung durchgeführt (vgl. Kap. 3.7, S. 70 f.). Fast alle für die kumulative Ausscheidung ermittelten Daten ließen sich mit größter Näherung durch eine Exponentialfunktion nach Mitscherlich beschreiben. Die einzige Ausnahme bildete die hepatobiliäre Elimination des 2G-ODN bei Wistarratten nach Präinjektion von 15 μmol S 3025: Dieser Graph ließ sich am besten durch eine lineare Funktion der Form

$$z(t) = m \cdot (t - t_{\text{Zeit}}) + \text{Basis}$$

anpassen. Dabei sind

$z(t)$:	insgesamt ausgeschiedene Menge des 2G-ODN zum Zeitpunkt t
m :	Geradensteigung; hier: $(0,94 \pm 0,25)$ pmol/min
t :	Messzeitpunkt
t_{Zeit} :	Totzeit; hier: $(8,04 \pm 1,96)$ min
Basis:	Basiswert; hier: $(0,89 \pm 0,32)$ pmol

Die Ausscheidungskurve der zugehörigen Kontrollen - Präinjektion von 1 ml DMSO/Glycerin/PBS und Applikation von 2G-ODN - ließen sich über eine (exponentielle) Mitscherlich-Funktion anpassen. Lineare und Mitscherlich-Funktion enthielten unterschiedliche Parameter, so dass es nicht möglich war, die Auswirkungen der Präinjektion von 15 μmol S 3025 auf die hepatobiliäre Elimination des 2G-ODN mittels Varianzanalyse zu überprüfen. Die Tatsache, dass die Präinjektion von 15 μmol S 3025 zu einem völlig veränderten Verlauf der Ausscheidungskinetik des 2G-ODN führte, war jedoch schon ein hinreichender Beweis für den statistisch signifikanten Einfluss dieses mrp2-Substrates auf die hepatobiliäre Elimination des Bis-Gallensäure-konjugierten Oligonukleotids.

Die Ausscheidungskurve des n-ODN konnte dagegen auch nach Präinjektion von 15 μmol S 3025 durch eine Mitscherlich-Funktion angepasst werden. In diesem Fall wurde eine einfaktorische Varianzanalyse für die Hauptwirkung „15 μmol S 3025“ durchgeführt, um die Signifikanzen bzw. statistischen Irrtumswahrscheinlichkeiten p für die empirisch gefundenen Unterschiede der Prozessparameter zu prüfen. Die Ergebnisse sind in Tab. 4.28 aufgeführt.

Tab. 4.28: Einfluss der Präinjektion von 15 μmol S 3025 auf die hepatobiliäre Elimination des n-ODN bei Wistarratten. Es sind die Signifikanzen bzw. Irrtumswahrscheinlichkeiten p der Prozessparameter für die Hauptwirkung "15 μmol S 3025" angegeben.

Parameter	Haupteffekt 15 μmol S 3025
log(E)	$p < 0,0001$
log(k)	n.s. ($p = 0,1467$)
log(tZeit)	$p = 0,0049$
log(m)	n.s. ($p = 0,3503$)
log(G_1)	$p = 0,0021$
log(G_2)	$p < 0,0001$
log(G_3)	n.s. ($p = 0,1467$)

Die Präinjektion von 15 μmol S 3025 hatte signifikanten Einfluss auf die hepatobiliäre Elimination des n-ODN: Die Konstanten der Steigungen des exponentiellen (k) und des linearen Teils (m) der Kurve sowie die Zeit bis zum Erreichen der Hälfte des Endwertes des exponentiellen Teils (G_3) wurden zwar nicht verändert, doch unter Einfluss von 15 μmol S 3025 ergaben sich eine kleinere initiale Steigung sowie ein geringerer Endwert der Ausscheidung.

Sowohl Wistar- als auch TR⁻-Ratten erhielten Präinjektionen von 5 μmol S 3025 und anschließende Applikationen beider Oligonukleotide. Auf Grund der experimentellen Befunde war von einem Einfluss des mrp2-Substrates auf die Elimination beider Oligonukleotide bei beiden Rattenstämmen auszugehen. Die Signifikanz dieser Ergebnisse wurde mittels einer dreifaktoriellen Varianzanalyse untersucht, wobei die Hauptwirkungen „Oligonukleotid“, „Rattenstamm“ und „5 μmol S 3025“ herangezogen wurden. Tab. 4.29 zeigt die berechneten statistischen Irrtumswahrscheinlichkeiten p bzw. Signifikanzen der Prozessparameter sowie deren Wechselwirkungen.

Tab. 4.29: Ergebnisse der dreifaktoriellen Varianzanalyse zur Überprüfung des Einflusses einer Präinjektion von 5 μmol S 3025 auf die hepatobiliäre Elimination von Oligonukleotiden. Neben den Signifikanzen der Hauptwirkungen "5 μmol S 3025", "Oligonukleotid" und "Rattenstamm" mit den statistischen Irrtumswahrscheinlichkeiten p der Prozessparameter sowie die Wechselwirkungen dieser Hauptwirkungen angegeben.

Parameter	Hauptwirkungen		
	5 μmol S 3025	Oligonukleotid	Rattenstamm
log(E)	n.s. (p=0,2686)	p<0,0001	p=0,0012
log(k)	p=0,0028	n.s. (p=0,8447)	n.s. (p=0,0727)
log(tZeit)	n.s. (p=0,1337)	p<0,0001	p=0,0015
log(m)	n.s. (p=0,4412)	n.s. (p=0,2029)	p=0,0088
log(G ₁)	p=0,0335	p<0,0001	p<0,0001
log(G ₂)	p=0,0043	p<0,0001	p<0,0001
log(G ₃)	p=0,0028	n.s. (p=0,8447)	n.s. (p=0,0727)

Parameter	Wechselwirkung je zweier Hauptwirkungen			Wechselwirkung alle
	WW S 3025-Oligo	WW S 3025-RStamm	WW Oligo-RStamm	
log(E)	n.s. (p=0,0634)	n.s. (p=0,1422)	n.s. (p=0,3152)	n.s. (p=0,5723)
log(k)	p=0,0200	n.s. (p=0,0643)	p<0,0001	n.s. (p=0,5886)
log(tZeit)	n.s. (p=0,9940)	n.s. (p=0,5686)	p=0,0133	n.s. (p=0,2021)
log(m)	n.s. (p=0,8815)	n.s. (p=0,8949)	p=0,0444	n.s. (p=0,6285)
log(G ₁)	n.s. (p=0,8472)	n.s. (p=0,8653)	p=0,0007	n.s. (p=0,7770)
log(G ₂)	n.s. (p=0,7762)	n.s. (p=0,9539)	p<0,0001	n.s. (p=0,6587)
log(G ₃)	p=0,0200	n.s. (p=0,0643)	p<0,0001	n.s. (p=0,5886)

Die Auswertung der dreifaktoriellen Varianzanalyse ergab, dass alle drei untersuchten Hauptwirkungen, jeweils allein betrachtet, die Elimination der Oligonukleotide in die Galle signifikant beeinflussten. Die Präinjektion von 5 μmol S 3025 hatte zwar keine Auswirkungen auf die Totzeit, die Steigung des linearen Kurventeils und den Endwert, verlangsamte jedoch den exponentiellen Teil der Ausscheidung. Der Einfluss der Art des Oligonukleotides war dergestalt, dass sich die Totzeit beim 2G-ODN gegenüber dem n-ODN verringerte, es wurde bei diesem Bis-Gallensäure-konjugierten Oligonukleotid ein höherer Endwert der Ausscheidung erreicht, und die Steigungen G₁ und G₂ nahmen höhere Werte an. Lediglich die Ausscheidungskonstante k des exponentiellen Kurventeils, die Steigung m des linearen Bereiches und die Halbwertszeit G₃ waren unabhängig von der Art des Oligonukleotids. Der Rattenstamm beeinflusste alle Prozessparameter mit Ausnahme der Geschwindigkeitskonstanten k des

exponentiellen Teils der Ausscheidungskurve und der Halbwertszeit G_3 in signifikanter Weise: Unabhängig von der Art des Oligonukleotids und einer Präinjektion von $5 \mu\text{mol}$ S 3025 wurden bei TR⁻-Ratten geringere Mengen an Oligonukleotid in die Galle sezerniert, wobei eine längere Totzeit bis zum erstmaligen Erscheinen des Oligonukleotids in der Galle zu verzeichnen war und die Konstanten für die initialen Steigungen (G_1 , G_2) sowie die Steigung des linearen Kurventeils (m) geringer ausfielen. Die Präinjektion von $5 \mu\text{mol}$ S 3025 und die Art des Oligonukleotids übten eine Wechselwirkung aufeinander aus im Hinblick auf die Geschwindigkeitskonstante k und die Halbwertszeit G_3 . S 3025 verringerte k und vergrößerte G_3 , wobei dieser Effekt beim 2G-ODN stärker zu Tage trat als beim n-ODN. Außerdem trat eine Wechselwirkung zwischen dem Rattenstamm und der Art des Oligonukleotids auf: Bei TR⁻-Ratten verzögerte sich die Ausscheidung eines bestimmten Oligonukleotids im Vergleich zu den Wistarratten, die Verzögerung fiel beim n-ODN geringer aus als beim 2G-ODN. Wechselwirkungen zwischen der Präinjektion von $5 \mu\text{mol}$ S 3025 und dem Rattenstamm traten ebenso wenig auf wie Wechselwirkungen aller drei Hauptwirkungen aufeinander.

Die im Messzeitraum sezernierten Galle*mengen* zeigten eine starke Abhängigkeit vom Rattenstamm (s. Tab. 9.13, S. 215); TR⁻-Ratten schieden signifikant weniger Galle aus, zudem fiel die initiale Steigung des Galleflusses bei ihnen geringer aus. Bei beiden Rattenstämmen hatte die Präinjektion von $5 \mu\text{mol}$ S 3025 keinen Einfluss auf den Gallefluss (s. Tab. 9.11, S. 213, und Tab. 9.13, S. 215). Bei Wistarratten vergrößerte sich nach Applikation von $15 \mu\text{mol}$ S 3025 die initiale Steigung des Galleflusses im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen, wenn anschließend n-ODN injiziert wurde, während sie sich nach Injektion des 2G-ODN verringerte (s. Tab. 9.12, S. 214). Auswirkungen von S 3025 auf den Endwert des Galleflusses waren nicht festzustellen.

S 3025 verzögert die hepatobiliäre Elimination von Oligonukleotiden sowohl bei Wistar- als auch bei TR⁻-Ratten (vgl. Tab. 4.29, S. 126). Das Ausmaß der Hemmung ist abhängig von der Dosis des applizierten S 3025 und tritt bei Bis-Gallensäure-konjugierten Oligonukleotiden stärker zu Tage als bei unmodifizierten (vgl. Tab. 4.27, S. 123, und Tab. 4.28, S. 125).

4.4.3.3 MK 571

Der Leukotrien-D₄-Rezeptor-Antagonist MK 571 ist ein Substrat des humanen Transporters MRP1 sowie des mrp2 der Ratte. Es wurden $5 \mu\text{mol}$ MK 571 in $500 \mu\text{l}$ PBS gelöst und Wistarratten 2 min vor Applikation des jeweiligen Oligonukleotides in eine Femoralvene injiziert. Die Substanz wurde nicht für TR⁻-Ratten verwendet, die

hepatobiliäre Elimination der Oligonukleotide durch diesen Rattenstamm wurde jedoch in den graphischen Auswertungen zum Vergleich mit aufgetragen.

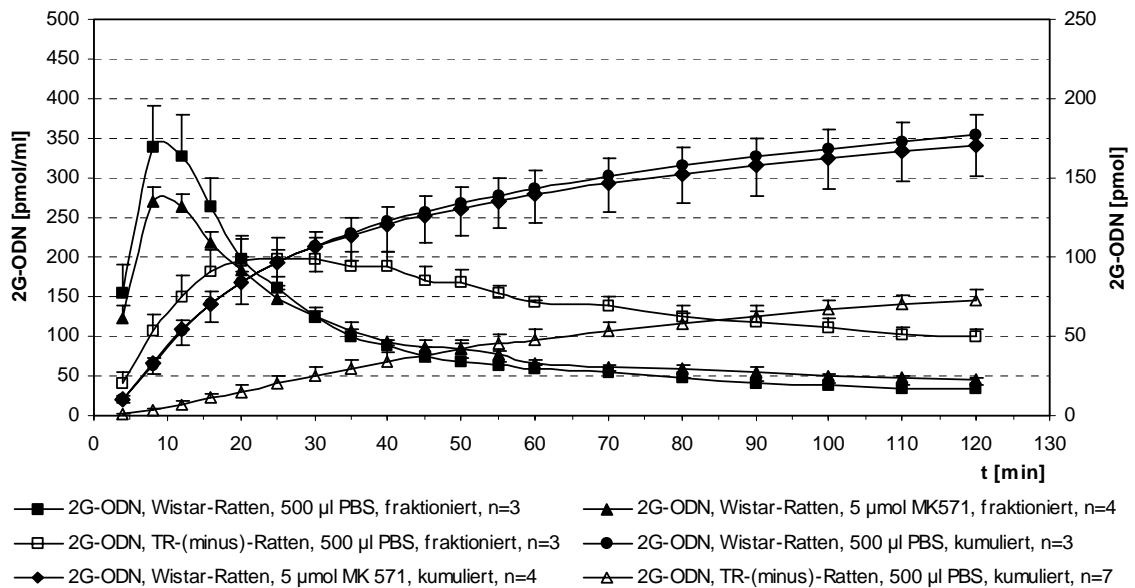


Abb. 4.37: Fraktionierte und kumulierte Galleausscheidung des 2G-ODN in Gegenwart von MK 571

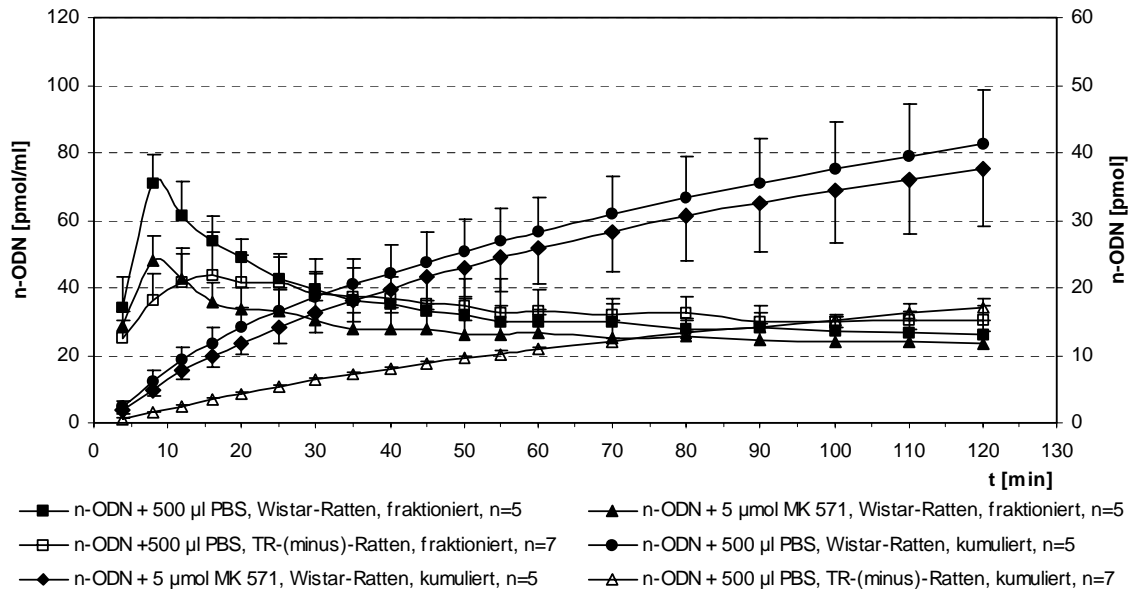


Abb. 4.38: Fraktionierte und kumulierte Galleausscheidung des n-ODN in Gegenwart von MK 571

Beim 2G-ODN ergab sich nach Präinjektion von MK 571 bei der fraktionierten Darstellung ebenso wie bei den Kontrollen ein Peak nach 8 min (Abb. 4.37). Bis etwa 25 min nach Versuchsbeginn wurden unter MK 571-Applikation geringere Oligonukleotid-Konzentrationen in der Galle gefunden als bei den nicht präinjizierten Kontrolltieren. Dies war auf das höhere Gallenvolumen zurückzuführen (Tab. 4.30).

Gesamtausscheidung und Verlauf der kumulativen Ausscheidungskurve waren jedoch bei MK 571-präinjizierten und unbehandelten Kontrolltieren nahezu identisch.

Wurden Wistarratten zunächst mit MK 571 und dann mit n-ODN behandelt, so wurde wie bei den unbehandelten Kontrollen bei der fraktionierten Auswertung der Galleausscheidung nach 8 min ein Peak gefunden (Abb. 4.38). Unter Einfluss von MK 571 waren die n-ODN-Konzentrationen in der Galle jedoch zu jedem Zeitpunkt geringer als bei den nicht vorbehandelten Wistarratten; die biliären n-ODN-Konzentrationen lagen teilweise sogar unter denen von TR⁻-Ratten. Verantwortlich hierfür war die in Gegenwart von MK 571 vergleichsweise hohe Gallenmenge (Tab. 4.30). Die (kumulative) Gesamtausscheidung des n-ODN war nach der Applikation von MK 571 etwas geringer als bei den nicht präinjizierten Kontrolltieren. Allerdings wurden sowohl für die Präinjektion von MK 571 als auch für die Kontrollen vergleichsweise hohe Standardabweichungen ermittelt.

Es wurden folgende Mengen an Galle und hepatobiliär ausgeschiedenem Oligonukleotid für die Präinjektion von 5 µmol MK 571 ermittelt:

Tab. 4.30: Wistarratten wurden 5 µmol MK 571 in 500 µl PBS appliziert, anschließend wurden 0,8 nmol n-ODN bzw. 2G-ODN injiziert. Es sind die Standardabweichungen des im Messzeitraum von 120 min insgesamt in die Galle ausgeschiedenen Oligonukleotids sowie die in diesem Intervall aufgefangene Gallenmenge angegeben.

Präinjektion / Oligonukleotid	ausgeschiedene Menge Oligonukleotid		ausgeschiedene Gallenmenge [g]
	[pmol]	[%]	
PBS / 2G-ODN	177,02 ± 12,46	22,13 ± 1,56	1,7813 ± 0,2319
5 µmol MK 571 / 2G-ODN	170,72 ± 19,58	21,34 ± 2,45	1,5210 ± 0,1671
PBS / n-ODN	41,41 ± 7,95	5,18 ± 0,99	1,1688 ± 0,3345
5 µmol MK 571 / n-ODN	37,69 ± 8,66	4,71 ± 1,08	1,2909 ± 0,2669

Im untersuchten Zeitraum von 120 min nahm die *Gallenmenge* bei allen Versuchsreihen von 30min-Intervall zu 30min-Intervall kontinuierlich ab (s. Abb. 9.12, S. 216). Die Präinjektion von MK 571 führte bei beiden Oligonukleotiden zu einem starken Anstieg des initialen Galleflusses, d.h. innerhalb der ersten 30 min, im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen. Danach nahmen die nach Präinjektion von MK 571 aufgefangenen Gallenmengen im Falle des 2G-ODN schneller, beim n-ODN jedoch langsamer ab als bei den zugehörigen Kontrollen. Die insgesamt ausgeschiedene Gallenmenge verringerte sich beim 2G-ODN, falls vorher MK 571 appliziert worden war, während sie sich beim n-ODN erhöhte (s. Tab. 9.14, S. 216).

In einer zweifaktoriellen Varianzanalyse wurde untersucht, ob die in den Experimenten ermittelten Unterschiede statistisch signifikant waren. Berücksichtigte Haupteffekte

waren dabei „5 μmol MK 571“ und „Oligonukleotid“. Dabei wurden folgende Signifikanzen bzw. Irrtumswahrscheinlichkeiten p der Prozessparameter errechnet (vgl. S. 90):

Tab. 4.31: Einflüsse der Art des Oligonukleotids (n-ODN oder 2G-ODN) und der Präinjektion von 5 μmol MK 571 auf die Ausscheidung von Oligonukleotiden in die Galle von Wistarratten. Es sind die Signifikanzen bzw. Irrtumswahrscheinlichkeiten p der beiden Hauptwirkungen "Oligonukleotid" und "5 μmol MK 571" der Prozessparameter und die Wechselwirkungen der beiden Haupteffekte angegeben.

Parameter	Haupteffekte		Wechselwirkung
	5 μmol MK 571	Oligonukleotid	
log(E)	n.s. ($p=0,1869$)	$p<0,0001$	n.s. ($p=0,2669$)
log(k)	n.s. ($p=0,1178$)	$p=0,0150$	n.s. ($p=0,0635$)
log(tZeit)	n.s. ($p=0,9498$)	$p=0,0002$	n.s. ($p=0,8447$)
log(m)	n.s. ($p=0,0593$)	$p<0,0001$	n.s. ($p=0,1504$)
log(G ₁)	n.s. ($p=0,2945$)	$p<0,0001$	n.s. ($p=0,1663$)
log(G ₂)	n.s. ($p=0,2023$)	$p<0,0001$	n.s. ($p=0,1256$)
log(G ₃)	n.s. ($p=0,1178$)	$p=0,0150$	n.s. ($p=0,0635$)

Es zeigte sich, dass die Art des Oligonukleotids alle untersuchten Prozessparameter signifikant beeinflusste: Das 2G-ODN wurde schneller und in größerer Menge hepatobiliär ausgeschieden als das n-ODN. Die Präinjektion von MK 571 hatte keinen Einfluss auf die Galleausscheidung der Oligonukleotide, und Wechselwirkungen zwischen MK 571 und dem jeweiligen Oligonukleotid waren ebenfalls nicht festzustellen.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Präinjektion von MK 571 die hepatobiliäre Elimination von Oligonukleotiden durch Wistarratten nicht signifikant beeinflusste (s. Tab. 4.31, S. 130). Lediglich der Gallefluss veränderte sich in Gegenwart von MK 571 (s. Tab. 9.14, S. 216); dies hatte jedoch keine Auswirkungen auf die Sekretion des Oligonukleotide.

4.4.3.4 CDNB

Die Substanz CDNB wird binnen 10 min in vivo quantitativ Glutathion-konjugiert; dieses Konjugat besitzt eine hohe Affinität zum mrp2. Wistarratten erhielten 5 min vor Applikation des Oligonukleotids 5 μmol CDNB, gelöst in 50 μl Ethanol, in eine Femoralvene. Die Versuche wurden nicht an TR⁻-Ratten durchgeführt, da CDNB bei ihnen zu toxisch wirkte; die Ergebnisse der hepatobiliären Elimination von Oligo-

nukleotiden durch diesen Rattenstamm wurde jedoch in den graphischen Auswertungen zum Vergleich mit aufgetragen.

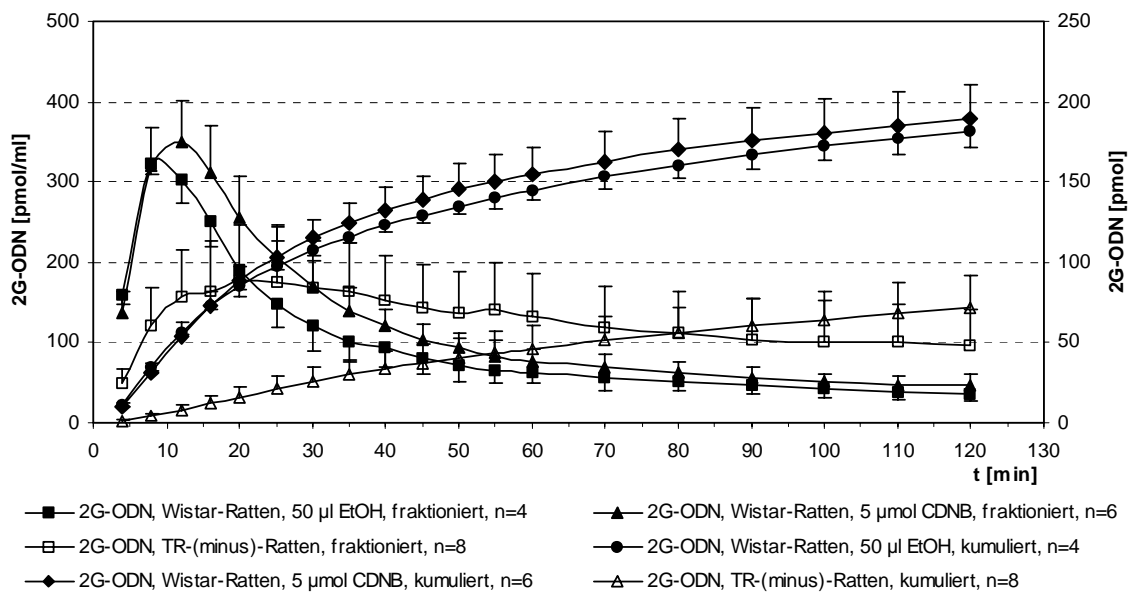


Abb. 4.39: Fraktionierte und kumulierte Galleausscheidung des 2G-ODN in Gegenwart von CDNB

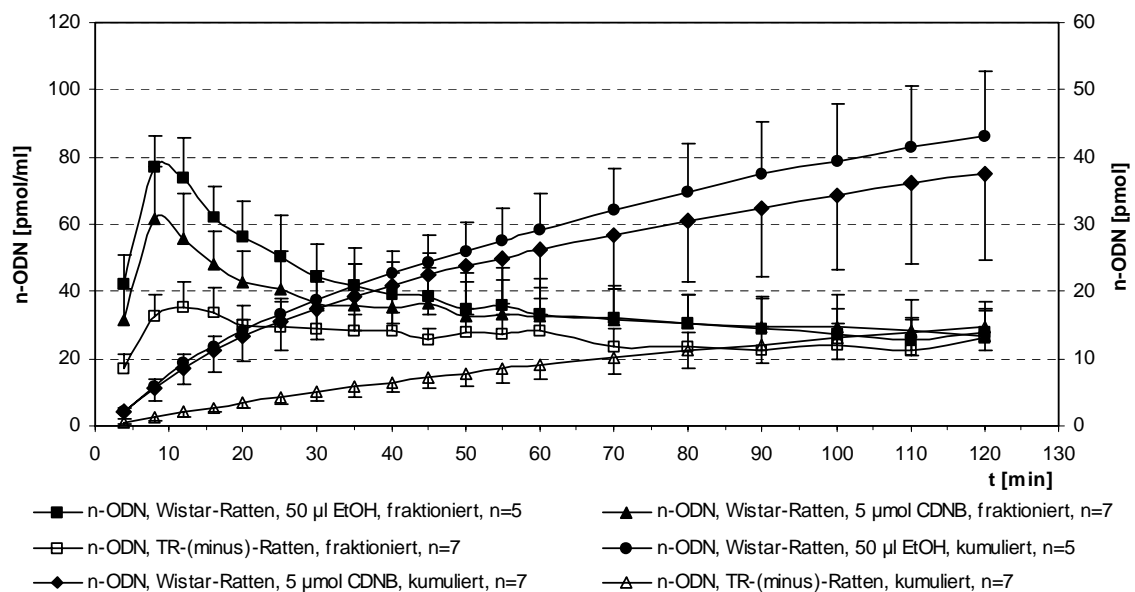


Abb. 4.40: Fraktionierte und kumulierte Galleausscheidung des n-ODN in Gegenwart von CDNB

Nach Präinjektion von CDNB verschob sich der Peak in der fraktionierten Auswertung der Galleausscheidung des 2G-ODN um 4 min im Vergleich zu den Kontrollen; er erschien nach 12 min (Abb. 4.39). Während der ersten Stunde der Messzeit führte die Applikation von CDNB zu einer zeitlichen Verschiebung der Konzentrationen des 2G-ODN in der Galle. Die ermittelte Kurve der Gesamtausscheidung führte unter Einfluss

von CDNB zu einer um 4% gegenüber den Kontrolltieren erhöhten Menge an sezerniertem Oligonukleotid; die CDNB-Kurve wies jedoch vergleichsweise hohe Standardabweichungen auf.

Beim n-ODN verschob sich der Peak der fraktionierten Ausscheidung im Vergleich zu den nicht vorbehandelten Kontrolltieren nicht (Abb. 4.40). Die unter Einfluss von CDNB ermittelten Oligonukleotid-Konzentrationen waren in der ersten Hälfte der Messzeit etwas geringer als bei den Kontrollen. Insgesamt wurde nach Präinjektion von CDNB etwa 15% weniger n-ODN in die Galle sezerniert als bei den Kontrollen. Die Graphen der kumulativen Darstellung waren aber sowohl bei den CDNB-behandelten als auch bei den Kontrolltieren mit hohen Standardabweichungen behaftet.

Die Ergebnisse der Versuche zur Wirkung von CDNB auf Gallmenge und Oligonukleotidausscheidung sind nachfolgend zusammengestellt (Tab. 4.32).

Tab. 4.32: Wistarratten wurden 5 µmol CDNB, gelöst in 50 µl Ethanol, präinjiziert; danach wurden 0,8 nmol 2G-ODN oder n-ODN appliziert. Die Mittelwerte des im Messzeitraum in die Galle sezernierten Oligonukleotids sowie die in dieser Zeit aufgefangene Gallmenge sind mit den zugehörigen Standardabweichungen aufgeführt.

Präinjektion / Oligonukleotid	ausgeschiedene Menge Oligonukleotid		ausgeschiedene Gallmenge [g]
	[pmol]	[%]	
Ethanol / 2G-ODN	181,34 ± 10,00	22,67 ± 1,25	1,8486 ± 0,4403
5 µmol CDNB / 2G-ODN	189,31 ± 22,00	23,66 ± 2,75	1,5117 ± 0,3876
Ethanol / n-ODN	43,25 ± 9,54	5,41 ± 1,19	1,1617 ± 0,4116
5 µmol CDNB / n-ODN	37,59 ± 12,85	4,70 ± 1,61	1,0846 ± 0,4854

Im Messzeitraum von 120 min nahm die Gallmenge bei allen Versuchsreihen von 30min-Intervall zu 30min-Intervall kontinuierlich ab (s. Abb. 9.13, S. 217). Bei denjenigen Tieren, die CDNB erhalten hatten, nahm die sezernierte Gallmenge unabhängig von der Art des anschließend injizierten Oligonukleotids nach Ablauf der ersten 30 min stärker ab als bei den Kontrolltieren. Die CDNB-Applikation führte zu einer Verringerung des insgesamt ausgeschiedenen Gallmenge, wobei dieser Effekt auf Grund der hohen ermittelten Standardabweichungen statistisch nicht signifikant war (s. Tab. 9.15, S. 217). Ebenso schieden die Wistarratten, die n-ODN erhalten hatten, etwas weniger Galle aus als die Tiere, denen 2G-ODN verabreicht worden war. Auch dieser Unterschied erwies sich als nicht signifikant. Dagegen führte die Applikation des 2G-ODN zu einer signifikanten Steigerung des initialen Galleflusses im Vergleich zum n-ODN.

Die empirisch gefundenen Unterschiede bei der Galleausscheidung der Oligonukleotide wurden mit Hilfe einer zweifaktoriellen Varianzanalyse hinsichtlich ihrer Signifikanz

untersucht. Dabei ergaben sich für die beiden Hauptwirkungen „Oligonukleotid“ und „5 μmol CDNB“ die nachfolgend aufgeführten Signifikanzen bzw. statistischen Irrtumswahrscheinlichkeiten p der Prozessparameter (vgl. S. 90).

Tab. 4.33: Einflüsse der Art des Oligonukleotids (n-ODN oder 2G-ODN) und der Präinjektion von 5 μmol CDNB auf die Ausscheidung von Oligonukleotiden in die Galle von Wistarratten. Es sind die Signifikanzen bzw. Irrtumswahrscheinlichkeiten p der beiden Hauptwirkungen "Oligonukleotid" und "5 μmol CDNB" der Prozessparameter und die Wechselwirkungen der beiden Haupteffekte angegeben.

Parameter	Haupteffekte		Wechselwirkung
	5 μmol CDNB	Oligonukleotid	
$\log(E)$	n.s. ($p=0,6577$)	$p<0,0001$	n.s. ($p=0,1870$)
$\log(k)$	n.s. ($p=0,9179$)	n.s. ($p=0,0900$)	n.s. ($p=0,2621$)
$\log(t_{\text{Zeit}})$	n.s. ($p=0,1613$)	$p=0,0241$	n.s. ($p=0,6722$)
$\log(m)$	n.s. ($p=0,0768$)	$p<0,0001$	n.s. ($p=0,8533$)
$\log(G_1)$	n.s. ($p=0,5410$)	$p<0,0001$	n.s. ($p=0,9237$)
$\log(G_2)$	n.s. ($p=0,9748$)	$p<0,0001$	n.s. ($p=0,8987$)
$\log(G_3)$	n.s. ($p=0,9179$)	n.s. ($p=0,0900$)	n.s. ($p=0,2621$)

Die Art des Oligonukleotids beeinflusste alle Prozessparameter mit Ausnahme der Geschwindigkeitskonstanten k des exponentiellen Kurventeils und der Halbwertszeit G_3 in signifikanter Weise: Die Ausscheidung des 2G-ODN erfolgte schneller, die Kurve verlief steiler und führte zu einem höheren Endwert als diejenige des n-ODN. Dagegen wirkte sich die Applikation von CDNB nicht auf die Sekretion der Oligonukleotide aus; signifikante Wechselwirkungen zwischen CDNB und der Art des Oligonukleotids existierten nicht.

Die oben beschriebenen Versuche ergaben keinen signifikanten Einfluss von CDNB auf die hepatobiliäre Elimination von Oligonukleotiden (vgl. Tab. 4.33, S. 133). Dagegen wurde die Exkretionskonstante b des Galleflusses durch CDNB signifikant verändert; die insgesamt ausgeschiedene Gallenmenge ging jedoch nur geringfügig und nicht signifikant zurück (s. Tab. 9.15, S. 217). Nach Applikation des 2G-ODN war die initiale Steigung des Galleflusses höher als beim n-ODN.

4.4.3.5 Sirolimus

Das Immunsuppressivum und Pgp-Substrat Sirolimus (Rapamune[®]) lag in einer Konzentration von 1 mg Wirkstoff / ml Fettgemisch vor. Jedem untersuchten Tier wurden 250 μl dieser Lösung i.p. appliziert; 30 min später wurde das Oligonukleotid

injiziert. Sirolimus fand ausschließlich an Wistarratten Verwendung; die Ergebnisse der hepatobiliären Elimination von Oligonukleotiden durch TR-Ratten wurde jedoch in den graphischen Auswertungen zum Vergleich mit aufgetragen.

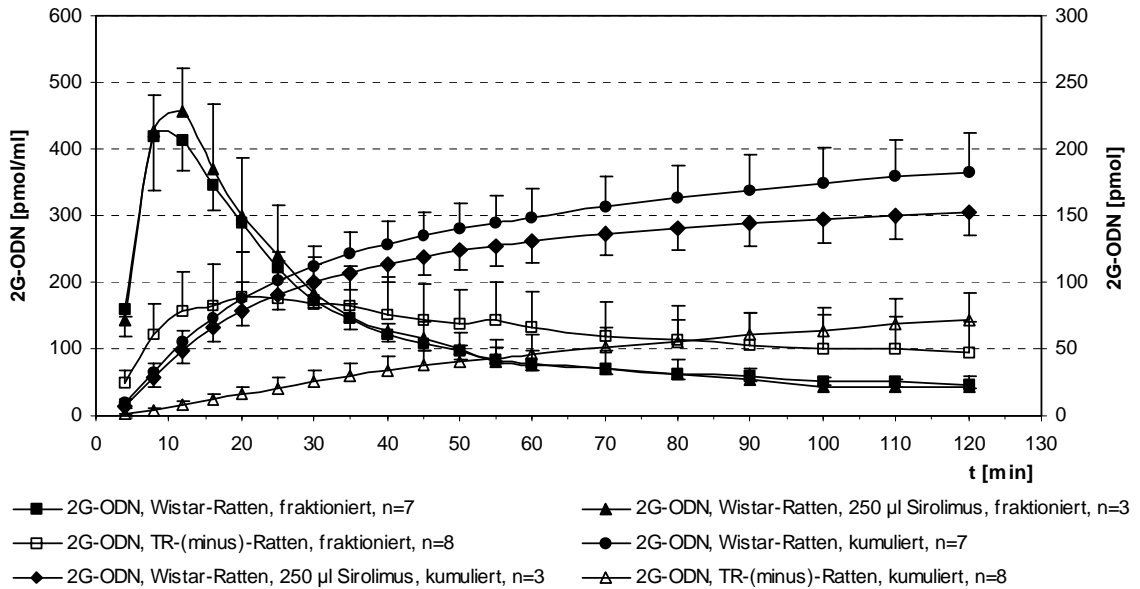


Abb. 4.41: Fraktionierte und kumulierte Galleausscheidung des 2G-ODN in Gegenwart von Sirolimus

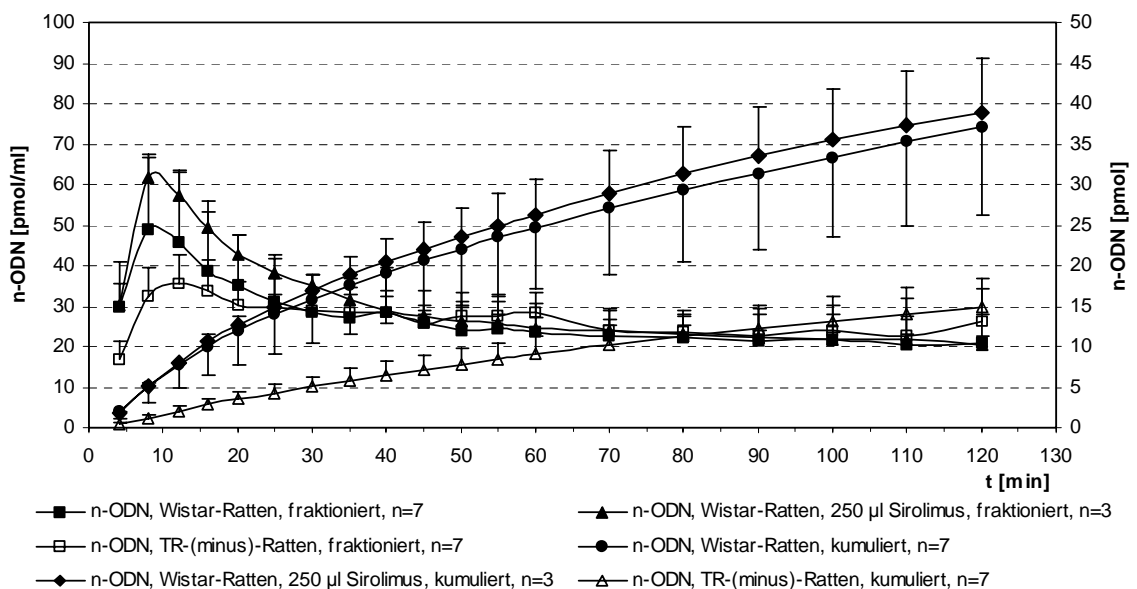


Abb. 4.42: Fraktionierte und kumulierte Galleausscheidung des n-ODN in Gegenwart von Sirolimus

Wurde Sirolimus vor dem 2G-ODN injiziert, so wurde der Peak der fraktionierten Ausscheidung nach 12 min gefunden (Abb. 4.41); bei den Kontrolltieren erschien der Peak schon nach 8 min. Ansonsten waren die beiden Graphen der fraktionierten Darstellung fast deckungsgleich. Gegenüber den Kontrolltieren ergab sich für den

Sirolimus-Einfluss in der kumulativen Darstellung eine um etwa 15% reduzierte Sekretion des 2G-ODN in die Galle (Tab. 4.34). Die initiale Steigung des für die Sirolimus-Applikation erhaltenen kumulativen Graphen schien kleiner zu sein als diejenige der Kontrolle; diese Unterschiede erwiesen sich jedoch als nicht signifikant (Tab. 4.35).

Beim n-ODN wurde der initiale Ausscheidungspeak ebenso wie bei den Kontrollen nach 8 min gefunden (Abb. 4.42). In den ersten 30 min der Messung waren die Konzentrationen des n-ODN in der Galle gegenüber den Kontrollen leicht erhöht. In der kumulativen Darstellung ergab sich unter Einfluss von Sirolimus eine Kurve, die mit der Kontrollkurve nahezu deckungsgleich waren. Nach Applikation von Sirolimus wurden insgesamt ca. 5% mehr n-ODN in die Galle ausgeschieden (Tab. 4.34). Allerdings waren alle Graphen mit hohen Standardabweichungen behaftet; ein signifikanter Einfluss von Sirolimus auf die hepatobiliäre Elimination des n-ODN konnte nicht festgestellt werden (Tab. 4.35).

Bei allen Versuchsreihen nahm die *Gallemenge* im 120-minütigen Versuchszeitraum von 30min-Intervall zu 30min-Intervall kontinuierlich ab (s. Abb. 9.14, S. 218). Nach Applikation von Sirolimus nahm die insgesamt sezernierte Menge bei beiden Oligoscheinbar ab. Da aber alle Versuchsreihen hohe Standardabweichungen aufwiesen, konnte keine signifikante Wirkung von Sirolimus auf den Gallefluss festgestellt werden (s. Tab. 9.16, S. 218).

Nach Präinjektion von Sirolimus wurden die in Tab. 4.34 aufgeführten Mengen an Galle und hepatobiliär sezerniertem Oligonukleotid ermittelt:

Tab. 4.34: Wistarratten wurden 250 µl Sirolimus, gelöst in 250 µl Fettsäuregemisch, präinjiziert; danach wurden 0,8 nmol 2G-ODN oder n-ODN appliziert. Die Mittelwerte des im Messzeitraum in die Galle sezernierten Oligonukleotids sowie die in dieser Zeit aufgefangene Gallemenge sind mit den zugehörigen Standardabweichungen aufgeführt.

Präinjektion / Oligonukleotid	ausgeschiedene Menge Oligonukleotid		ausgeschiedene Gallemenge [g]
	[pmol]	[%]	
- / 2G-ODN	183,09 ± 29,02	22,89 ± 3,63	1,3315 ± 0,2672
Sirolimus / 2G-ODN	152,82 ± 18,12	19,10 ± 2,27	1,1076 ± 0,4321
- / n-ODN	37,03 ± 10,71	4,63 ± 1,34	1,4272 ± 0,5408
Sirolimus / n-ODN	38,93 ± 6,66	4,87 ± 0,83	1,2282 ± 0,2407

Die empirisch gefundenen Unterschiede bei der Galleausscheidung der Oligonukleotide wurden mit Hilfe einer zweifaktoriellen Varianzanalyse hinsichtlich ihrer Signifikanz untersucht. Dabei ergaben sich für die beiden Hauptwirkungen „Oligonukleotid“ und

„Sirolimus“ die nachfolgend aufgeführten Signifikanzen bzw. statistischen Irrtumswahrscheinlichkeiten p der Prozessparameter (vgl. S. 90):

Tab. 4.35: Einflüsse der Art des Oligonukleotids (n-ODN oder 2G-ODN) und der Präinjektion von 250 μ l Sirolimus auf die Ausscheidung von Oligonukleotiden in die Galle von Wistarratten. Es sind die Signifikanzen bzw. Irrtumswahrscheinlichkeiten p der beiden Hauptwirkungen "Oligonukleotid" und "Sirolimus" der Prozessparameter und die Wechselwirkungen der beiden Haupteffekte angegeben.

Parameter	Haupteffekte		Wechselwirkung
	250 μ l Sirolimus	Oligonukleotid	
log(E)	n.s. ($p=0,9454$)	$p=0,0008$	n.s. ($p=0,6812$)
log(k)	n.s. ($p=0,8083$)	n.s. ($p=0,1262$)	n.s. ($p=0,7286$)
log(tZeit)	n.s. ($p=0,4107$)	$p=0,0005$	n.s. ($p=0,5994$)
log(m)	$p=0,0071$	$p<0,0001$	n.s. ($p=0,1685$)
log(G ₁)	n.s. ($p=0,7702$)	$p<0,0001$	n.s. ($p=0,4397$)
log(G ₂)	n.s. ($p=0,8432$)	$p<0,0001$	n.s. ($p=0,4646$)
log(G ₃)	n.s. ($p=0,8083$)	n.s. ($p=0,1262$)	n.s. ($p=0,7286$)

Die Auswertung der statistischen Berechnungen ergab, dass die Art des Oligonukleotids alle Prozessparameter mit Ausnahme der Geschwindigkeitskonstanten k des exponentiellen Kurventeils und der Halbwertszeit G_3 signifikant beeinflusste. Das 2G-ODN wurde schneller ausgeschieden als das n-ODN, wobei die Kurve steiler anstieg und zu einem höheren Endwert der hepatobiliären Elimination führte. Sirolimus hatte lediglich auf die Steigung m des linearen Teils der Ausscheidungskurve einen signifikanten Einfluss; in Gegenwart von Sirolimus war diese geringer als bei den entsprechenden Kontrollen. Wechselwirkungen der untersuchten Haupteffekte traten nicht auf.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass Sirolimus die Steigung des linearen Teils der kumulativen Ausscheidungskurve beider Oligonukleotide veränderte, ansonsten jedoch keinen Einfluss auf die hepatobiliäre Exkretion hatte (Tab. 4.35). Der Gallefluss wurde nach Applikation von Sirolimus nicht signifikant verändert (s. Tab. 9.16, S. 218).

4.5 Verteilung der Oligonukleotide auf die Organe

Bei den in situ-Galleausscheidungsversuchen zur Untersuchung des Transportverhaltens von Oligonukleotiden wurde die sezernierte Galle nach Injektion dieser Substanzen über einen Zeitraum von 120 min aufgefangen. Im Anschluss daran wurden Proben zahlreicher Organe entnommen, aufgearbeitet und die in ihnen enthaltene Radioaktivität

bestimmt (vgl. Kap. 3.5.3, S. 68). Aus den erhaltenen Messwerten wurden die Gesamtmenge des jeweiligen Oligonukleotids in pmol berechnet.

Bei allen Versuchsreihen wiesen die Mittelwerte der für die Organproben errechneten Parameter deutlich höhere Standardabweichungen auf als die zugehörigen Galleproben. Dies traf in besonderem Maße für die aus Harnblaseninhalt und Darm gewonnenen Proben zu: Die für die Versuchsreihen eingesetzten Ratten erhielten Futter und Wasser ad libitum; es ließ sich nicht feststellen, wie lange vor Versuchsbeginn die Tiere welche Mengen an Kot und Urin ausgeschieden bzw. wieviel Nahrung sie aufgenommen hatten. Darm- und Urinproben wurden daher in den nachfolgenden Darstellungen der Ergebnisse nicht aufgeführt.

4.5.1 Einfluss des Applikationsortes

Wistarratten wurden 0,8 nmol 2G-ODN bzw. n-ODN in eine Jejunal- bzw. Femoralvene injiziert. Zwei Stunden nach dieser Injektion wurden Organproben entnommen und das in ihnen enthaltene Oligonukleotid nach entsprechender Aufarbeitung mittels Flüssigkeitsszintillationszählung bestimmt. Zwei Stunden nach Injektion der Oligonukleotide wurden die mit Abstand höchsten Gesamtmengen dieser Substanzen im Blut ermittelt (Abb. 4.43). Auch Leber, Niere und Lunge enthielten relativ große Mengen an Oligonukleotid; in allen anderen Organen war nur wenig Oligonukleotid zu finden. Es spielte jedoch keine Rolle, ob die Oligonukleotide in eine Femoral- oder Jejunalvene injiziert worden waren.

Mittels einer zweifaktoriellen Varianzanalyse wurde untersucht, ob die beiden Hauptwirkungen „Oligonukleotid“ und „Applikationsort“ die Gesamtmenge des im jeweiligen Organ gefundenen Oligonukleotids signifikant beeinflussten. Dabei wurden die Tab. 4.36 in aufgeführten statistischen Irrtumswahrscheinlichkeiten p bzw. Signifikanzgrade der Prozessparameter, d.h. Gesamtmengen an Oligonukleotid in den jeweiligen Organen, gefunden.

Es zeigte sich, dass die für die Injektion des Oligonukleotids gewählte Vene keinerlei signifikanten Einfluss auf die Gesamtmenge des jeweiligen Oligonukleotids in den Organen hatte. Dagegen wurden nach Applikation des 2G-ODN in Nebenniere, Milz, Herz, Lunge und Gehirn signifikant höhere Oligonukleotidmengen gefunden als nach Injektion des n-ODN. Im Falle der Niere war die Wirkung des 2G-ODN knapp nicht signifikant. Bei allen anderen Organen hing die zwei Stunden nach Applikation gefundene Menge an Oligonukleotid nicht davon ab, ob 2G-ODN oder n-ODN gespritzt worden waren. Wechselwirkungen zwischen der Art des Oligonukleotids und dem Applikationsort traten nicht auf.

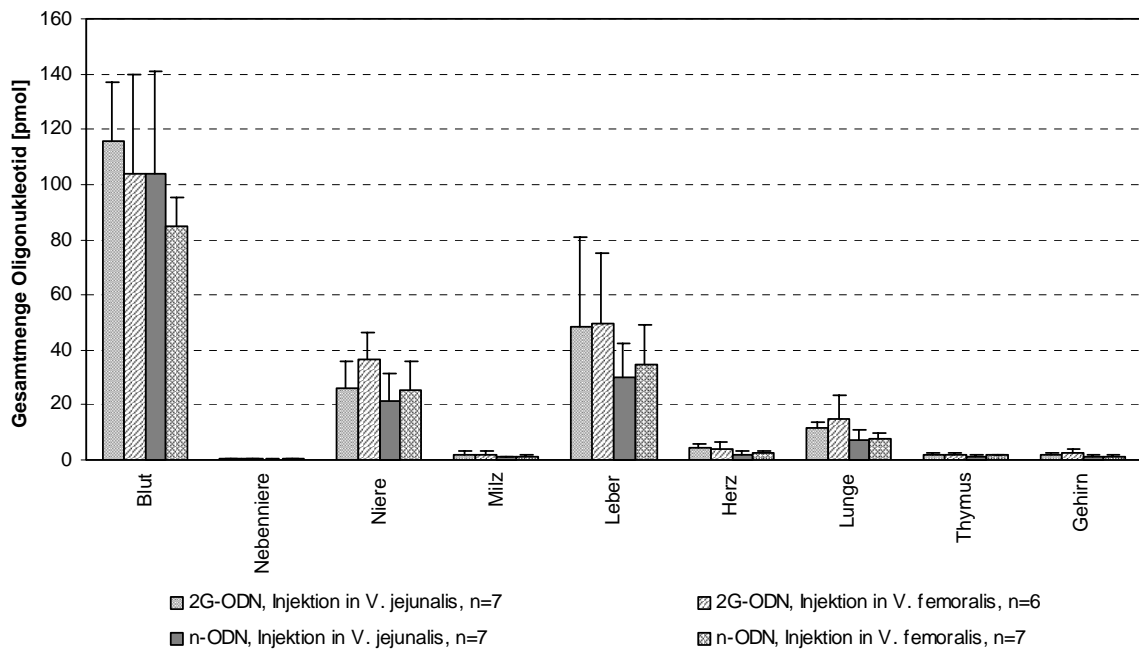


Abb. 4.43: Gesamtmengen an Oligonukleotid, die zwei Stunden nach Applikation von 0,8 nmol 2G-ODN bzw. n-ODN in eine Femoral- oder Jejunalvene von Wistarratten in den untersuchten Organen vorlagen. Angegeben sind die Mittelwerte mit den zugehörigen Standardabweichungen.

Tab. 4.36: Ergebnisse der zweifaktoriellen Varianzanalyse zur Überprüfung des Einflusses des Applikationsortes auf die Gesamtmenge an Oligonukleotid in den untersuchten Organen

Parameter	Hauptwirkungen		Wechselwirkung
	Vene (jejunalis/femorals)	Oligonukleotid	
Blut	n.s. (p=0,2539)	n.s. (p=0,1267)	n.s. (p=0,6122)
Nebenniere	n.s. (p=0,8093)	p=0,0070	n.s. (p=0,4799)
Niere	n.s. (p=0,0760)	knapp n.s., p=0,0528	n.s. (p=0,4539)
Milz	n.s. (p=0,6756)	p=0,0242	n.s. (p=0,5183)
Leber	n.s. (p=0,7435)	n.s. (p=0,0849)	n.s. (p=0,8552)
Herz	n.s. (p=0,8235)	p=0,0113	n.s. (p=0,4167)
Lunge	n.s. (p=0,3351)	p=0,0255	n.s. (p=0,5318)
Thymus	n.s. (p=0,4785)	p=0,1781	n.s. (p=0,1864)
Gehirn	n.s. (p=0,8456)	p=0,0213	n.s. (p=0,7440)

4.5.2 Einfluss des Lösungsmittels

Auf Grund bisher vorliegender Befunde war anzunehmen, dass der canalikuläre Transporter mrp2 eine entscheidende Rolle bei der hepatobiliären Elimination von

Oligonukleotiden spielt (Starke 1999). Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit vor Injektion der Oligonukleotide verschiedene mrp2-Substrate appliziert (vgl. 3.5.1.2, S. 64 ff.), um festzustellen, ob diese Substanzen die hepatobiliäre Elimination der Oligonukleotide hemmen bzw. ihre Verteilung auf die verschiedenen Organe beeinflussen. Die verwendeten mrp2-Substrate wurden in verschiedenen Lösungsmitteln gelöst, deren Wirkung auf die Galleausscheidung und Organverteilung der Oligonukleotide zuvor untersucht werden musste. Es handelte sich dabei um die Lösungsmittel Ethanol, PBS und DMSO/Glycerin/PBS 15:15:70 (Vol/Vol/Vol). Ethanol wurde lediglich Wistarratten präinjiziert; die beiden anderen Lösungsmittel wurden beiden Rattenstämmen verabreicht.

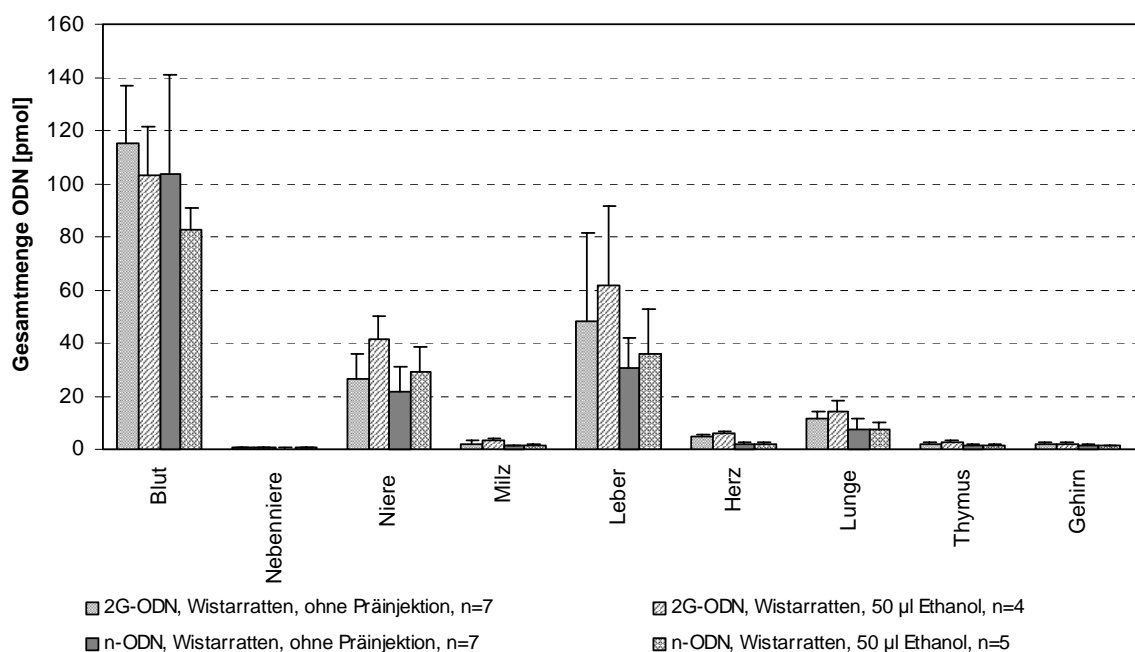


Abb. 4.44: Gesamt mengen an 2G-ODN bzw. n-ODN, die zwei Stunden nach Präinjektion von 50 µl Ethanol und anschließender Applikation von 0,8 nmol des jeweiligen Oligonukleotids in den Organen von Wistarratten gefunden wurden. Angegeben sind die Mittelwerte mit den zugehörigen Standardabweichungen.

Zwei Stunden nach Applikation des *Ethanol*s wurden die höchsten Gesamt mengen an Oligonukleotid in Blut, Leber und Niere gefunden (Abb. 4.44). In allen Organen wurden nach Injektion des 2G-ODN höhere Oligonukleotidmengen gefunden, als dies beim n-ODN der Fall war. Wurde vor der Gabe des Oligonukleotids Ethanol gespritzt, so resultierten bei allen Organen mit Ausnahme des Blutes höhere Gesamt mengen an Oligonukleotid. Allerdings wurden für alle Mittelwerte hohe Standardabweichungen ermittelt.

Die Signifikanz der experimentell ermittelten Unterschiede wurde mit Hilfe einer zweifaktoriellen Varianzanalyse berechnet. In Tab. 4.37 sind die Signifikanzen bzw. statistischen Irrtumswahrscheinlichkeiten p der Prozessparameter für die Hauptwirkungen „Ethanol“ und „Oligonukleotid“ aufgeführt.

Lediglich die Gesamtmenge an Oligonukleotid in der Niere wurde durch die Gabe von Ethanol signifikant beeinflusst; in Anwesenheit des Lösungsmittels wurden höhere Oligonukleotidmengen gefunden. Welches Oligonukleotid appliziert worden war, wirkte sich dagegen signifikant auf Nebenniere, Milz, Herz, Lunge, Thymus und Gehirn aus: Nach Injektion von 2G-ODN wurden in diesen Organen signifikant höhere Oligonukleotidmengen gefunden, als dies beim n-ODN der Fall war. Wechselwirkungen zwischen der Präinjektion von Ethanol und der Art des applizierten Oligonukleotids wurden nicht beobachtet.

Tab. 4.37: Ergebnisse der zweifaktoriellen Varianzanalyse zur Untersuchung des Einflusses von Ethanol auf die Gesamtmenge an Oligonukleotid in den untersuchten Organen

Parameter	Hauptwirkungen		Wechselwirkung
	Ethanol	Oligonukleotid	
Blut	n.s. ($p=0,0972$)	n.s. ($p=0,1578$)	n.s. ($p=0,6837$)
Nebenniere	n.s. ($p=0,2005$)	$p=0,0002$	n.s. ($p=0,8573$)
Niere	$p=0,0123$	n.s. ($p=0,0587$)	n.s. ($p=0,4178$)
Milz	n.s. ($p=0,1425$)	$p=0,0012$	n.s. ($p=0,4111$)
Leber	n.s. ($p=0,3765$)	n.s. ($p=0,0708$)	n.s. ($p=0,7282$)
Herz	n.s. ($p=0,1392$)	$p=0,0001$	n.s. ($p=0,1064$)
Lunge	n.s. ($p=0,3034$)	$p=0,0009$	n.s. ($p=0,3369$)
Thymus	n.s. ($p=0,0821$)	$p=0,0003$	n.s. ($p=0,1121$)
Gehirn	n.s. ($p=0,6165$)	$p=0,0003$	n.s. ($p=0,7062$)

Bei den Versuchen, die zur Wirkung einer *PBS-Präinjektion* auf Galleausscheidung und Verteilung der Oligonukleotide auf die Organe durchgeführt wurden, wurden die höchsten Gesamtmengen der Oligonukleotide sowohl nach PBS-Präinjektion als auch bei den Kontrollversuchen bei Blut, Leber und Niere erreicht (Abb. 4.45).

Bedingt durch die hohen Standardabweichungen der errechneten Mittelwerte ließen sich Aussagen über signifikante Einflüsse der drei Hauptwirkungen „PBS“, „Oligonukleotid“ und „Rattenstamm“ erst nach dreifaktorieller Varianzanalyse treffen. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Tab. 4.38 dargestellt.

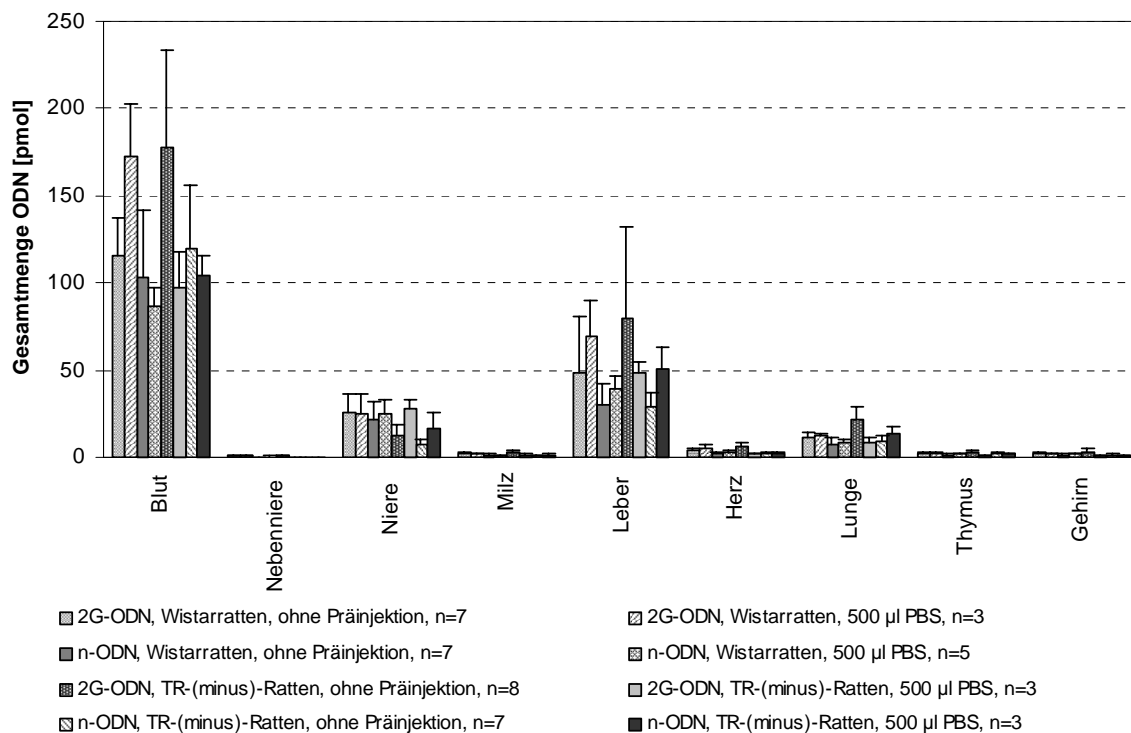


Abb. 4.45: Gesamtmenge an Oligonukleotid in den Organen, die zwei Stunden nach Applikation von 500 µl PBS und anschließender Injektion von 0,8 nmol 2G-ODN oder n-ODN in Wistarratten bzw. TR⁻-Ratten ermittelt wurden. Angegeben sind die die jeweiligen Mittelwerte mit den zugehörigen Standardabweichungen.

Nach Applikation von *PBS* wurden unabhängig von Rattenstamm und Art des Oligonukleotids signifikant größere Oligonukleotidmengen in der Niere gefunden. Dagegen wurden nach Applikation des 2G-ODN höhere Mengen an Oligonukleotid in Blut, Herz und Nebenniere gefunden als im Falle des n-ODN, wobei der Befund an der Nebenniere knapp nicht signifikant war. TR⁻-Ratten wiesen nach PBS-Präinjektion erhöhte Gesamt mengen des jeweiligen Oligonukleotids in der Lunge auf; dieses Resultat war knapp nicht signifikant. Die Haupteffekte „PBS“ und „Oligonukleotid“ wechselwirkten in Bezug auf die Gesamtmenge an Oligonukleotid in Gehirn und Nebenniere: In der Kombination PBS-Präinjektion / Applikation von n-ODN stiegen die Gesamt mengen an Oligonukleotid im Vergleich zu den Kontrollen stärker als bei einer PBS-Präinjektion, der eine Applikation des 2G-ODN folgte. Bei der Nebenniere war dieser Effekt knapp nicht signifikant. Wechselwirkungen zwischen PBS-Präinjektion und Rattenstamm waren bei den in Blut, Niere, Herz und Lunge gefundenen Gesamt mengen der Oligonukleotide festzustellen. Unter Berücksichtigung der Standardabweichungen hatte eine PBS-Präinjektion bei Wistarratten keinen Einfluss auf die insgesamt im Blut vorliegende Menge an Oligonukleotid, während das Lösungsmittel bei TR⁻-Ratten diese Gesamtmenge verringerte.

Tab. 4.38: Einflüsse der Art des Oligonukleotids, der Präinjektion von 500 µl PBS und des Rattenstamms auf die Gesamtmenge an Oligonukleotid in den Organen. Es sind die Signifikanzen der Hauptwirkungen „PBS“, "Oligonukleotid" und "Rattenstamm" mit den Irrtumswahrscheinlichkeiten p der Prozessparameter und die Analyse der Wechselwirkungen der beiden Haupteffekte dargestellt.

Parameter	Hauptwirkungen		
	PBS	Oligonukleotid	Rattenstamm
Blut	n.s. (p=0,1187)	p=0,0101	n.s. (p=0,7317)
Nebenniere	n.s. (p=0,3604)	knapp n.s., p=0,0540	n.s. (p=0,8530)
Niere	p=0,0058	n.s. (p=0,5267)	n.s. (p=0,1096)
Milz	n.s. (p=0,4980)	n.s. (p=0,1674)	n.s. (p=0,9653)
Leber	n.s. (p=0,5966)	n.s. (p=0,1731)	n.s. (p=0,7438)
Herz	n.s. (p=0,1662)	p=0,0025	n.s. (p=0,7241)
Lunge	n.s. (p=0,0860)	n.s. (p=0,0650)	knapp n.s., p=0,0540
Thymus	n.s. (p=0,4344)	n.s. (p=0,1075)	n.s. (p=0,7770)
Gehirn	n.s. (p=0,0911)	n.s. (p=0,1565)	n.s. (p=0,6301)

Parameter	Wechselwirkung je zweier Hauptwirkungen			Wechselwirkung alle
	WW PBS-Oligo	WW PBS-RStamm	WW Oligo-RStamm	
Blut	n.s. (p=0,7300)	p=0,0095	n.s. (p=0,6397)	p=0,0401
Nebenniere	knapp n.s., p=0,0506	n.s. (p=0,0697)	n.s. (p=0,2467)	n.s. (p=0,0958)
Niere	n.s. (p=0,5346)	p=0,0298	n.s. (p=0,7273)	n.s. (p=0,7123)
Milz	n.s. (p=0,1079)	n.s. (p=0,7413)	n.s. (p=0,3408)	n.s. (p=0,3962)
Leber	n.s. (p=0,4631)	n.s. (p=0,6060)	n.s. (p=0,7770)	n.s. (p=0,2599)
Herz	n.s. (p=0,0657)	p=0,0227	n.s. (p=0,2031)	p=0,0231
Lunge	n.s. (p=0,1274)	p=0,0299	n.s. (p=0,6776)	n.s. (p=0,1083)
Thymus	n.s. (p=0,1523)	n.s. (p=0,0768)	n.s. (p=0,4210)	n.s. (p=0,0781)
Gehirn	p=0,0441	n.s. (p=0,2029)	n.s. (p=0,8787)	n.s. (p=0,3484)

Die Oligonukleotidmenge in den Nieren von Wistarratten wurde nicht durch die PBS-Präinjektion verändert, während PBS bei TR⁻-Ratten zu höheren Oligonukleotidmengen im genannten Organ führte. Im Herz nahm die Gesamtmenge an Oligonukleotid nach PBS-Präinjektion bei den TR⁻-Ratten ab, bei den Wistarratten jedoch zu, während im Falle der Lunge die umgekehrte Tendenz zu beobachten war. Dagegen beeinflussten sich Rattenstamm und Art des Oligonukleotids nicht. Alle drei Haupteffekte beeinflussten die Gesamtmenge des Oligos in Blut und Herz: Beim 2G-ODN wurden höhere Werte gefunden als beim n-ODN, wobei dieser Trend bei Wistarratten stärker

ausgeprägt war als bei TR⁻-Ratten, im Falle einer PBS-Präinjektion jedoch weniger ins Gewicht fiel als bei den jeweiligen Kontrollen.

Nach allen Experimenten, die zur Untersuchung des Einflusses von *DMSO/Glycerin/PBS* durchgeführt wurden, ergaben sich die höchsten Gesamtmengen an Oligonukleotid in Blut, Leber und Niere (Abb. 4.46).

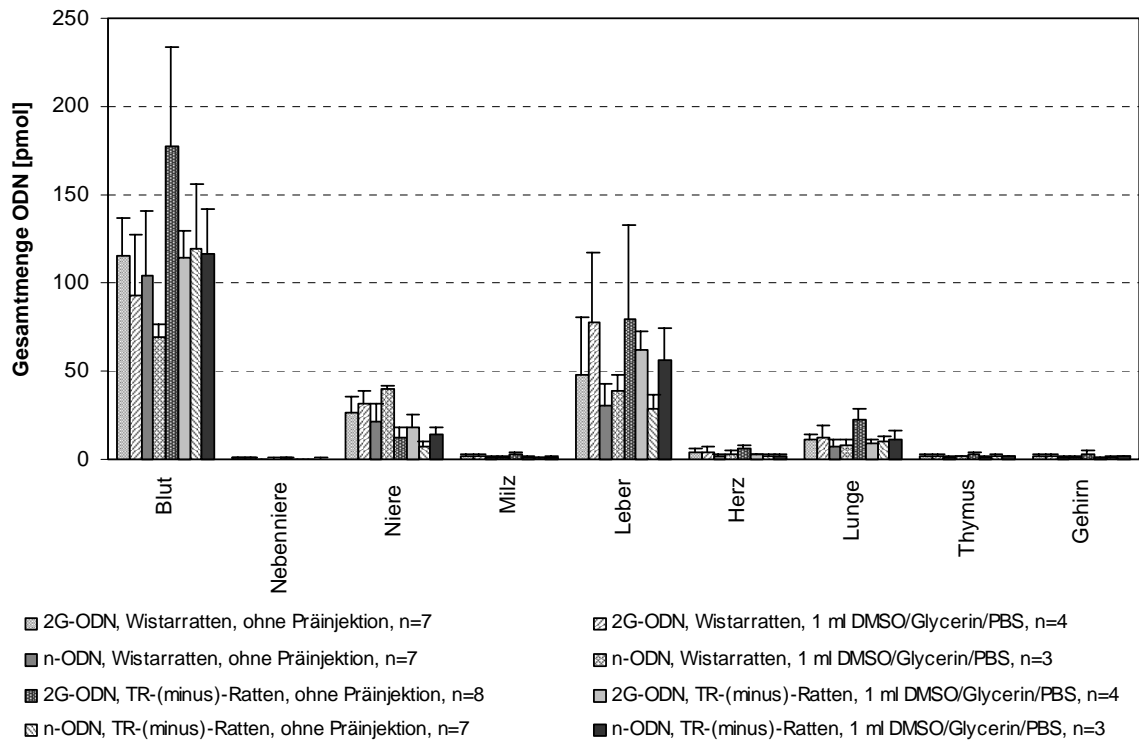


Abb. 4.46: Gesamtmenge an Oligonukleotid in den Organen, die zwei Stunden nach Applikation von 1 ml *DMSO/Glycerin/PBS* und anschließender Injektion von 0,8 nmol 2G-ODN oder n-ODN in Wistarratten bzw. TR--Ratten ermittelt wurden. Angegeben sind die jeweiligen Mittelwerte mit den zugehörigen Standardabweichungen.

Bei Betrachtung jedes einzelnen Organs ergaben sich in Abhängigkeit von den drei Haupteffekten „*DMSO/Glycerin/PBS*“, „Oligonukleotid“ und „Rattenstamm“ unterschiedliche Gesamtmengen an Oligonukleotid. Da die berechneten Mittelwerte mit hohen Standardabweichungen behaftet waren, konnten für die besagten Haupteffekte erst nach der dreifaktoriellen Varianzanalyse Aussagen über signifikante Unterschiede getroffen werden. Bei dieser Varianzanalyse wurden die in Tab. 4.39 aufgeführten Signifikanzen bzw. statistischen Irrtumswahrscheinlichkeiten p ermittelt:

Tab. 4.39: Einflüsse der Art des Oligonukleotids, der Präinjektion von 1 ml DMSO/Glycerin/PBS und des Rattenstamms auf die Gesamtmenge an Oligonukleotid in den Organen. Es sind die Signifikanzen der Hauptwirkungen „DMSO/Glycerin/PBS“ (Lsm), "Oligonukleotid" und "Rattenstamm" mit den Irrtumswahrscheinlichkeiten p der Prozessparameter und die Analyse der Wechselwirkungen der beiden Haupteffekte dargestellt.

Parameter	Hauptwirkungen		
	Lsm	Oligonukleotid	Rattenstamm
Blut	p=0,0123	p=0,0329	n.s. (p=0,0773)
Nebenniere	n.s. (p=0,8075)	n.s. (p=0,0691)	n.s. (p=0,8628)
Niere	p=0,0457	n.s. (p=0,9969)	p=0,0001
Milz	n.s. (p=0,8172)	n.s. (p=0,0980)	n.s. (p=0,4124)
Leber	n.s. (p=0,3272)	n.s. (p=0,2188)	n.s. (p=0,6910)
Herz	n.s. (p=0,4545)	p=0,0140	n.s. (p=0,7451)
Lunge	n.s. (p=0,1499)	p=0,0465	n.s. (p=0,1765)
Thymus	n.s. (p=0,4323)	n.s. (p=0,1485)	n.s. (p=0,7258)
Gehirn	n.s. (p=0,1753)	n.s. (p=0,1201)	n.s. (p=0,7453)

Parameter	Wechselwirkung je zweier Hauptwirkungen			Wechselwirkung alle
	WW Lsm-Oligo	WW Lsm-RStamm	WW Oligo-RStamm	
Blut	n.s. (p=0,9934)	n.s. (p=0,2822)	n.s. (p=0,2016)	n.s. (p=0,7919)
Nebenniere	n.s. (p=0,1550)	n.s. (p=0,1256)	n.s. (p=0,8599)	n.s. (p=0,5340)
Niere	n.s. (p=0,2207)	n.s. (p=0,3368)	n.s. (p=0,7306)	n.s. (p=0,7157)
Milz	n.s. (p=0,3276)	n.s. (p=0,2551)	n.s. (p=0,7994)	n.s. (p=0,8729)
Leber	n.s. (p=0,5278)	n.s. (p=0,7268)	n.s. (p=0,7066)	n.s. (p=0,2620)
Herz	n.s. (p=0,0980)	knapp n.s. (p=0,0521)	n.s. (p=0,4414)	n.s. (p=0,8864)
Lunge	n.s. (p=0,3759)	p=0,0297	n.s. (p=0,6458)	n.s. (p=0,5521)
Thymus	n.s. (p=0,2376)	n.s. (p=0,1031)	n.s. (p=0,9776)	n.s. (p=0,3732)
Gehirn	n.s. (p=0,1233)	n.s. (p=0,0653)	n.s. (p=0,9978)	n.s. (p=0,3290)

Die Präinjektion von *DMSO/Glycerin/PBS* erhöhte unabhängig von der Art des Oligonukleotids und des Rattenstammes die Gesamtmenge an Oligonukleotid im Blut signifikant, während diese Menge unter den genannten Bedingungen in der Niere zunahm. Die Injektion von 2G-ODN führte gegenüber einer Applikation von n-ODN zu signifikant höheren Gesamtmengen an Oligonukleotid in Blut, Herz und Lunge. TR⁻-Ratten wiesen gegenüber Wistar-Ratten sowohl nach erfolgter Präinjektion von *DMSO/Glycerin/PBS* als auch ohne Präinjektion und jeweils identischem Oligonukleotid signifikant niedrigere Gesamtmengen an Oligonukleotid in der Niere

auf. Bei den in Herz und Lunge gefundenen Gesamtmengen an Oligonukleotid trat eine Wechselwirkung zwischen der Präinjektion von DMSO/Glycerin/PBS und dem Rattenstamm auf, wobei diese Wechselwirkung beim Herzen knapp nicht signifikant war. Bei beiden Rattenstämmen nahm die Gesamtmenge an Oligonukleotid in Herzen nach Präinjektion von DMSO/Glycerin/PBS ab, bei Wistarratten trat dieser Effekt jedoch stärker zu Tage als bei TR⁻-Ratten. Die Lungen der Wistarratten wiesen nach Präinjektion von DMSO/Glycerin/PBS signifikant höhere Gesamtmengen an Oligonukleotid auf als die entsprechenden Kontrollen. Bei TR⁻-Ratten nahm die Gesamtmenge an Oligonukleotid in der Lunge dagegen im Vergleich zu den Kontrollen ab, wenn 2G-ODN appliziert wurde; nach Injektion von n-ODN blieb sie jedoch annähernd gleich.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Präinjektion von Lösungsmitteln die Verteilung von Oligonukleotiden auf die Organe beeinflusst. Ähnliche Befunde ergaben sich auch für die Wirkung der betrachteten Lösungsmittel auf die hepatobiliäre Elimination der Oligonukleotide (vgl. 4.4.2, S. 99 ff.). Deshalb mussten bei den anschließend durchgeführten Versuchen zur Wirkung der mrp2-Substrate jeweils die entsprechenden mit dem Lösungsmittel durchgeführten Versuche die Bezugsgrößen sein.

4.5.3 Effekte verschiedener Substrate canaliculärer Transporter

4.5.3.1 Bromsulphthalein (BSP)

Wistarratten wurden 2 min vor Applikation eines der beiden Oligonukleotide (2G-ODN oder n-ODN) 5 bzw. 15 μmol BSP, gelöst in 500 μl PBS, in eine Femoralvene injiziert (vgl. S. 67). Weil die höhere BSP-Konzentration bei TR⁻-Ratten zu toxisch wirkte, wurden bei ihnen nur 5 μmol BSP injiziert. Zwei Stunden nach Injektion der Oligonukleotide wurden die Tiere getötet und Proben der Organe entnommen (vgl. 3.5.3, S. 68 ff.).

Bei allen zur Wirkung von 5 μmol BSP durchgeführten Versuchen wurden die höchsten Gesamtmengen an Oligonukleotid in Blut, Leber und Niere gefunden (Abb. 4.47). Die Präinjektion von 5 μmol BSP hatte bei Blut, Leber, Herz und Lunge unabhängig von Rattenstamm und Art des Oligonukleotids eine Abnahme der Gesamtmenge an Oligonukleotid zur Folge; in den anderen Organen bewirkte dieses mrp2-Substrat eine Zunahme. Bei TR⁻-Ratten nahm die Gesamtmenge an Oligonukleotid in der Niere nach Injektion von BSP ab, bei Wistarratten jedoch zu.

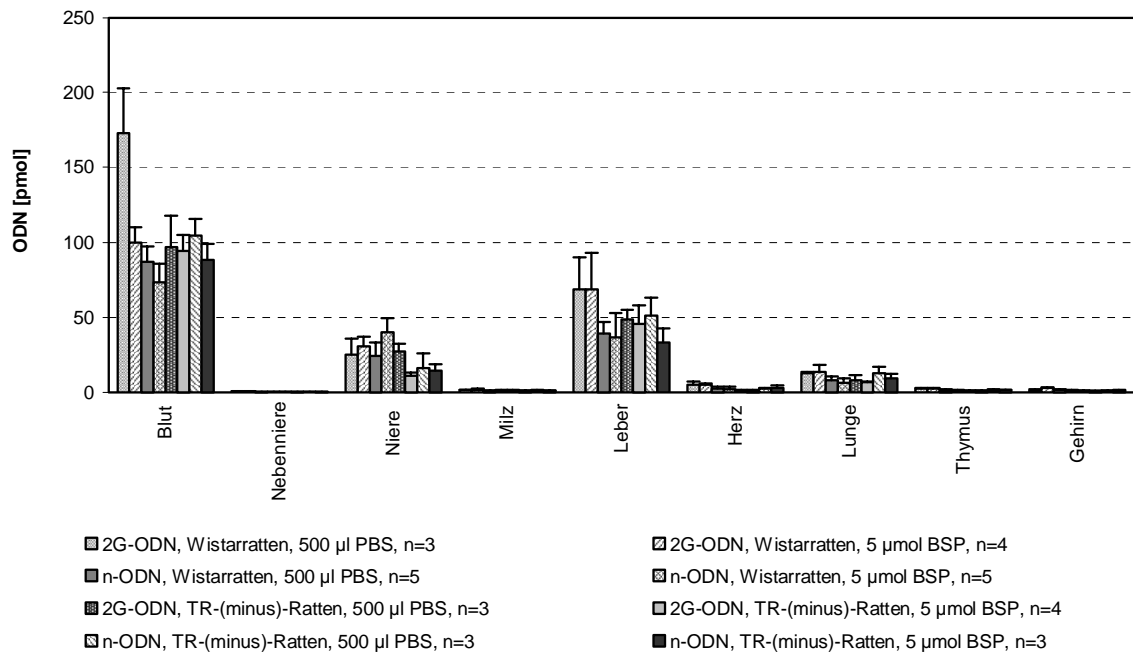


Abb. 4.47: Gesamtmenngen an 2G-ODN und n-ODN, die zwei Stunden nach Präinjektion von 5 µmol BSP und anschließender Applikation des jeweiligen Oligonukleotids in den Organen von Wistar- und TR-Ratten gefunden wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte mit den entsprechenden Standardabweichungen.

Zwecks Untersuchung der Signifikanz der empirisch gefundenen Unterschiede wurden zunächst nur die Wistarratten betrachtet. In einer zweifaktoriellen Varianzanalyse wurden die Signifikanzgrade bzw. statistischen Irrtumswahrscheinlichkeiten p der Prozessparameter für die beiden Hauptwirkungen „Oligonukleotid“ und „5 µmol BSP“ ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tab. 4.40 zusammengefasst.

Die Präinjektion von 5 µmol BSP hatte bei Wistarratten einen signifikanten Einfluss auf die zwei Stunden nach Applikation ermittelten Gesamtmenngen der Oligonukleotide in Blut und Niere: Die BSP-Applikation führte im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen zu höheren Werten in der Niere und zu niedrigeren im Blut. Dagegen spielte es bei allen Organen mit Ausnahme der Niere eine signifikante Rolle, ob n-ODN oder 2G-ODN appliziert worden war: Verglichen mit dem n-ODN wurden nach Injektion des 2G-ODN niedrigere Oligonukleotidmenngen in der Niere und höhere in allen anderen Organen gefunden. Eine Wechselwirkung trat lediglich beim Gehirn auf: Beim n-ODN wurde nach BSP-Applikation eine niedrigere Oligomenge und beim 2G-ODN eine höhere gefunden als bei den zugehörigen Kontrollen.

Tab. 4.40: Ergebnisse der zweifaktoriellen Varianzanalyse zur Untersuchung des Einflusses von 5 μmol BSP auf die Gesamtmenge an Oligonukleotid in den untersuchten Organen von Wistarratten

Parameter	Hauptwirkungen		Wechselwirkung
	5 μmol BSP	Oligonukleotid	
Blut	p=0,0217	p=0,0103	n.s. (p=0,0647)
Nebenniere	n.s. (p=0,2840)	p=0,0013	n.s. (p=0,5449)
Niere	p=0,0314	n.s. (p=0,3376)	n.s. (p=0,2620)
Milz	n.s. (p=0,5229)	p=0,0178	n.s. (p=0,7878)
Leber	n.s. (p=0,8958)	p=0,0035	n.s. (p=0,9239)
Herz	n.s. (p=0,6977)	p=0,0015	n.s. (p=0,9196)
Lunge	n.s. (p=0,9243)	p=0,0029	n.s. (p=0,4244)
Thymus	n.s. (p=0,8725)	p=0,0008	n.s. (p=0,5267)
Gehirn	n.s. (p=0,1895)	p=0,0333	p=0,0138

Schließlich wurden auch die *TR*⁻-Ratten in diese statistische Untersuchung des Einflusses von 5 μmol BSP auf die Gesamtmengen der Oligonukleotide in den Organen einbezogen. In dieser dreifaktoriellen Varianzanalyse wurden die drei Haupteffekte „5 μmol BSP“, „Oligonukleotid“ und „Rattenstamm“ untersucht. Tab. 4.41 zeigt die ermittelten Signifikanzgrade bzw. Irrtumswahrscheinlichkeiten p.

Im Blut sanken die Gesamtmengen an Oligonukleotid bei allen untersuchten Tieren nach Präinjektion von 5 μmol BSP signifikant. Die Art des Oligonukleotids sowie der Rattenstamm hatten - jeweils isoliert betrachtet - dieselbe Wirkung auf die Oligonukleotidmenge im Blut. Der Rattenstamm beeinflusste außerdem die Gesamtmengen an Oligonukleotid, die in Nebenniere, Niere, Herz und Thymus gefunden wurden, wobei der Befund für die Nebenniere knapp nicht signifikant war. Wurden *TR*⁻-Ratten eingesetzt, so wurden niedrigere Gesamtmengen an Oligonukleotid gefunden als bei Wistarratten. Rattenstamm und BSP-Präinjektion wechselwirkten im Hinblick auf die Gesamtmenge des Oligonukleotids im Blut, da BSP diesen Wert grundsätzlich verringerte, der Effekt bei Wistarratten jedoch stärker zu Tage trat als bei *TR*⁻-Ratten. Des weiteren traten Wechselwirkungen zwischen dem Rattenstamm und der Art des Oligonukleotids auf: Wurde 2G-ODN injiziert, so resultierten für Nebenniere, Milz, Herz, Lunge, Thymus und Gehirn jeweils höhere Gesamtmengen an Oligonukleotid als bei *TR*⁻-Ratten, während sie im Falle der Applikation von n-ODN beim Übergang von Wistar- zu *TR*⁻-Ratten fast gleich blieben.

Tab. 4.41: Ergebnisse der dreifaktoriellen Varianzanalyse zur Untersuchung des Einflusses von 5 μmol BSP auf die Gesamtmenge an Oligonukleotid in den untersuchten Organen von Wistar- und TR-Ratten

Parameter	Hauptwirkungen		
	5 μmol BSP	Oligonukleotid	Rattenstamm
Blut	p=0,0120	p=0,0012	p=0,0259
Nebenniere	n.s. (p=0,5831)	n.s. (p=0,7064)	knapp n.s. (p=0,0524)
Niere	n.s. (p=0,4406)	n.s. (p=0,3631)	p=0,0255
Milz	n.s. (p=0,8460)	n.s. (p=0,9666)	n.s. (p=0,4985)
Leber	n.s. (p=0,4459)	n.s. (p=0,1541)	n.s. (p=0,3620)
Herz	n.s. (p=0,7741)	n.s. (p=0,2265)	p=0,0225
Lunge	n.s. (p=0,9476)	n.s. (p=0,6694)	n.s. (p=0,8213)
Thymus	n.s. (p=0,7592)	n.s. (p=0,4135)	p=0,0297
Gehirn	n.s. (p=0,3059)	n.s. (p=0,7555)	n.s. (p=0,0847)

Parameter	Wechselwirkung je zweier Hauptwirkungen			Wechselwirkung alle
	WW 5 μmol BSP-Oligo	WW 5 μmol BSP-RStamm	WW Oligo-RStamm	
Blut	n.s. (p=0,0876)	knapp n.s. (p=0,0517)	p=0,0102	n.s. (p=0,0698)
Nebenniere	n.s. (p=0,6781)	n.s. (p=0,6641)	p=0,0026	n.s. (p=0,9460)
Niere	n.s. (p=0,3570)	p=0,0070	n.s. (p=0,5030)	n.s. (p=0,9673)
Milz	n.s. (p=0,7165)	n.s. (p=0,7614)	p=0,0348	n.s. (p=0,9202)
Leber	n.s. (p=0,6639)	n.s. (p=0,5371)	n.s. (p=0,0660)	n.s. (p=0,7476)
Herz	n.s. (p=0,9870)	n.s. (p=0,9217)	p=0,0065	n.s. (p=0,9197)
Lunge	n.s. (p=0,9582)	n.s. (p=0,9418)	p=0,0098	n.s. (p=0,4698)
Thymus	n.s. (p=0,5697)	n.s. (p=0,6622)	p=0,0028	n.s. (p=0,9610)
Gehirn	n.s. (p=0,2618)	n.s. (p=0,4356)	p=0,0193	n.s. (p=0,1288)

Nur bei *Wistarratten* wurde die Wirkung von 15 μmol BSP auf die Galleausscheidung und Organverteilung der Oligonukleotide getestet. Die höchsten Gesamt mengen an Oligonukleotid resultierten nach Präinjektion von 15 μmol BSP in Blut, Niere und Leber. Nach Applikation von 15 μmol BSP sanken die Gesamt mengen an Oligonukleotid in allen untersuchten Organen außer der Niere, in der sie zunahm. Diese Befunde sind in Abb. 4.48 dargestellt.

Mit Hilfe einer zweifaktoriellen Varianzanalyse wurden die Einflüsse der beiden Hauptwirkungen „15 μmol BSP“ und „Oligonukleotid“ untersucht. In Tab. 4.42 sind die dabei

ermittelten Signifikanzgrade bzw. statistischen Irrtumswahrscheinlichkeiten p sowie die Analyse der Wechselwirkungen dargestellt.

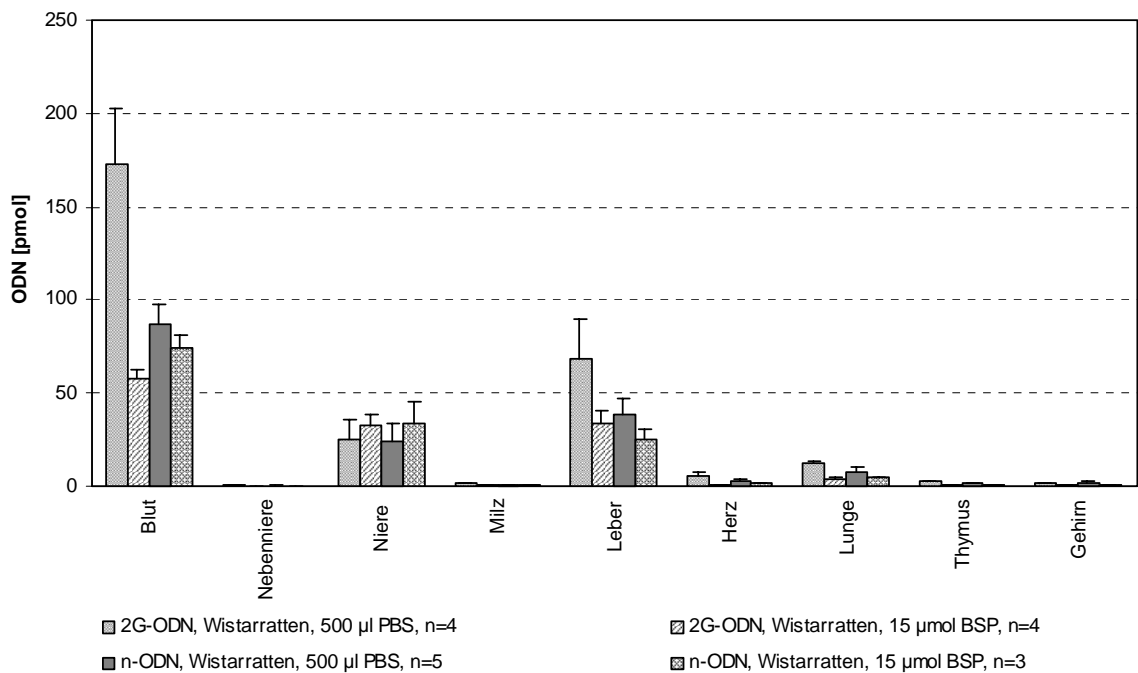


Abb. 4.48: Gesamtmengen an 2G-ODN und n-ODN, die zwei Stunden nach Präinjektion von 15 µmol BSP und anschließender Applikation des jeweiligen Oligonukleotids in den Organen von Wistarratten gefunden wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte mit den entsprechenden Standardabweichungen.

Tab. 4.42: Ergebnisse der zweifaktoriellen Varianzanalyse zur Untersuchung des Einflusses von 15 µmol BSP auf die Gesamtmenge an Oligonukleotid in den untersuchten Organen von Wistarratten

Parameter	Hauptwirkungen		Wechselwirkung
	15 µmol BSP	Oligonukleotid	
Blut	$p=0,0191$	n.s. ($p=0,0761$)	$p=0,0303$
Nebenniere	$p=0,0009$	n.s. ($p=0,1578$)	$p=0,0165$
Niere	n.s. ($p=0,1133$)	n.s. ($p=0,9480$)	n.s. ($p=0,8236$)
Milz	$p=0,0002$	$p=0,0031$	n.s. ($p=0,1018$)
Leber	$p=0,0016$	$p=0,0081$	n.s. ($p=0,0900$)
Herz	$p=0,0194$	n.s. ($p=0,0956$)	$p=0,0111$
Lunge	$p=0,0003$	n.s. ($p=0,0979$)	$p=0,0092$
Thymus	$p=0,0008$	n.s. ($p=0,3497$)	$p=0,0062$
Gehirn	$p=0,0243$	n.s. ($p=0,2971$)	n.s. ($p=0,5870$)

Es zeigte sich, dass BSP die Gesamtmengen der Oligonukleotide in allen Organen mit Ausnahme der Niere signifikant verringerte. Das applizierte Oligonukleotid (2G-ODN oder n-ODN) hatte eine signifikante Wirkung auf die zwei Stunden nach dieser Applikation ermittelten Oligonukleotidmengen in Leber und Milz, die im Falle des n-ODN niedriger waren als beim 2G-ODN. Wechselwirkungen der beiden Haupteffekte traten bei Blut, Nebenniere, Herz, Lunge und Thymus auf: Durch Applikation von 15 μmol BSP sanken die in diesen Organen gefundenen Oligonukleotidmengen, wobei der Effekt im Falle der Injektion des 2G-ODN stärker war als beim n-ODN.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass BSP die Verteilung von Oligonukleotiden auf die Organe von Wistar- und TR⁻-Ratten signifikant beeinflusst. Nach Injektion dieses mrp2-Substrates sinken die Gesamtmengen der Oligonukleotide in den Organen bei Wistarratten in allen Organen mit Ausnahme der Niere, wobei diese Effekte im Falle des 2G-ODN stärker sind als beim n-ODN. Auf die Organe von TR⁻-Ratten wirkte sich die BSP-Präinjektion in ähnlicher Weise aus, wobei bei ihnen keine so starke Abnahme der Oligonukleotidmengen zu verzeichnen war und die Oligomenge unter BSP-Einfluss auch in der Niere abnahm.

4.5.3.2 S 3025

In 1 ml DMSO/Glycerin/PBS 15:15:70 (Vol/Vol/Vol) wurden 5 bzw. 15 μmol des mrp2-Substrates S 3025 gelöst. Wistarratten wurde 2 min vor Injektion des jeweiligen Oligonukleotids (2G-ODN oder n-ODN) eine dieser beiden Lösungen in eine Femoralvene injiziert. Dagegen wurde TR⁻-Ratten lediglich die niedrigere der beiden S 3025-Konzentrationen verabreicht, denn die höhere wirkte bei ihnen zu toxisch (vgl. S. 67). Die Tiere wurden zwei Stunden nach Applikation des Oligonukleotids getötet, anschließend wurden wie in 3.5.3 beschrieben Organproben entnommen (vgl. S. 68).

Bei allen Experimenten, die zur Untersuchung des Einflusses von 5 μmol S 3025 auf Galleausscheidung und Organverteilung der Oligonukleotide durchgeführt wurden, ergaben sich die höchsten Gesamtmengen des jeweiligen Oligonukleotids (2G-ODN oder n-ODN) in Blut, Leber und Niere. Die ermittelten Gesamtmengen der beiden verwendeten Oligonukleotide in den Organen sind in Abb. 4.49 dargestellt.

Welche Gesamtmenge des jeweiligen Oligonukleotids ermittelt wurde, hing bei allen Organen von Rattenstamm, Art des Oligonukleotids und erfolgter oder nicht erfolgter Präinjektion von 5 μmol S 3025 ab (Haupteffekte). Da alle berechneten Mittelwerte mit hohen Standardabweichungen behaftet waren, mussten Varianzanalysen Aufschluss über signifikante Einflüsse der genannten Haupteffekte geben. Zunächst wurde der Einfluss von 5 μmol S 3025 auf die Gesamtmengen der Oligonukleotide in den Organen von Wistarratten untersucht. Haupteffekte dieser zweifaktoriellen Varianzanalyse waren

„5 $\mu\text{mol S 3025}$ “ und „Oligonukleotid“. In Tab. 4.43 sind die ermittelten Signifikanzen der Prozessparameter dargestellt.

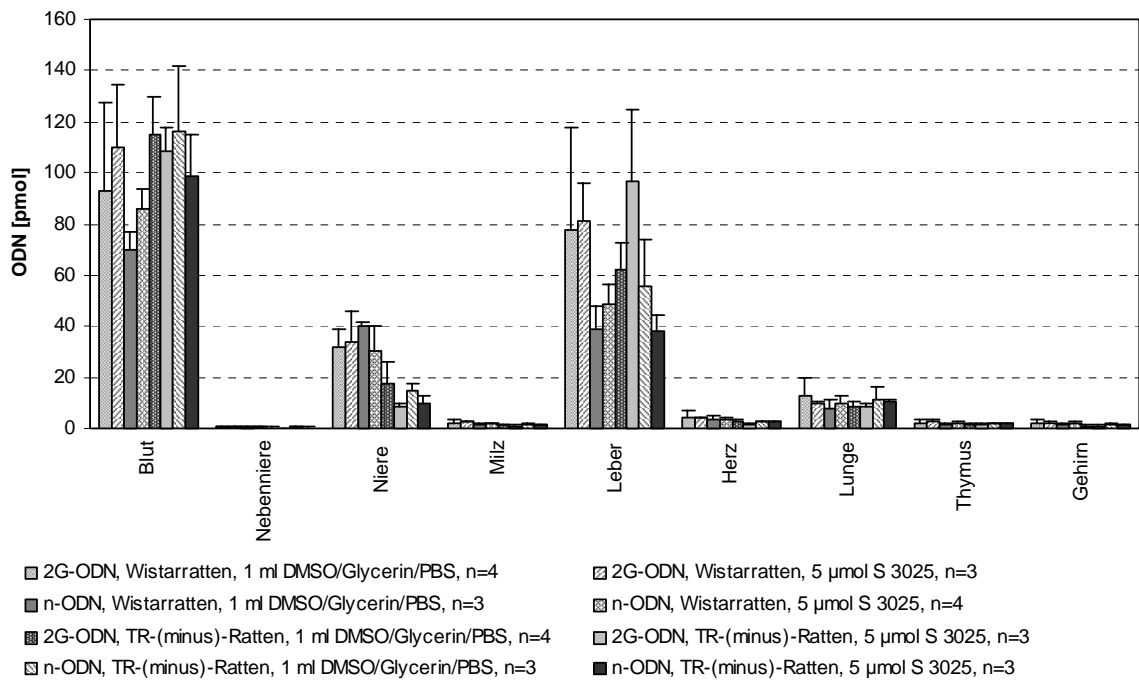


Abb. 4.49: Gesamtmenen an 2G-ODN und n-ODN, die zwei Stunden nach Präinjektion von 5 $\mu\text{mol S 3025}$ und anschließender Applikation des jeweiligen Oligonukleotids in den Organen von Wistar- und TR⁻-Ratten gefunden wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte mit den entsprechenden Standardabweichungen.

Tab. 4.43: Ergebnisse der zweifaktoriellen Varianzanalyse zur Überprüfung des Einflusses von 5 $\mu\text{mol S 3025}$ auf die Gesamtmenge an Oligonukleotid in den untersuchten Organen von Wistarratten

Parameter	Hauptwirkungen		Wechselwirkung
	5 $\mu\text{mol S 3025}$	Oligonukleotid	
Blut	n.s. (p=0,1980)	n.s. (p=0,1072)	n.s. (p=0,9773)
Nebenniere	n.s. (p=0,4644)	n.s. (p=0,1386)	n.s. (p=0,6430)
Niere	n.s. (p=0,4481)	n.s. (p=0,6349)	n.s. (p=0,2099)
Milz	n.s. (p=0,2758)	p=0,0296	n.s. (p=0,6282)
Leber	n.s. (p=0,6126)	p=0,0389	n.s. (p=0,7733)
Herz	n.s. (p=0,7863)	n.s. (p=0,3804)	n.s. (p=0,7415)
Lunge	n.s. (p=0,8466)	n.s. (p=0,3658)	n.s. (p=0,3457)
Thymus	n.s. (p=0,1985)	n.s. (p=0,0618)	n.s. (p=0,7022)
Gehirn	n.s. (p=0,4272)	n.s. (p=0,1637)	n.s. (p=0,6929)

Die Präinjektion von 5 μmol S 3025 ergab bei Wistarratten keine signifikanten Einflüsse auf die Gesamtmengen der Oligonukleotide in den Organen. Dagegen wurden nach Applikation des 2G-ODN im Vergleich zum n-ODN signifikant höhere Oligonukleotidmengen in Milz und Leber gefunden. Wechselwirkungen der beiden Haupteffekte traten nicht auf.

Anschließend wurden auch die TR⁻-Ratten in die statistischen Berechnungen einbezogen. Die dreifaktorielle Varianzanalyse der Haupteffekte „5 μmol S 3025“, „Oligonukleotid“ und „Rattenstamm“ führte zu den in Tab. 4.44 angegebenen Signifikanzen:

Tab. 4.44: Ergebnisse der dreifaktoriellen Varianzanalyse zur Untersuchung des Einflusses von 5 μmol S 3025 auf die Gesamtmenge an Oligonukleotid in den untersuchten Organen von Wistar- und TR⁻-Ratten

Parameter	Hauptwirkungen		
	5 μmol S 3025	Oligonukleotid	Rattenstamm
Blut	n.s. (p=0,6512)	n.s. (p=0,0776)	n.s. (p=0,5306)
Nebenniere	n.s. (p=0,8510)	n.s. (p=0,8841)	n.s. (p=0,0787)
Niere	n.s. (p=0,8338)	n.s. (p=0,5699)	p=0,0001
Milz	n.s. (p=0,7701)	n.s. (p=0,4607)	p=0,0311
Leber	n.s. (p=0,4898)	knapp n.s. (p=0,0529)	n.s. (p=0,6123)
Herz	n.s. (p=0,7116)	n.s. (p=0,6883)	n.s. (p=0,0962)
Lunge	n.s. (p=0,7868)	n.s. (p=0,8936)	n.s. (p=0,4905)
Thymus	n.s. (p=0,4547)	n.s. (p=0,7479)	n.s. (p=0,0693)
Gehirn	n.s. (p=0,5814)	n.s. (p=0,9885)	n.s. (p=0,0664)

Parameter	Wechselwirkung je zweier Hauptwirkungen			Wechselwirkung alle
	WW 5 μmol S 3025-Oligo	WW 5 μmol S 3025-RStamm	WW Oligo-RStamm	
Blut	n.s. (p=0,4162)	n.s. (p=0,7728)	n.s. (p=0,3542)	n.s. (p=0,7357)
Nebenniere	n.s. (p=0,8400)	n.s. (p=0,5859)	n.s. (p=0,4104)	n.s. (p=0,8428)
Niere	n.s. (p=0,3970)	n.s. (p=0,4164)	n.s. (p=0,7827)	n.s. (p=0,2894)
Milz	n.s. (p=0,9749)	n.s. (p=0,5880)	n.s. (p=0,3250)	n.s. (p=0,5521)
Leber	n.s. (p=0,1510)	n.s. (p=0,6483)	n.s. (p=0,8398)	n.s. (p=0,0962)
Herz	n.s. (p=0,7991)	n.s. (p=0,8716)	n.s. (p=0,9905)	n.s. (p=0,6654)
Lunge	n.s. (p=0,4281)	n.s. (p=0,9800)	n.s. (p=0,7616)	n.s. (p=0,8444)
Thymus	n.s. (p=0,9242)	n.s. (p=0,7033)	n.s. (p=0,2457)	n.s. (p=0,6461)
Gehirn	n.s. (p=0,9990)	n.s. (p=0,9739)	n.s. (p=0,4270)	n.s. (p=0,9342)

Im Vergleich zum n-ODN wurden nach Applikation des 2G-ODN unabhängig von Rattenstamm und Präinjektion des mrp2-Substrates höhere Oligonukleotidmengen in der Leber gefunden; dieser Befund war knapp nicht signifikant. In Abhängigkeit vom Rattenstamm änderten sich die gefundenen Gesamtmengen des jeweiligen Oligonukleotids in Niere und Milz; bei TR⁻-Ratten wurden signifikant geringere Mengen ermittelt als bei Wistarratten. Die drei untersuchten Haupteffekte übten jedoch keinerlei signifikante Wechselwirkungen aufeinander aus.

Bei Wistarratten wurden außerdem die Auswirkungen einer Applikation von 15 µmol S 3025 untersucht. Die höchsten Gesamtmengen der Oligonukleotide wurden bei allen im Zusammenhang mit der Präinjektion von 15 µmol S 3025 untersuchten Tieren in Blut, Leber und Niere gefunden (Abb. 4.50).

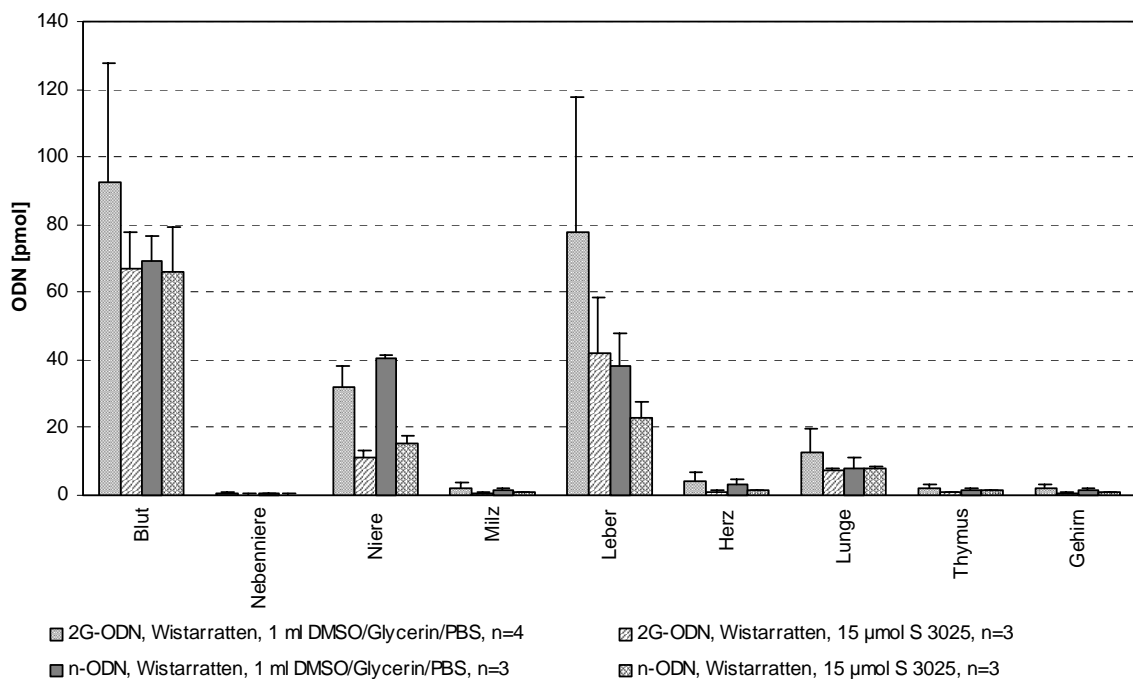


Abb. 4.50: Gesamtmengen an 2G-ODN und n-ODN, die zwei Stunden nach Präinjektion von 15 µmol S 3025 und anschließender Applikation des jeweiligen Oligonukleotids in den Organen von Wistarratten gefunden wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte mit den entsprechenden Standardabweichungen.

Wurde 2G-ODN appliziert, so resultierten in allen Organen mit Ausnahme der Niere unabhängig von einer S 3025-Präinjektion höhere Gesamtmengen an Oligonukleotid als bei Verwendung des n-ODN; in der Niere wurde jedoch mehr n-ODN gefunden. In allen Organen nahmen die Gesamtmengen des jeweiligen Oligonukleotids nach Präinjektion von 15 µmol S 3025 im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen ab.

Die Signifikanzen der empirisch ermittelten Befunde wurden mit Hilfe einer zweifaktoriellen Varianzanalyse berechnet; als Hauptwirkungen dienten dabei „15 μmol S 3025“ und „Oligonukleotid“. Tab. 4.45 zeigt die Ergebnisse dieser Varianzanalyse.

Tab. 4.45: Ergebnisse der zweifaktoriellen Varianzanalyse zur Untersuchung des Einflusses von 15 μmol S 3025 auf die Gesamtmenge an Oligonukleotid in den untersuchten Organen von Wistarratten

Parameter	Hauptwirkungen		Wechselwirkung
	15 μmol S 3025	Oligonukleotid	
Blut	n.s. (p=0,2687)	n.s. (p=0,3416)	n.s. (p=0,3947)
Nebenniere	n.s. (p=0,0704)	n.s. (p=0,3507)	n.s. (p=0,3641)
Niere	p=0,0003	p=0,0422	n.s. (p=0,4394)
Milz	p=0,0213	n.s. (p=0,4510)	n.s. (p=0,3108)
Leber	n.s. (p=0,0970)	n.s. (p=0,0641)	n.s. (p=0,4850)
Herz	p=0,0349	n.s. (p=0,7433)	n.s. (p=0,4393)
Lunge	n.s. (p=0,2535)	n.s. (p=0,4028)	n.s. (p=0,3265)
Thymus	p=0,0459	n.s. (p=0,9622)	n.s. (p=0,1096)
Gehirn	knapp n.s. (p=0,0510)	n.s. (p=0,7429)	n.s. (p=0,1595)

Es zeigte sich, dass eine Präinjektion von 15 μmol S 3025 die Gesamtmengen des jeweiligen Oligonukleotids in Niere, Milz, Herz und Thymus signifikant verringerte; beim Gehirn war diese Wirkung knapp nicht signifikant. Eine Applikation von 2G-ODN an Stelle von n-ODN führte unabhängig von der Gabe des mrp2-Substrates S 3025 zu einer verringerten Gesamtmenge dieses Oligonukleotids in der Niere. Wechselwirkungen zwischen der Art des Oligonukleotids und einer Präinjektion von 15 μmol S 3025 existierten nicht.

Die Applikation von 5 μmol S 3025 beeinflusste die Gesamtmengen der Oligonukleotide in den Organen nicht. Dagegen wurden nach Präinjektion von 15 μmol S 3025 in allen Organen geringere Gesamtmengen des jeweiligen Oligonukleotids in Niere, Milz, Herz, Thymus und Gehirn gefunden.

4.5.3.3 MK 571

Wistarratten wurden 5 μmol MK 571 des mrp2-Substrates MK 571, gelöst in 500 μl PBS, in eine Femoralvene injiziert; 2 min später wurde 2G-ODN oder n-ODN injiziert. Bei Betrachtung der Gesamtmengen der Oligonukleotide, die bei den MK 571-Versuchen ermittelt wurden, ergaben sich die höchsten Werte für Blut, Leber und Niere,

wobei die Injektion des 2G-ODN verglichen mit n-ODN in allen Organen zu höheren Oligonukleotidmengen führte (Abb. 4.51).

Die Signifikanz der empirisch erhaltenen Ergebnisse wurde durch eine zweifaktorielle Varianzanalyse untersucht. Hauptwirkungen waren dabei „5 μmol MK 571“ und „Oligonukleotid“. In Tab. 4.46 sind die ermittelten Signifikanzen bzw. statistischen Irrtumswahrscheinlichkeiten p aufgeführt.

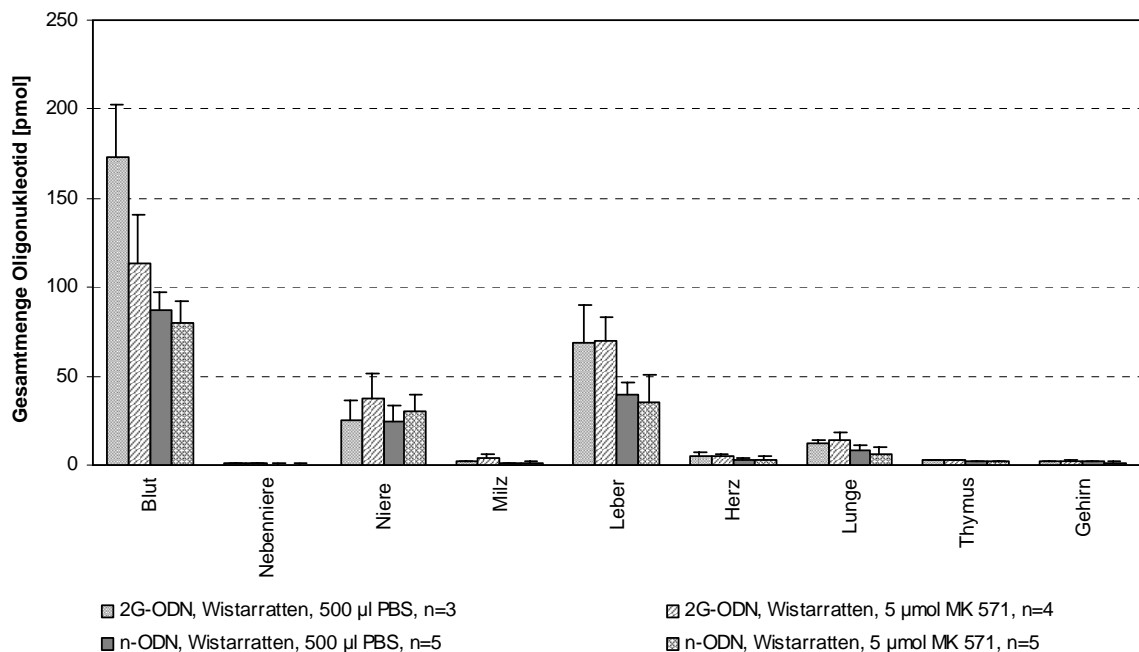


Abb. 4.51: Gesamt mengen an 2G-ODN und n-ODN, die zwei Stunden nach Präinjektion von 5 μmol MK 571 und anschließender Applikation des jeweiligen Oligonukleotids in den Organen von Wistarratten gefunden wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte mit den entsprechenden Standardabweichungen.

Die Auswertung von Tab. 4.46 zeigte eine durch MK 571 verursachte signifikante Abnahme der Gesamtmenge des jeweiligen Oligonukleotids im Blut. Nach Injektion des 2G-ODN wurde unabhängig von einer MK 571-Präinjektion signifikant mehr Oligonukleotid in Blut, Nebenniere, Milz, Leber, Herz, Lunge und Thymus gefunden. Die beiden Haupteffekte wechselwirkten im Hinblick auf die Gesamtmenge des betreffenden Oligonukleotids im Blut: Nach Präinjektion von MK 571 sank die Gesamtmenge beider Oligonukleotide im Blut; beim 2G-ODN war dieser Effekt jedoch stärker als beim n-ODN.

Die mit MK 571 durchgeführten Versuche lassen die Schlussfolgerung zu, dass dieses mrp2-Substrat mit Ausnahme des Blutes nicht zu sinkenden Gesamt mengen an Oligonukleotid in den Organen führt.

Tab. 4.46: Ergebnisse der zweifaktoriellen Varianzanalyse zur Untersuchung des Einflusses von 5 μmol MK 571 auf die Gesamtmenge an Oligonukleotid in den untersuchten Organen von Wistarratten

Parameter	Hauptwirkungen		Wechselwirkung
	5 μmol MK 571	Oligonukleotid	
Blut	p=0,0050	p=0,0039	p=0,0193
Nebenniere	n.s. (p=0,2816)	p=0,0004	n.s. (p=0,1567)
Niere	n.s. (p=0,1002)	n.s. (p=0,4601)	n.s. (p=0,5496)
Milz	n.s. (p=0,0642)	p=0,0052	n.s. (p=0,0682)
Leber	n.s. (p=0,8303)	p=0,0005	n.s. (p=0,7143)
Herz	n.s. (p=0,9958)	p=0,0041	n.s. (p=0,7766)
Lunge	n.s. (p=0,8311)	p=0,0008	n.s. (p=0,2344)
Thymus	n.s. (p=0,5988)	p=0,0016	n.s. (p=0,4676)
Gehirn	n.s. (p=0,4926)	n.s. (p=0,2524)	n.s. (p=0,1124)

4.5.3.4 CDNB

Die Versuche mit CDNB wurden ausschließlich an Wistarratten durchgeführt. Dazu wurden 5 μmol CDNB in 50 μl Ethanol gelöst und 5 min vor Applikation der Oligonukleotide in eine Femoralvene injiziert.

Bei sämtlichen Versuchen, die zur Untersuchung des Einflusses von 5 μmol CDNB durchgeführt wurden, wiesen alle Tiere die höchsten Gesamtmengen des jeweiligen Oligonukleotids in Blut, Leber und Niere auf (Abb. 4.52). Bei den Kontrolltieren, die 2G-ODN erhalten hatten, ergaben sich im Vergleich zu den n-ODN-Kontrollen in allen Organen höhere Gesamtmengen des Oligonukleotids. Die Präinjektion von CDNB führte beim 2G-ODN zu einer verringerten Oligonukleotidmenge in allen Organen, während sie im Falle der anschließenden Applikation des n-ODN in leicht erhöhten Gesamtmengen des Oligonukleotids resultierte.

Zur Klärung der Signifikanz der experimentell gefundenen Unterschiede wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse für die beiden Haupteffekte „5 μmol CDNB“ und „Oligonukleotid“ durchgeführt. Die hierbei berechneten Signifikanzen bzw. statistischen Irrtumswahrscheinlichkeiten p der Prozessparameter sind in Tab. 4.47 dargestellt.

CDNB hatte keinen signifikanten Einfluss auf die zwei Stunden nach Injektion von 2G-ODN oder n-ODN vorhandenen Gesamtmengen der Oligonukleotide in den Organen. Die Art des Oligonukleotids hatte dagegen signifikante Auswirkungen auf die Oligonukleotidmengen in den Organen: Nach Applikation des 2G-ODN wurden im Vergleich zum n-ODN höhere Oligonukleotidmengen in allen Organen außer Blut und

Niere gefunden. Zwischen der Präinjektion von CDNB und der Art des verabreichten Oligonukleotids traten keine Wechselwirkungen auf.

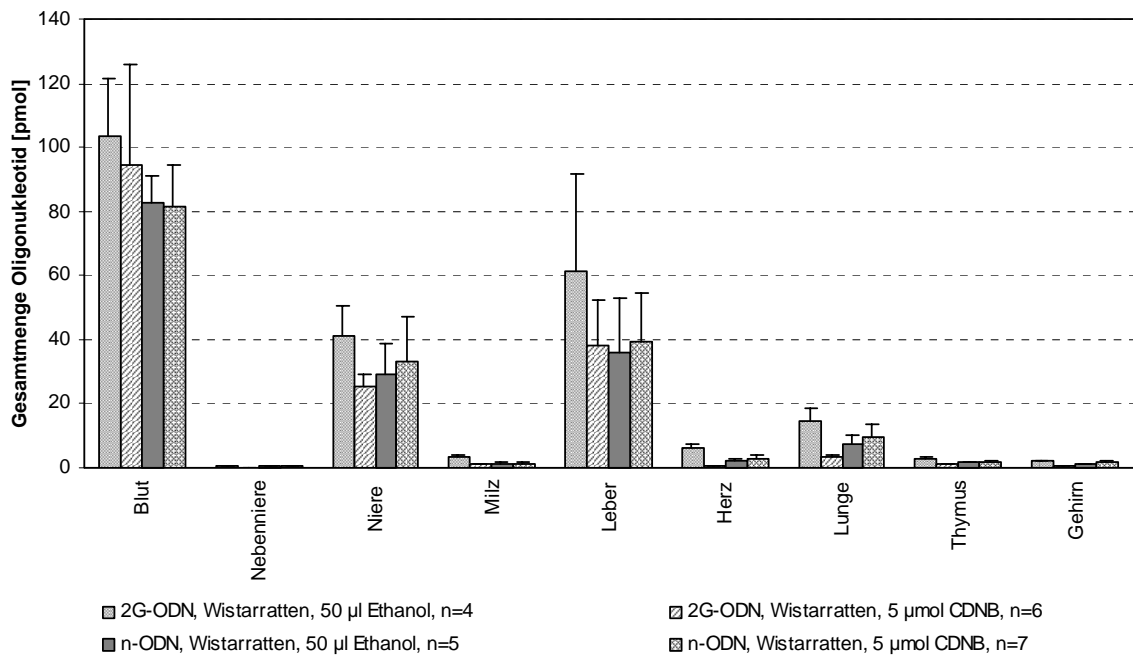


Abb. 4.52: Gesamtmenge an 2G-ODN und n-ODN, die zwei Stunden nach Präinjektion von 5 µmol CDNB und anschließender Applikation des jeweiligen Oligonukleotids in den Organen von Wistarratten gefunden wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte mit den entsprechenden Standardabweichungen.

Tab. 4.47: Ergebnisse der zweifaktoriellen Varianzanalyse zur Untersuchung des Einflusses von 5 µmol CDNB auf die Gesamtmenge an Oligonukleotid in den untersuchten Organen von Wistarratten

Parameter	Hauptwirkungen		Wechselwirkung
	5 µmol CDNB	Oligonukleotid	
Blut	n.s. (p=0,5889)	n.s. (p=0,0802)	n.s. (p=0,6670)
Nebenniere	n.s. (p=0,3097)	p=0,0483	n.s. (p=0,4509)
Niere	n.s. (p=0,4017)	n.s. (p=0,3823)	n.s. (p=0,1056)
Milz	n.s. (p=0,3012)	p=0,0015	n.s. (p=0,3901)
Leber	n.s. (p=0,8180)	p=0,0488	n.s. (p=0,9100)
Herz	n.s. (p=0,5051)	p=0,0036	n.s. (p=0,1469)
Lunge	n.s. (p=0,8949)	p=0,0276	n.d. (p=0,1926)
Thymus	n.s. (p=0,1843)	p=0,0153	n.s. (p=0,1062)
Gehirn	n.s. (p=0,8218)	p=0,0478	n.s. (p=0,3372)

CDNB hatte auf die Gesamtmengen der Oligonukleotide in den Organen keinen Einfluss.

4.5.3.5 Sirolimus

Die Präinjektion von Sirolimus erfolgte ausschließlich bei Wistarratten. 30 min vor Injektion des jeweiligen Oligonukleotids wurden jedem Tier 250 µl Sirolimus i.p. verabreicht. Die höchsten Gesamtmengen der Oligonukleotide wurden in Blut, Leber und Niere gefunden; dieses Ergebnis war unabhängig von einer Sirolimus-Präinjektion sowie der Art des applizierten Oligonukleotids (Abb. 4.53). Abgesehen von der Niere nahm die Gesamtmenge des jeweiligen Oligonukleotids in allen Organen nach Sirolimus-Applikation ab.

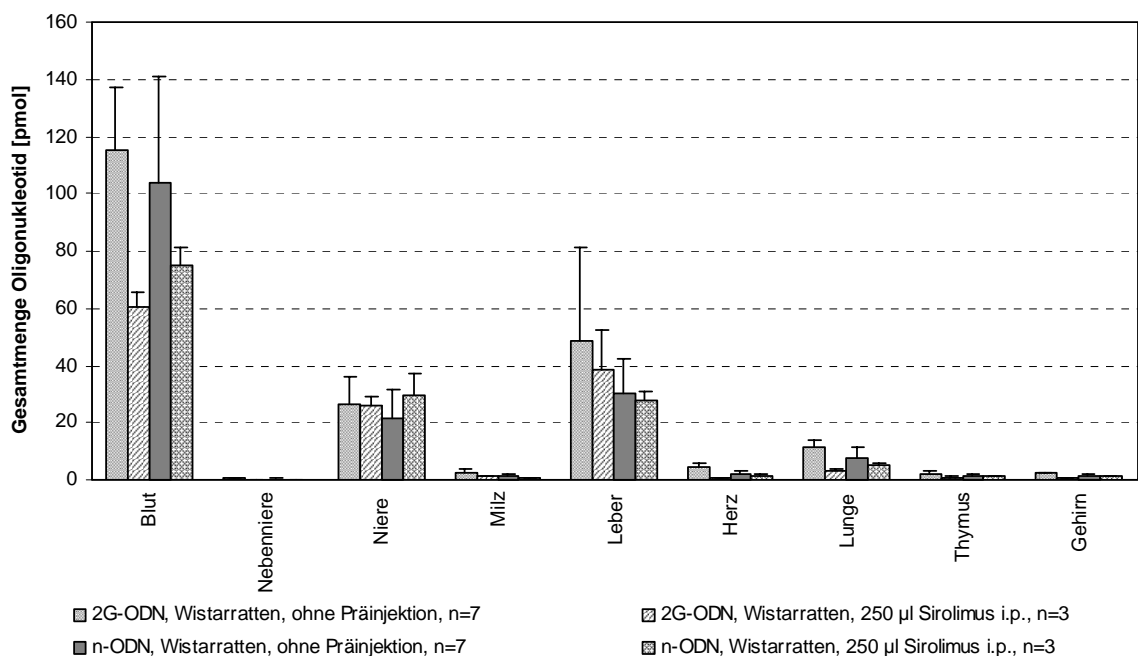


Abb. 4.53: Gesamtmengen an 2G-ODN und n-ODN, die zwei Stunden nach i.p.-Präinjektion von 250 µl Sirolimus und anschließender Applikation des jeweiligen Oligonukleotids in den Organen von Wistarratten gefunden wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte mit den entsprechenden Standardabweichungen.

Mittels einer zweifaktoriellen Varianzanalyse für die beiden Haupteffekte „250 µl Sirolimus i.p.“ und „Oligonukleotid“ wurden die Signifikanzen dieser Befunde berechnet. Das Ergebnis dieser Varianzanalyse zeigt Tab. 4.48.

Tab. 4.48: Ergebnisse der zweifaktoriellen Varianzanalyse zur Untersuchung des Einflusses von 250 µl Sirolimus auf die Gesamtmenge an Oligonukleotid in den untersuchten Organen von Wistarratten

Parameter	Hauptwirkungen		Wechselwirkung
	250 µl Sirolimus i.p.	Oligonukleotid	
Blut	p=0,0004	n.s. (p=0,9185)	n.s. (p=0,3324)
Nebenniere	p=0,0004	n.s. (p=0,0698)	p=0,0058
Niere	n.s. (p=0,4107)	n.s. (p=0,9310)	n.s. (p=0,3231)
Milz	p=0,0256	n.s. (p=0,0729)	n.s. (p=0,2853)
Leber	n.s. (p=0,5760)	n.s. (p=0,1986)	n.s. (p=0,7366)
Herz	p=0,0001	n.s. (p=0,0765)	p=0,0022
Lunge	p=0,0001	n.s. (p=0,4584)	p=0,0408
Thymus	p=0,0180	n.s. (p=0,6869)	knapp n.s. (p=0,0527)
Gehirn	p=0,0001	n.s. (p=0,3687)	p=0,0266

Die Präinjektion von Sirolimus führte bei beiden Oligonukleotiden zu einer signifikanten Abnahme der Gesamtmenge an Oligonukleotid in fast allen Organen. Lediglich bei Niere und Leber war keine signifikante Abnahme zu verzeichnen. Welches Oligonukleotid injiziert worden war, hatte keinen signifikanten Einfluss. Dagegen existierten Wechselwirkungen zwischen Sirolimus und der Art des verabreichten Oligonukleotids, die sich auf die Gesamtmengen des jeweiligen Oligonukleotids in Nebenniere, Herz, Lunge, Thymus und Gehirn auswirkten: Sirolimus verringerte die Gesamtmengen des 2G-ODN in diesen Organen stärker, als es das beim n-ODN tat.

Abschließend lässt sich feststellen, dass Sirolimus die Gesamtmenge beider Oligonukleotide in zahlreichen Organen signifikant verringerte. Nur die Niere wurde nicht in dieser Weise beeinflusst. Bei vielen Organen war die durch Sirolimus induzierte Abnahme von Oligonukleotidkonzentration und -gesamtmenge deutlicher, wenn 2G-ODN an Stelle von n-ODN injiziert worden war.

4.5.4 Prozentualer Vergleich der Oligonukleotidmengen in Organen und Körperflüssigkeiten

Unter allen in der vorliegenden Arbeit untersuchten mrp2-Substraten hatten BSP und S 3025 den größten Einfluss auf die hepatobiliäre Elimination von 2G-ODN und n-ODN sowie die Verteilung dieser Oligonukleotide auf Organe und Körperflüssigkeiten. Unabhängig von Dosis und Art einer Präinjektion, eingesetztem Rattenstamm und der Applikation von 2G-ODN oder n-ODN wurden die höchsten Gesamtmengen der Oligo-

nukleotide in Galle, Serum, Leber und Niere gefunden. Nachfolgend sind die prozentualen Verteilungen der beiden verwendeten Oligonukleotide auf die genannten Organe und Körperflüssigkeiten und die Einflüsse von BSP und S 3025 dargestellt und erläutert (s. Abb. 4.54 und Abb. 4.55). Dabei wird die Summe des im Zeitraum von zwei Stunden in die Galle eliminierten und des nach zwei Stunden in der Leber befindlichen Oligonukleotids als „Organpassage“ bezeichnet; „Restkörper“ ist die Differenz aus applizierter und in den genannten Organen ermittelter Oligonukleotidmenge.

4.5.4.1 Wirkung von BSP

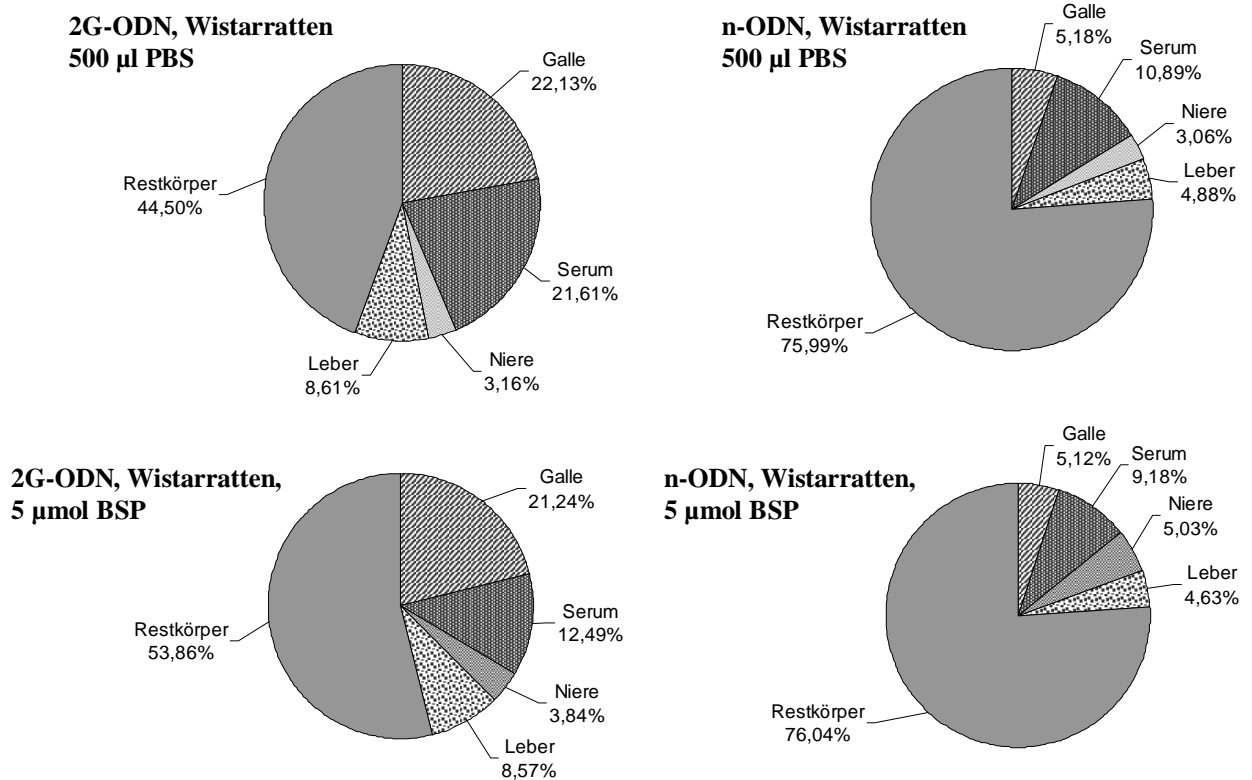
Im Serum der Wistarratten, denen PBS und 2G-ODN injiziert wurden (Kontrolltiere) wurde eine sehr hohe Menge an Oligonukleotid gefunden. Bei allen hier beschriebenen Versuchen wurden 8-14 Wochen alte Ratten mit einem Gewicht von 170-340 g eingesetzt (vgl. Kap. 2.1, S. 42). Diejenigen Wistarratten, die PBS und 2G-ODN erhielten, waren vergleichsweise schwer; ihr Durchschnittsgewicht betrug etwa 300 g. Im Gegensatz dazu wogen die Tiere aller anderen Versuchsgruppen im Schnitt etwa 220-250 g. Dies führte rein rechnerisch sowohl relativ als auch absolut zu einer größeren Menge an 2G-ODN im Blut der Wistar-Kontrollratten.

Das Bis-Gallensäurekonjugat (2G-ODN) war in Galle und Leber bei allen Versuchsreihen im Vergleich zum n-ODN deutlich angereichert. Unter Berücksichtigung der Standardabweichungen veränderten sich bei Wistarratten nach Präinjektion von 5 μmol BSP Organpassage und Anteil der Oligonukleotide in Galle und Leber im Vergleich zu den Kontrollen nicht. Die Ausscheidung beider Oligonukleotide in die Galle verzögerte sich zwar durch Präinjektion von 5 μmol BSP (vgl. 4.4.3.1, S. 111), führte aber innerhalb des Messzeitraumes zu identischen Endwerten. Da in den Lebern der BSP-präinjizierten Tiere ebenso viel Oligonukleotid gefunden wurde wie bei den Kontrollen, verzögerte sich bei diesem Rattenstamm durch die Applikation von 5 μmol BSP offensichtlich die Ausscheidung, nicht aber die Aufnahme der Oligonukleotide.

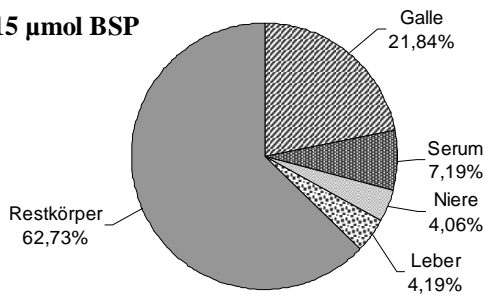
Nach Applikation von 15 μmol BSP wurde unabhängig vom applizierten Oligonukleotid eine veränderte Organpassage festgestellt; dabei nahm die insgesamt in die Galle sezernierte Menge an Oligonukleotid nur geringfügig, die nach zwei Stunden in der Leber gefundene jedoch stark ab. Vermutlich spielt hier auch die Aufnahme von BSP bzw. den Oligos in die Hepatozyten eine Rolle: BSP wird basolateral vor allem über den *oatp1* in Hepatozyten aufgenommen (vgl. 3.5.1.2, S. 64 ff.) und canaliculär über den *mrp2* in die Galle ausgeschieden; über die Affinität von Oligonukleotiden zu den verschiedenen *oatps* ist nichts bekannt. In Gegenwart von 15 μmol BSP nahmen die Mengen beider Oligonukleotide in der Leber im Vergleich zu den Kontrollen ab, in der

Niere aber zu. Möglicherweise besitzen Oligonukleotide auf der basolateralen Seite der Hepatozyten - ebenso wie BSP - eine höhere Affinität zum oatp1 als zum oatp3; ihr canalikulärer Transport erfolgt wahrscheinlich in hohem Maße über den mrp2. Dieser canalikuläre Transporter wird in der Leber stärker exprimiert als in der Niere (Inui et al. 2000). Möglicherweise ist das basolaterale System flexibler und/oder die Aufnahme von Substraten erfolgt schneller als die Ausscheidung.

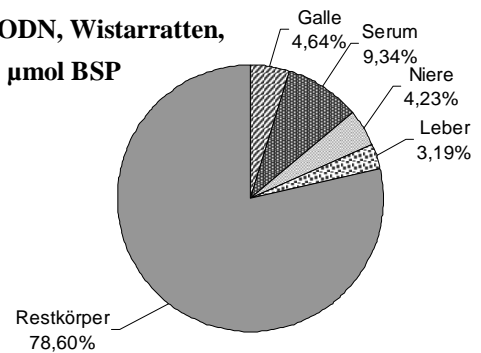
Bei TR⁻-Ratten nahm die Organpassage nach Applikation von 5 µmol BSP im Vergleich zu den Kontrollen ab, wobei sich für diesen Rattenstamm durch Präinjektion des oatp- und mrp2-Substrates BSP sowohl in der Galle als auch in der Leber niedrigere Oligonukleotidmengen ergaben als bei den Kontrollen. Auf Grund der hohen Standardabweichungen ergab sich derselbe Befund scheinbar für die Niere, obwohl der Defekt bei TR⁻-Ratten auf den mrp2 beschränkt und die Aktivität anderer organischer Anionentransporter nicht eingeschränkt ist (Paulusma und Oude Elferink 1997). Tab. 4.41 zeigt jedoch, dass der Oligonukleotidgehalt in der Niere nach BSP-Applikation zunahm. Durch das Fehlen des mrp2 war die hepatobiliäre Elimination der Oligonukleotide bei diesem Rattenstamm im Vergleich zu Wistarratten eingeschränkt, kam jedoch nicht völlig zum Erliegen. Auch das mrp2-Substrat BSP wird von TR⁻-Ratten biliär sezerniert, wenn auch in signifikant geringerem Maß als bei Wistarratten (vgl. Abb. 4.18, S. 88). Es erscheint plausibel, dass in Abwesenheit des mrp2 andere Transporter auf mrp2-Substrate ansprechen.



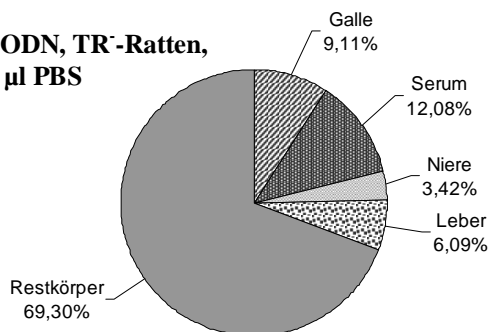
**2G-ODN, Wistarratten,
15 µmol BSP**



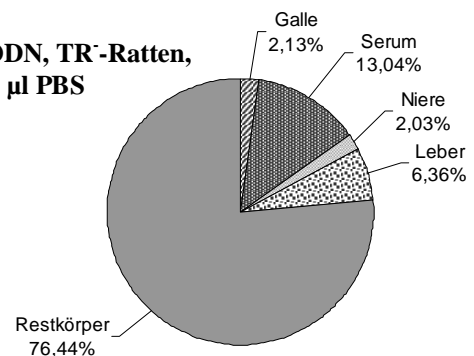
**n-ODN, Wistarratten,
15 µmol BSP**



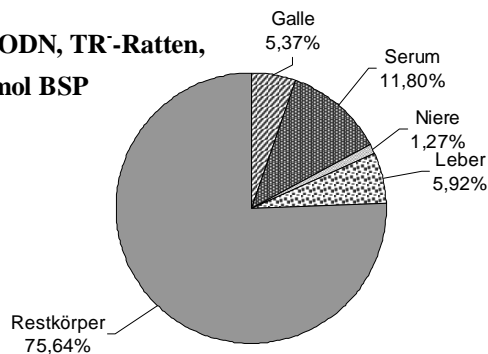
**2G-ODN, TR⁻-Ratten,
500 µl PBS**



**n-ODN, TR⁻-Ratten,
500 µl PBS**



**2G-ODN, TR⁻-Ratten,
5 µmol BSP**



**n-ODN, TR⁻-Ratten,
5 µmol BSP**

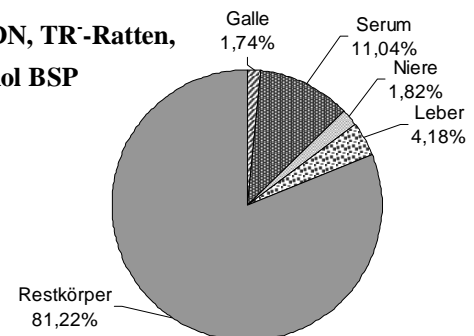


Abb. 4.54: Prozentuale Verteilung von 2G-ODN bzw. n-ODN auf Galle, Serum, Niere und Leber.

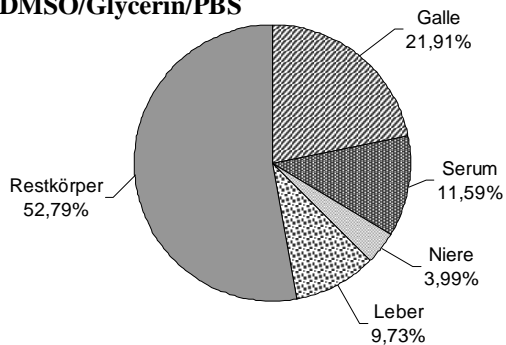
Berücksichtigt wurden dabei die Oligonukleotidmengen, die während der 120-minütigen Messzeit in die Galle sezerniert bzw. nach Ablauf dieser 120 min in Serum, Niere und Leber ermittelt wurden. Dargestellt sind die Ergebnisse der Präinjektion von BSP bei Wistar- und TR⁻-Ratten.

4.5.4.2 Wirkung von S 3025

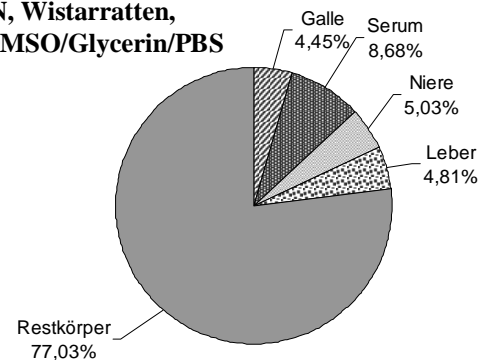
Nach Applikation von 5 µmol S 3025 blieb die Organpassage von 2G-ODN und n-ODN bei Wistarratten annähernd konstant. Die hepatobiliäre Elimination beider Oligonukleotide war nach Präinjektion von 5 µmol S 3025 verzögert, führte jedoch im beobachteten Messzeitraum von zwei Stunden zu denselben Endwerten wie bei den mit

dem Lösungsmittel behandelten Kontrollen (vgl. Tab. 4.29, S. 126). Die Plasmaclearance von S 3025 ist bei Wistarratten in diesem Zeitraum abgeschlossen (Herling et al. 2002). Bei Applikation von 5 μmol S 3025 wurde die hepatobiliäre Aufnahme der Oligonukleotide offensichtlich nicht gehemmt, da sich die Organpassage dieser Substanzen im Vergleich zu den Kontrolltieren nicht veränderte. Dagegen spricht die in Gegenwart von 5 μmol S 3025 verlangsamte Galleausscheidung für eine Hemmung der mrp2-vermittelten Elimination durch dieses Substrat.

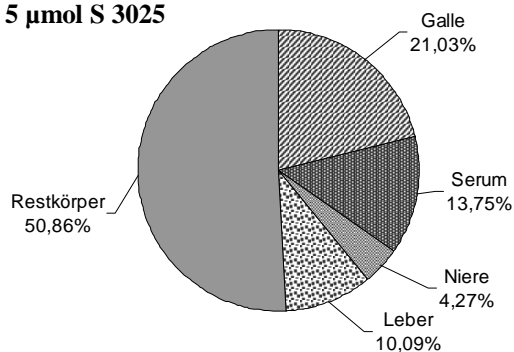
**2G-ODN, Wistarratten,
1 ml DMSO/Glycerin/PBS**



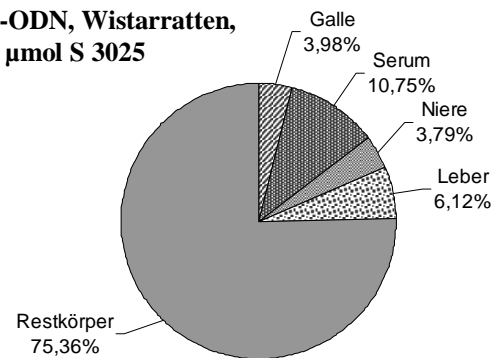
**n-ODN, Wistarratten,
1 ml DMSO/Glycerin/PBS**



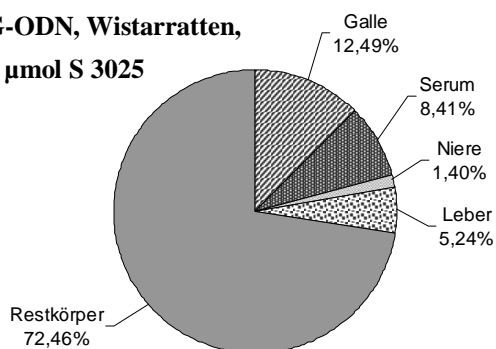
**2G-ODN, Wistarratten,
5 μmol S 3025**



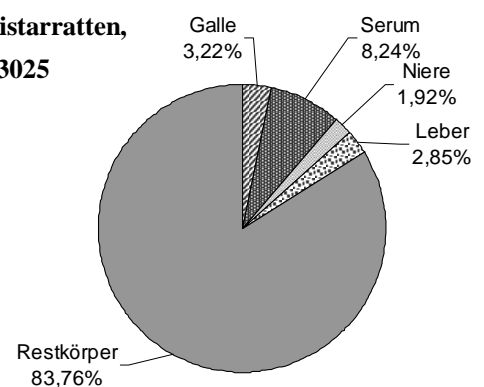
**n-ODN, Wistarratten,
5 μmol S 3025**



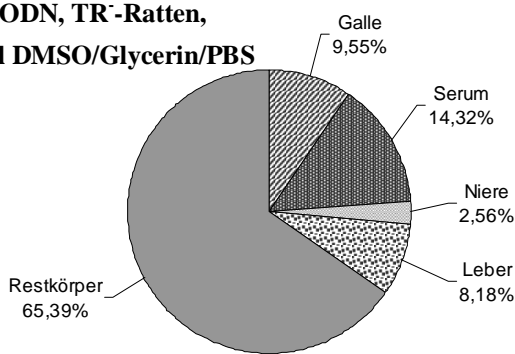
**2G-ODN, Wistarratten,
15 μmol S 3025**



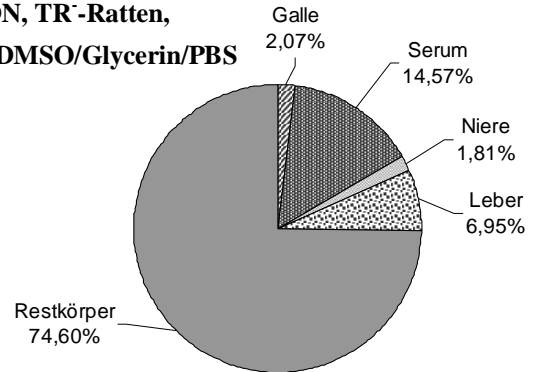
**n-ODN, Wistarratten,
15 μmol S 3025**



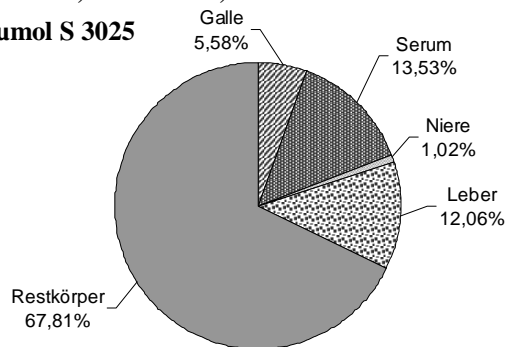
**2G-ODN, TR⁻-Ratten,
1 ml DMSO/Glycerin/PBS**



**n-ODN, TR⁻-Ratten,
1 ml DMSO/Glycerin/PBS**



**2G-ODN, TR⁻-Ratten,
5 µmol S 3025**



**n-ODN, TR⁻-Ratten,
5 µmol S 3025**

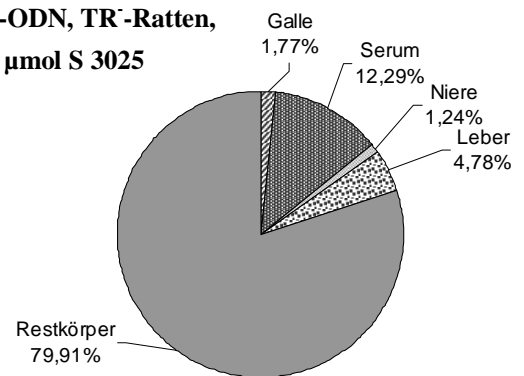


Abb. 4.55: Prozentuale Verteilung von 2G-ODN bzw. n-ODN auf Galle, Serum, Niere und Leber.

Berücksichtigt wurden dabei die Oligonukleotidmengen, die während der 120-minütigen Messzeit in die Galle sezerniert bzw. nach Ablauf dieser 120 min in Serum, Niere und Leber ermittelt wurden. Dargestellt sind die Ergebnisse der Präinjektion von S 3025 bei Wistar- und TR⁻-Ratten.

Die Präinjektion von 15 µmol S 3025 führte bei den Wistarratten zu einer stark verminderten Organpassage beider Oligonukleotide. In der Leber waren die Gesamtmengen der Oligonukleotide nach Applikation von 15 µmol S 3025 gegenüber den Kontrollen nicht signifikant verändert (vgl. Tab. 4.45, S. 154). Vermutlich besaßen die Tiere, welche 15 µmol S 3025 erhalten hatten, zufällig schwerere Lebern als die Kontrolltiere, so dass sich trotz signifikant niedrigerer Oligonukleotidkonzentrationen keine signifikant geringeren Gesamtmengen der Oligonukleotide ergaben. Die Mengen der hepatobiliär eliminierten Oligonukleotide waren nach Präinjektion von 15 µmol S 3025 signifikant verringert (vgl. S. 124 ff.).

Bei TR⁻-Ratten ergaben sich nach Präinjektion von 5 µmol S 3025 Verteilungen der Oligonukleotide auf Körperflüssigkeiten und Organe, die gegenüber den Kontrollen stark verändert waren. Signifikant waren diese Veränderungen jedoch nur im Falle der Galleausscheidung (vgl. Tab. 4.29, S. 126 und Tab. 4.44, S. 152). TR⁻-Ratten scheiden auf Grund des fehlenden mrp2 signifikant weniger Oligonukleotid in die Galle aus als

Wistarratten; nach Applikation von 5 μmol S 3025 nahm die hepatobiliäre Ausscheidung noch weiter ab. Hier dürfte es eine Rolle spielen, dass S 3025 den Blutglucosespiegel über einen längeren Zeitraum verringert, als dies bei Wistarratten der Fall ist.

4.6 Antisense-Studien an *Xenopus laevis*-Oozyten

Der basolaterale Transporter Ntcp transportiert physiologische Gallensäuren in Gegenwart von Natrium (Hagenbuch et al. 1996). Um seine Eigenschaften unabhängig von anderen Transportern untersuchen zu können, bietet sich die Injektion von Ntcp-cRNA in *Xenopus-laevis*-Oozyten an (vgl. Kap. 3.6, S. 68 ff.). Hagenbuch konnte zeigen, dass die Expression des Ntcp gehemmt werden kann, wenn Ntcp-cRNA und geeignete Antisense-Oligonukleotide coinjiziert werden, wobei es sich bei den Antisense-Oligonukleotiden um unmodifizierte Phosphodiester handelte (Hagenbuch et al. 1996). In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob diese Antisense-Wirkung geeigneter Oligonukleotide auch dann noch eintritt, wenn eine Backbone-Modifikation (Phosphorothioat) und / oder eine Gallensäure-Konjugation dieser Oligonukleotide vorliegen. Außerdem wurde getestet, ob eventuelle Einflüsse der gemeinsam mit der Ntcp-cRNA injizierten Oligonukleotide auch dann eintreten, wenn diese Oligonukleotide eine willkürliche, nicht im Ntcp vorkommende oder eine Sense-Sequenz besitzen (vgl. 2.3, S. 43).

Abb. 4.56 zeigt die Ergebnisse dieser Aufnahmestudien. In Gegenwart von Natrium wurde die höchste Aufnahme an ^3H -Taurocholat erwartungsgemäß bei denjenigen Oozyten gefunden, bei denen ausschließlich Ntcp-cRNA injiziert worden war (Positiv-Kontrolle); die niedrigsten Aufnahmen zeigten Oozyten, die lediglich H_2O erhalten hatten (Negativ-Kontrolle). Bei Coinjektion aller eingesetzten Oligonukleotide (vgl. S. 44) nahm die Natrium-abhängige Taurocholataufnahme im Vergleich zu den Positiv-Kontrollen ab. Die Coinjektion von Oligonukleotiden mit Antisense-Sequenz führte zu signifikant geringeren Taurocholataufnahmen als die Coinjektion von Oligonukleotiden mit Sense-Sequenz (20mer Sense-nODN) oder einer willkürlichen, nicht im Ntcp vorkommenden Sequenz (n-ODN oder 2G-ODN). Dabei wiesen die Oozyten, die Phosphorothioat-modifizierte Antisense-Oligonukleotide (20mer AS-nODN und 20mer AS-2G-ODN) erhalten hatten, niedrigere Taurocholataufnahmen auf als Oozyten, denen Phosphodiester-Antisense-Oligonukleotide (20mer AS-nODN-DE) und 20mer AS-2G-ODN-DE) coinjiziert worden war. In Gegenwart von Cholin an Stelle von Natrium ging die Taurocholat-Aufnahme aller Oozyten mit Ausnahme der Negativ-Kontrolle und der mit Sense-Oligonukleotid behandelten zurück.

Die Signifikanz der ermittelten Befunde wurde mit Hilfe von Varianzanalysen untersucht. Dabei wurden die für die Coinjektion verwendeten Oligonukleotide gruppenweise zusammengefasst (vgl. 3.7, S. 70): In einer dreifaktoriellen Varianzanalyse wurden die Einflüsse von Backbone-Modifikation, Gallensäure-Konjugation und Natrium auf die Taurocholataufnahme der mit Antisense-Oligonukleotiden (20mer AS-nODN-DE, 20mer AS-2G-ODN-DE, 20mer AS-nODN und 20mer AS-2G-ODN) behandelten Oozyten untersucht. Eine weitere dreifaktorielle Varianzanalyse gab Aufschluss über die Wirkung von Sequenz, Gallensäure-Konjugation und Natrium auf die Taurocholataufnahme der mit Phosphorothioat-Oligonukleotiden behandelten Oozyten (20mer AS-nODN, 20mer AS-2G-ODN, n-ODN und 2G-ODN). Zuletzt wurden die beiden nicht Gallensäure-modifizierten Oligonukleotide in einer zweifaktoriellen Varianzanalyse miteinander verglichen, um festzustellen, welche Einflüsse ihre Sequenzen und die Anwesenheit von Natrium auf die Oozyten hatten, in die sie gemeinsam mit der Ntcp-cRNA injiziert worden waren. Die Ergebnisse der statistischen Auswertungen sind in Tab. 4.49 dargestellt.

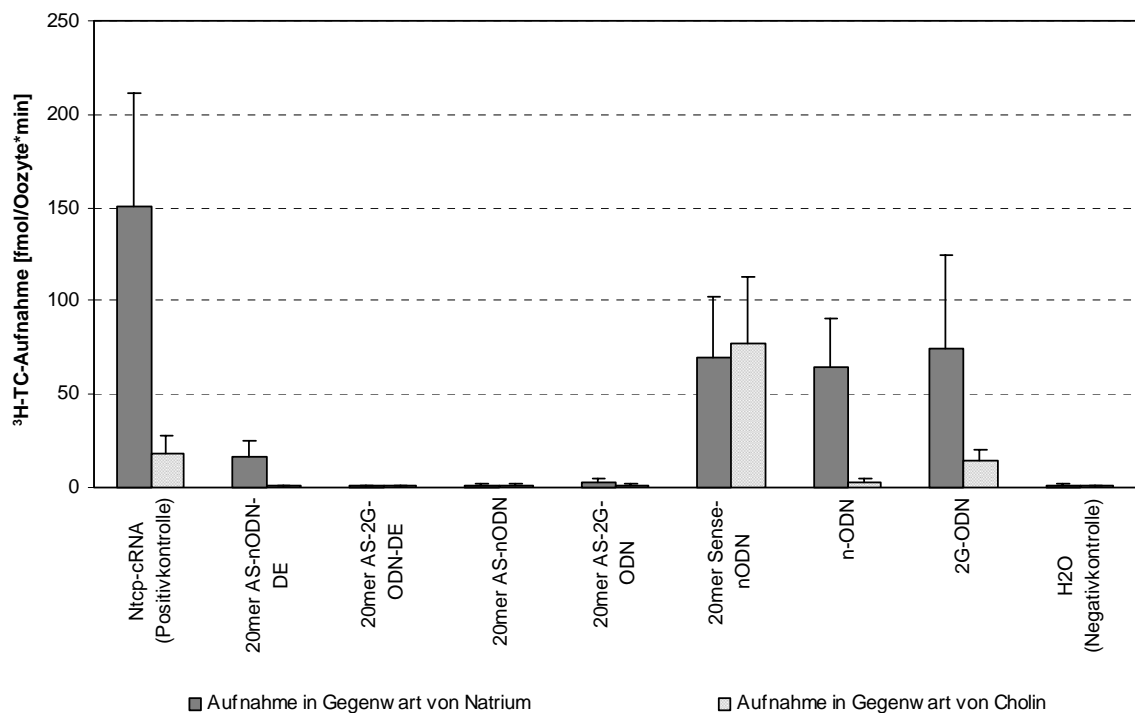


Abb. 4.56: Einfluss verschiedener Oligonukleotide auf die Expression des Ntcp und die Taurocholataufnahme von *Xenopus laevis*-Oozyten

Die Auswertung lässt nur qualitative Aussagen zu, da die Aufnahmemessungen lediglich an Oozyten eines einzigen Frosches durchgeführt wurden. Es ist jedoch festzuhalten, dass die Coinjektion aller verwendeten Oligonukleotide die Expression des Ntcp hemmte, wobei die Hemmung nach Coinjektion von Antisense-Oligonukleotiden

signifikant stärker war. Backbone-modifizierte Oligonukleotide hemmten die Expression mehr als die entsprechenden Phosphodiester. Ebenso wie bei den Positiv-Kontrollen nahm die TC-Aufnahme auch nach Coinjektion von Oligonukleotiden ab, wenn im Medium Natrium durch Cholin ersetzt wurde. Die einzige Ausnahme bildete das Sense-Oligonukleotid (20mer Sense-ODN), was jedoch auf die hohen Standardabweichungen zurückzuführen sein dürfte.

Tab. 4.49: Verschiedene Oligonukleotide wurden gemeinsam mit Ntcp-cRNA in *Xenopus laevis*-Oozyten injiziert. Nach Expression des Transporters wurde die TC-Aufnahme gemessen. Dargestellt sind die Signifikanzen von Sequenz, Backbone-Modifikation, Gallensäure-Konjugation und Anwesenheit von Natrium auf die TC-Aufnahme der Oozyten.

dreifaktorielle Varianzanalyse für die Antisense-Oligonukleotide (20mer AS-nODN-DE, 20 mer AS-2G-ODN-DE, 20mer AS-nODN, 20mer AS-2G-ODN)	
Backbone-Modifikation	n.s. (p=0,7009)
Gallensäure-Konjugation	p<0,0001
Natrium im Medium	p<0,0001
Ww Backbone - Gallensäuremodifikation	p<0,0001
Ww Backbone - Natrium im Medium	p<0,0001
Ww Gallensäure-Modifikation - Natrium im Medium	p<0,0001
Ww alle	p<0,0001

dreifaktorielle Varianzanalyse für die Phosphorothioat-Oligonukleotide (20mer AS-nODN, 20 mer AS-2G-ODN, n-ODN, 2G-ODN)	
Sequenz	p<0,0001
Gallensäure-Konjugation	p<0,0001
Natrium im Medium	p<0,0001
Ww Sequenz - Gallensäuremodifikation	knapp n.s. (p=0,0540)
Ww Sequenz - Natrium im Medium	p<0,0001
Ww Gallensäure-Modifikation - Natrium im Medium	n.s. (p=0,2337)
Ww alle	p<0,0001

zweifaktorielle Varianzanalyse für die 20mer-Oligonukleotide ohne Gallensäure-Konjugation (20mer Sense-ODN und 20mer AS-ODN-DE)	
Sequenz	p<0,0001
Natrium im Medium	p<0,0001
Ww Sequenz - Natrium im Medium	p<0,0001

5 Diskussion

Die Antisense-Therapie stellt ein viel versprechendes Konzept dar, mit dessen Hilfe die Behandlung viraler Erkrankungen sowie die Regulation der Überexpression einzelner Gene möglich scheint. Unmodifizierte Oligonukleotide sind wegen ihrer leichten Abbaubarkeit therapeutisch nicht einsetzbar; Oligonukleotid-Phosphodiester werden in vivo innerhalb von 2 bis 3 Stunden zu Mononukleotiden abgebaut (Sands et al. 1994). Deswegen wurden verschiedene Derivate synthetisiert, die in vitro und in vivo hinreichend stabil sind. Problematisch für eine breite Anwendung sind jedoch die schlechte Aufnahme vieler Oligonukleotide und ihrer Derivate sowie ihre mangelnde Zell- und Zielspezifität.

Agrawal et al. versuchten, die in vivo-Stabilität von Oligonukleotid-Derivaten zu erhöhen, indem sie Methylphosphonate einsetzten (Agrawal et al. 1997). Eine einzige Methylphosphonatgruppe am 3'- oder 5'-Ende des Oligonukleotids führte aber nicht zu einem hinreichenden Schutz vor durch Nukleasen bedingtem Abbau. Zwei aufeinander folgende Methylphosphonate vergrößerten dagegen die Halbwertszeit in vivo um das Zweifache. Nachteilig hierbei ist jedoch die schlechte zelluläre Aufnahme der Methylphosphonat-Oligonukleotide (Miller 1991). Die zelluläre Aufnahme von Phosphorothioaten ist im Allgemeinen höher und ihre Toxizität geringer als die vergleichbarer Methylphosphonate. Bei der Untersuchung der pathologischen Effekte einiger sequenzhomologer Oligonukleotidderivate, bei denen es sich um ein Homophosphorothioat, ein Homophosphorothioat mit Methylphosphonatgruppen am 3'- und am 5'-Ende, ein Phosphorothioat mit je vier 2'-O-Methylribonucleosiden am 3'- und am 5'-Ende sowie ein Phosphorothioat mit einem 8 bp-Loop am 3'Ende handelte (self-stabilized oligo) zeigte sich, dass alle vier Substanzen zu Thrombozytopenie, Anämie und Neutropenie führten (Agrawal et al. 1997). Dieser Effekt war beim Methylphosphonat am stärksten und bei self-stabilized Oligonukleotid und Methylribonucleosidderivat am schwächsten ausgeprägt, wobei das Phosphorothioat die höchste Aufnahme zeigte.

An Oligonukleotiden, die die Expression des murinen interzellulären Adhäsionsmoleküls (ICAM-1) hemmen, konnten die Auswirkungen verschiedener Derivatisierungen auf Zielspezifität, Lipophilie und Plasmaclearance gezeigt werden (Crooke et al. 1996). 2'-Propoxy-modifizierter Homo-Phosphodiester, Homo-Phosphorothioat und mixed backbone Phosphodiester-Phosphorothioat besaßen eine höhere Affinität zur komplementären ICAM-1-RNA als das unmodifizierte Oligonukleotid, wobei das mixed-backbone-Derivat weniger lipophil war als die beiden anderen Oligonukleotide. Wurden die Oligonukleotide am 5'-Ende mit lipophilen Gruppen wie 5'-(2'-O-Hexylamino)-cholesterol oder 5'-Octadecylamin versehen, so stieg die Lipophilie um das 3- bis 7-fache. Lipophile Derivate wiesen eine hohe Bindung an bovines Serumalbumin auf, was ihre zelluläre Aufnahme verschlechterte. Die Plasmaclearance war bei den lipophileren Phosphorothioaten langsamer als bei Phosphodiestern; dagegen waren die Phosphorothioate resistent gegenüber einem Abbau durch Nukleasen.

Um ein Leber-spezifisches Drug-Targeting von Oligonukleotiden zu erreichen, wurden die Oligonukleotide in früheren Arbeiten auf verschiedenen Wegen an natürlich vorkommende Gallensäuren gekoppelt. So wurde beispielsweise Cholesterol über Disulfidbrücken an das 5'-Ende eines 12mer-Oligonukleotids gebunden (Boutorine und Kostina 1993). Die Disulfidbrücke ist leicht spaltbar und lässt das Oligonukleotid intrazellulär in freier Form vorliegen. Schon nach 2 Stunden war das Cholesterol *in vivo* fast vollständig abgespalten. Die Aufnahme des Cholesterolderivates war gegenüber dem unkonjugierten 12mer gesteigert, doch das Oligonukleotid haftete an der Zellmembran, ohne sie zu durchdringen. Wurde stattdessen Cholsäure mit einer freien 3'-Hydroxylgruppe über die Carboxylgruppe an C-24 an Oligonukleotide gekoppelt (Manoharan et al. 1994), so war die Stabilität gegenüber 3'-Exonukleasen *in vivo* selbst bei Verwendung von Phosphodiestern so hoch wie diejenige von Phosphorothioaten ohne Cholsäure. Allerdings war die Wirkung dieser über C-24 gekoppelten Cholsäurekonjugate nur in Gegenwart von kationischen Liposomen gegenüber der Wirkung von nicht derivatisierten Oligonukleotiden verbessert; andernfalls ergab sich keine verbesserte zelluläre Aufnahme. Kramer und Wess konnten zeigen, dass Cholsäure-Derivate ohne freie 3'-Hydroxylgruppe und mit negativ geladener Seitenkette (freie Carboxylgruppe an C-24 oder Taurinkonjugation) sowie Trihydroxy-Gallensäuren wie Cholsäure besser von Leberzellen transportiert werden als Dihydroxygallensäuren (Kramer und Wess 1996). So wurden z.B. Peptide, die kovalent an Gallensäuren gebunden waren, im Gegensatz zu freien Peptiden hepatobiliär transportiert (Kramer et al. 1992). Dabei wurde ein 2-Aminoethoxylinker an der 3 β -Position der Gallensäure verwendet; die C-24-Position der Gallensäure war entweder frei oder Taurin-konjugiert. Ähnliche Befunde ergaben sich beim HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor HR 780 (Petzinger et al. 1995, Kullak-Ublick et al. 1997) der nach Gallensäure-Konjugation signifikant besser von Leberzellen aufgenommen wurde (Kramer et al. 1994). Längere Aminoalkoxy-Linker und / oder eine Blockade von C-24 führten zu einer geringeren Aufnahmerate durch Hepatozyten und damit zu einer geringeren Inhibierung der HMG-CoA-Reduktase. Die *in vivo*-Stabilität dieser Konjugate wurde in Galleausscheidungsversuchen gezeigt (Kramer et al. 1993).

Das Konzept dieses leberspezifischen Drug-Targetings wurde durch Konjugation mit Cholsäure erstmals auf die Substanzklasse der Oligonukleotide übertragen (Pagels 1999, Starke 1999). Es wurden mixed backbone Oligonukleotide eingesetzt, da sie einen sinnvollen Kompromiss aus hinreichend geringer Lipophilie, Permeationsvermögen durch die Zellmembran, Nukleasestabilität und geringer Toxizität darstellen. Im Sinne eines Drug-targetings für die Leber wurden diese Oligonukleotide ferner am 3'- und am 5'-Ende an 3 β -(2-Aminoethoxy)-cholsäure gekoppelt, deren Carboxylgruppe an C-24 in freier Form vorlag. Bei der für die Galleausscheidungsversuche gewählten Sequenz handelte es sich um eine Nukleotidabfolge, die weder selbst komplementär noch komplementär zu einer Sequenz aus dem Rattengenom ist (Starke 1999, Starke et al. 2001).

Die zelluläre Aufnahme von Oligonukleotiden ist bis heute nicht geklärt. Bei allen aus der Literatur bekannten modifizierten und unmodifizierten Oligonukleotiden, die in Tierversuchen eingesetzt wurden, handelte es sich jedoch um organische Polyanionen; und

diese Oligonukleotide wurden in allen untersuchten Organen nachgewiesen. Es erscheint plausibel, dass Oligonukleotidderivate über Transporter einer in allen Organen vertretenen Transporterfamilie aufgenommen werden, die bevorzugt organische Anionen transportieren und sich in ihrem Substratspektrum sehr ähnlich sind.

Allgemein zeigt sich an Hand der Literatur über die Gallebildung und besonders über die Exkretion von endogenen und xenobiotischen Substraten, dass der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der biliären Sezernierung dieser Substanzen am canaliculären Pol der Hepatozyten liegt (Kullak-Ublick et al. 2000). Am canaliculären Pol wird der hepatobiliäre Transport in die Galle vor allem durch einige primär aktive ATPasen aufrecht erhalten. Diese Pumpen gehören zu den ABC-Cassetten-Carrierproteinen, deren Substratspektrum eine gewisse Überlappung aufweist (Schinkel et al. 1995), besonders im Falle von mrp1 und mrp2. Mrp1 wird bei allen untersuchten Spezies in allen Organen exprimiert, wobei die Expression in der Leber an der lateralen Membran der Hepatozyten erfolgt und nur schwach ist; der mrp2 wird in der canaliculären Membran der Hepatozyten stark, in der Niere und im Darm schwach (Schaub et al. 1997, Borst et al. 1999) und in anderen Organen überhaupt nicht exprimiert (Paulusma et al. 1996). Mrp1 und mrp2 transportieren bei allen Spezies bevorzugt mehrwertige organische Anionen. Mrp2 ist für die aktive, ATP-abhängige Ausscheidung verschiedener endogener und exogener Substrate verantwortlich, besonders für die Exkretion glucuronidierter, sulfatierter und Glutathionkonjugierter Xenobiotika (Keppler und König 1997, Paulusma und Oude Elferink 1997). Der mrp2 der Ratte ist zu 83 % sequenzhomolog zum mrp1 dieser Tierart (Paulusma et al. 1996), während die Sequenzhomologie zwischen humanem MRP1 und MRP2 49 % beträgt (Inui et al. 2000).

Zu den am besten charakterisierten canaliculären Transportern gehören mrp2, Bsep und mdr1. Die wichtigste Pumpe für die Exkretion organischer Anionen ist mrp2 (Hagenbuch et al. 2001). Andere ATPasen der ABC-Cassettenfamilie wie mrp3, mrp4, mrp5, mrp6 und noch zu entdeckende Pumpen tragen ebenfalls zu den Exkretionseigenschaften der Hepatozyten bei (Kool et al. 1997, Borst et al. 1999, Kool et al. 1999). Diese Pumpen kompensieren jedoch eher die gestörte Exkretion unter cholestatischen Bedingungen, die beispielsweise in Abwesenheit oder bei gestörter Funktion des mrp2 eintritt. Außerdem sind mrp1 sowie mrp3 bis mrp6 nicht am canaliculären Pol, sondern an der basolateralen bzw. der lateralen Membran der Hepatozyten lokalisiert, wo sie Substanzen zurück ins Blut sezernieren (Gekeler et al. 1995).

In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass Gallensäure-Oligonukleotid-Konjugate in höherem Maße hepatobiliär sezerniert werden als die nicht an Gallensäuren gekoppelten Ausgangssubstanzen, wobei dieser Effekt bei Bis-Gallensäure-Konjugaten wesentlich stärker zum Tragen kam als bei einfach Gallensäure-konjugierten Oligonukleotiden. Galleausscheidung und Verteilung auf die Organe waren abhängig vom eingesetzten Rattenstamm (Starke 1999): TR⁻-Ratten sind ein Stamm mutierter Wistarratten, denen das multidrug resistance-assoziierte Protein mrp2 fehlt (Büchler et al. 1996). Sie schieden bedeutend weniger Oligonukleotid in die Galle aus als Wistarratten; dagegen enthielten die

Lebern dieses mutierten Rattenstammes erheblich höhere Mengen an Oligonukleotid (Starke 1999, Starke et al. 2001).

Aus diesen Gründen konzentrieren sich die vorliegende Arbeit sowie die Interpretation der Ergebnisse auf mrp2 und Bsep, weil diese Transporter organische Anionen durch die canalikuläre Membran transportieren und Oligonukleotide organische Anionen sind. Der ebenfalls an der canalikulären Hepatozytenmembran lokalisierte Mdr1 scheint nicht an der Oligonukleotid-Ausscheidung beteiligt, da dieser Carrier in TR⁻-Ratten normal exprimiert ist und bevorzugt neutrale und kationische Verbindungen transportiert (Frijters et al. 1997, Müller und Jansen 1997).

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass mixed backbone Oligonukleotide und ihre Gallensäurederivate physikochemisch und in vivo hinreichend lange stabil sind, um eine pharmakologische Wirkung ausüben zu können. Die dreidimensionalen Strukturen der drei 15mer-Phosphorothioate n-ODN, 3',5'-gelinktes 15mer Phosphorothioat und 2G-ODN wurden mit dem Programm Chem 3D Pro 5.0 berechnet. Alle drei Oligonukleotide besitzen eine helicale Struktur. Die Einführung von Linkern und Gallensäuremolekülen führt nicht zu einer wesentlichen Veränderung dieser Struktur.

Hepatobiliäre Sekretion und Organverteilung der Oligonukleotide zeigten eine starke Abhängigkeit von der Art des Rattenstammes und bestätigten damit die aus früheren Arbeiten bekannten Befunde (Starke 1999): TR⁻-Ratten schieden bedeutend geringe Anteile der applizierten Oligonukleotide aus als Wistarratten, wobei dieser Effekt im Falle des 2G-ODN signifikant größer war als beim n-ODN: TR⁻-Ratten schieden 1,85 % des applizierten n-ODN und 11,9 % des 2G-ODN über die Galle aus, während Wistarratten 4,6 % des n-ODN und 22,9 % des 2G-ODN biliär sezernierten. Auch die Eliminationsprofile waren im Vergleich zu Wistarratten verändert; der für die hepatobiliäre Sekretion der Oligonukleotide durch Wistarratten typische Peak nach 8 min trat nicht auf. Stattdessen kam es zu einer Schulterbildung, und die Konzentration der Oligonukleotide in der Galle blieb über lange Zeit auf konstantem Niveau. Alle für die Ausscheidungskurven ermittelten Parameter waren bei dem mrp2-defizienten Rattenstamm signifikant kleiner als bei Wistarratten, wobei diese Effekte im Falle des 2G-ODN stärker zum Tragen kamen als beim n-ODN.

Da TR⁻-Ratten den mrp2-Transporter nicht besitzen, wurde die Auswirkung des mrp2-Substrates BSP auf die Galleausscheidung von Oligonukleotiden untersucht. Bei Wistarratten war die Oligonukleotid-Ausscheidung in Abhängigkeit von der Konzentration des präinjizierten BSP deutlich verzögert, die Gesamtmenge des ausgeschiedenen BSP (5 bzw. 15 µmol / Tier) jedoch nicht verändert. In der frühen Exkretionsphase ergaben sich bei diesem Rattenstamm unter Einfluss von BSP deutlich geringere Oligonukleotid-Konzentrationen sowie geringere Anfangsgeschwindigkeiten und Steigungen. Die Ausscheidungskurven besaßen im Falle einer BSP-Applikation eine S-förmige Gestalt statt einer hyperbolischen, wie sie bei den Kontrollen zu beobachten war. Dies legte die Vermutung nahe, dass die

Oligonukleotid-Ausscheidung verhindert wurde, solange an der canaliculären Membran BSP vorhanden war. Je mehr BSP jedoch apical sezerniert worden war, desto geringer wurde seine Inhibitorwirkung, und je mehr BSP aus dem Cytosol der Hepatozyten entfernt worden war, desto geringer war auch die verbleibende Hemmwirkung. Daher erreichte die Oligonukleotid-Sekretion ebenso hohe Werte wie bei den Kontrollen, wenn auch zeitlich verzögert. Es konnte nicht exakt ermittelt werden, welcher Art die Inhibitorwirkung war. Die vorübergehende Hemmwirkung deutet aber eher auf eine Verdrängung an aktiven Transportmechanismen hin als auf dauerhafte oder unspezifische toxische Wechselwirkungen, wie sie beispielsweise nach ATP-Abbau oder Proteinzerstörung zu verzeichnen gewesen wären. Bei Wistarratten ergaben sich für die Hemmung der Ausscheidung der beiden untersuchten Oligonukleotidderivate (n-ODN und 2G-ODN) durch BSP vergleichbare Resultate. Bei TR⁻-Ratten veränderte sich die Oligonukleotid-Ausscheidung nach Applikation von 5 µmol BSP ebenfalls. Die Präinjektion von BSP führte bei diesem Rattenstamm nicht nur zu einer signifikanten Abnahme der Exkretionskonstante bei gleichzeitiger Zunahme der Halbwertszeit der Ausscheidung, sondern auch zu deutlich verminderten Endwerten der Gesamtsekretion. Die ausgeschiedene Gesamtmenge an Oligonukleotid verminderte sich bei beiden Oligonukleotiden um rund 35 % im Vergleich zu den Kontrollen; nämlich beim n-ODN von 2,1 % auf 1,7 % und beim 2G-ODN von 9,1 % auf 5,9 %. Wegen dieser Ergebnisse schien es sehr wahrscheinlich, dass neben dem mrp2 auch noch eine weitere, nicht durch den mrp2 vermittelte Exkretion auf die BSP-Präinjektion ansprach.

Es konnte in dieser und anderen Arbeiten gezeigt werden, dass das Chlorogensäurederivat S 3025 sehr wahrscheinlich ein mrp2-Substrat ist: S 3025 wurde fast gar nicht in die Galle von TR⁻-Ratten sezerniert (Herling et al. 2002), und es hemmte die Ausscheidung des mrp2-Substrates BSP, nicht aber die des Bsep-Substrates Taurocholat. S 3025 erwies sich als der stärkste unter allen in dieser Arbeit untersuchten Inhibitoren der Galleausscheidung von Oligonukleotiden. Die Inhibitorwirkung von S 3025 war bei Wistarratten deutlich ausgeprägter als bei TR⁻-Ratten und im Falle des 2G-ODN bedeutend höher als beim n-ODN. Wistarratten erhielten 5 bzw. 15 µmol S 3025 pro Tier, wobei sich die Gesamtausscheidung der Oligonukleotide gegenüber den Kontrollen in Abhängigkeit von der Konzentration des applizierten Chlorogensäurederivates um bis zu 28 % im Falle des n-ODN und 57 % im Falle des 2G-ODN verminderte. Nach Präinjektion von 15 µmol S 3025 war bei den Kurven der fraktionierten Galleausscheidung kein Peak mehr erkennbar, und mit Ausnahme von Totzeit und Steigung des linearen Kurventeils der kumulierten Ausscheidung waren alle Parameter signifikant verändert. TR⁻-Ratten erhielten zwar weniger, nämlich 5 µmol S 3025 pro Tier, jedoch führte S 3025 auch bei diesen Tieren zu einer Verminderung der n-ODN-Ausscheidung um 15 % und des 2G-ODN um 45 %. Das heißt, dass das bisher als mrp2-spezifisch betrachtete S 3025 (Herling et al. 2002) die Ausscheidung von Oligonukleotiden bei TR⁻-Ratten hemmt, obwohl dieser Rattenstamm kein mrp2-System besitzt. Auf Grund dieser Befunde sind Zweifel an der Transportspezifität von S 3025 angebracht, und daher sind weitere Untersuchungen notwendig, um die Wechselwirkung von mrp2 und S 3025 zu klären.

Die vorliegende Arbeit ergab weiterhin, dass die Exkretion von Oligonukleotiden in die Galle durch viele, aber nicht alle untersuchten mrp2-Substrate hemmbar war. MK 571 (Leier et al. 1994, Büchler et al. 1996) und CDNB (Müller et al. 1994, Keppler et al. 1998) führten in Versuchen mit canaliculären Membranvesikeln eindeutig zu einer Hemmung des mrp2-vermittelten Transports. Aus Experimenten an verschiedenen Zelllinien ist bekannt, dass CDNB über mrp1, mrp2 und mrp3 transportiert wird (Ueda et al. 1999). In vivo ist CDNB jedoch hoch toxisch und wurde aus diesem Grund bisher nicht in Tierversuchen mit TR⁻-Ratten eingesetzt. In der Literatur existieren bis heute keine Berichte über Tierversuche mit CDNB. Ebenso gibt es keine Berichte über Galleausscheidungsversuche unter Verwendung von MK 571. Es ist jedoch bekannt, dass MK 571 sowohl ein mrp1- als auch ein mrp2-Substrat ist (Walle et al. 1999a). Bei MK 571 handelt es sich um ein racemisches Chlorochinolin-phenylpropionat, dessen R-Enantiomer in der Ratte relativ stark an Plasma gebunden wird (Tocco et al. 1990). Dabei scheint MK 571 den mrp2-vermittelten Transport von Glucuroniden wesentlich potenter zu hemmen als denjenigen von Sulfaten. Weder MK 571 noch CDNB führten in vivo zu einer Hemmung der Oligonukleotid-Ausscheidung. Möglicherweise spielte hierbei eine Rolle, dass MK 571 und CDNB eine geringere Affinität zu mrp2 besitzen als BSP und S 3025. Es konnte jedoch nicht abschließend geklärt werden, warum MK 571 und CDNB keinerlei Inhibitorwirkung auf die Sezernierung der Oligonukleotide ausübten.

Die Auswirkung einer Präinjektion von Sirolimus auf Gallefluss und Oligonukleotidausscheidung wurde ausschließlich an Wistarratten untersucht, da keine ausreichenden Mengen an Oligonukleotiden zur Verfügung standen. Sirolimus führte lediglich zu einer geringen, nicht signifikanten Verminderung des Galleflusses sowie zu einer gegenüber den Kontrollen leicht erhöhten Steigung des linearen Kurventeils der Galleausscheidung. Bei diesem Macrolid-Lacton handelt es sich um ein MDR1/mdr1-Pgp-Substrat von Mensch (Paine et al. 2002), Maus (Kerr et al. 2001) und Ratte (Deters et al. 2001), das die ATPase-Aktivität von Pgp und den Pgp-vermittelten Gallefluss inhibiert, die Ausscheidung von Gallensäuresalzen jedoch nicht beeinflusst (Lo und Burckardt 1999). Es wirkt cholestatisch und reduziert vermutlich die biliäre GSH-Ausscheidung (Deters et al. 2001, Bramow et al. 2001). An frisch isolierten Rattenhepatozyten konnte gezeigt werden, dass Sirolimus kein Substrat von Ntcp, oatp1 und mrp2 ist (Webster und Anwer 1999). Es vermindert jedoch die oatp1-Expression und erhöht gleichzeitig die oatp2-Expression (Bramow et al. 2001). Auf Grund der Literaturdaten und der in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse ist deshalb davon auszugehen, dass Oligonukleotide keine Pgp-respektive MDR1-Substrate sind.

Die Betrachtung der Verteilung der Oligonukleotide auf die Organe von Versuchsratten zeigte, dass die höchsten Konzentrationen von n-ODN und 2G-ODN in Niere, Serum und Lunge auftraten, während die höchsten Gesamtmengen in Leber, Niere und Serum gefunden wurden. Der Applikationsort spielte dabei keine Rolle. Grundsätzlich konnten die Oligonukleotide in allen untersuchten Organen nachgewiesen werden. Diese Befunde deckten sich weitgehend mit Literaturdaten: In Mäusen wurden die höchsten Konzentrationen von

Homophosphorothioaten in der Niere gefunden, die Leber enthielt ebenfalls hohe Oligonukleotidkonzentrationen, während geringere Mengen in Milz und Lunge auftraten (Butler et al. 2000). Bei Ratten wurden die höchsten Konzentrationen an Homophosphorothioaten in der Niere und die höchsten Gesamtmengen in der Leber ermittelt; geringe Mengen wurden außerdem in Milz, Lunge sowie im Bindegewebe fast aller anderen Organe gefunden (Butler et al. 1997). Die Applikation von mixed backbone-Oligonukleotiden veränderte die Organverteilung im Vergleich zu Homophosphorothioaten nicht; auch bei den mixed backbone-Oligonukleotiden wurden die höchsten Konzentrationen in der Niere und die höchsten Gesamtmengen in der Leber detektiert (Agrawal 1999, Rusckowski et al. 2000), und die Oligonukleotide konnten in allen untersuchten Organen nachgewiesen werden. Höhere applizierte Dosen führten - mit Ausnahme der Niere - zu höheren Oligonukleotidmengen und -konzentrationen in den Organen (Rusckowski et al. 2000). Der Applikationsort führte nicht zu signifikanten Unterschieden in der Gewebsverteilung; bei i.p.- oder s.c.-Injektion ergaben sich lediglich niedrigere Plasmakonzentrationen im Vergleich zur i.v.-Applikation (Agrawal 1999).

In der vorliegenden Arbeit ergaben sich für die Lebern von TR⁻-Ratten höhere Oligonukleotidgehalte als bei Wistarratten (2G-ODN: 11,2 % und 8,3 %; n-ODN: 7,6 % und 4,1 %), und innerhalb jedes Rattenstamms wurde mehr 2G-ODN als n-ODN in der Leber gefunden. Ein ähnliches Ergebnis wurde von Bijsterbosch et al. gefunden, die die Verteilung eines 20mer Phosphorothioates und seines 3'-Cholesterol-konjugierten Derivates an Ratten untersuchten (Bijsterbosch et al. 2000): Nach Applikation des Cholesterolderivates wurden in den Lebern der Tiere doppelt so hohe Oligonukleotidmengen ermittelt wie bei den Kontrollen (64 % gegenüber 30 %), der Rest war auf viele Organe verteilt, z.B. Muskel, Herz, Niere, Darm und Knochenmark.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stimmen mit der Clearancefunktion des mrp2 für die biliäre Exkretion von Oligonukleotiden überein. Außerdem lassen die Resultate vermuten, dass die Oligonukleotidaufnahme in die Leber von TR⁻-Ratten nicht signifikant verändert war, da ihre Lebern sogar zwei Stunden nach der Injektion höhere Mengen von n-ODN und 2G-ODN enthielten als die Lebern von Wistarratten. Vermutlich gleicht der sinusoidale Reflux der Oligonukleotide zurück ins Blut die bei den TR⁻-Ratten gestörte canaliculäre Exkretion der Oligonukleotide nicht oder zumindest nicht völlig aus.

Die Galleausscheidungsversuche zeigten, dass die biliäre Sekretion der Oligonukleotide zu einem großen Teil über den mrp2 erfolgt. An canaliculären inside-out-Membranvesikeln aus HEK-Zellstämmen wurde die Substratspezifität und ATP-Abhängigkeit des Oligonukleotid-Transportes durch mrp-Isoformen untersucht. Dabei stellten HEK K0-Zellen den Wildtyp und HEK Ca1-Zellen den stabil MRP2-transfizierten Subtyp dieser Zelllinie dar. Die Experimente wurden ausschließlich mit dem n-ODN durchgeführt, da keine ausreichende Substanzmenge der Gallensäure-gekoppelten Oligonukleotide zur Verfügung stand. Sowohl bei der Filtration durch Nitrocellulosefilter als auch bei der Gelmatrix-Zentrifugation ergab sich in Anwesenheit und in Abwesenheit von ATP eine annähernd identische und sehr geringe

Transportrate. Der ATP-abhängige Nettotransport war praktisch fast Null, und die Konzentration des eingesetzten n-ODN hatte auf die Transportrate keinen Einfluss. Bei diesen Befunden ist jedoch zu bedenken, dass sich n-ODN gegenüber dem Lebergewebe nicht in der Galle anreichern; ein Anreicherungseffekt existiert nur beim 2G-ODN. Auch im Tierversuch ergab sich für das n-ODN eine sehr geringe Transportrate. Deshalb sprechen die hier erhaltenen Befunde nicht grundsätzlich gegen einen mrp2-vermittelten Transport von Oligonukleotiden, vor allem nicht im Falle der 2G-ODN.

Xenopus laevis-Oozyten sind sehr geeignet, um einzelne Transporter zu exprimieren und ihre Eigenschaften zu untersuchen. Hagenbuch et al. konnten zeigen, dass die Expression des basolateralen Hepatozyten-Transporters Ntcp gehemmt wird, wenn gleichzeitig mit der Ntcp-cRNA Antisense-Oligonukleotide aus der codierenden Sequenz dieses Transporters injiziert wurden (Hagenbuch et al. 1996). Dabei wurden unmodifizierte Phosphodiester eingesetzt. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Hemmung der Expression des (Ratten-)Ntcp auch dann eintritt, wenn die Antisense-Oligonukleotide backbone-modifiziert sind, am 3'- und am 5'-Ende Gallensäure-konjugiert sind oder beide Modifikationen vorliegen. In allen genannten Fällen hemmten die Antisense-Oligonukleotide die Ntcp-Expression fast vollständig. Im Gegensatz dazu wurde die Expression dieses Transporters durch einen Sense-Phosphodiester bzw. die beiden mixed backbone Oligonukleotide n-ODN und 2G-ODN, deren Sequenz nicht komplementär zu einer bekannten Sequenz des Rattengenoms ist, nur um rund 50 % vermindert. Theoretisch dürften Sense-Oligonukleotide und Zufallssequenzen die Expression des Ntcp überhaupt nicht inhibieren. Allerdings neigen Phosphorothioate (hier: 2G-ODN und n-ODN) konzentrationsabhängig zu sog. Nonantisense-Effekten, z.B. Wechselwirkungen mit Proteinen (Stein und Krieg 1994, Crooke 1998).

Bis heute ist die Aufnahme von Oligonukleotiden in Hepatozyten nicht eindeutig geklärt und wird heftig diskutiert; ungeklärt ist insbesondere ihre Passage durch die Phospholipidmembran. Vlassow et al. schlossen einen Diffusionsprozess grundsätzlich aus und schlugen „fluid-phase“-Endocytose als wahrscheinlichsten Weg der Aufnahme vor (Vlassow et al. 1994). Andere Autoren beschrieben eine Oligonukleotidaufnahme über Rezeptor-vermittelte Endocytose, die auftrat, wenn die verwendete DNA eine hohe Affinität zum Asialoglycoproteinrezeptor hatte (Lu et al. 1994) oder mit Poly-L-Lysin komplexiert war (Mahato et al. 1997). Des weiteren wurde eine Aufnahme von unmodifizierten Oligonukleotiden durch Endocytose über Scavenger-Rezeptor-Internalisierung vorgeschlagen, die vor allem bei Leberendothelzellen auftreten soll (Bijsterbosch et al. 1997) und durch Dextransulfat inhibiert wurde (Steward et al. 1998). In knockout-Mäusen ohne Scavenger-Rezeptor wurde jedoch keinerlei Veränderung der Ausscheidungskinetik von Oligonukleotiden beobachtet (Butler et al. 2000). Ferner führte die Applikation von Dextransulfat im Tierversuch nicht zu einer veränderten hepatobiliären Exkretion von Oligonukleotiden (Starke 1999). Eine Aufnahme von Oligonukleotiden über den Scavenger-Rezeptor erscheint deshalb unwahrscheinlich. Andererseits konnte in isolierten Rattenhepatozyten kein für die Oligonukleotidaufnahme verantwortlicher Lebertransporter

lokalisiert werden, da eine Suspension von isolierten Hepatozyten innerhalb von 90 min nur etwa 0,5 % der auch in der vorliegenden Arbeit verwendeten n-ODN und 2G-ODN aufnahm (Starke 1999). In diesem Modell konnte die geringe ODN-Aufnahme nicht durch andere Substanzen gehemmt werden. Deshalb ist der Mechanismus der Aufnahme von Oligonukleotiden in isolierte Hepatozyten unklar. Die hier dargestellten in situ-Experimente zeigen aber, dass signifikante Mengen aller Oligonukleotide die Galle innerhalb weniger Minuten erreichen. Diese schnelle Exkretion erfolgt nach transzellulärer Passage durch Hepatozyten in der intakten Leber. Deshalb scheinen die offensichtlich nicht vorhandene Aufnahme in isolierte Hepatozyten (Alahari et al. 1998, Bennett et al. 1992, Dean et al. 1994) und in Nicht-Leberzellen (Tondelli et al. 1998, Bennett et al. 1994, Offensperger et al. 1998) Zeichen einer schnellen Exkretion der ODN zurück ins Suspensionsmedium zu sein. Diese „Rückexkretion“ könnte durch Pumpen der ABC-Cassettenfamilie erfolgen und ähnelt dann wahrscheinlich der Multidrug Resistance von Tumorzellen gegenüber Chemotherapeutika, die durch den Export dieser Substrate durch P-Glycoprotein hervorgerufen wird.

Bei TR⁻-Ratten ist außer dem Fehlen des mrp2 kein weiterer Defekt canaliculärer Transportsysteme bekannt (Hagenbuch et al. 1996, Mills et al. 1999). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die biliäre Ausscheidung von Oligonukleotiden auch bei Fehlen des mrp2 nicht völlig zum Erliegen kommt: Die Galle von TR⁻-Ratten enthielt zwar deutlich geringere Mengen der Oligonukleotide als die Galle von Wistarratten, war aber keineswegs frei von ihnen. Dieser Befund deutete an, dass das geringe Exkretionsvermögen von Oligonukleotiden in diesem Rattenstamm durch andere Carrier aufrecht erhalten wird. Möglicherweise stellt die Bsep (bile salt export pump) unter diesen Bedingungen einen alternativen Ausscheidungsweg dar: Bsep transportiert sehr spezifisch und ATP-abhängig Gallensäuren (Childs et al. 1998, Stieger et al. 2000, Hooiveld et al. 2001), scheint aber auch Taxol (Lecureur et al. 2000) und Vinblastin (Vlassow et al. 1994) zu transportieren. In der Ratte liegt die Bsep-vermittelte Transportgeschwindigkeit verschiedener Gallensäuresalze in derselben Größenordnung wie der ATP-abhängige Transport dieser Substrate in canaliculären Plasmamembranvesikeln der Leber (Hooiveld et al. 2001). Bsep transportiert nach derzeitigem Kenntnisstand negativ geladene Gallensäurederivate, jedoch keine mrp2-Substrate (Stieger et al. 2000). Es wurde jedoch gezeigt, dass mrp2 und Bsep überlappend interagieren: Ethinylestradiol-17 β -glucuronid wurde rund sieben Mal besser von mrp2 als von Bsep transportiert und führte zu einer trans-Inhibierung der Bsep-Funktion in canaliculären Leberplasmamembranvesikeln, die sowohl mrp2 als auch Bsep exprimierten. In Vesikeln der mrp2-defizienten TR⁻-Ratten konnte keine derartige Inhibierung beobachtet werden (Stieger et al. 2000). In cholestatischen Modellen bzw. bei cholestatischen Leberverletzungen bleibt die Bsep-Expression weitgehend erhalten und trägt weiter zur Exkretion von Gallensäuresalzen bei, wenn auch mit leicht verminderter Geschwindigkeit (Hooiveld et al. 2001). Im Gegensatz dazu nimmt die Expression der basolateralen Carrier Ntcp und oatp1 sowie des canaliculären Transporters mrp2 bei Cholestase stark ab.

Zweifach Gallensäure-konjugierte Oligonukleotide wurden von TR⁻-Ratten signifikant besser hepatobiliär sezerniert, als unkonjugierte Oligonukleotide von beiden Rattenstämmen

ausgeschieden werden, was ebenfalls auf eine Beteiligung der Bsep bei der Sezernierung der Oligonukleotid-Derivate hindeutet. Die Existenz einer weiteren Pumpe, die in Abwesenheit von mrp2 Gallensäure-konjugierte Oligonukleotidderivate transportiert, erscheint plausibel. Bei normalen Wistarratten bewirkte Cholsäure keine Hemmung der Ausscheidung von n-ODN und 2G-ODN (Starke 1999). Dieser Befund ist ein Hinweis darauf, dass die Bsep nur im Extremfall des fehlenden mrp2 zur Oligonukleotid-Ausscheidung beiträgt, indem sie die Funktion des mrp2 teilweise übernimmt und ausgleicht. Folgendes Modell der Oligonukleotidausscheidung könnte die unterschiedlichen Kinetiken bei Wistar- und TR⁻-Ratten erklären:

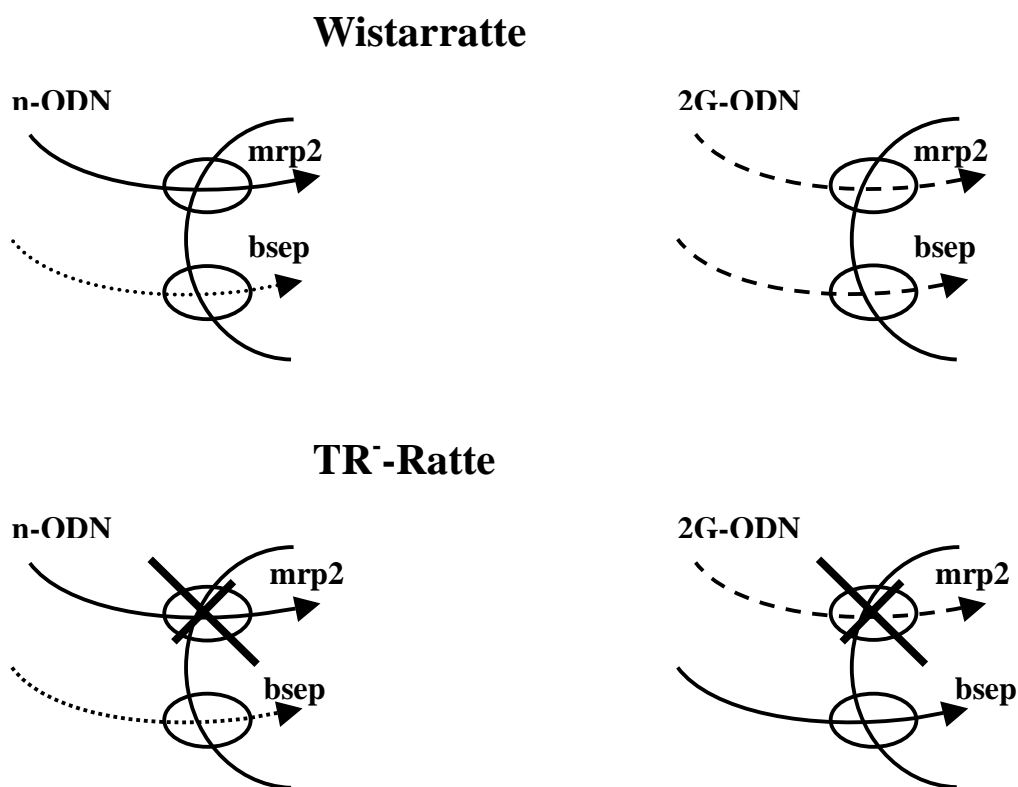


Abb. 5.1: Modell der Ausscheidung von Oligonukleotidderivaten in Wistar- und TR⁻-Ratten. Linien mit durchgezogenen Linien symbolisieren den Hauptausscheidungsweg, gestrichelte Linien weniger bevorzugte Transporter. Kreuze stehen für den bei TR⁻-Ratten nicht vorhandenen mrp2.

Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass mixed backbone Oligonukleotide schnell und hauptsächlich in intakter Form in die Galle ausgeschieden werden. Die zelluläre Clearance von Oligonukleotiden wurde durch Konjugation mit zwei Gallensäuren erhöht; bei Wistarratten wurde das 2G-ODN fünf Mal effektiver biliär sezerniert als das unkonjugierte Oligonukleotide n-ODN. Das 2G-ODN wurde ferner in höherem Maße in die Galle von TR⁻-Ratten sezerniert als das n-ODN in die Galle von Wistarratten. Vor allem Gallensäure-konjugierte Oligonukleotide könnten in Abwesenheit des mrp2 auch über die Bsep biliär

sezerniert werden. Es ist noch zu klären, ob dieser Ausweichmechanismus eine physiologische Bedeutung hat.

Das für die Galleausscheidungsversuche gewählte 15mer hybridisiert auf Grund seiner Nukleotidsequenz nicht mit mRNA von Ratten (Starke et al. 2001). Trotzdem waren nach zwei Stunden noch geringe Mengen von Oligonukleotid in der Leber der behandelten Tiere zu finden, wobei das 2G-ODN in höheren Konzentrationen vorlag als das n-ODN. Bis-Gallensäure-konjugierte Oligonukleotide sind wahrscheinlich trotz der viel besseren hepatobiliären Elimination besser für eine auf die Leber gerichtete Antisense-Therapie geeignet als n-ODN. Voraussetzung hierfür ist jedoch, dass die Gallensäurekonjugation die Hybridisierung von Antisense-Oligonukleotiden mit ihrer spezifischen Ziel-RNA nicht stört. In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von Ntcp-cRNA in *Xenopus laevis*-Oozyten gehemmt; dabei erwies sich das 2G-ODN als ebenso wirksam wie das n-ODN. Andere Gruppen zeigten ebenfalls, dass Cholesterol-Konjugate die Hybridisierung mit Ziel-RNA nicht verhindern (Boutorine und Kostina 1993). Unter gewissen Umständen (Länge der Linkermoleküle, Länge der Nukleotidkette, Position der gekoppelten Verbindung) ist eine Wechselwirkung der gekoppelten Molekülteile mit der Ziel-RNA vermeidbar. Deshalb erscheint es nicht unrealistisch, therapeutische Fortschritte mit Gallensäure-gekoppelten Oligonukleotiden in vivo zu erwarten. Dies ist besonders für virale Leberinfektionen wie Hepatitis B oder C interessant. Antisense-Oligonukleotide gelten in diesem Bereich als viel versprechende Kandidaten für eine verbesserte Therapie (Wu und Wu 1992, Nakazano et al. 1996, Offensperger et al. 1998).

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Galleausscheidung von unkonjugierten Oligonukleotiden und ihren 3',5'-Bis-Gallensäure-Konjugaten an anesthetisierten Ratten untersucht. Sowohl ein 15mer mixed backbone Oligodeoxynukleotid (n-ODN) als auch das 3',5'-Bis-Gallensäure-Konjugat waren ausreichend stabil und ließen sich in der Galle nachweisen. Hierbei war die in situ-Ausscheidung des 2G-ODN mit bis zu 25 % der applizierten Menge vier bis fünf Mal höher als die des n-ODN mit etwa 5 %. TR⁻-Ratten, die den canalikulären Transporter mrp2 (multidrug resistance associated protein 2) nicht besitzen, schieden insgesamt nur 40-50 % dieser Menge aus, nämlich ca. 12 % des injizierten 2G-ODN bzw. 2 % des applizierten n-ODN. Im Gegensatz zu Wistarratten zeigte sich bei der biliären Sekretion der Oligonukleotide durch TR⁻-Ratten kein exkretorischer Peak, sondern eine Schulterbildung.

Um eine Beteiligung des mrp2 an der Exkretion der Oligonukleotide in die Galle zu untersuchen, wurden mehrere Substrate canalikulärer Transporter kurz vor Injektion der Oligonukleotide appliziert und die in situ-Galleausscheidung der Oligonukleotide bestimmt. Unter diesen Substraten befanden sich die beiden mrp2-Substrate Sulfbromophthalein (BSP) und S 3025. Bei S 3025 handelt es sich um ein neuartiges Chlorogensäurederivat, das die Glucose-6-Phosphat-Translokase inhibiert. In Vorversuchen wurde gezeigt, dass S 3025 die Ausscheidung des oatp1/mrp2-Substrates BSP hemmt, die des Ntcp/Bsep-Substrates Taurocholat jedoch nicht. Sowohl BSP als auch S 3025 hemmten die Galleausscheidung der Oligonukleotide in konzentrationsabhängiger Weise. BSP führte bei Wistarratten zu einer konzentrationsabhängig verzögerten Ausscheidung der Oligonukleotide, veränderte die sezernierte Gesamtmenge jedoch nicht. Dagegen nahm die hepatobiliäre Sekretion der Oligonukleotide bei TR⁻-Ratten nach Präinjektion von BSP weiter ab. Das Chlorogensäurederivat S 3025 verzögerte den Verlauf und verringerte die Gesamtmenge der Oligonukleotidausscheidung bei Wistarratten in konzentrationsabhängiger Weise; die Hemmwirkung war beim 2G-ODN stärker als beim n-ODN. Auf die Oligonukleotid-Ausscheidung der mrp2-defizienten TR⁻-Ratten hatte S 3025 keinen Einfluss. Aus diesen Versuchen wurde der Schluss gezogen, dass bei Wistarratten n-ODN und 2G-ODN hauptsächlich über den zur ABC-Transporterfamilie gehörenden mrp2 in die Galle sezerniert werden. Fehlt dieser Transporter, wie im Falle der TR⁻-Ratten, erfolgt die Ausscheidung über den ebenfalls zur ABC-Carrierfamilie gehörenden Transporter Bsep (bile salt export pump). Hierbei werden die Gallensäure-konjugierten Oligonukleotide noch besser ausgeschieden als n-ODN über den mrp2.

Sowohl S 3025 als auch BSP veränderten die Verteilung der Oligonukleotide auf die Organe: Im Falle einer Applikation von 15 µmol BSP bei Wistarratten bzw. 5 µmol BSP bei TR⁻-Ratten nahm die Oligonukleotidmenge in der Leber stark ab und in der Niere zu. Nach Applikation von 5 µmol S 3025 erhöhten sich bei Wistarratten die Oligonukleotidmengen in Leber und Serum; bei TR⁻-Ratten wurden keine Veränderungen festgestellt. Die Gabe von 15 µmol S 3025 verminderte die Oligonukleotidmengen in allen Organen, woraus gefolgert

wurde, dass die Oligonukleotidausscheidung über den mrp2 über den gesamten Versuchszeitraum stark inhibiert war. Da mrp2 in vielen Organen exprimiert wird, besonders in Leber, Niere und Lunge, war die Verweilzeit der Oligonukleotide im Blut verlängert, aus dem sie schließlich über den im renalen Tubulus exprimierten mrp1 in den Urin sezerniert wurden. Keinen Einfluss auf die hepatobiliäre Oligonukleotid-Ausscheidung hatten die mrp2-Substrate 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol und MK 571 sowie das P-Glycoprotein-Substrat (pgp-Substrat) Sirolimus.

Gallensäure-konjugierte Phosphorothioate sind prinzipiell für Antisense-Anwendungen geeignet. Wurde die cRNA des basolateralen Transporters Ntcp (Na^+ -dependent taurocholate cotransporting polypeptide) der Ratte in Gegenwart eines Antisense-Oligonukleotids, an das zwei Cholsäuremoleküle in 3'- und 5'-Position gekoppelt wurden, inkubiert und anschließend in *Xenopus laevis*-Oozyten injiziert, ging die Ntcp-Expression unabhängig von einer Gallensäurekonjugation oder Backbone-Modifikation der Antisense-Oligonukleotide drastisch zurück. Dagegen führte die Coinjektion von Ntcp-cRNA und Sense-Oligonukleotiden oder Oligonukleotiden mit einer Zufallsequenz zwar ebenfalls zu einem Rückgang der Taurocholataufnahme; dieser Rückgang war jedoch deutlich geringer als im Falle der Antisense-Oligonukleotide.

Die Ergebnisse zeigen, dass Endonuclease-stabile mixed backbone Phosphorothioat-Oligonukleotide während einer Leberpassage in vivo intakt bleiben. Sowohl Gallensäure-konjugierte als auch unkonjugierte Oligonukleotide werden nach Bolusinjektion rasch in die Galle ausgeschieden, wobei die Gallensäurekonjugation den Anteil des in die Galle sezernierten Oligonukleotids um das Vier- bis Fünffache steigert. Die Ausscheidung erfolgte hauptsächlich über den canalikulären Transporter mrp2. Daneben spielt jedoch vermutlich noch ein weiterer, über den Bsep-Transporter laufender Ausscheidungsweg eine Rolle. Gallensäure-konjugierte Phosphorothioat-Oligonukleotide sind geeignete Kandidaten für Antisense-Therapien bei Lebererkrankungen: Die Backbone-Modifikation erhöht die Nukleasestabilität, die Gallensäurekonjugation erhöht die Leberpassage, und eine Antisense-Wirkung bleibt von beiden Strukturveränderungen unberührt.

7 Summary

In the present thesis, biliary excretion of unconjugated oligonucleotides and their 3',5'-bis bile acid derivatives were investigated by examining anesthetized rats. A 15 mer mixed backbone oligodeoxynucleotide as well as the corresponding 3',5'-bile acid conjugate were sufficiently stable and detectable in bile.

The in situ bile excretion of 2G-ODN by wistar rats revealed that up to 25 % of the applied dose, resp. four to five times more than that of n-ODN (about 5 %), were excreted via the biliary pathway. TR⁻ rats lacking the canalicular transporter mrp2 (multidrug resistance protein 2) showed an overall excretion of 40-50 % of the amount secreted into bile by wistar rats, i.e. 12 % of the injected 2G-ODN resp. 2 % of the applied n-ODN. In contrast to the excretory curves obtained with wistar rats, biliary secretion of oligonucleotides by TR⁻ rats did not show an excretory peak. The curve instead showed a shoulder which remained constant over a long period of time.

In order to determine the participation of the canalicular transporter mrp2 in the hepatobiliary excretion of oligonucleotides, several substrates of different canalicular transporters were applied shortly before oligonucleotide injection and the in situ bile secretion of the oligonucleotides was investigated subsequently. Among these were mrp2 substrates Sulfbromophthalein (BSP) and S 3025. The latter, S 3025, represents a novel chlorogenic acid derivative which inhibits glucose-6-phosphate translocase. Preliminary experiments clearly demonstrated that S 3025 inhibits the biliary excretion of the oatp1 / mrp2 substrate BSP but not that of the Ntcp / Bsep substrate taurocholate. Both BSP and S 3025 inhibited hepatobiliary secretion of the oligonucleotides in a concentration-dependent manner. In wistar rats, BSP preinjection delayed oligonucleotide excretion in a concentration-dependent manner, whereas no influence on total excretory amount was observed. On the other hand, the oligonucleotide secretion of TR⁻ rats diminished in the presence of BSP. The chlorogenic acid derivative S 3025 caused a delayed excretion of both oligonucleotides and a reduction in the total amount excreted. The extent of these effects depended on the S 3025 concentration and also on the oligonucleotide; 2G-ODN was more strongly affected by the inhibitory effect of S 3025 than n-ODN. On the contrary, S 3025 had no influence on oligonucleotide excretion of mrp2-deficient TR⁻ rats.

The results thus obtained led to the conclusion that the ABC transporter mrp2 is the main excretory pathway for n-ODN and 2G-ODN in Wistar rats. If this transporter is lacking, as with TR⁻ rats, biliary excretion occurs via the ABC carrier Bsep (bile salt export pump). The excretion of bile acid-conjugated oligonucleotides via Bsep is even more efficient than excretion of unconjugated oligonucleotides via mrp2.

Both S 3025 and BSP changed organ distribution of the applied oligonucleotides. Preinjection of 15 µmol BSP led to increased amounts of oligonucleotides in wistar rat livers, whereas the amounts in the kidney decreased. The same result was obtained when TR⁻ rats received 5 µmol BSP prior to oligonucleotide injection. Due to the injection of 5 µmol S 3025, total oligonucleotide amounts in the liver and serum of wistar rats increased; under the same

conditions, TR⁻ rats showed no effect. After application of 15 μmol S 3025, total oligonucleotide amounts decreased in any examined organ of wistar rats which could be a consequence of overall inhibition of oligonucleotide excretion via the mrp2 pathway during the whole period of measurement. As mrp2 is expressed in many organs, especially in the liver, kidney and lung, oligonucleotides were retained in blood for a longer period of time and finally excreted into urine via mrp1, which is expressed in the renal tubules. No influence on organ distribution was observed when mrp2 substrates 1-chloro-2,4-dinitrobenzene and MK 571 or Pgp (P-glycoprotein) substrate Sirolimus were applied prior to oligonucleotide injection.

In principle, bile acid-conjugated phosphorothioates are suitable tools for antisense applications. If the cRNA of the rat basolateral transporter Ntcp (Na⁺-dependent taurocholate cotransporting polypeptide) was incubated together with an antisense oligonucleotide bearing cholic acid molecules on both the 3' and 5' end and subsequently injected into *Xenopus laevis* oocytes, Ntcp expression diminished drastically. This inhibitory effect did not depend on backbone modification or bile acid conjugation of the antisense oligonucleotides. On the other hand, coinjection of Ntcp cRNA together with sense or scrambled oligonucleotides in fact reduced taurocholic acid uptake of the oocytes, but to a significantly lesser extent than the antisense oligonucleotides.

These results obtained in the present thesis clearly demonstrate that endonuclease-resistant bile acid- mixed backbone phosphorothioate oligonucleotide conjugates remain intact during liver passage. After bolus injection, conjugated as well as unconjugated oligonucleotides are rapidly excreted into bile, whereby bile acid conjugation leads to a four- to five fold increase of the biliary excreted part of the applied oligonucleotides. Hepatobiliary excretion mainly occurs via the canalicular transporter mrp2. Furthermore, an additional excretory pathway involving Bsep transporter contributes to biliary excretion of oligonucleotides. Bile acid conjugated oligonucleotides are suitable candidates for antisense therapies of liver diseases: backbone modification confers a higher nuclease stability, bile acid conjugation bestows a better passage through liver, and antisense effects remain unchanged by either of these structural modifications.

8 Literatur

- Afonina I, Kutuyavin I, Lukhtanov E, Meyer RB and Gamper H (1996): Sequence-specific arrest of primer extension on single-stranded DNA by an Oligonucleotide-minor groove binder conjugate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 3199-3204
- Agrawal S (1999): Importance of nucleotide sequence and chemical modifications of antisense oligonucleotides. *Biochim. Biophys. Acta* 1489, 53-68
- Agrawal S, Zhao Q, Jiang Z, Oliver C, Giles H, Heath J and Serota S (1997): Toxicologic Effects of an Oligodeoxynucleotide Phosphorothioate and Its Analogs Following Intravenous Administration in Rats. *Antisense Nucl. Acid Drug Dev.* 7, 575-584
- Agrawal S and Zhao Q (1998): Antisense therapeutics. *Trends Biotechnol.* 14, 376-387
- Akhteruzzaman S, Kato Y, Hisaka A and Sugiyama Y (1999): Primary Active Transport of Peptidic Endothelin Antagonists by Rat Hepatic Canalicular Membrane. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 288, 575-581
- Akita H, Suzuki H, Ito K, Sato N, Takikawa H and Sugiyama Y (2001): Characterization of bile acid transport mediated by multidrug resistance associated protein 2 and bile salt export pump. *Biochim. Biophys. Acta* 1511, 7-16
- Alahari SK, DeLong R, Fisher MH, Dean NM, Villet P and Juliano RL (1998): Novel chemically modified oligonucleotides provide potent inhibition of P-glycoprotein by phosphorothioate and 5'-cholesterol-conjugated phosphorothioate antisense oligonucleotides. *Mol. Pharmacol.* 50, 808-819
- Aldrian-Herrada G, Rabie A, Fisher MH, Dean NM, Villet P and Juliano RL (1998): Solid-phase synthesis of peptide nucleic acid (PNA) monomers and their oligomerisation using disulphide anchoring linkers. *J. Pept. Sci.* 4, 266-81
- Altmann KH, Babbro D, Dean NM, Geiger T, Monia BP, Müller M and Nicklin P (1995): Second-generation antisense oligonucleotides: structure-activity relationships and the design of improved signal-transduction inhibitors. *Biochem. Soc. Trans.* 24, 630-637
- Anwer MS (1998): Cellular and molecular biology of the liver. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 14, 182-190
- Arima H, Sakamoto T, Aramaki Y, Ishidate K and Tsuchiya S (1997): Specific inhibition of nitric oxide production in macrophages by phosphorothioate antisense oligonucleotides. *J. Pharm. Sci.* 86, 1079-1084
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA and Struhlis K (eds.) (1995): Current protocols in molecular biology. Wiley, New York
- Baertschi AJ (1994): Antisense oligonucleotide strategies in physiology. *Mol. Cell Endocrinol.* 101, R15-R24
- Baldini G, Passamonti S, Lunazzi GC, Tiribelli C and Sottocasa GL (1986): Cellular localization of sulfobromophthalein transport activity in rat liver. *Biochim. Biophys. Acta* 856, 1-10
- Ballatori N, Rebbeor JF, Connolly GC, Seward DJ, Lenth BE, Henson JH, Sundaram P and Boyer JL (2000): Bile salt excretion in skate liver is mediated by a functional analog of Bsep/Spgp, the bile salt export pump. *Am. J. Physiol.* 278, G57-G63

- Beck J and Nassal M (1995): Efficient hammerhead ribozyme-mediated cleavage of the structured hepatitis B virus encapsidation signal in vitro and in cell extracts, but not in intact cells. *Nucl. Acids. Res.* 23, 4954-4962
- Bennett CF, Chiang MY, Chan H, Shoemaker JEE and Mirabelli CK (1992): Cationic lipids enhance cellular uptake and activity of phosphorothioate antisense oligonucleotides. *Mol. Pharmacol.* 41, 1023-1033
- Bennett CF, Condon TP, Grimm S, Chan H and Chiang MY (1994): Inhibition of endothelial cell adhesion molecule expression with antisense oligonucleotides. *J. Immunol.* 152, 3530-3540
- Biessen EAL, Vietsch H, Rump, ET, Fluiter K, Kuiper J, Bijsterbosch MK and van Berkel TJC (1999): Targeted delivery of oligodeoxynucleotides to parenchymal liver cells in vivo. *Biochem. J.* 240, 783-792
- Bijsterbosch MK, Manoharan M, Rump ET, De Vruhe RLA, van Veghel R, Tivel KL, Bennett CF, Cook PD and van Berkel TJC (1997): In vivo fate of phosphorothioate antisense oligodeoxynucleotides: predominant uptake by scavenger receptors on endothelial liver cells. *Nucl. Acids Res.* 25, 3290-3296
- Bijsterbosch MK, Rump ET, DeVruhe RLA, Dorland R, van Veghel R, Tivel KL, van Berkel TJC and Manoharan M (2000): Modulation of plasma protein binding and in vivo liver cell uptake of phosphorothioate oligodeoxynucleotides by cholesterol conjugation. *Nucl. Acids Res.* 28, 2717-2725
- Boiziau C, Debart G, Rayner B, Imbach JL and Toulmé JJ (1995): Chimeric alpha-beta oligonucleotides as antisense inhibitors of reverse transcription. *FEBS Lett.* 361, 41-45
- Bonfils E, Deperriex C, Midoux P, Thuong NT, Monsigny M and Roche AC (1992): Drug targeting: synthesis and endocytosis of oligonucleotide-neoglycoprotein conjugates. *Nucl. Acids. Res.* 20, 4621-4629
- Borst P, Evers R, Kool M and Wijnholds J (1999): The multidrug resistance protein family. *Biochim. Biophys. Acta* 1461, 347-357
- Boutorine AS and Kostina EV (1993): Reversible covalent attachment of cholesterol to oligodeoxyribonucleotides for studies of the mechanism of their penetration into eucaryotic cells. *Biochimie* 75, 35-41
- Bouwens L, de Bleser P, Vanderkerken K, Geerts B and Wisse E (1992): Liver Cell Heterogeneity: Functions of Non-Parenchymal Cells. *Enzyme* 46, 155-168
- Bramlage B and Eckstein F (1997): Das Hammerhead-Ribozym zur Inhibition der Genexpression. *Bioforum* 20, 134-137
- Bramow S, Ott P, Nielsen FT, Bangert K, Tygstrup N and Dalhoff K (2001): Cholestasis and Regulation of Genes Related to Drug Metabolism and biliary Transport in Rat Liver Following Treatment with Cyclosporine A and Sirolimus (Rapamycin). *Pharmacol. Toxicol.* 89, 133-139
- Büchler M, König J, Brom M, Kartenbeck J, Spring H, Horie T and Keppler D (1996): cRNA cloning of the hepatocyte canalicular isoform of the multidrug resistance protein, cMRP, reveals a novel conjugate export pump deficient in hyperbilirubinemic mutant rats. *J. Biol. Chem.* 271, 15091-98
- Burckhardt G, Kramer W, Wilson FA and Kurz G (1984): Investigation of the rat renal bile salt transport system by photoaffinity labeling. *Pflüger's Arch.* 400, R29

- Burckhardt G, Kramer W, Kurz W and Wilson FA (1987): Photoaffinity labeling studies of the rat renal sodium/bile salt cotransport system. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 143, 1018-1023
- Burke JM (1996): Hairpin ribozyme: current status and future prospects. *Biochem. Soc. Trans.* 24, 608-615
- Burwen SJ and Jones AL (1990): Hepatocellular processing of endocytosed proteins. *J. Electron. Microsc. Tech.* 14, 140-151
- Butler M, Stecker K and Bennett CF (1997): Cellular Distribution of Phosphorothioate Oligodeoxynucleotides in Normal Rodent Tissues. *Lab. Invest.* 77, 379-388
- Butler M, Crooke RM, Graham MJ, Lemonidis KM, Lougheed M, Murray SF, Witchell D, Steinbrecher U and Bennett CF (2000): Phosphorothioate Oligodeoxynucleotides Distribute Similarly in Class A Scavenger Receptor Knockout and Wild-Type Mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 292, 489-496
- CS Chem 3D 5.0 for Windows and Macintosh. User's Guide. Cambridge Soft Corp., Cambridge Park, Massachusetts, USA 1998
- Cazenave C, Stein CA, Loreau N, Thuong NT, Neckers LM, Subasinghe C, Hélène C, Cohen JS and Thoulmé JJ (1989): Comparative inhibition of rabbit globin mRNA translation by modified antisense oligodeoxynucleotides. *Nucl. Acids Res.* 17, 4255-4273
- Cech TR, Zaug AJ and Grabowski PJ (1981): In vitro splicing of the ribosomal RNA precursor of Tetrahymena: involvement of a guanosine nucleotide in the excision of the intervening sequence. *Cell* 64, 281-302
- Cech TR and Bass BL (1986): Biological catalysis by RNA. *Ann. Rev. Biochem.* 55, 599-626
- Chen TZ, Lin SB, Wu JC, Choo KB and Au LC (1996): A method for screening antisense oligodeoxyribonucleotides effective for mRNA translation-arrest. *J. Biochem.* 119, 252-259
- Childs S, Yeh RL, Hui D and Ling V (1998): Taxol resistance mediated by transfection of the liver-specific sister gene of P-glycoprotein. *Cancer Res.* 58, 4160-4167
- Chu XY, Kato Y and Sugiyama Y (1998): Possible Involvement of P-Glycoprotein in Biliary Excretion of CPT-11 in Rats. *Drug Metab. Dispos.* 27, 440-441
- Clarenc JP, Degols G, Leonetti JP, Milhaud P and Lebleu B (1993): Delivery of antisense oligonucleotides by poly (L-lysine) conjugation and liposome encapsulation. *Anti-Cancer Drug Des.* 8, 81-94
- Coleman R (1987): Biochemistry of bile secretion. *Biochem. J.* 244, 249-261
- Crooke ST (1993): Progress toward oligonucleotide therapeutics: pharmacodynamic properties. *FASEB J.* 7, 533-539
- Crooke ST (1998): An Overview of Progress in Antisense Therapeutics. *Antisense Nucl. Acid Drug Dev.* 8, 115-122
- Crooke ST, Graham MJ, Zuckerman JE, Brooks D, Conklin BS, Cummins LL, Greig MJ, Guinosso CJ, Kornbrust D, Manoharan M, Sasmor HM, Schleich T, Tivel KL and Griffey RH (1996): Pharmacokinetic Properties of Several Oligonucleotide Analogs in Mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 277, 923-937

- Crooke ST and Bennett CF (1996): Progress in antisense oligonucleotide therapeutics. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 36, 107-129
- Curcio LD, Bouffard DY and Scanlon KJ (1997): Oligonucleotides as modulators of cancer gene expression. *Pharmacol. Ther.* 74, 317-332
- Dean NM, McKay R, Condon TP and Bennett CF: Inhibition of protein kinase C- α expression in human A 549 cells by antisense oligodeoxynucleotides inhibits induction of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM) mRNA by phorbol esters. *J. Biol. Chem.* 269, 16416-16424
- Degols G, Leonetti JP, Gagnor C, Lemaitre M and Lebleu B (1989): Antiviral activity and possible mechanisms of action of oligonucleotides-poly(L-lysine) conjugates targeted to vesicular stomatitis virus mRNA and genomic RNA. *Nucl. Acids Res.* 17, 9341-9350
- Degols G, Leonetti JP, Mechti N and Lebleu B (1991): Antiproliferative effects of antisense oligonucleotides directed to the RNA of c-myc oncogene. *Nucl. Acids Res.* 19, 945-948
- Denzlinger C, Grimberg M, Kapp A, Haberl C and Wilmanns W (1991): Effect of the leukotriene receptor antagonists FPL 55712, LY 163443, and MK-571 on the elimination of cysteinyl leukotrienes in the rat. *Br. J. Pharmacol.* 102, 865-870
- Depré M, Malgorskie DJ, Van Hecken A, Hsieh JSY, Buntinx A, De Schepper PJ and Rogers JD (1992): Dose-dependent kinetics of the enantiomers of MK-571, an LTD₄-receptor antagonist. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 43, 431-433
- Deters M, Nolte K, Kirchner G, Resch K and Kaefer V (2001): Comparative study analyzing effects of sirolimus-cyclosporin and sirolimus-tacrolimus combinations on bile flow in the rat. *Dig. Dis. Sci.* 46, 2120-6
- Earnshaw DJ and Gaith MJ (1997): Progress toward the structure and therapeutic use of the hairpin ribozyme. *Antisense Nucleic Acid. Drug Dev.* 7, 403-411
- Eckhardt U, Horz JA, Petzinger E, Stüber W, Reers M, Dickneite G, Daniel H, Wagener M, Hagenbuch B, Stieger B and Meier pJ (1996): The peptide-based thrombin inhibitor CRC 220 is a new substrate of the basolateral rat liver organic anion-transporting polypeptide. *Hepatology* 24, 380-384
- Eckstein F (1996): The hammerhead ribozyme. *Biochem. Soc. Trans.* 24, 601-604
- Ellington AD and Szostak JW (1990): In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* 346, 818-822
- Flanagan WM, Wagner RW, Grant D, Lin KY and Matteucci MD (1999): Cellular penetration and antisense activity by a phenoxazine-substituted heptanucleotide. *Nat. Biotechnol.* 17, 48-52
- Föllmann W, Petzinger E and Kinne RKH (1990): Alterations of bile acid and bumetanide uptake during culturing of rat hepatocytes. *Am. J. Physiol.* 258, C700-C712
- Forgac M (1988): Receptor-mediated endocytosis. In: Arias IM, Jakoby WB, Popper H, Schachter D, and Shafritz DA (Eds.). *The liver: Biology and Pathobiology*. Raven Press, New York, pp. 207-225
- Frijters CMG, Groen AK and Oude Elferink RPJ (1997): MDR2 P-glycoprotein-mediated lipid secretion and its relevance to biliary drug transport. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 25, 201-215

- Gagnor C, Raynor B, Leonetti JP, Imbach JL and Lebleu B (1989): α -DNA IX: parallel annealing of α -anomeric oligodeoxyribonucleotides to natural mRNA is required for interference in RNase H mediated hydrolysis and reverse transcription. *Nucl. Acids Res.* 17, 5107-5114
- Gekeler V, Ise W, Sanders KH, Ulrich WR and Beck J (1995): The leukotriene D₄ receptor antagonist MK571 specifically modulates MRP associated multidrug resistance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 208, 345-352
- Gold L (1995): Oligonucleotides as research, diagnostics, and therapeutic agents. *J. Biol. Chem.* 270, 13581-13584
- Good L and Nielsen PE (1998): Antisense inhibition of gene expression in bacteria by PNA targeted to mRNA. *Nat. Biotechnol.* 16, 355-358
- Goodchild J (1990): conjugates of oligonucleotides and modified oligonucleotides: a review of their synthesis and properties. *Bionconj. Chem.* 1, 165-178
- Goodchild J, Carroll E and Greenbert JR (1988): Inhibition of rabbit b-globin synthesis by complementary oligonucleotides: identification of mRNA sites sensitive to inhibition. *Arch. Biochem. Biophys.* 263, 401-409
- Graham MJ, Crooke ST, Monteith DK, Cooper SR, Lemonidis KM, Stecker KK, Martin MJ and Crooke RM (1998): In vivo distribution and metabolism of a phosphorothioate oligonucleotide within rat liver after intravenous administration. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 286, 447-454
- Gregus Z and Klaassen CD (1982): Role of Ligandin as a Binding Protein and as an Enzyme in the Biliary Excretion of Sulfobromophthalein. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 221, 242-246
- Hagenbuch B (1997): Molecular Properties of Hepatic Uptake Systems for Bile Acids and Organic Anions. *J. Membrane Biol.* 160, 1-8
- Hagenbuch B, Lübbert H, Stieger B and Meier PJ (1990): Expression of the hepatocyte Na⁺/Bile Acid Cotransporter in *Xenopus laevis* oocytes. *J. Biol. Chem.* 265, 5357-60
- Hagenbuch B, Stieger B, Foguet M, Lubbert H and Meier PJ (1991): Functional expression cloning and characterization of the hepatocyte Na⁺/bile acid cotransport system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 23; 10629-33
- Hagenbuch B, Scharschmidt BF and Meier PJ (1996): Effect of antisense oligonucleotides on the expression of hepatocellular bile acid and organic anion uptake systems in *Xenopus laevis* oocytes. *Biochem. J.* 316, 901-4
- Hagenbuch N, Reichel C, Stieger B, Cattori V, Fattinger KE, Landmann L, Meier PJ and Kullak-Ublick GA (2001): Effect of phenobarbital on the expression of bile salt and organic anion transporters of rat liver. *J. Hepatol.* 34, 881-887
- Hamilton KO, Topp E, Magakiansar I, Siahaan T, Yazdanian M and Audus KL (2001): Multidrug Resistance-Associated Protein-1 Functional Activity in Calu-3 Cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 298, 1199-1205
- Hanvey JC, Peffer NJ, Bisi JE, Thomson ST, Cadilla R, Josey JA, Ricca DJ, Hassmann F, Bonham MA, Au KG, Carter SG, Bruckenstein DA, Boyd AL, Noble SA and Babiss LE (1992): Antisense and antigene properties of peptide nucleic acids. *Science* 258, 1481-1485

- Hayes JH, Soroka CJ, Rios-Velez L and Boyer JL (1999): Hepatic Sequestration and Modulation of the Canalicular Transport of the Organic Cation, Daunorubicin, in the Rat. *Hepatology* 29, 483-493
- Hélène C and Thoulmé JJ (1990): Specific regulation of gene expression by antisense, sense and antigene nucleic acids. *Biochim. Biophys. Acta* 1049, 99-125
- Herling AW, Schwab D, Burger HJ, Maas J, Hammerl R, Schmidt D, Strohschein S, Hemmerle H, Schubert G, Petry S and Kramer W (2002): Prolonged blood glucose reduction in mrp2-deficient rats (GY/TR⁻) by the glucose-6-phosphate translocase inhibitor S 3025. *Biochim. Biophys. Acta* 1569, 105-110
- Hickey AJ, Shokri M and Tian Y (1991): Injection site dependence of the appearance of sulfobromophthalein and phenolphthalein in bile. *Biopharm. Drug Dispos.* 12, 633-636
- Ho PTC and Parkinson DR: Antisense oligonucleotides as therapeutics for malignant diseases. *Semin. Oncol.* 24, 1-17
- Hoffmann AF (1994): Biliary secretion and excretion. The hepatobiliary component of the enterohepatic circulation of bile acids. In: Johnson LR (Ed.): Physiology of the gastrointestinal tract. Raven Press, New York, pp.1555-1576
- Hooiveld GJEJ, van Montfoort J, Meijer DKF and Müller M (2001): Function and regulation of ATP-binding cassette transport proteins involved in hepatobiliary transport. *Eur. J. Pharm. Sci.* 12, 525-543
- Hsiang B, Zhu Y, Wang Z, Wu Y, Sasseville V, Yang WP and Kirchgessner TG (1999): A Novel Human hepatic Organic Anion Transporting Polypeptide (OATP2). *J. Biol. Chem.* 274, 37161-37168
- Huang L, Hoffman T and Vore M (1998): Adenosine Triphosphate-Dependent Transport of Estradiol-17 β (β -D-Glucuronide) in Membrane Vesicles by MDR1 Expressed in Insect Cells. *Hepatology* 28, 1371-1377
- Inoue M, Okajima K, Nagase S and Morino Y (1983): Plasma clearance of sulfobromophthalein and its interaction with hepatic binding proteins in normal and albuminemic rats: Is plasma albumin essential for vectorial transport of organic anions in the liver? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 7654-7658
- Inui KI, Masuda S and Saito H (2000): Cellular and molecular aspects of drug transport in the kidney. *Kidney Int.* 58, 944-958
- Irie A, Kijima H, Ohkawa T, Bouffard DY, Suzuki T, Curcio LD, Holm PS, Sassani A and Scanlon KJ (1997): Anti-oncogene ribozymes for cancer gene therapy. *Adv. Pharmacol.* 40, 207-257
- Ito K, Suzuki H, Hirohashi T, Kume K, Shimizu T and Sugiyama Y (1998): Functional analysis of a canalicular multispecific organic anion transporter cloned from rat liver. *J. Biol. Chem.* 273, 1684-88
- Jäger W, Winter O, Halper B, Salamon A, Sartori M, Gajdzik L, Hamilton G, Theyer G, Graf J and Thalhammer T (1997): Modulation of Liver Canalicular Transport Processes by the Tyrosine-Kinase Inhibitor Genistein: Implications of Genistein Metabolism in the Rat. *Hepatology* 26, 1467-76
- James JA, Twomey CM, Mills KI and Gibson I (1996): Specificity of ribozymes against the bcr-ab1 mRNAs in vitro. *Biochem. Soc. Trans.* 24, 409S

- Jansen PLM, Peters WHM and Meijer DKF (1987): Heptobiliary Excretion of Organic Anions in Double-Mutant Rats With a Combination of Defective Canalicular Transport and Uridine 5'-Diphosphate Glucuronyltransferase Deficiency. *Gastroenterology* 93, 1094-1103
- Jansen PLM, van Klinken JW, van Gelder M, Ottenhoff R and Oude Elferink RPJ (1993): Preserved organic anion transport in mutant TR⁻ rats with a hepatobiliary secretion defect. *Am. J. Physiol.* 265, G445-G452
- Jedlitschky G (1999): pers. Mitt.
- Jedlitschky G, Leier I, Buchholz U, Barnouin K, Kurz G and Keppler D (1996): Transport of glutathione, glucuronate, and sulfate conjugates by the MRP gene-encoded conjugate export pump. *Cancer Res.* 56, 988-94
- Jones TR, Zamboni R, Belley M, Champion E, Charette L, Ford-Hutchinson AW, Frenette R, Gauthier JY, Leger S, Masson P, McFarlane CS, Piechuta H, Rokach J, Williams H, Young RN, DeHaven RN and Pong SS (1989): Pharmacology of L-660,711 (MK-571): a novel potent and selective leukotriene D₄ receptor antagonist. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 67, 17-28
- Kandimalla ER, Manning A, Zhao Q, Shaw DR, Byrn RA, Sasisekharan V and Agrawal S (1997): Mixed backbone antisense oligonucleotides: design, biochemical and biological properties of oligonucleotides containing 2'-5'-ribo- and 3'-5'-deoxyribonucleotide segments. *Nucl. Acids Res.* 25, 370-378
- Kashani-Sabet M and Scanlon KJ (1995): Application of ribozymes to cancer gene therapy. *Cancer Gene Ther.* 2, 213-223
- Kast C and Gros P (1997): Topology Mapping of the Amino-terminal Half of Multidrug Resistance-associated Protein by Epitope Insertion and Immunofluorescence. *J. Biol. Chem.* 272, 26479-26487
- Kawaguchi T, Asakawa H, Tashiro Y, Juni K and Sueishi T (1995): Stability, specific binding activity, and plasma concentration in mice of an oligodeoxynucleotide modified at 5'-terminal with polyethylene glycol. *Biol. Pharm. Bull.* 18, 474-476
- Keppler D, Leier I and Jedlitschky G (1997): Transport of glutathione conjugates and glucuronides by the multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2. *Biol. Chem.* 378, 787-91
- Keppler D, Jedlitschky G and Leier I (1998): Transport function and substrate specificity of multidrug resistance protein. *Methods Enzymol.* 292, 607-16
- Keppler D and Kartenbeck J (1996): The canalicular conjugate export pump encoded by the *cmrp/cmoat* gene. *Prog. Liver Dis.* 14, 55-67
- Keppler D and König J (1997): Expression and localization of the conjugate export pump encoded by the MRP2 (cMRP / cMOAT) gene in liver. *FASEB J.* 11, 509-516
- Kerr KM, Sauna ZE and Ambudkar SV (2001): Correlation between Steady-state ATP-Hydrolysis and Vanadate-induced ADP Trapping in Human P-glycoprotein. *J. Biol. Chem.* 276, 8657-8664
- Khan IM and Coulson JM (1993): A novel method to stabilize antisense oligonucleotides against exonuclease degradation. *Nucl. Acids Res.* 21, 2957-2958
- Kijima H, Ishida H, Ohkawa T, Kashani-Sabet M and Scanlon KJ (1995): Therapeutic applications of ribozymes. *Pharmacol. Ther.* 68, 247-267

- Kleuss C, Hescheler J, Ewel C, Rosenthal W, Schultz G and Wittig B (1991): A signment og G-protein subtypes to specific receptors inducing inhibition of calcium currents. *Nature* 353, 43-48
- Knorr R, Trecziak A, Bannwarth W and Gillessen D (1989): New coupling reagents in peptide chemistry. *Tetrahedron Lett.* 30,1927-30
- Kobayashi K, Sogame Y, Hara H and Hayashi K (1990): Mechanism of Glutathione S-conjugate Transport in Canalicular and Basolateral Rat Liver Plasma Membranes. *J. Biol. Chem.* 265, 7737-7741
- Kool M, de Haas M, Scheffer GL, Scheper RJ, van Eijk MJT, Juijn J, Baas F and Borst P: Analysis of the Expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, Homologues of the Multidrug Resistance-associated Protein Gene (MRP1), in Human Cancer Cell Lines. *Cancer Res.* 57, 3537-3547
- Kool M, van der Linden M, de Haas M, Baas F and Borst P (1999): Expression of Human MRP6, a Homologue of the Multidrug Resitance Protein Gene MRP1, in Tissues and Cancer Cells. *Cancer Res.* 59, 175-182
- Kramer W, Wess G, Schubert G, Bickel M, Girbig F, Gutjahr U, Kowalewski S, Baringhaus KH, Ehnsen A, Glombik H, Müllner S, Neckermann G, Schulz S and Petzinger E (1992): Liver-specific Drug Targeting by Coupling to Bile Acids. *J. Biol. Chem.* 267, 18598-18604
- Kramer W, Wess G, Schubert G, Bickel M, Hoffmann A, Baringhaus KH, Ehnsen A, Glombik H, Müllner S, Neckermann G, Schulz S and Petzinger E (1993): Bile acids as carriers for drugs. In: Paumgartner G, Stiehl A and Gerok W (Eds.): Bile Acids and the hepatobiliary System. From basic Science to clinical Practice. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht / Boston / London 1993 (Falk Symposium 68), 161-176
- Kramer W, Wess G, Ehnsen A, Bock K, Falk E, Hoffmann A, Neckermann G, Gantz D, Schulz S, Nickau L, Petzinger E, Turley S and Dietschy JM (1994): Bile acid derived HMG-CoA reductase inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta* 1227, 137-154
- Kramer W and Wess G (1996): Bile acid transport systems as pharmaceutical targets. *Eur. J. Clin. Invest.* 26, 715-732
- Kuipers F, Enserink M, Havinga R, van der Stehen ABM, Hardonk MJ, Fevery J and Vonk RJ (1988): Separate Transport Systems for Biliary Secretion of Sulfated and Unsulfated Bile Acids in the Rat. *J. Clin. Invest.* 81, 1593-1599
- Kullak-Ublick GA, Beuers U and Paumgartner G (1996): Molecular and Functional Characterization of Bile Acid Transport in Human Hepatoblastoma HepG2 Cells. *Hepatology* 23, 1053-1060
- Kullak-Ublick GA, Glasa J, Böker C, Oswald M, Grützner U, Hagenbuch B, Stieger B, Meier PJ, Beuers U, Kramer W, Wess G and Paumgartner G (1997): Chlorambucil-Taurocholate Is Transported by Bile Acid Carriers Expresses in Human Hepatocellular Carcinomas. *Gastroenterology* 113, 1295-1305
- Kullak-Ublick et al. 2000
Kullak-Ublick GA, Stieger B, Hagenbuch B and Meier PJ (2000): Hepatic Transport of Bile Salts. *Sem. Liver Dis.* 20, 273-292

- Kullak-Ublick GA, Ismail M, Stieger B, Landmann L, Huber R, Pizzagalli F, Fattinger K, Meier PJ and Hagenbuch B (2001): Organic Anion-Transporting Polypeptide B (OATP-B) and Its Functional Comparison With Three Other OATPs of Human Liver. *Gastroenterology* 120, 525-533
- Kurisu H, Kamisaka K, Koyo T, Yamasuge S, Igarashi H, Maezawa H, Uesugi T and Tagaya O (1991): Organic anion transport study in mutant rats with autosomal conjugated hyperbilirubinemia. *Life Sci.* 49, 1003-11
- Kusuhara H, Han YH, Shimoda M, Kokue E, Suzuki H and Sugiyama Y (1998a): Reduced folate derivatives are endogenous substrates for cMOAT in rats. *Am. J. Physiol.* 275, G789-G796
- Kusuhara H, Suzuki H, Naito M, Tsuruo T and Sugiyama Y (1998b): Characterization of Efflux Transport of Organic Anions in a Mouse Brain Capillary Endothelial Cell Line. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 285, 1260-1265
- Labori KJ, Bjørneth BA, Hattum E, Lyberg T and Ræder MG (2000): Intravenous Bilirubin, Dibromosulfophthalein, and Bromosulfophthalein Infusions Uncouple Biliary Phospholipid and Cholesterol Secretion by Inhibiting Hepatic Phosphoglycoprotein-3 Activity in Pigs. *Scand. J. Gastroenterol.* 2000, 873-882
- Lebleu B, Robbins I, Bastide L, Vives E and Gee JE (1997): Pharmacokinetics of oligonucleotides in cell culture. Discussion. *Ciba Found Symp.* 209, 54-59
- Lecureur V, Sun D, Hargrove P, Schuetz EG, Kim RB, Lan LB and Schuetz JD (2000): Cloning and expression of murine sister of P-glycoprotein reveals a more discriminating transporter than MDR1/P-glycoprotein. *Mol. Pharmacol.* 57, 24-35
- Lee JM, Trauner M, Soroka CJ, Stieger B, Meier PJ and Boyer JL (2000): Expression of the Bile Salt Export Pump Is Maintained After Chronic Cholestasis in the Rat. *Gastroenterology* 118, 163-172
- Levy CM and Bender J (1963): Physiology of dye extraction by the liver: Comparative studies of sulfobromophthalein and indocyanine green. *Ann. NY Acad. Sci.* 111, 161-175
- Lehmann TJ and Engels JW (2001): Synthesis and Properties of Bile Acid Phosphoramidites 5'-Tethered to Antisense Oligodeoxynucleotides Against HCV. *Bioorg. Med. Chem.* 9, 1827-1835
- Leier I, Jedlitschky G, Buchholz U, Cole SPC, Deeley R and Keppler D (1994): The MRP gene encodes an ATP-dependent export pump for Leukotriene C₄ and structurally related conjugates. *J. Biol. Chem.* 269, 27807-27810
- Lewin B (1998): *Molekularbiologie der Gene*. 6. Auflage, Spektrum Verlag, Heidelberg 1998
- Lin KY, Jones RJ and Matteucci MD (1995): Tricyclic 2'-Deoxycytidine analogs: syntheses and incorporation into oligonucleotides which have enhanced binding to complementary RNA. *J. Am. Chem. Soc.* 117, 3873-3874
- Liu J, Chen H, Miller DS, Saavedra JE, Keefer LK, Johnson DR, Klaassen CD and Waalkes MP (2001): Overexpression of Glutathione S-Transferase II and Multidrug Resistance Transport Proteins Is Associated with Acquired Tolerance to Inorganic Arsenic. *Mol. Pharmacol.* 60: 302-309
- Lo A and Burckhardt GJ (1999): P-glycoprotein and Drug Therapy in Organ Transplantation. *J. Clin. Pharmacol.* 39, 995-1005

- Lu XM, Fischmann AJ, Jyawook SL, Hendricks K, Tompkins RG and Yarmush ML (1994): Antisense DNA Delivery In Vivo: Liver Targeting by Receptor-Mediated Uptake. *J. Nucl. Med.* 35, 269-275
- Madon J, Eckhardt U, Gerloff T, Stieger B and Meier PJ (1997): Functional expression of the rat liver canalicular isoform of the multidrug resistance-associated protein. *FEBS Letters* 406, 75-78
- Madon J, Hagenbuch B, Landmann L, Meier PJ and Stieger B (2000): Transport Function and Hepatocellular Localization of mrp6 in Rat Liver. *Mol. Pharmacol.* 57, 634-641
- Mahato RI, Takemura S, Akematsu K, Nishikawa M, Takakura Y and Hashida M (1997): Physicochemical and Disposition Characteristics of Antisense Oligonucleotides Complexed with Glycosylated Poly-L-Lysine. *Biochem. Pharmacol.* 53, 887-895
- Maher LJ, Wold B and Dervan PB (1991): Oligonucleotide-directed DNA triple-helix formation: an approach to artificial repressors? *Antisense Res. Dev.* 1, 277-281
- Makowski P and Piłkuła S (1997): Participation of the Multispecific Organic Anion Transporter in Hepatobiliary Excretion of Glutathione S-Conjugates, Drugs and Other Xenobiotics. *Pol. J. Pharmacol.* 49, 387-394
- Manoharan M, Johnson LK, Bennett CF, Vickers TA, Ecker DJ, Cowser LM, Freier SM and Cook PD (1994): Cholic Acid- Oligonucleotide Conjugates for Antisense Applications. *Biorg. Med. Chem. Lett.* 4, 1053-1060
- Marcus-Sekura CJ (1988): Techniques for using antisense oligodeoxynucleotides to study gene expression. *Anal. Biochem.* 172, 289-295
- Marr JJ (1996): Ribozymes as therapeutic agents. *Drug Deliv. Today* 1, 94-102
- Marschall P, Thomson JB and Eckstein F (1994): Inhibition of gene expression with ribozymes. *Cell. Mol. Neurobiol.* 14, 523-538
- Masuda M, I'izuka Y, Yamazaki M, Nishigaki R, Kato Y, Ni'inuma K, Suzuki H and Sugiyama Y (1997): Methotrexate Is Excreted into the Bile by Canalicular Multispecific Organic Anion Transporter in Rats. *Cancer Res.* 57, 3506-3510
- Matteucci MD and Wagner RW (1996): In pursuit of antisense. *Nature* 384, Supp. 20-22
- Meier PF, Eckhardt U, Schroeder A, Hagenbuch B and Stieger B (1997): Substrate Specificity of Sinusoidal Bile Acid and Organic Anion Uptake Systems in Rat and Human Liver. *Hepatology* 26, 1667-1677
- Meijer DKF (1987): Current concepts on hepatic transport of drugs. *J. Hepatol.* 4, 259-268
- Meijer DKF and Molema D (1995): Targeting of drugs to the liver. *Sem. Liver Dis.* 15, 202-256
- Mignet N, Tosquellas G, Barber I, Morvan F, Rayner B and Imbach JL (1997): The prooligonucleotide approach: synthesis and stability of chimeric prooligonucleotides in culture medium and in total cell extract. *New. J. Chem.* 21, 73-79
- Miller PS (1991): Oligonucleoside methylphosphonates as antisense reagents. *Biotechnol.* 9, 358-362
- Milligan JF, Matteucci MD and Martin JC (1993): Current concepts in antisense drug design. *J. Med. Chem.* 36, 1923-1937

- Mills CO, Milkiewicz P, Müller M, Roma MG, Havinga R, Coleman R, Kuipers F, Jansen P and Elias E (1999): Different pathways of canalicular secretion of sulfated and non-sulfated fluorescent bile acids: A study in isolated hepatocyte couplets and TR- rats. *J. Hepatol.* 31, 678-684
- Mirabelli CK, Bennett CF, Anderson K and Crooke ST (1991): In vitro and in vivo pharmacologic activities of antisense oligonucleotides. *Anti-Cancer Drug Des.* 6, 647-661
- Monia BP, Hohnston JF, Ecker DJ, Zounes MA, Lima WF and Freier SM (1992): Selective inhibition of mutant Ha-ras mRNA expression by antisense oligonucleotides. *J. Biol. Chem.* 267, 19954-19962
- Müller M, Meijer C, Zaman GJR, Borst P, Scheper RJ, Mulder NH, DeVries EGE and Jansen PLM (1994): Overexpression of the gene encoding the multidrug resistance-associated protein results in increased ATP-dependent glutathione S-conjugate transport. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 13033-13037
- Müller M and Jansen PLM (1997): Molecular aspects of hepatobiliary transport. *Am. J. Physiol.* 272, G1285-G1303
- Müller N and Petzinger E (1988): Hepatocellular uptake of aflatoxin B1 by non-ionic diffusion. Inhibition of bile acid transport by interference with membrane lipids. *Biochim. Biophys. Acta* 938, 334-344
- Nakazano K, Ito Y, Wu CH and Wu GY (1996): Inhibition of hepatitis B virus replication by targeted pretreatment of complexed antisense DNA in vitro. *Hepatology* 23, 1297-1303
- Ni'inuma K, Takenaka O, Horie T, Kobayashi K, Kato Y, Suzuki H and Sugiyama Y (1997): Kinetic Analysis of the Primary Active Transport of Conjugated Metabolites Across the Bile Canalicular Membrane: Comparative Study of S-(2,4-Dinitrophenyl)-glutathione and 6-Hydroxy-5,7-dimethyl-2-methylamino-4-(3-pyridylmethyl)benzothiazole Glucuronide. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 282, 866-872
- Nicoll-Griffith D, Yergey J, Trimble L, Williams H, Rasori R and Zamboni R (1992): In vitro and in vivo biotransformations of the potent leukotriene D₄ antagonist verlukast in the rat. *Drug Metab. and Dispos.* 20, 383-389
- Nielsen PE, Egholm M, Berg RH and Buchardt O (1993): Peptide nucleic acids (PNAs): potential antisense and anti-gene agents. *Anti-Cancer Drug Des.* 8, 53-63
- Nielsen PE, Egholm M and Buchardt O (1994): Sequence-specific transcription arrest by peptide nucleic acid bound to the DNA template strand. *Gene* 49, 139-145
- Noe J, Hagenbuch B, Meier PJ and St-Pierre MV (2001): Characterization of the Mouse Bile Salt Export Pump Overexpressed in the Baculovirus System. *Hepatology* 33, 1223-1231
- Nolting A, DeLong RK, Fisher MH, Wickstrom E, Pollack GM, Juliano RL and Brouwer KLR (1997): Hepatic distribution and clearance of antisense oligonucleotides in the isolated perfused rat liver. *Pharm. Res.* 14, 516-521
- Offensperger WB, Offensperger S and Blum HE (1998): Antisense therapy of hepatitis B virus infection. *Molec. Biotechnol.* 9, 161-170
- Okada T, Yamaguchi K and Yamashita J (1994): Triplex-forming oligonucleotide binding represses transcription of the human c-erbB gene in glioma. *Growth Factors* 11, 250-270

- Orson FM, Thomas DW, McShan WM, Kessler DJ and Hogan ME (1991): Oligonucleotide inhibition of IL2R α mRNA transcription by promoter region collinear triplex formation in lymphocytes. *Nucl. Acids Res.* 19, 3435-3441
- Oude Elferink RPJ, Ottenhoff O, Liefting W, deHaan J and Jansen PML (1998a): Hepatobiliary Transport of glutathione and glutathione conjugates in rats with hereditary hyperbilirubinemia. *J. Clin. Invest.* 84, 476-83
- Oude Elferink RPJ, de Haan J, Lambert KJ, Hagey LR, Hofmann AF and Jansen PLM (1998b): Selective Hepatobiliary Transport of Nordeoxycholate Side Chain Conjugates in Mutant Rats with a Canalicular Transport Defect. *Hepatology* 9, 861-865
- Oude Elferink RPJ, Ottenhoff R, Liefting WGM, Schoemaker B, Groen AK and Jansen PLM (1990): ATP-dependent efflux of GSSG and GS-conjugate from isolated rat hepatocytes. *Am. J. Physiol.* 258, G699-G706
- Pagels P (1999): Synthese von Gallensäure-Oligonukleotid-Konjugaten und Charakterisierung der hepatischen Aufnahme und Elimination. Inaugural-Dissertation der naturwissenschaftlichen Fakultät der Justus-Liebig-Universität Gießen, Gießen 1999
- Paine MF, Leung LY, Lim HK, Liao K, Oganessian A, Zhang MY, Thummel KE and Watkins PB (2002): Identification of a Novel Route of Extraction of Sirolimus in Human Small Intestine: Roles of Metabolism and Secretion. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 301, 174-186
- Pascolo L, Bayon EJ, Cupelli F, Ostrow JD and Tiribelli C (1998): ATP-dependent transport of unconjugated bilirubin by rat liver canalicular plasma membrane vesicles. *Biochem. J.* 331, 99-103
- Paulusma CC, Bosma OJ, Zaman GJR, Bakker CTM, Otter M, Scheffer GL, Scheper RJ, Borst P and Oude Elferink RPJ (1996): Congenital jaundice in rats with a mutation in a multidrug resistance-associated protein gene. *Science* 271, 1126-27
- Paulusma CC, van Geer MA, Evers R, Heijn M, Ottenhoff R, Borst P and Oude Elferink RPJ (1999): Canalicular multispecific organic anion transporter / multidrug resistance protein 2 mediates low-affinity transport of reduced glutathione. *Biochem. J.* 338,393-401
- Paulusma CC and Oude Elferink RPJ (1997): The canalicular multispecific organic anion transporter and conjugated hyperbilirubinemia in rat and man. *J. Mol. Med.* 75, 420-428
- Pertoft H and Smedsrød B: Separation and Characterization of Liver Cells. In: Cell Separation: Methods and Selected Applications, Vol 4, Chapter 1, pp 1-24, Academic Press 1987
- Petzinger E (1991): Canalicular transport: Experimental models, morphology requirements and transport processes. In: Siegers CP and Watkin III. JB (Eds.): Biliary excretion of drugs and other chemicals. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, S. 49-87
- Petzinger E (1994): Transport of organic anions in the liver. An update on bile acid, fatty acid, monocarboxylate, anionic amino acid, cholephilic organic anion, and anionic drug transport. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 123, 47-211

- Petzinger E, Nickau L, Horz JA, Schulz S, Wess G, Ehnsen A, Falk E, Baringhaus KH, Glombik H, Hoffmann A, Müllner S, Neckermann G and Kramer W (1995): Hepatobiliary transport of hepatic 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors conjugated with bile acids. *Hepatology* 22, 1801-1811
- Piller M (1963): Eiweißbindung und Verteilung von Bromsulphthalein im Organismus. *Schweiz. Med. Wochenschr.* 30, 1034-1039
- Postel EH, Flint SJ, Kessler DJ and Hogan ME (1991): Evidence that a triplex-forming oligodeoxyribonucleotide bind to the c-myc promoter in HeLa cells, thereby reducing c-myc mRNA levels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 8227-8231
- Poupon R, Chretien Y, Parquet M, Ballet R, Rey C and Infante R (1988): Hepatic transport of bile acids in the isolated rat liver. *Biochem. Pharmacol.* 17, 209-12
- Quale JM, Bergasa NV and Mandel L (1988): Determination of sulfobromophthalein excretion in rabbits. *Am. J. Physiol.* 254, R 1043-46
- Reichel C, Gao B, van Montfoort J, Cattori V, Rahner C, Hagenbuch B, Stieger B, Kamisako T and Meier PJ (1999): Localization and Function of the Organic Anion-Transporting Polypeptide Oatp2 in Rat Liver. *Gastroenterology* 117, 688-695
- Reichen J (2000): Skriptum „Pathophysiologie der Leber“, Institut für klinische Pharmakologie der Universität Bern, Bern/Schweiz
- Rossi JJ (1995): Therapeutic antisense and ribozymes. *Brit. Med. Bull.* 51, 217-225
- Rusckowski M, Qu T, Roskey A and Agrawal S (2000): Biodistribution and Metabolism of a Mixed Backbone Oligonucleotide (GEM 231) Following Single and Multiple Dose Administration in Mice. *Antisense Nucl. Acid Drug Dev.* 10, 333-345
- Russel DW and Setchell KDR (1992): Bile acid biosynthesis. *Biochem.* 31, 4737-4749
- Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T (1989): Molecular cloning. 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor
- Samstag W, Eisenhardt S, Offensperger WB and Engels JW (1996): Synthesis and properties of new antisense oligodeoxynucleotides containing benzylphosphonate linkages. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 6, 153-156
- Sands H, Gorey-Feret LJ, Cocuzza AJ, Hobbs FW, Chidester D and Trainor GL (1994): Biodistribution and Metabolism of Internally ³H-Labeled Oligonucleotides. I. Comparison of a Phosphodiester and a Phosphorothioate. *Mol. Pharmacol.* 45, 932-943
- Sasse D, Spornitz UM and Maly PI (1992): Liver Architecture. *Enzyme* 46, 8-32
- Schaub T, Kartenbeck J, König J, Vogel O, Witzgall R, Kriz W and Keppler D (1997): Expression of the Conjugate Export Pump Encoded by the mrp2 Gene in the Apical Membrane of Kidney Proximal Tubules. *J. Am. Soc. Nephrol.* 8, 1213-1221
- Schinkel AH, Wagenaar E, van Deemter L, Mol CAAM and Borst P (1995): Absence of the mdr1a P-Glycoprotein in Mice Affects Tissue Distribution and Pharmacokinetics of Dexamethasone, Digoxin, and Cyclosporin A. *J. Clin. Invest.* 96, 1698-1705
- Schinkel AH, Mayer U, Wagenaar E, Mol CAAM, van Deemter L, Smit JJM, van der Valk MA, Voordouw AC, Spits H, van Tellingen O, Zijlmans JMJM, Fibbe WE and Borst P (1997): Normal viability and altered pharmacokinetics in mice lacking mdr1-type (drug-transporting) P-glycoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 4028-4033

- Schippers IJ, Moshage H, Roelofsen H, Müller M, Heymans HSA, Ruiters M and Kuipers F (1997): Immortalized human hepatocytes as a tool for the study of hepatocytic (de-)differentiation. *Cell Biol. Toxicol.* 13, 375-386
- Schmidt RF und Thews G (1997): Physiologie des Menschen, 27. Auflage, Springer Verlag, Berlin
- Schwab D, Herling AW, Hemmerle H, Schubert G, Hagenbuch B and Burger H-J (2001): Hepatic Uptake of Synthetic Chlorogenic Acid Derivatives by the Organic Anion Transport Proteins. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 296, 91-98
- Schwarz LR, Götz R and Klaassen CD (1980): Uptake of sulfobromophthalein-glutathione conjugate by isolated hepatocytes. *Am. J. Physiol.* 239, C118-C123
- Schwenk M, Burr R and Pfaff E (1976): Influence of Viability on Bromosulfophthalein Uptake by Isolated Hepatocytes. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 295, 99-102
- Scott WG and Klug A (1996): Ribozymes: structure and mechanism in RNA catalysis. *Trends Biochem. Sci.* 21, 220-224
- Shea RG, Marsters JC and Bischofberger N (1990): Synthesis, hybridization properties and antiviral activity of lipid-oligonucleotide conjugates. *Nucl. Acids Res.* 18, 3777-3783
- Shneider BL and Moyer MS (1993): Characterization of Endogenous Carrier-mediated Taurocholate Efflux from *Xenopus laevis* Oocytes. *J. Biol. Chem.* 268, 6985-6988
- Shoda J, Toll A, Axelson M, Pieper F, Wikvall K and Sjövall J (1993): Formation of 7 α - and 7 β -hydroxylated bile acid precursors from 27-hydroxycholesterol in human liver microsomes and mitochondria. *Hepatology* 17, 395-403
- Simon FR, Fortune J, Iwahashi M, Bowman S, Wolkoff A and Sutherland E (1999): Characterization of the mechanisms involved in the gender differences in hepatic taurocholate uptake. *Am. J. Physiol.* 276, G556-G565
- Snel CAW, Zhao Y, Mulder GJ and Pang KS (1993): Methods for the Quantitation of Bromosulfophthalein and Its Glutathione Conjugate in Biological Fluids. *Anal. Biochem.* 212, 28-34
- Sorrentino D, Licko V and Weisiger RA (1988): Sex differences in sulfobromophthalein-glutathione transport by perfused rat liver. *Biochem. Pharmacol.* 37, 3119-3126
- Srinivasan SK, Tewary HK and Iversen PL (1995): Characterization of binding sites, extent of binding, and drug interactions of oligonucleotides with albumin. *Antisense Res. Dev.* 5, 131-139
- Starke D (1999): Hepatobiliäre Aufnahme und Ausscheidung von Oligonukleotiden und Oligonukleotid-Gallensäure-Konjugaten. Inaugural-Dissertation des Fachbereiches Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen, Gießen 1999
- Starke D, Lischka K, Pagels P, Uhlmann E, Kramer W, Wess G and Petzinger E (2001): Bile acid-oligodeoxynucleotide conjugates: synthesis and liver excretion in rats. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11, 945-9
- Stege TE, Loose LD and Di Luzio NR (1975): Comparative Uptake of Sulfobromophthalein by Isolated Kupffer and Parenchymal Cells (38827). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 149, 455-461

- Stein CA and Krieg AM (1994): Problems in interpretation of data derived from in vitro and in vivo use of antisense oligodeoxynucleotides. *Antisense Res. Dev.* 4, 67-69
- Stephenson ML and Zamecnik PC (1978): Inhibition of Rous sarcoma viral RNA translation by a specific oligodeoxyribonucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 285-288
- Steward A, Christian RA, Hamilton KO and Nicklin PL (1998): Co-administration of Polyanions with a Phosphorothioate Oligodeoxynucleotide (CGP 69846A): A Role for the Scavenger Receptor in its In Vivo Disposition. *Biochem. Pharmacol.* 56, 509-516
- Stieger B, Fattinger K, Madon J, Kullak-Ublick GA and Meier PJ (2000): Drug- and estrogen induced cholestasis through inhibition of the hepatocellular bile salt export pump (Bsep) of rat liver. *Gastroenterology* 118, 422-430
- Stremmel W and Diede HE (1990): Cellular uptake of conjugated bilirubin and sulfobromophthalein (BSP) by the human hepatoma cell line Hep G2 is mediated by a membrane BSP/bilirubin binding protein. *J. Hepatol.* 10, 99-104
- Stull RA and Szoka Jr FC (1995): Antigen, ribozyme and aptamer nucleic acid drugs: progress and prospects. *Pharm. Res.* 12, 465-483
- Sturm A, Ziemann C, Hirsch-Ernst KI and Segner H (2001): Expression and functional activity of P-glycoprotein in cultured hepatocytes from *Oncorhynchus mykiss*. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 281, R1119-R1126
- Sugiyama Y, Iga T, Awazu S and Hanano M (1979): Multiplicity of sulfobromophthalein-binding proteins in Y-fraction from rat liver. *J. Pharm. Dyn.* 2, 193-204
- Sugiyama Y and Hanano M (1989): Receptor-mediated transport of peptide hormones and its importance in the overall hormone disposition in the body. *Pharm. Res.* 6, 192-202
- Takikawa H, Sano N, Narita T, Uchida Y, Yamanaka M, Horie T, Mikami T and Tagaya O (1991): Biliary Excretion of Bile Acid Conjugates in a Hyperbilirubinemic Mutant Sprague-Dawley Rat. *Hepatology* 14, 352-360
- Takikawa H, Sano N, Akimoto K, Ogasawara T and Yamanaka M (1998): Effects of colchicine and phenothiazine on biliary excretion of organic anions in rats. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 13, 427-432
- Thompson NL, Hixson DC, Callanan H, Panzica M, Flanagan D, Faris RA, Hong WJ, Hartel-Schenk S and Doyle D (1991): A Fischer rat substrain deficient in dipeptidyl peptidase IV activity makes normal steady-state RNA levels and an altered protein. *Biochem. J.* 273, 497-502
- Tocco DJ, DeLuna FA, Duncan AEW, Hsieh JH and Lin JH (1990): Interspecies differences in stereoselective protein binding and clearance of MK-571. *Drug Metab. and Dispos.* 18, 388-392
- Tondelli R, Ricca A, Laus M, Lelli M and Citro G (1998): Highly efficient cellular uptake of c-myc antisense oligonucleotides through specifically designed polymeric nanospheres. *Nucl. Acids Res.* 26, 5425-5431
- Tonkinson JL, Guvakova M, Zehangir Khaled JL, Yabukov L, Marshall WS, Caruthers MH and Stein CA (1994): Cellular pharmacology and protein binding of phosphoromonothioate and phosphorodithioate oligodeoxynucleotides: a comparative study. *Antisense Res. Dev.* 4, 269-278

- Ueda K, Suzuki H, Akiyama S and Sugiyama Y (1999): Differences in Substrate Specificity among Glutathione conjugates (GS-X) Pump Family Members: Comparison between Multidrug Resistance-associated Protein and a Novel Transporter Expressed on a Cisplatin-resistant Cell Line (KCP-4). *Jpn. J. Cancer Res.* 90, 439-447
- Uhlmann E (1998): Antisense-Oligonucleotide - ein universelles Therapieprinzip. *Chemie in unserer Zeit* 32, 150-160
- Uhlmann E and Peymann A (1990): Antisense oligonucleotides: a new therapeutic principle. *Chem. Rev.* 90, 544-584
- van Aubel RAMH, van Kuijck MA, Koenderink JB, Deen PMT, van Os CH and Russel FGM (1998): Adenosine Triphosphate-Dependent Transport of Anionic Conjugates by the Rabbit Multidrug Resistance-Associated Protein Mrp2 Expressed in Insect Cells. *Mol. Pharmacol.* 53, 1062-1067
- van Dijk TH, van der Sluist FH, Wiegman CH, Baller, JFW, Gustafson LA, Burger HJ, Herling AW, Kuipers F, Meijer AJ and Reijngoud DJ (2001): Acute Inhibition of Hepatic Glucose-6-phosphatase Does Not Affect Gluconeogenesis but Directs Gluconeogenic Flux toward Glycogen in Fasted Rats. *J. Biol. Chem.* 276, 25727-25735
- van Montfoort J, Stieger B, Meijer DKF, Weinmann HJ, Meijer PJ and Kattinger KE (1999): Hepatic Uptake of the Magnetic Resonance Imaging Contrast Agent Gadoxetate by the Organic Anion Transporting Polypeptide Oatp1. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 290, 153-157
- Vlassow VV, Balakireva L and Yakubov LA (1994): Transport of Oligonucleotides Across Natural and Model Membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1197, 95-108
- Wagner RW (1994): Gene inhibition using antisense oligodeoxynucleotides. *Nature* 372, 333-335
- Wagner RW (1995): The state of the art in antisense research. *Nat. Med.* 1, 1116-1118
- Wagner RW, Matteuci MD, Lewis JG, Gutierrez AJ, Moulds C and Froehler BC (1993): Antisense gene inhibitory by oligonucleotides containing C-5 propine pyrimidines. *Science* 260, 1510-1513
- Walle UK, Galijatovic A and Walle T (1999a): Transport of the Flavonoid Chrysin and Its Conjugated Metabolites by the Human Intestinal Cell Line Caco-2. *Biochem. Pharmacol.* 58, 431-438
- Walle UK, French KL, Walgren RA and Walle T (1999b): Transport of Genistein-7-glucoside by human intestinal Caco-2 cells: potential role for mrp2. *Res. Comm. Mol. Pathol. Pharmacol.* 103, 45-56
- Wallstab A, Koester M, Boehme M and Keppler D (1999): Selective Inhibition of MDR1 P-glycoprotein-mediated transport by the acridone carboxamide derivative GG918. *Brit. J. Cancer* 79, 1053-1060
- Webster CRL and Anwer MS (1999): Role of PI3K/PKB signaling pathway in cAMP-mediated translocation of rat liver Ntcp. *Am. J. Physiol.* 277, G1165-G1172
- Wess G, Kramer W, Bartmann W, Ehnsen A, Glombik H, Müllner S, Bock K, Dries A, Kleine H and Schmitt W (1992): Modified bile acids: preparation of 7 α ,12 α -dihydroxy-3 β - and 7 α ,12 α -dihydroxy-3 α -(2-hydroxyethoxy)-5 β -cholanolic acid and their biological activity. *Tetrahedron Lett.* 33, 195-8

- Wess G, Kramer W, Ehnsen A, Glombik H, Baringhaus KH, Bock K, Kleine H and Schmitt W (1993): Preparation of 3 α - and 3 β -(ω -aminoalkoxy)-7 α ,12 α -dihydroxy-5 β -cholanoic acid esters: versatile shuttles for drug targeting. *Tetrahedron Lett.* 34, 817-8
- Wheeler HO, Epstein RM, Robinson R and Snell, ES (1960): Biliary transport and hepatic storage of sulfobromophthalein sodium in the unanesthetized dog, in normal man, and in patients with hepatic disease. *J. Clin. Invest.* 39, 1131-44
- Wisse E, de Zanger RB, Charels K, van der Smissen P and McCuskey RS (1985): The Liver Sieve: Considerations Concerning the Structure and Function of Endothelial Fenestrae, the Sinusoidal Wall and the Space of Disse. *Hepatology* 5, 683-692
- Wolkoff AW (1996): Hepatocellular Sinusoidal Membrane Organic Anion Transport and Transporters. *Sem. Liver Dis.* 16, 121-127
- Woolf TM, Melton DA and Jennings CGB (1992): Specificity of antisense oligonucleotides in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 7305-7309
- Wu GY and WU CH (1992): Specific inhibition of hepatitis B viral gene expression in vitro by targeted antisense oligonucleotides. *J. Biol. Chem.* 267, 12436-12439
- Xu W and Ellington AD (1996): Anti-peptide aptamers recognize amino acid sequence and bind protein epitope. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 7475-7480
- Yamada T, Kato Y, Kusuhara H, Lemaire M and Sugiyama Y (1998): Characterization of the Transport of a Cationic Octapeptide, Octreotide, in Rat Bile Canalicular Membrane: Possible Involvement of P-Glycoprotein. *Biol. Pharm. Bull.* 21, 874-878
- Yamazaki M, Akiyama S, Ni'inuma K, Nishigaki R and Sugiyama Y (1997): Biliary Excretion of Pravastatin in Rats: Contribution of the Excretion Pathway Mediated by Canalicular Multispecific Organic Anion Transporter (cMOAT). *Drug Metab. Dispos.* 25, 1123-1129
- Yi JR, Ku S, Fernández-Checa J and Kaplowitz N (1995): Expression cloning of the cRNA for a polypeptide associated with rat hepatic sinusoidal reduced glutathione transport: Characteristics and comparison with the canalicular transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 1495-1499
- Yu RZ, Zhang H, geary RS, Graham M, Masarjian L, Lemonidis K, Crooke R, Dean NM and Levin AA (2001): Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of an Antisense Phosphorothioate Oligonucleotide Targeting Fas mRNA in Mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 296, 388-395
- Zhenodarova SM (1998): Nucleozymes and minizymes: new data. *Mol. Biol.* 32, 326-333
- Ziegler K, Polzin G and Frimmer M (1988): Hepatocellular uptake of cyclosporin A by simple diffusion. *Biochim. Biophys. Acta* 938, 44-50
- Zon G (1988): Oligonucleotide analogues as potential chemotherapeutic agents. *Pharm. Res.* 5, 539-549

9 Anhang

9.1 Gallefluss

Während der in situ-Galleausscheidungsversuche wurde die ausgeschiedene Galle in tarierten Eppendorfgläsern aufgefangen, die am Ende jedes der angegebenen Zeitintervalle gewechselt wurden. Nach Versuchsende wurden die Eppendorfgläser gewogen und die Masse der enthaltenen Galleflüssigkeit durch Differenzbildung bestimmt. Dabei wurde eine Dichte der Galle von 1,0 g/ml angenommen (Poupon et al. 1988). Nach kumulativer Darstellung der Gallenmengen wurden zwei- bzw. dreifaktorielle Varianzanalysen durchgeführt. Damit sollten Einflüsse verschiedener Faktoren wie Art des Oligonukleotids, Applikationsort, Rattenstamm und Präinjektion verschiedener Substrate auf die Menge der ausgeschiedenen Galle untersucht werden. In den nachfolgenden graphischen Darstellungen sind die Gallenmengen in 30min-Intervallen aufgetragen. In den statistischen Berechnungen wurden die Signifikanzgrade der jeweiligen Faktoren (Hauptwirkungen) berechnet, wobei die statistische Irrtumswahrscheinlichkeit p der Prozessparameter herangezogen wurde. Diese Prozessparameter waren der Endwert „E“ der ausgeschiedenen Gallenmasse, die Exkretionskonstante „b“ des Galleflusses sowie die initiale Steigung „ G_1 “. Für die Varianzanalyse wurde der Parameter „E“ logarithmiert.

Bei allen durchgeführten Versuchen nahm die Menge der ausgeschiedenen Galle im Verlauf des 120-minütigen Messzeitraumes von 30min-Intervall zu 30min-Intervall kontinuierlich ab.

9.1.1 Einfluss von S 3025 auf den Gallefluss während der BSP-Ausscheidung

Bei den Wistar-Ratten ergab die zweifaktorielle Varianzanalyse für die beiden Hauptwirkungen „BSP-Konzentration“ und „S 3025“ die in Tab. 9.1 aufgeführten Signifikanzgrade hinsichtlich der statistischen Irrtumswahrscheinlichkeiten p der Prozessparameter $\log(E)$, b und G_1 .

Es hatte keine Auswirkungen auf den Gallefluss, ob eine Präinjektion von 5 μmol S 3025 erfolgt war oder nicht. Die BSP-Konzentration wirkte sich jedoch auf alle untersuchten Prozessparameter aus: Nach Applikation von 5 μmol BSP wurden signifikant niedrigere Endwerte des Galleflusses gefunden als nach Injektion von 1 μmol BSP; die höhere BSP-Konzentration führte jedoch zu einer größeren initialen Steigung des Galleflusses sowie zu einer größeren Exkretionskonstante b . Wechselwirkungen zwischen der Gabe von S 3025 und der Menge des verabreichten BSP traten nicht auf.

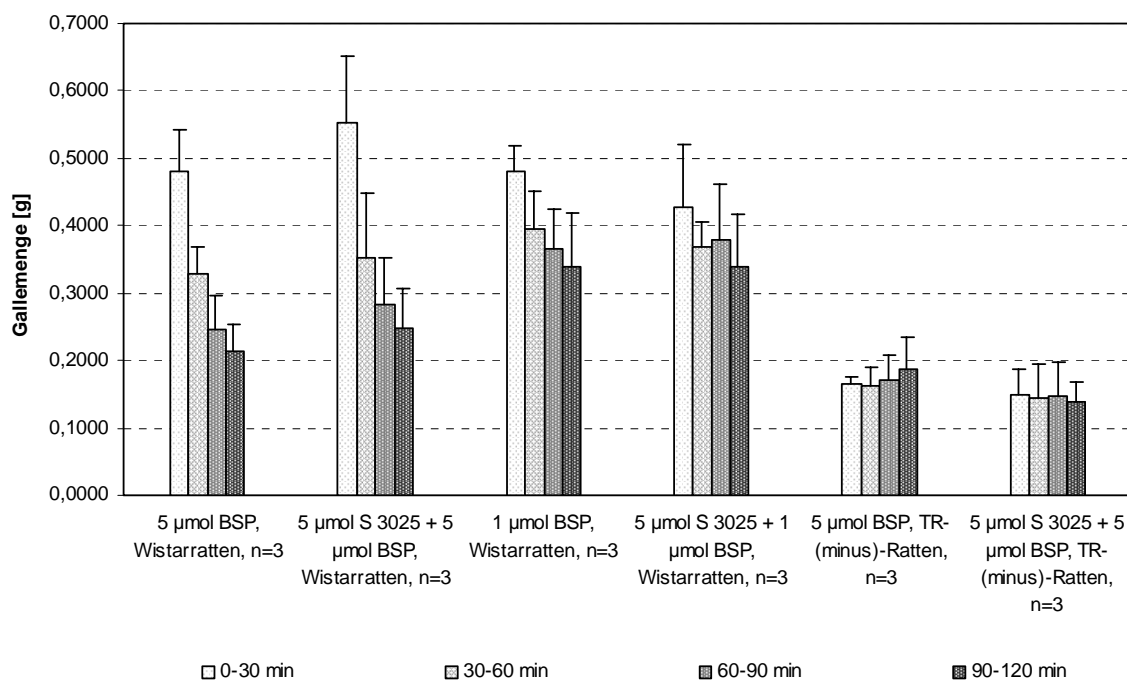


Abb. 9.1: Gallenmengen in g, die nach Präinjektion von 5 µmol S 3025 und Applikation von 1 bzw. 5 µmol BSP bei Wistar- und TR⁻-Ratten aufgefangen wurden. Angegeben sind die Mittelwerte der 30min-Intervalle mit den zugehörigen Standardabweichungen.

Tab. 9.1: Einfluss der Präinjektion von 5 µmol S 3025 sowie der anschließenden Applikation von 1 bzw. 5 µmol BSP auf den Gallefluss von Wistar-Ratten. Es sind die Signifikanzen der Prozessparameter log(E), b und G₁ mit den Irrtumswahrscheinlichkeiten für die beiden Hauptwirkungen „BSP-Konzentration“ und „S 3025“ angegeben.

Parameter	Hauptwirkungen		Wechselwirkung
	Applikation von 5 µmol S 3025	1 bzw. 5 µmol BSP	
log(E)	n.s. (p=0,2493)	p=0,0071	n.s. (p=0,3293)
b	n.s. (p=0,3310)	p<0,0001	n.s. (p=0,1383)
G ₁	n.s. (p=0,8763)	p=0,0383	n.s. (p=0,1271)

Die Applikation von 5 µmol BSP und die Untersuchung des Einflusses von 5 µmol S 3025 auf die hepatobiliäre Elimination von BSP und den Gallefluss erfolgte sowohl bei Wistar- als auch bei TR⁻-Ratten. Die Signifikanz der empirisch ermittelten Unterschiede wurde mittels einer zweifaktoriellen Varianzanalyse untersucht (Tab. 9.2). Hauptwirkungen waren dabei „5 µmol S 3025“ und „Rattenstamm“.

Tab. 9.2: Einfluss der Präinjektion von 5 μmol S 3025 sowie der anschließenden Applikation von 5 μmol BSP auf den Gallefluss von Wistar- und TR⁻-Ratten. Es sind die Signifikanzen der Prozessparameter $\log(E)$, b und G_1 mit den Irrtumswahrscheinlichkeiten für die beiden Hauptwirkungen „Rattenstamm“ und „S 3025“ angegeben.

Parameter	Hauptwirkungen		
	Applikation von 5 μmol S 3025	Rattenstamm	Wechselwirkung
$\log(E)$	n.s. ($p=0,1950$)	$p=0,0469$	n.s. ($p=0,1478$)
b	n.s. ($p=0,4247$)	$p=0,0004$	n.s. ($p=0,9473$)
G_1	n.s. ($p=0,4437$)	$p=0,0005$	n.s. ($p=0,2336$)

Die Applikation von 5 μmol S 3025 hatte keinen signifikanten Einfluss auf die ausgeschiedene Gallenmenge. Die beiden Rattenstämme unterschieden sich in allen untersuchten Prozessparametern. Für die TR⁻-Ratten ergab sich ein höherer Endwert, da der Gallefluss im Gegensatz zu den Wistarratten während der 120minütigen Messzeit nicht abnahm. Initiale Steigung und Exkretionskonstante des Galleflusses waren jedoch bei den Wistarratten signifikant höher. Es traten keine Wechselwirkungen zwischen einer Präinjektion von 5 μmol S 3025 und dem untersuchten Rattenstamm auf.

9.1.2 Einfluss von S 3025 auf den Gallefluss während der Taurocholat-Ausscheidung

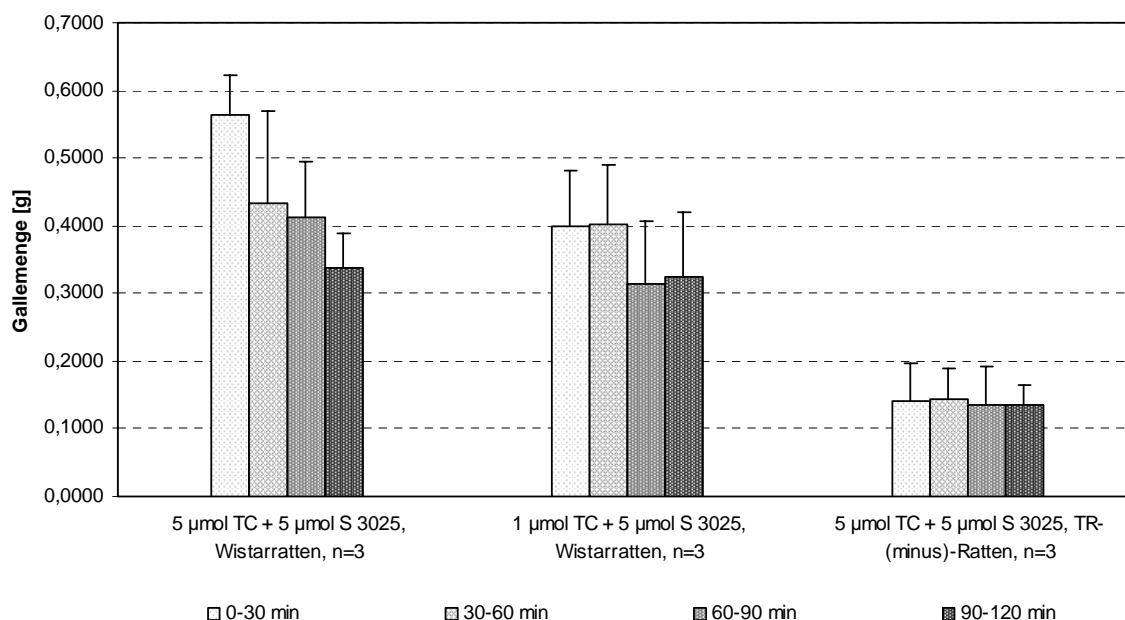


Abb. 9.2: Wistarratten erhielten 1 bzw. 5 μmol und TR⁻-Ratten 5 μmol Taurocholat. Nach 24 min wurden je 5 μmol S 3025 appliziert, nach 30 min nochmals die aufgeführten Mengen Taurocholat. Aufgeführt sind die Gallenmengen, die im 120 minütigen Messzeitraum aufgefangen wurden. Es sind Mittelwerte und Standardabweichungen der 30min-Intervalle angegeben.

Es war nicht möglich zu unterscheiden, welcher Anteil des Galleflusses auf welche Injektion zurückzuführen war. Deshalb wurden t-Tests für unabhängige Stichproben durchgeführt. Bei den Wistarratten ergab der t-Test für die Hauptwirkung „TC-Konzentration“ folgende Signifikanzgrade hinsichtlich der statistischen Irrtumswahrscheinlichkeiten p der Prozessparameter $\log(E)$, b und G_1 :

Tab. 9.3: Wistarratten erhielten zweimal innerhalb 30 Minuten je 1 bzw. 5 μmol Taurocholat. Angegeben sind die Signifikanzen der Prozessparameter $\log(E)$, b und G_1 bzw. Irrtumswahrscheinlichkeiten p für den Einfluss der Hauptwirkung „TC-Konzentration“ auf den Gallefluss während der 120minütigen Messzeit.

Parameter	Hauptwirkung TC-Konzentration
$\log(E)$	n.s. ($p=0,6553$)
b	n.s. ($p=0,1504$)
G_1	n.s. ($p=0,0689$)

Die Konzentration des injizierten Taurocholats hatte keinen Einfluss auf den Gallefluss.

Sowohl Wistar- als auch TR^- -Ratten erhielten je zweimal 5 μmol Taurocholat. In Tab. 9.4 sind die Ergebnisse des t-Tests für die Hauptwirkung „Rattenstamm“ aufgeführt.

Tab. 9.4: Wistar- und TR^- -Ratten erhielten zweimal innerhalb 30 Minuten je 5 μmol Taurocholat. Angegeben sind die Signifikanzen der Prozessparameter $\log(E)$, b und G_1 bzw. Irrtumswahrscheinlichkeiten p für den Einfluss der Hauptwirkung „Rattenstamm“ auf den Gallefluss während der 120minütigen Messzeit.

Parameter	Hauptwirkung Rattenstamm
$\log(E)$	n.s. ($p=0,7807$)
b	$p=0,0040$
G_1	$p=0,0011$

Der Endwert des Galleflusses hing nicht vom Rattenstamm ab. Durch die Kurvenanpassungen erhält man den Endwert nach theoretisch unendlicher Messzeit. Die TR^- -Ratten schieden zwar im Messzeitraum deutlich weniger Galle aus, ihr Gallefluss blieb aber im gesamten Messzeitraum konstant. Bei den Wistarratten nahm er dagegen von 30min-Intervall zu 30min-Intervall kontinuierlich ab. Nach einer unendlichen Messzeit hätten beide Rattenstämme daher rechnerisch dieselben Gallenmengen ausgeschieden. Exkretionskonstante und initiale Steigung des Galleflusses waren bei den TR^- -Ratten jedoch signifikant geringer als bei den Wistarratten.

9.1.3 Einfluss des Applikationsortes

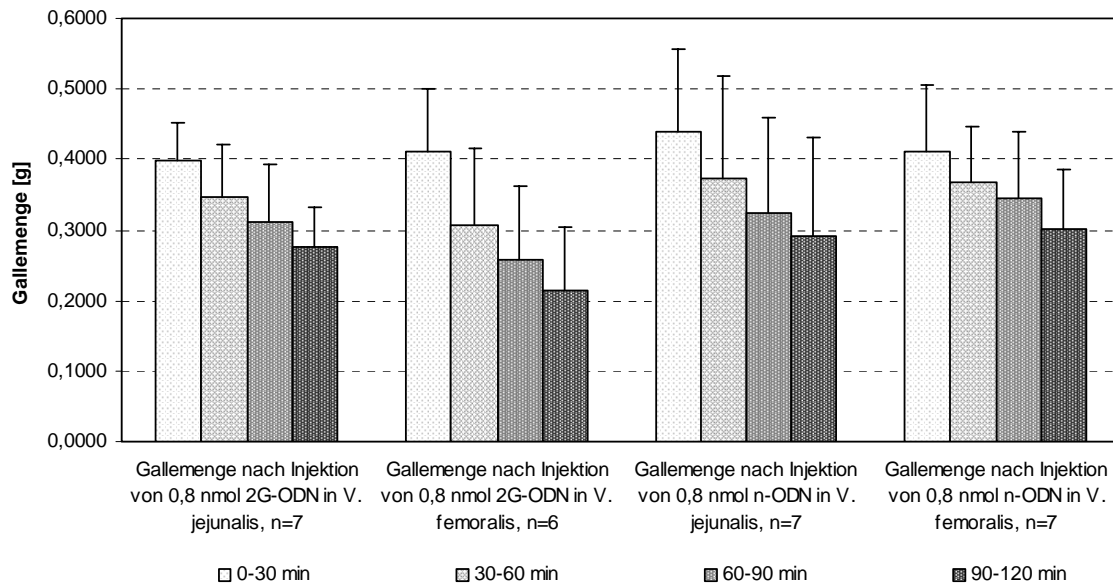


Abb. 9.3: Gallenmengen in g, die nach Injektion von 0,8 nmol 2G-ODN bzw. n-ODN in eine Jejunal- oder Femoralvene von Wistarratten aufgefangen wurden. Aufgetragen sind die Mittelwerte der 30min-Intervalle mit den zugehörigen Standardabweichungen.

Die Untersuchungen zum Einfluss des Applikationsortes wurden ausschließlich an Wistarratten durchgeführt. Die zweifaktorielle Varianzanalyse für die beiden Hauptwirkungen „Oligonukleotid“ und „Vene“ ergab folgende Signifikanzgrade hinsichtlich der statistischen Irrtumswahrscheinlichkeiten p der Prozessparameter $\log(E)$, b und G_1 :

Tab. 9.5: Einflüsse der Art des Oligonukleotids und des Applikationsortes auf die ausgeschiedene Gallenmenge. Dargestellt sind die Signifikanzen der beiden Hauptwirkungen "Oligonukleotid" und "Vene" mit den Irrtumswahrscheinlichkeiten der Prozessparameter $\log(E)$, b und G_1 sowie die Analyse der Wechselwirkungen der beiden Haupteffekte.

Parameter	Hauptwirkungen		Wechselwirkung
	Vene (jejunalis/femoralis)	Oligonukleotid	
$\log(E)$	n.s. ($p=0,5398$)	n.s. ($p=0,3444$)	n.s. ($p=0,1340$)
b	n.s. ($p=0,2153$)	n.s. ($p=0,3614$)	n.s. ($p=0,0978$)
G_1	n.s. ($p=0,6636$)	n.s. ($p=0,4758$)	n.s. ($p=0,4890$)

Weder die Art des Oligonukleotids noch die für dessen Injektion gewählte Vene beeinflussten die Masse der ausgeschiedenen Galle in signifikanter Weise. Eine Wechselwirkung der beiden untersuchten Haupteffekte konnte ebenfalls nicht festgestellt werden.

9.1.4 Einfluss des Lösungsmittels

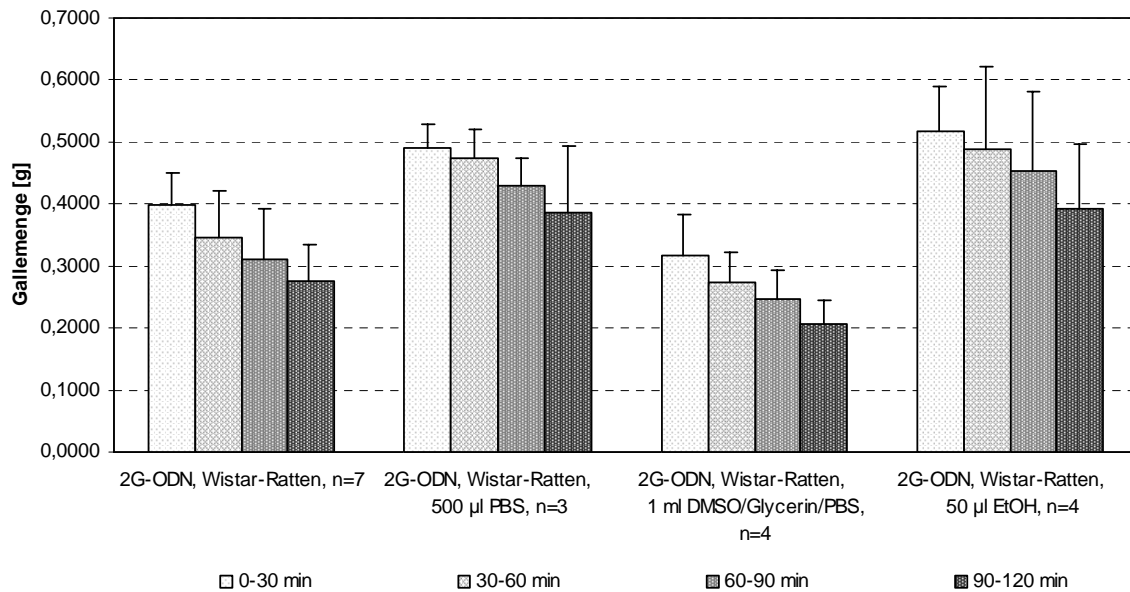


Abb. 9.4: Gallmengen in g, die nach Applikation von PBS, EtOH bzw. DMSO/Glycerin/PBS und Injektion von 0,8 nmol 2G-ODN in Wistarratten aufgefangen wurden. Es sind Mittelwerte und Standardabweichungen der 30min-Intervalle aufgetragen.

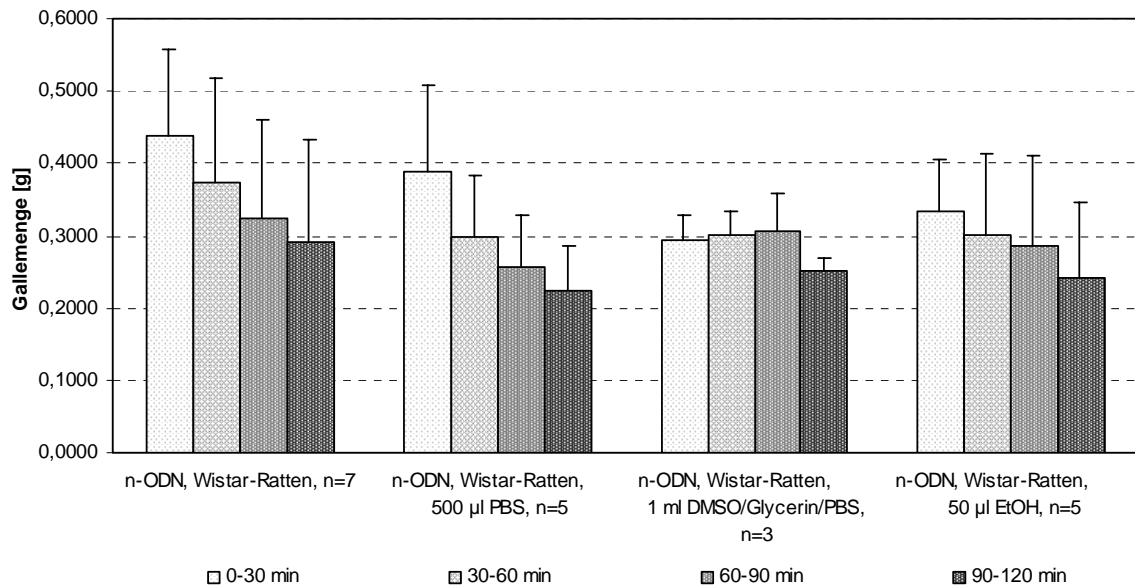


Abb. 9.5: Wistarratten wurde PBS, EtOH bzw. DMSO/Glycerin/PBS präinjiziert, anschließend 0,8 nmol n-ODN appliziert. Aufgetragen sind die Gallmengen in g, wobei Mittelwerte und Standardabweichungen der 30min-Intervalle angegeben sind.

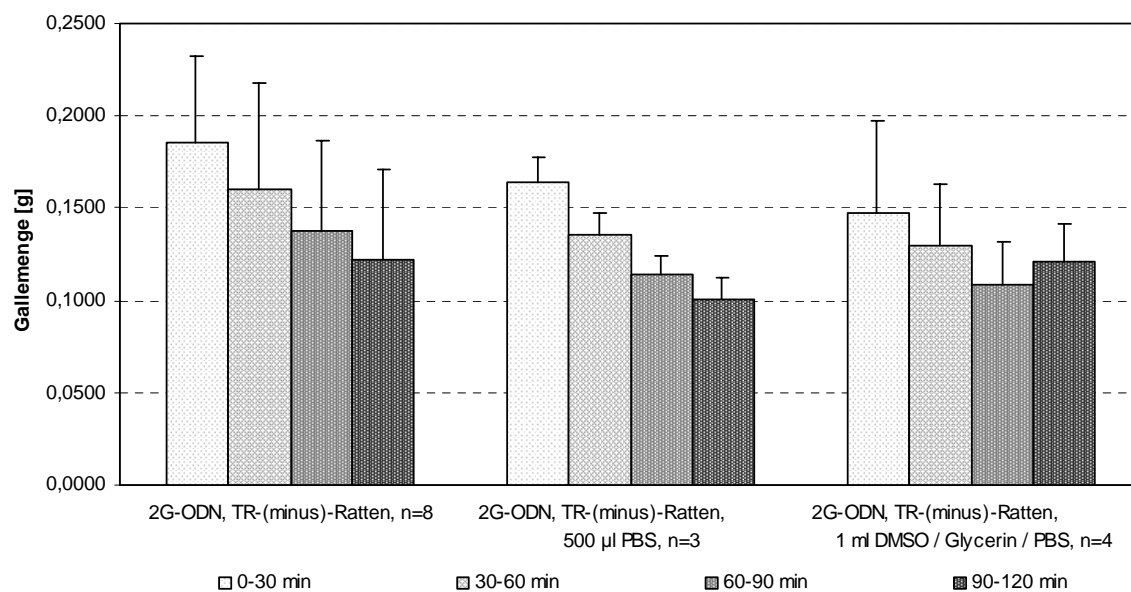


Abb. 9.6: Gallmengen in g, die bei TR⁻-Ratten nach Präinjektion von PBS bzw. DMSO/Glycerin/PBS und Applikation von 0,8 nmol 2G-ODN aufgefangen wurden. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der 30min-Intervalle.

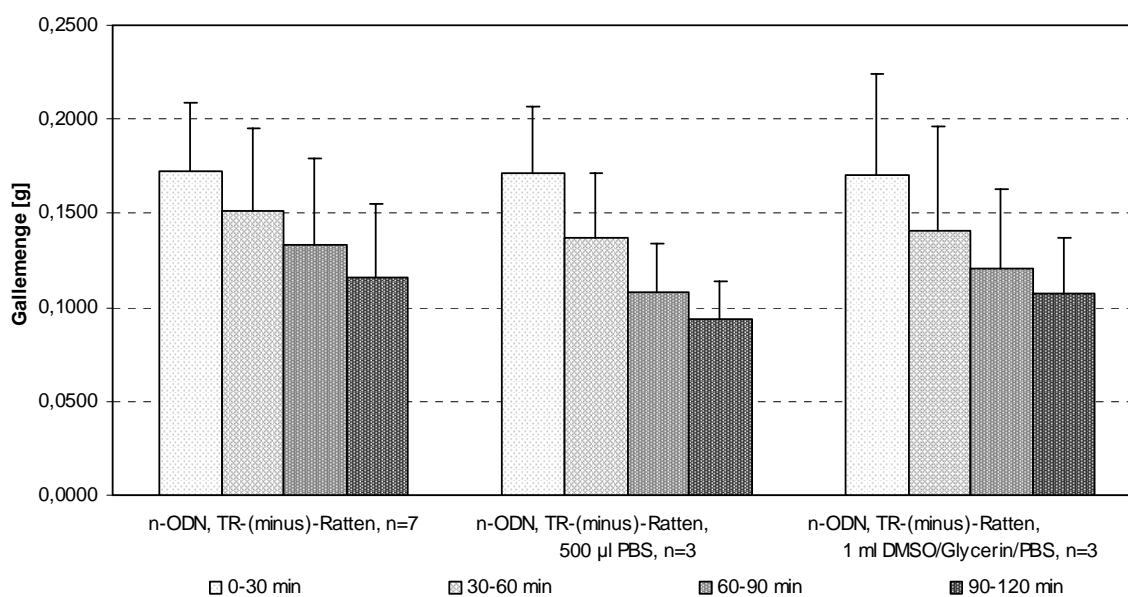


Abb. 9.7: Gallmengen in g, die bei TR⁻-Ratten nach Präinjektion von PBS bzw. DMSO/Glycerin/PBS und Applikation von 0,8 nmol n-ODN aufgefangen wurden. Es sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der 30min-Intervalle angegeben.

Um die statistische Signifikanz der beiden Hauptwirkungen „Oligonukleotid“ und „Ethanol“ zu untersuchen, wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse durchgeführt. In Bezug auf die statistischen Irrtumswahrscheinlichkeiten p der Prozessparameter $\log(E)$, b und G_1 wurden folgende Signifikanzgrade und Wechselwirkungen errechnet (vgl. 9.1, S.200):

Tab. 9.6: Einflüsse der Art des Oligonukleotids (n-ODN oder 2G-ODN) und der Präinjektion von Ethanol auf die ausgeschiedene Gallmenge. Es sind die Signifikanzen der beiden Hauptwirkungen "Oligonukleotid" und "Ethanol" mit den Irrtumswahrscheinlichkeiten der Prozessparameter $\log(E)$, b und G_1 sowie die Analyse der Wechselwirkungen der beiden Haupteffekte angegeben.

Parameter	Hauptwirkungen		Wechselwirkung
	Ethanol	Oligonukleotid	
$\log(E)$	n.s. ($p=0,3286$)	n.s. ($p=0,3258$)	n.s. ($p=0,5806$)
b	n.s. ($p=0,6828$)	n.s. ($p=0,3294$)	n.s. ($p=0,8049$)
G_1	n.s. ($p=0,7719$)	n.s. ($p=0,0627$)	$p=0,0031$

Keine der beiden Hauptwirkungen beeinflusste für sich allein betrachtet die ausgeschiedene Gallmenge: Wurde ein bestimmtes Oligonukleotid injiziert, so spielte es für Endwert (E), Exkretionskonstante (b) und initiale Steigung (G_1) des Galleflusses keine Rolle, ob vorher Ethanol injiziert worden war oder nicht. Untersuchte man die beiden möglichen Präinjektionen – d.h. die Ethanolgabe erfolgte immer, oder sie erfolgte nie – so hatte die Art des Oligonukleotids ebenfalls keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die für den Gallefluss bestimmten Prozessparameter. Es gab keine statistisch signifikanten Wechselwirkungen der beiden Hauptwirkungen „Oligonukleotid“ und „Ethanol“ in Bezug auf den Endwert E und die Exkretionskonstante b der ausgeschiedenen Gallmenge. Dagegen beeinflussten sich die beiden Hauptwirkungen im Hinblick auf die initiale Steigung G_1 : Beim 2G-ODN führte die Präinjektion von Ethanol zu einer vergrößerten initialen Steigung, beim n-ODN jedoch zu einer verringerten im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen ohne Präinjektion. „Innerhalb“ einer Art von Präinjektion bzw. „innerhalb“ einer bestimmten Art von Oligonukleotid war die Veränderung statistisch nicht signifikant (s.o.), die Kombination beider Hauptwirkungen ergab jedoch eine signifikante wechselseitige Beeinflussung.

Die statistische Signifikanz der beiden Hauptwirkungen „Oligonukleotid“ und „Lösungsmittel“ wurden für die Lösungsmittel PBS und DMSO/Glycerin/PBS mittels einer dreifaktoriellen Varianzanalyse berechnet. Die Effekte dieser beiden Lösungsmittel auf die hepatobiliäre Elimination der Oligonukleotide (n-ODN und 2G-ODN) und den Gallefluss wurde nämlich sowohl an Wistar- als auch an TR^- -Ratten untersucht, so dass die Hauptwirkung „Rattenstamm“ als dritter Faktor in die Varianzanalyse einfluss.

Es ergaben sich die in Tab. 9.7 aufgeführten statistischen Irrtumswahrscheinlichkeiten p bzw. Signifikanzen der Parameter $\log(E)$, b und G_1 sowie Wechselwirkungen (vgl. 9.1, S. 200).

Bei Betrachtung der Versuche zur Präinjektion von PBS ergab sich lediglich für die Hauptwirkung „Rattenstamm“ ein signifikanter Einfluss auf die ausgeschiedene Gallmenge: Endwert E (bzw. $\log(E)$) und initiale Steigung G_1 des Galleflusses waren bei TR^- -Ratten signifikant von den entsprechenden Werten bei Wistarratten verschieden. TR^- -Ratten schieden weniger Galle aus als Wistarratten, und der initiale Anstieg des Galleflusses war bei ihnen geringer. Für die Exkretionskonstante b konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen

Tab. 9.7: Einflüsse der Art des Oligonukleotids (n-ODN oder 2G-ODN), des Rattenstammes (Wistar- bzw. TR-Ratte) sowie der Präinjektion von PBS (links) bzw. DMSO/Glycerin/PBS (rechts) auf die ausgeschiedene Gallmenge. Dargestellt sind die Signifikanzen der Hauptwirkungen "Oligonukleotid", "Rattenstamm" und "Lösungsmittel" mit den Irrtumswahrscheinlichkeiten p der Prozessparameter log(E), b und G₁ sowie die Analyse der Wechselwirkungen der Haupteffekte.

Präinjektion von PBS							
Variable	Hauptwirkungen			Wechselwirkungen			
	PBS-Gabe	Oligonukleotid	Rattenstamm	WW PBS-Oligo	WW PBS-RStamm	WW Oligo-RStamm	WW alle
log(E)	n.s. (p=0,6389)	n.s. (p=0,1353)	p=0,0013	n.s. (p=0,3638)	n.s. (p=0,5287)	n.s. (p=0,5908)	n.s. (p=0,5388)
b	n.s. (p=0,9483)	n.s. (p=0,1087)	n.s. (p=0,2301)	n.s. (p=0,2902)	n.s. (p=0,9438)	n.s. (p=0,5774)	n.s. (p=0,8576)
G ₁	n.s. (p=0,9695)	n.s. (p=0,7588)	p=0,0001	n.s. (p=0,4377)	n.s. (p=0,2608)	n.s. (p=0,8406)	n.s. (p=0,2729)

Präinjektion von DMSO/Glycerin/PBS							
Variable	Hauptwirkungen			Wechselwirkungen			
	Lsm.-Gabe	Oligonukleotid	Rattenstamm	WW Lsm.-Oligo	WW Lsm.-RStamm	WW Oligo-RStamm	WW alle
log(E)	n.s. (p=0,6728)	n.s. (p=0,6884)	p=0,0029	n.s. (p=0,8562)	n.s. (p=0,6282)	n.s. (p=0,2805)	n.s. (p=0,3134)
b	n.s. (p=0,3751)	n.s. (p=0,7506)	n.s. (p=0,1632)	n.s. (p=0,8052)	n.s. (p=0,8654)	n.s. (p=0,5690)	n.s. (p=0,3513)
G ₁	p=0,0147	n.s. (p=0,8197)	p=0,0001	n.s. (p=0,4640)	n.s. (p=0,3866)	n.s. (p=0,4186)	n.s. (p=0,8716)

den beiden Rattenstämmen festgestellt werden. Die Hauptwirkungen „Lösungsmittel“ und „Oligonukleotid“ beeinflussten den Gallefluss nicht; des weiteren traten keine Wechselwirkungen dieser Haupteffekte auf.

Die dreifaktorielle Varianzanalyse eines möglichen Einflusses von DMSO/Glycerin/PBS auf die Menge der ausgeschiedenen Galle ergab statistisch signifikante Auswirkungen der beiden Haupteffekte „Rattenstamm“ und „Lösungsmittel“. Der Rattenstamm beeinflusste sowohl die initiale Steigung des Galleflusses (G_1) als auch den Endwert E (bzw. $\log(E)$) der ausgeschiedenen Gallenmasse: Bei TR⁻-Ratten waren beide Werte signifikant kleiner als bei Wistarratten. Das Lösungsmittelgemisch DMSO/Glycerin/PBS beeinflusste lediglich den initialen Anstieg des Galleflusses; unabhängig von Rattenstamm und Oligonukleotid war dieser in Gegenwart von DMSO/Glycerin/PBS geringer als in Abwesenheit. Wechselwirkungen der Haupteffekte traten nicht auf.

9.1.5 Gallemengen nach Applikation verschiedener Substrate canaliculärer Transporter

9.1.5.1 Bromsulphthalein (BSP)

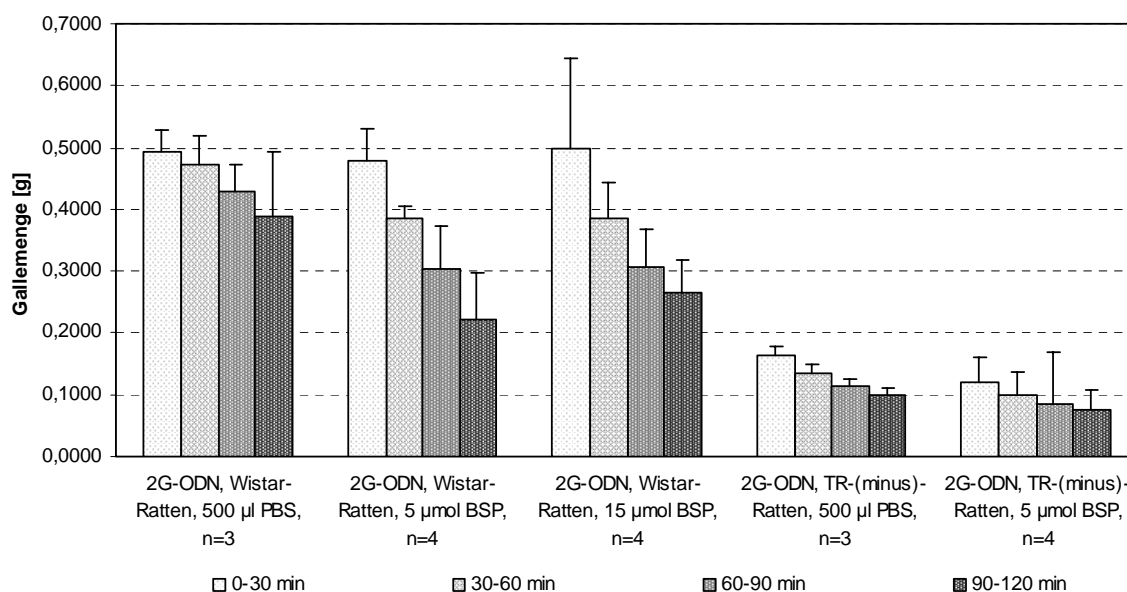


Abb. 9.8: Wistarratten wurden 5 bzw. 15 µmol BSP, gelöst in 500 µl PBS, präinjiziert; TR⁻-Ratten erhielten 5 µmol BSP. Anschließend wurden 0,8 nmol 2G-ODN appliziert. Bei beiden Rattenstämmen diente die Präinjektion von PBS als Kontrolle. Mittelwerte und Standardabweichungen der aufgefangenen Gallemengen in g sind in 30min-Intervallen aufgetragen.

Die statistische Untersuchung der Auswirkungen einer Präinjektion wurde zunächst ausschließlich für Wistarratten durchgeführt. Dabei wurde die statistische Signifikanz der beiden Hauptwirkungen „BSP-Präinjektion“ (5 bzw. 15 µmol BSP) und „Oligonukleotid“ sowie deren mögliche Wechselwirkungen untersucht. Für die Präinjektion von 5 µmol BSP

wurden die in (Tab. 9.8) aufgeführten Irrtumswahrscheinlichkeiten p bzw. Signifikanzgrade der Prozessparameter $\log(E)$, b und G_1 errechnet (vgl. S. 200).

Die Auswertung der zweifaktoriellen Varianzanalyse ergab für die Präinjektion von $5 \mu\text{mol}$ BSP bei Wistarratten, dass sich nach Applikation dieses mrp2-Substrates alle für die Gallemengen ermittelten Prozessparameter signifikant von den entsprechenden Werten der jeweiligen Kontrollen unterschieden. Die Art des Oligonukleotids beeinflusste den Endwert sowie die initiale Steigung G_1 des Galleflusses: Beim n-ODN führte die Präinjektion von $5 \mu\text{mol}$ BSP zu einem geringeren, beim 2G-ODN zu einem höheren Endwert des Galleflusses als bei den jeweiligen Kontrollen. Bei beiden Oligonukleotiden war die initiale Steigung des Galleflusses nach Präinjektion von $5 \mu\text{mol}$ BSP höher als bei den entsprechenden Kontrollen; beim n-ODN nahm die initiale Steigung G_1 des Galleflusses jedoch stärker zu als beim 2G-ODN. Die beiden Hauptwirkungen „Oligonukleotid“ und „Präinjektion von $5 \mu\text{mol}$ BSP“ beeinflussten sich gegenseitig im Hinblick auf den Endwert E (bzw. $\log(E)$) des Galleflusses: Beim n-ODN war die insgesamt ausgeschiedene Gallmenge nach Applikation von $5 \mu\text{mol}$ BSP größer als bei den Kontrollen, beim 2G-ODN führte die BSP-Präinjektion dagegen zu einer Verringerung dieses Wertes.

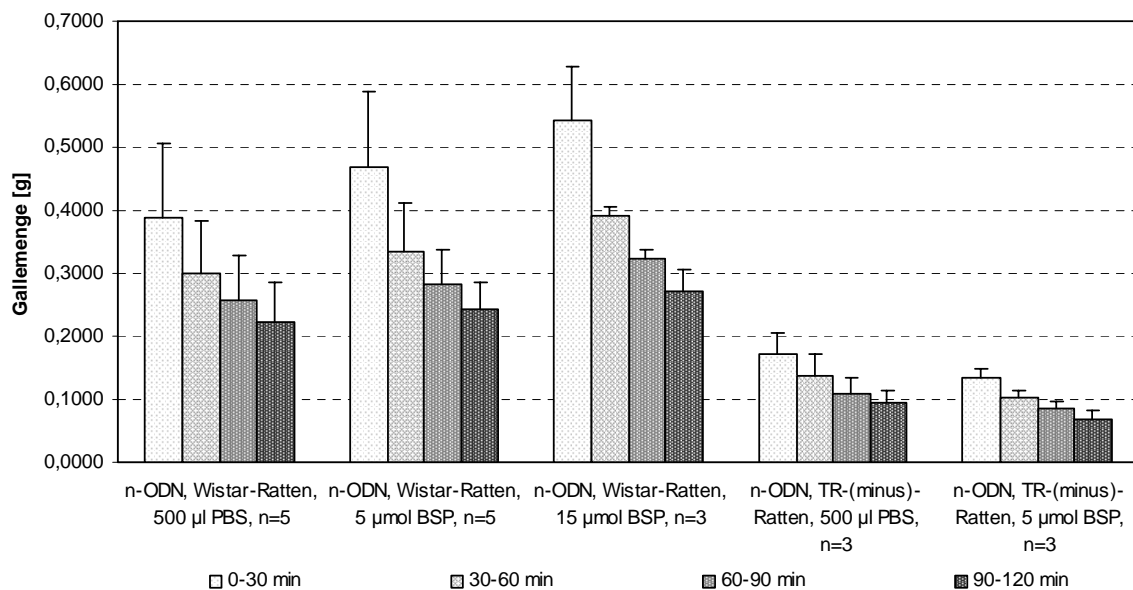


Abb. 9.9: Wistarratten wurden 5 bzw. $15 \mu\text{mol}$ BSP, gelöst in $500 \mu\text{l}$ PBS, präinjiziert; TR⁻-Ratten erhielten $5 \mu\text{mol}$ BSP. Anschließend wurden $0,8 \text{ nmol}$ 2G-ODN appliziert. Bei beiden Rattenstämmen diente die Präinjektion von PBS als Kontrolle. Mittelwerte und Standardabweichungen der aufgefangenen Gallmengen in g sind in 30min-Intervallen aufgetragen.

Tab. 9.8: Einflüsse der Art des Oligonukleotids (n-ODN oder 2G-ODN) und der Präinjektion von 5 μmol BSP auf die ausgeschiedene Gallmenge bei Wistarratten. Es sind die Signifikanzen der beiden Hauptwirkungen "Oligonukleotid" und "5 μmol BSP" mit den Irrtumswahrscheinlichkeiten p der Prozessparameter $\log(E)$, b und G_1 sowie die Analyse der Wechselwirkungen der beiden Haupteffekte angegeben.

Parameter	Hauptwirkungen		Wechselwirkung
	5 μmol BSP	Oligonukleotid	
$\log(E)$	$p=0,0159$	$p=0,0019$	$p=0,0156$
b	$p=0,0313$	n.s. ($p=0,1620$)	n.s. ($p=0,1896$)
G_1	$p=0,0298$	$p=0,0001$	$p=0,0041$

Die Präinjektion von 15 μmol BSP wurde ausschließlich an Wistarratten durchgeführt, dabei wurden folgende Ergebnisse gefunden (Tab. 9.9):

Tab. 9.9: Einflüsse der Art des Oligonukleotids (n-ODN oder 2G-ODN) und der Präinjektion von 15 μmol BSP auf die ausgeschiedene Gallmenge bei Wistarratten. Es sind die Signifikanzen der beiden Hauptwirkungen "Oligonukleotid" und "15 μmol BSP" mit den Irrtumswahrscheinlichkeiten p der Prozessparameter $\log(E)$, b und G_1 sowie die Analyse der Wechselwirkungen der beiden Haupteffekte angegeben.

Parameter	Hauptwirkungen		Wechselwirkung
	15 μmol BSP	Oligonukleotid	
$\log(E)$	n.s. ($p=0,0827$)	$p=0,0073$	$p=0,0148$
b	$p=0,0446$	n.s. ($p=0,0882$)	n.s. ($p=0,2623$)
G_1	n.s. ($p=0,1446$)	n.s. ($p=0,6717$)	n.s. ($p=0,2600$)

Durch die zweifaktorielle Varianzanalyse wurde ein signifikanter Einfluss der untersuchten Hauptwirkung „15 μmol BSP“ auf die Exkretionskonstante b des Galleflusses festgestellt: Bei allen in diesem Zusammenhang betrachteten Versuchen nahm der Gallefluss von 30min-Intervall zu 30min-Intervall ab; wurden 15 μmol BSP präinjiziert, so war der Fluss in den ersten 30 min des Messzeitraumes höher als bei den Kontrollen, nahm dann aber schneller ab als bei jenen. Eine Applikation von 15 μmol BSP hatte jedoch keinen signifikanten Einfluss auf Steigung und Endwert des Galleflusses. Die ermittelten Endwerte des Galleflusses unterschieden sich in Abhängigkeit vom gewählten Oligonukleotid; Exkretionskonstante und initiale Steigung des Galleflusses unterschieden sich für n-ODN und 2G-ODN jedoch nicht signifikant. Lediglich in Bezug auf die insgesamt ausgeschiedene Gallmenge ergab sich eine Wechselwirkung der beiden Haupteffekte „15 μmol BSP“ und „Oligonukleotid“: Beim 2G-ODN führte die Präinjektion von 15 μmol BSP zu einer signifikanten Abnahme der insgesamt ausgeschiedenen Gallmenge, beim n-ODN aber zu einer Zunahme.

5 μmol BSP wurden nicht nur Wistar- sondern auch TR⁻-Ratten präinjiziert. Um zu untersuchen, ob und welche Auswirkungen die drei Haupteffekte „5 μmol BSP“, „Oligonukleotid“ und „Rattenstamm“ auf den Gallefluss hatten, wurde eine dreifaktorielle Varianzanalyse durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tab. 9.10 zusammengefasst.

In der dreifaktoriellen Varianzanalyse - d.h. unter Einbeziehung zweier Rattenstämme - konnte im Gegensatz zur zweifaktoriellen mit nur einem Rattenstamm kein Einfluss der Präinjektion von 5 μmol BSP auf die ausgeschiedene Gallenmenge festgestellt werden. Dagegen spielte das gewählte Oligonukleotid für den Endwert der Galleausscheidung eine Rolle: Unabhängig von Rattenstamm und BSP-Präinjektion war die Gesamtausscheidung nach Applikation des 2G-ODN höher als beim n-ODN; im Hinblick auf Exkretionskonstante und initiale Steigung des Galleflusses wurden jedoch keine signifikanten Unterschiede der beiden Oligonukleotide festgestellt. Der Rattenstamm beeinflusste die Menge der insgesamt ausgeschiedenen Gallenmenge ($\log(E)$); TR⁻-Ratten schieden grundsätzlich signifikant weniger Galle aus als Wistar-Ratten. Wechselwirkungen der untersuchten Haupteffekte waren nicht festzustellen.

Tab. 9.10: Einflüsse der Art des Oligonukleotids (n-ODN oder 2G-ODN), des Rattenstammes (Wistar- oder TR⁻-Ratte) sowie der Präinjektion von 5 μmol BSP auf die ausgeschiedene Gallenmenge. Dargestellt sind die Signifikanzen der Hauptwirkungen "Oligonukleotid", "Rattenstamm" und "Lösungsmittel" mit den Irrtumswahrscheinlichkeiten p der Prozessparameter $\log(E)$, b und G_1 sowie die Analyse der Wechselwirkungen der Haupteffekte.

Parameter	Hauptwirkungen		
	5 μmol BSP	Oligonukleotid	Rattenstamm
$\log(E)$	n.s. ($p=0,3861$)	$p=0,0174$	$p=0,0003$
b	n.s. ($p=0,4200$)	n.s. ($p=0,0934$)	n.s. ($p=0,8190$)
G_1	n.s. ($p=0,2033$)	n.s. ($p=0,1945$)	n.s. ($p=0,4900$)

Parameter	Wechselwirkung je zweier Hauptwirkungen			Wechselwirkung alle
	WW BSP-Oligo	WW BSP-RStamm	WW Oligo-RStamm	
$\log(E)$	n.s. ($p=0,5302$)	n.s. ($p=0,3282$)	n.s. ($p=0,8814$)	n.s. ($p=0,1757$)
b	n.s. ($p=0,5590$)	n.s. ($p=0,2333$)	n.s. ($p=0,8221$)	n.s. ($p=0,3936$)
G_1	n.s. ($p=0,2160$)	n.s. ($p=0,2298$)	n.s. ($p=0,2266$)	n.s. ($p=0,1999$)

9.1.5.2 S 3025

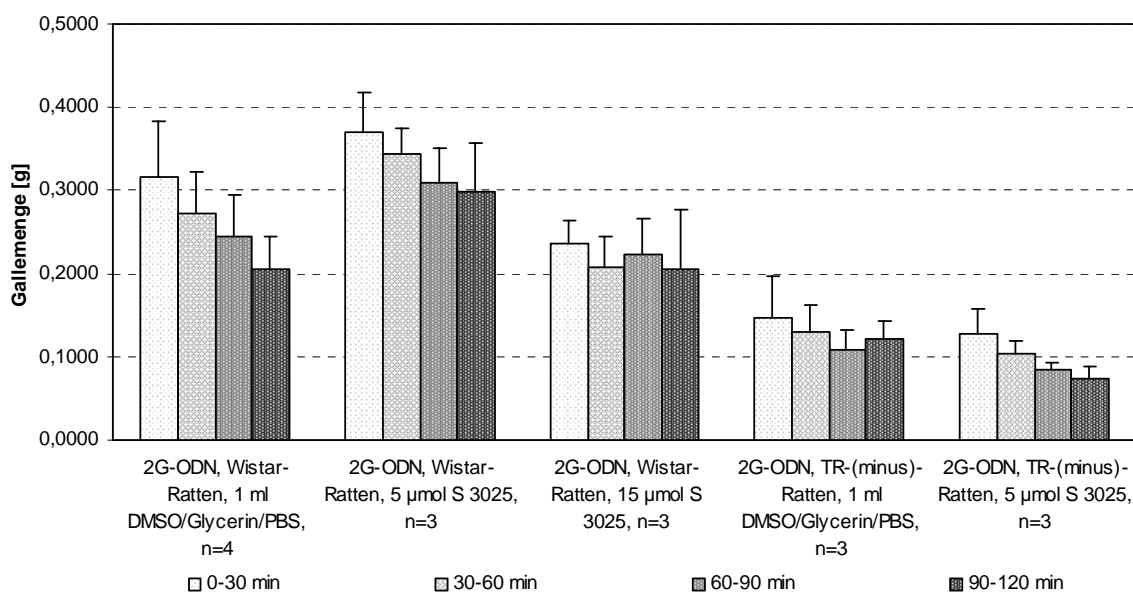


Abb. 9.10: Wistarratten wurden 5 bzw. 15 µmol S 3025, gelöst in 1 ml DMSO/Glycerin/PBS 15:15:70, präinjiziert; TR-Ratten erhielten 5 µmol S 3025. Anschließend wurden 0,8 nmol 2G-ODN appliziert. Bei beiden Rattenstämmen diente die Präinjektion von DMSO/Glycerin/PBS als Kontrolle. Mittelwerte und Standardabweichungen der aufgefangenen Gallenmengen in g sind in 30min-Intervallen aufgetragen.

Tab. 9.11: Einflüsse der Art des Oligonukleotids (n-ODN oder 2G-ODN) und der Präinjektion von 5 µmol S 3025 auf die ausgeschiedene Gallenmenge bei Wistarratten. Es sind die Signifikanzen der beiden Hauptwirkungen "Oligonukleotid" und "5 µmol S 3025" mit den Irrtumswahrscheinlichkeiten p der Prozessparameter log (E), b und G₁ sowie die Analyse der Wechselwirkungen der beiden Haupteffekte angegeben.

Parameter	Hauptwirkungen		Wechselwirkung
	5 µmol S 3025	Oligonukleotid	
log(E)	n.s. (p=0,9821)	n.s. (p=0,9804)	n.s. (p=0,0985)
b	n.s. (p=0,6711)	n.s. (p=0,6540)	n.s. (p=0,1601)
G ₁	n.s. (p=0,2503)	n.s. (p=0,1619)	n.s. (p=0,2167)

Die Präinjektion zweier verschiedener Konzentrationen von S 3025 (5 bzw. 15 µmol pro Tier) erfolgte ausschließlich bei Wistarratten. Die empirisch gefundenen unterschiedlichen Galleflüsse wurden deshalb zunächst mit Hilfe einer zweifaktoriellen Varianzanalyse auf ihre statistische Signifikanz untersucht. Hauptwirkungen waren dabei die Effekte „S 3025-Präinjektion“ (5 bzw. 15 µmol S 3025) und „Oligonukleotid“. Dabei wurden für die Prozessparameter log(E), b und G₁ (vgl. S. 200) der beiden Haupteffekte und ihrer

Wechselwirkungen in Falle der Präinjektion von 5 μmol S 3025 die in Tab. 9.11 aufgeführten Signifikanzen bzw. statistischen Irrtumswahrscheinlichkeiten p errechnet.

Weder die Präinjektion von 5 μmol S 3025 noch die Art des Oligonukleotids beeinflussten den Gallefluss der Wistarratten in signifikanter Weise. Eine Wechselwirkung dieser beiden Haupteffekte trat ebenfalls nicht auf.

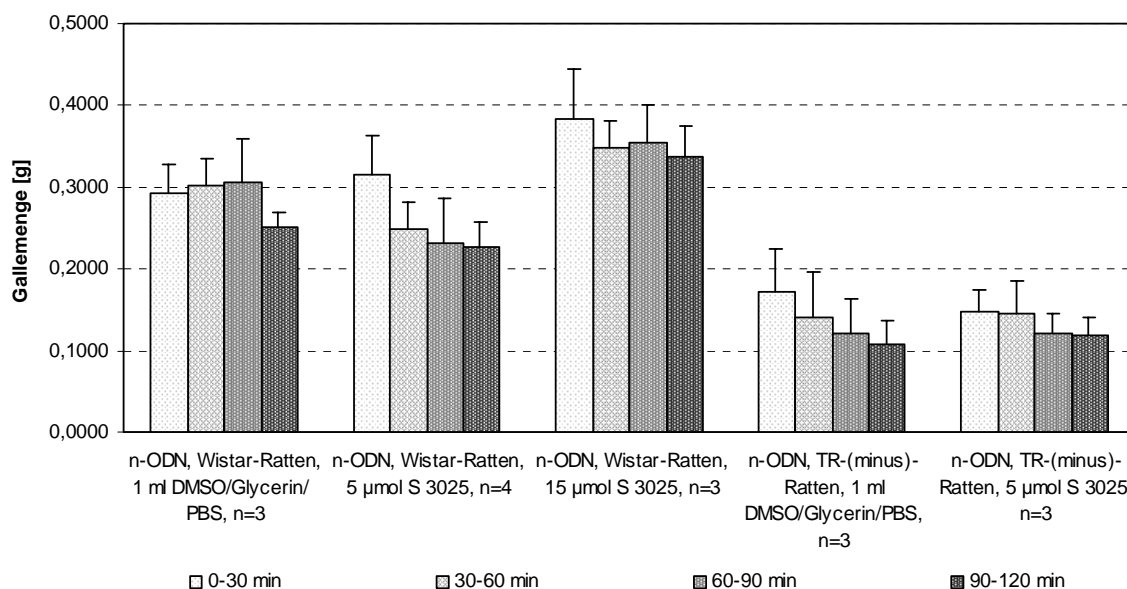


Abb. 9.11: Wistarratten wurden 5 bzw. 15 μmol S 3025, gelöst in 1 ml DMSO/Glycerin/PBS 15:15:70, präinjiziert; TR-Ratten erhielten 5 μmol S 3025. Anschließend wurden 0,8 nmol n-ODN appliziert. Bei beiden Rattenstämmen diente die Präinjektion von DMSO/Glycerin/PBS als Kontrolle. Mittelwerte und Standardabweichungen der aufgefangenen Gallenmengen in g sind in 30min-Intervallen aufgetragen.

Die Präinjektion von 15 μmol S 3025 wurde ausschließlich an Wistarratten durchgeführt; die zweifaktorielle Varianzanalyse zur Untersuchung des Galleflusses lieferte die folgenden Resultate:

Tab. 9.12: Einflüsse der Art des Oligonukleotids (n-ODN oder 2G-ODN) und der Präinjektion von 15 μmol S 3025 auf die ausgeschiedene Gallenmenge bei Wistarratten. Es sind die Signifikanzen der beiden Hauptwirkungen "Oligonukleotid" und "15 μmol S 3025" mit den Irrtumswahrscheinlichkeiten p der Prozessparameter $\log(E)$, b und G_1 sowie die Analyse der Wechselwirkungen der beiden Haupteffekte angegeben.

Parameter	Hauptwirkungen		Wechselwirkung
	15 μmol S 3025	Oligonukleotid	
$\log(E)$	n.s. ($p=0,2469$)	n.s. ($p=0,1222$)	n.s. ($p=0,7970$)
b	n.s. ($p=0,0990$)	n.s. ($p=0,2679$)	n.s. ($p=0,3052$)
G_1	n.s. ($p=0,6202$)	$p=0,0356$	$p=0,0106$

Bei keinem der untersuchten Prozessparameter wurde ein signifikanter Einfluss auf die Exkretionskonstante oder den Endwert des Galleflusses gefunden. Die Art des Oligonukleotids veränderte lediglich die initiale Steigung G_1 des Galleflusses, die beim n-ODN höher war als beim 2G-ODN. Wechselwirkungen der untersuchten Haupteffekte traten nur bei der initialen Steigung G_1 auf: Die Applikation von 15 μmol S 3025 selbst hatte zwar keinen Einfluss auf G_1 , führte aber beim n-ODN zu einer Zunahme und beim 2G-ODN zu einer Abnahme des initialen Galleflusses im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen.

Die Präinjektion von 5 μmol S 3025 erfolgte nicht nur bei Wistar- sondern auch bei TR⁻-Ratten. In einer dreifaktoriellen Varianzanalyse wurde untersucht, welche Effekte die drei Hauptwirkungen „5 μmol S 3025“, „Oligonukleotid“ und „Rattenstamm“ auf den Gallefluss hatten und ob Wechselwirkungen dieser Hauptwirkungen auftraten. In Tab. 9.13 sind die Signifikanzen bzw. Irrtumswahrscheinlichkeiten p zusammengefasst.

Die Auswertung von Tab. 9.13 ergab nur für die Hauptwirkung „Rattenstamm“ einen signifikanten Einfluss auf den Gallefluss, und zwar bei den Parametern $\log(E)$, (Endwert) und G_1 (initiale Steigung). Beide Parameter wiesen bei TR⁻-Ratten unabhängig von einer Präinjektion von S 3025 sowie unabhängig vom applizierten Oligonukleotid signifikant niedrigere Werte auf als bei Wistarratten. Signifikante Wechselwirkungen der untersuchten Haupteffekte traten nicht auf.

Tab. 9.13: Einflüsse der Art des Oligonukleotids (n-ODN oder 2G-ODN), des Rattenstammes (Wistar- oder TR⁻-Ratte) sowie der Präinjektion von 5 μmol S 3025 auf die ausgeschiedene Gallmenge. Dargestellt sind die Signifikanzen der Hauptwirkungen "Oligonukleotid", "Rattenstamm" und "Lösungsmittel" mit den Irrtumswahrscheinlichkeiten p der Prozessparameter $\log(E)$, b und G_1 sowie die Analyse der Wechselwirkungen der Haupteffekte.

Parameter	Hauptwirkungen		
	5 μmol S 3025	Oligonukleotid	Rattenstamm
$\log(E)$	n.s. ($p=0,3948$)	n.s. ($p=0,3504$)	$p=0,0189$
b	n.s. ($p=0,3593$)	n.s. ($p=0,4068$)	n.s. ($p=0,8616$)
G_1	n.s. ($p=0,8750$)	n.s. ($p=0,5220$)	$p<0,0001$

Parameter	Wechselwirkung je zweier Hauptwirkungen			Wechselwirkung alle
	WW S 3025-Oligo	WW S 3025-RStamm	WW Oligo-RStamm	
$\log(E)$	n.s. ($p=0,4541$)	n.s. ($p=0,5633$)	n.s. ($p=0,4853$)	n.s. ($p=0,2522$)
b	n.s. ($p=0,4419$)	n.s. ($p=0,2280$)	n.s. ($p=0,6121$)	n.s. ($p=0,4041$)
G_1	n.s. ($p=0,5908$)	n.s. ($p=0,2384$)	n.s. ($p=0,7776$)	n.s. ($p=0,2934$)

9.1.5.3 MK 571

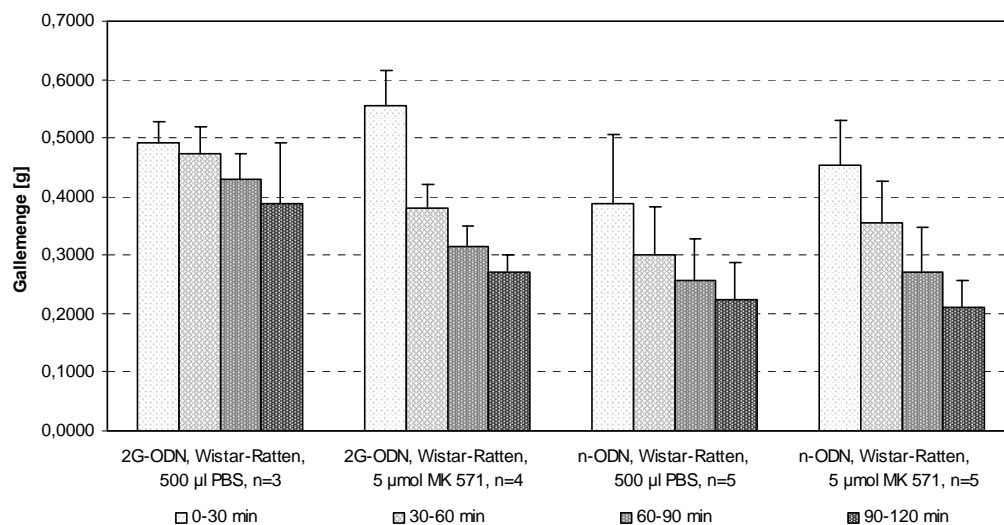


Abb. 9.12: Wistarratten wurden 5 µmol MK 571, gelöst in 500 µl PBS, präinjiziert. Anschließend wurden 0,8 nmol 2G-ODN oder n-ODN appliziert. Mittelwerte und Standardabweichungen der aufgefangenen Gallenmengen in g sind in 30min-Intervallen aufgetragen.

Nachfolgend sind die Ergebnisse der zweifaktoriellen Varianzanalyse für die beiden Hauptwirkungen „MK 571“ und „Oligonukleotid“ aufgeführt. Es ergaben sich folgende Signifikanzgrade bzw. Irrtumswahrscheinlichkeiten p der Prozessparameter $\log(E)$, b und G_1 (vgl. S. 200).

Tab. 9.14: Einflüsse der beiden Hauptwirkungen "MK 571" und "Oligonukleotid" auf die ausgeschiedene Gallenmenge. Dargestellt sind die Signifikanzen bzw. Irrtumswahrscheinlichkeiten p der Prozessparameter $\log(e)$, b und G_1 sowie die Analyse der Wechselwirkungen der beiden Haupteffekte.

Parameter	Hauptwirkungen		Wechselwirkung
	5 µmol MK 571	Oligonukleotid	
$\log(E)$	$p=0,0074$	$p=0,0032$	$p=0,0424$
b	$p=0,0045$	n.s. ($p=0,1593$)	n.s. ($p=0,1154$)
G_1	$p=0,0494$	$p=0,0223$	n.s. ($p=0,8675$)

Die Auswertung obiger Tabelle zeigte, dass MK 571 alle drei für den Gallefluss bestimmten Parameter in signifikanter Weise beeinflusste: Die initiale Steigung G_1 des Galleflusses war nach Applikation von MK 571 unabhängig von der Art des anschließend injizierten Oligonukleotids höher; der logarithmierte Endwert (E) und die Exkretionskonstante b gegenüber den Kontrollen verändert. Auch die Art des Oligonukleotids beeinflusste den Gallefluss: Beim 2G-ODN war die initiale Steigung nach Injektion von MK 571 größer, der Endwert des Galleflusses aber geringer als bei den Kontrolltieren; beim n-ODN verhielt es sich genau umgekehrt. Eine Wechselwirkung der beiden Haupteffekte trat nur im Hinblick auf

den Endwert des Galleflusses auf. MK 571 verringerte beim 2G-ODN die insgesamt ausgeschiedene Gallmenge im Vergleich zu den Kontrollen, während die Gallmenge beim n-ODN nach Applikation von MK 571 zunahm.

9.1.5.4 CDNB

Die experimentell ermittelten unterschiedlichen Gallmengen wurden einer zweifaktoriellen Varianzanalyse unterzogen. Hauptwirkungen waren dabei „Oligonukleotid“ und „CDNB“. Die errechneten Signifikanzgrade bzw. statistischen Irrtumswahrscheinlichkeiten p der Prozessparameter $\log(E)$, b und G_1 (vgl. S. 200) sind in Tab. 9.15 dargestellt.

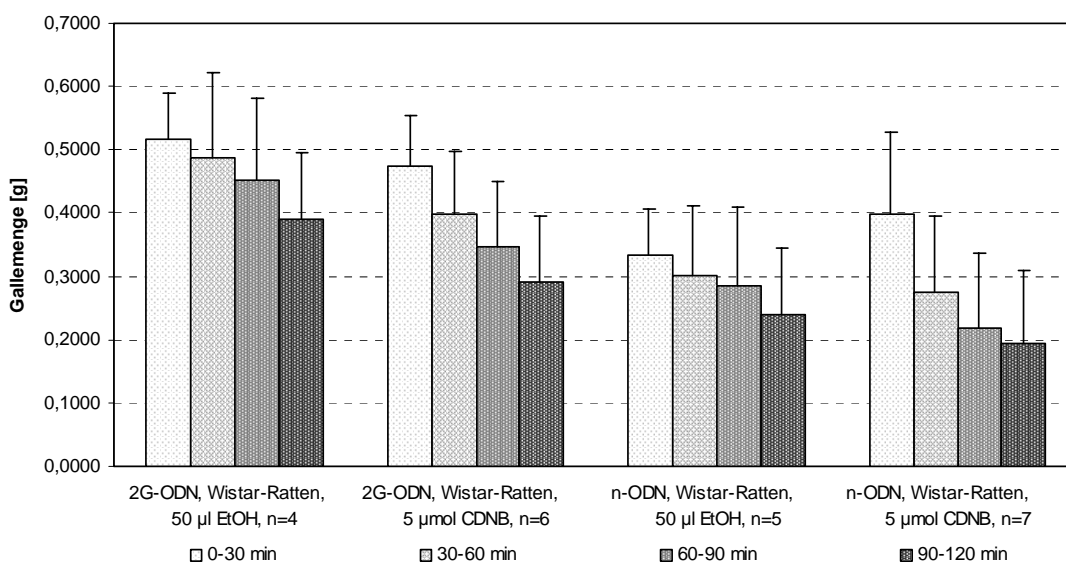


Abb. 9.13: Wistarratten wurden 5 µmol CDNB, gelöst in 50 µl Ethanol, präinjiziert. Anschließend wurden 0,8 nmol 2G-ODN oder n-ODN appliziert. Mittelwerte und Standardabweichungen der aufgefängenen Gallmengen in g sind in 30min-Intervallen aufgetragen.

Tab. 9.15: Einflüsse der beiden Hauptwirkungen "CDNB" und "Oligonukleotid" auf die ausgeschiedene Gallmenge. Dargestellt sind die Signifikanzen bzw. Irrtumswahrscheinlichkeiten p der Prozessparameter $\log(e)$, b und G_1 sowie die Analyse der Wechselwirkungen der beiden Haupteffekte.

Parameter	Hauptwirkungen		Wechselwirkung
	5 µmol CDNB	Oligonukleotid	
$\log(E)$	knapp n.s. ($p=0,0553$)	n.s. ($p=0,0772$)	n.s. ($p=0,7623$)
b	$p=0,0364$	n.s. ($p=0,0666$)	n.s. ($p=0,4324$)
G_1	n.s. ($p=0,3990$)	$p=0,0032$	n.s. ($p=0,1263$)

Der Einfluss, den CDNB auf den Endwert der aufgefängenen Gallmenge ausübte, war mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p=0,0553$ knapp nicht signifikant. Die Exkretionskonstante b wurde durch CDNB signifikant verändert, die initiale Steigung des Galleflusses nicht. Die Art

des Oligonukleotids beeinflusste lediglich den initialen Gallefluss in signifikanter Weise; er war beim 2G-ODN höher als beim n-ODN. Wechselwirkungen zwischen der Art des Oligonukleotids und einer CDNB-Präinjektion waren nicht zu beobachten.

9.1.5.5 Sirolimus

Mit Hilfe einer zweifaktoriellen Varianzanalyse wurde die Signifikanz der ermittelten Unterschiede der Gallenmengen untersucht. Hauptwirkungen waren dabei „Oligonukleotid“ und „Sirolimus“. Die errechneten Signifikanzgrade bzw. statistischen Irrtumswahrscheinlichkeiten p der Prozessparameter $\log(E)$, b und G_1 sind in Tab. 9.16 dargestellt.

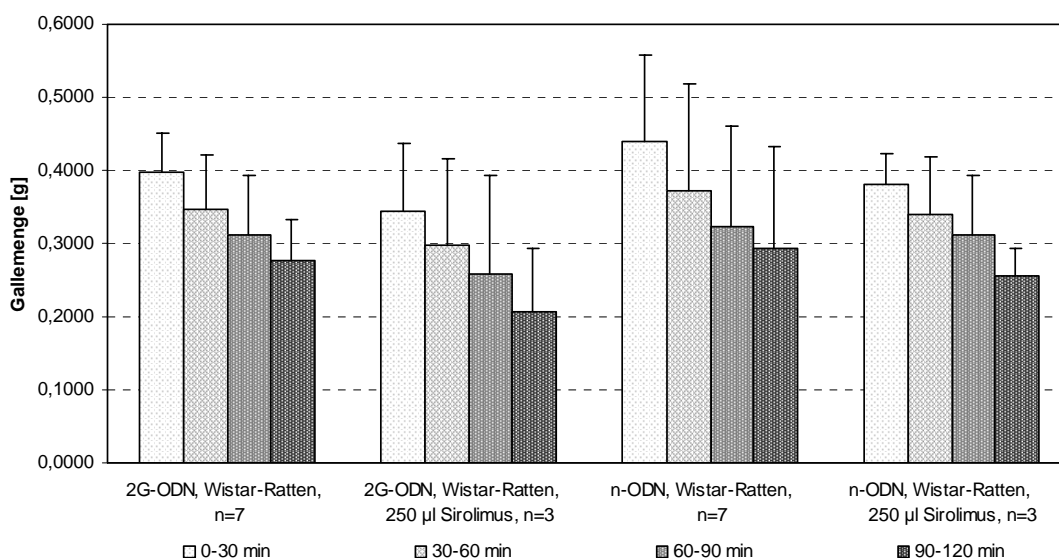


Abb. 9.14: Wistarratten wurden 250 µg Sirolimus, gelöst in 250 µl Fettsäuregemisch, präinjiziert. Anschließend wurden 0,8 nmol 2G-ODN oder n-ODN appliziert. Mittelwerte und Standardabweichungen der aufgefangenen Gallenmengen in g sind in 30min-Intervallen aufgetragen.

Tab. 9.16: Einflüsse der beiden Hauptwirkungen "Sirolimus" und "Oligonukleotid" auf die ausgeschiedene Gallenmenge. Dargestellt sind die Signifikanzen bzw. Irrtumswahrscheinlichkeiten p der Prozessparameter $\log(e)$, b und G_1 sowie die Analyse der Wechselwirkungen der beiden Haupteffekte.

Parameter	Hauptwirkungen		Wechselwirkung
	250 µl Sirolimus	Oligonukleotid	
$\log(E)$	n.s. ($p=0,7707$)	n.s. ($p=0,6877$)	n.s. ($p=0,4055$)
b	n.s. ($p=0,8721$)	n.s. ($p=0,8388$)	n.s. ($p=0,2738$)
G_1	n.s. ($p=0,2071$)	n.s. ($p=0,3405$)	n.s. ($p=0,7543$)

Weder die Präinjektion von Sirolimus noch die Art des applizierten Oligonukleotids beeinflussten den Gallefluss in signifikanter Weise. Außerdem waren keine Wechselwirkungen der beiden Hauptwirkungen festzustellen.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Ernst Petzinger für die Überlassung des interessanten Themas, seine jederzeit gewährte Unterstützung und ständige Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. Alfred M. Pingoud, Fachbereich Chemie, Biologie und Geowissenschaften, Institut für Biochemie, danke ich sehr herzlich für seine Bereitschaft, meine Arbeit vor diesem Fachbereich zu vertreten.

Den Herren Prof. Dr. Dr. Werner Kramer und Prof. Dr. Andreas Herling von Aventis Pharma Deutschland danke ich für die Kooperation bei diesem Projekt; Herrn Prof. Herling danke ich besonders für die wertvollen Hinweise zu und die Überlassung von S 3025. Dr. Eugen Uhlmann bin ich für die Durchführung der HPLC- und MS-Analysen zu großem Dank verpflichtet. Prof. Kramer und Herrn Klaus Bock bin ich für die Bereitstellung der Synthesestufen und die Hilfestellung bei der Synthese des Gallensäure-C₂-Amins sehr verbunden.

Mein herzlicher Dank gilt auch den Mitarbeitern des Rudolf-Buchheim-Instituts für Pharmakologie: Prof. Dr. Hansjörg Teschemacher, Petra Kronich, Beate Dickopf und Christiane Zibuschka, deren Lyophilisator ich während der Synthese des Gallensäure-C₂-Amins immer wieder benutzen durfte und die mir jederzeit ihre Microwaage überließen, sowie Dr. Holger Repp und Dr. Holger Wenzlaff für zahlreiche gute Computer-Tipps.

Bei Frau Prof. Dr. Gabriele Klug, Maysa Azzeh und Svetlin Tautobatchev, Fachbereich Biologie, Institut für Mikrobiologie, sowie Prof. Dr. Roland Friedrich und Karin Schultheiß, Institut für medizinische Virologie, möchte ich mich dafür bedanken, dass ich immer wieder und zu jeder Unzeit Videodigitizer und Vakuumzentrifugen mitbenutzen durfte. Ein Dankeschön auch an Birgit Rabe und Herrn PD Dr. Michael Kann für die stets zügige Beschaffung „meiner“ Radionuklide.

Bei Herrn PD Dr. Georgios Scheiner-Bobis, Institut für Biochemie des Fachbereiches Veterinärmedizin, möchte ich mich für seine geduldige Einführung in das Programm Chem 3 D und die Unterstützung bei der Erzeugung der Strukturmodelle meiner Oligos bedanken.

Herrn Prof. Dr. Dietrich Keppler, Dr. Inka Leier, Dr. Gabriele Jedlitschky, Johanna Hummel-Eisenbeiss und Ulrike Buchholz, Institut für Tumorbiologie des DKFZ Heidelberg, bin ich sehr dankbar für die Hilfestellung bei der Durchführung der Vesikelversuche. Ferner gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Volkhard Kaefer, Medizinische Hochschule Hannover, Institut für Pharmakologie, für die freundliche Überlassung von Sirolimus.

Ganz besonders herzlich möchte ich mich bei den Herren Dr. Klaus Failing, Horst Heiter und Thomas Schulz von der AG Biomathematik und Datenverarbeitung für die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre, die kompetente Beratung bei den statistischen Auswertungen und die Geduld angesichts der von mir angeschleppten Datenflut und meiner zahlreichen Sonderwünsche bedanken.

Claus Steiger und Brandon Bone danke ich herzlich für die Korrektur der Summary.

Last but not least möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie des Fachbereiches Veterinärmedizin sehr herzlich für die kollegiale, freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und viele schöne Erlebnisse abseits des Labors bedanken. Mein Dank gilt Dr. Dieter Starke („Ich mag rothaarige Frauen, besonders mit Nussauce!“) für die Einführungen in die Synthese von Gallensäure-Oligonukleotid-Konjugaten und die Einarbeitung in die Durchführung von Galleausscheidungsversuchen. Bei Dorothee von Schnakenburg, dem organisatorischen Allround-Talent des Institutes („Das Tieri ist doch mindestens schon über hundert!“) möchte ich mich exemplarisch für unzählige behördliche Hilfestellungen und den besten Cappuccino der Welt bedanken. Dr. Frank Langewische („Frank, döss iss’n Virus, Du musst sofort komme!“) bin ich sehr verbunden für seine Computer-Kompetenz, die Bekanntschaft mit Norwegischen Waldkatzen und seine Fähigkeit, jeden chinesischen Koch zu Höchstleistungen anzutreiben. Dr. Marita Langewische („Ich muss heute unbedingt noch zu OBI!“) danke ich für die engagierte Unterstützung bei den Oozyten-Versuchen, zahlreiche tolle Kuchenrezepte, noch mehr Kontakt mit Norwegischen Waldkatzen und die schönen Bastelaktionen. Ein ganz besonderes Dankeschön an Dr. Jörg Alber („Ich kenne diese Frau nicht!“) für seine Tipps zu Molekularbiologie und Biochemie, Unmengen an Schokolade und gemeinsames Frösteln auf dem holländischen EXPO-Pavillon (Ich werde Dich nie wieder in einem namhaften Museum blamieren!).- Danke an Dr. Sabine Geis („Komm’ Se rein, könn’ Se rausschau’n!“) für Rotwein, Pizza, Bauchschmerzen vor Lachen und ihre sehr individuelle Art, mit Haarsprayflaschen und Biegeplüsch umzugehen. Dr. Silke Neumann („Ei, zum Kugguck“) danke ich ganz herzlich für ihre Freundschaft in allen Lebenslagen, ihre unglaubliche Zuverlässigkeit und die vielen gemeinsamen Stunden im Radioaktivtrakt. Ich danke Dr. Uta Tortell für die riesengroße Hilfe bei der Durchführung der Oozytenversuche und Elisabeth Jüngst-Carter („Wie goldig!“) für das häufige Aufpassen auf meine narkotisierten Ratten und die schönen Kneipenabende. Danke auch an Dr. Martina Jung und Dr. Daniel Zahner für die kollegiale Zusammenarbeit. Dirk Grizan werde ich wegen seiner Computerkenntnisse und der originellen Anleitung zum Überführen von Handydieben bestimmt nicht vergessen. Tatjana Andres und Sabine Wagner danke ich für die schöne Zusammenarbeit, Rotwein, Feuerzangenbowle und tiefe Einblicke in die saarländische Mentalität. Den Tierpflegern Manuela Binz, Ingo Lotz, Hans Walbrecht, Kurt Haas und Ernst Balsler danke ich herzlich für ihre ständige Bereitschaft, mir routiniert und sachkundig beim Umgang mit Ratten zu helfen. Ein großes Dankeschön auch an Kurt Stumpf, Klaus Schuh und Steffi Weghenkel für organisatorische und experimentelle Hilfestellung sowie an Birgit Kauß und Anneliese Lotz für ihre Hilfsbereitschaft und moralische Unterstützung.

Zum Schluss möchte ich meinen Eltern Edgar und Anita Lischka und meinem Freund Frank Nipko danken, ohne deren moralische und finanzielle Unterstützung weder Studium noch Promotion möglich gewesen wären.