

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Biliäre Elimination des Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonisten
Valsartan über die kanalikuläre Plasmamembran
der Rattenleber**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
Martina Jung

Gießen 2001

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuerin: Prof. Dr. K. Ziegler

**Biliäre Elimination des Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonisten
Valsartan über die kanalikuläre Plasmamembran
der Rattenleber**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
Martina Jung
Tierärztin aus Neunkirchen / Saar

Gießen 2001

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. M. Reinacher

1. Berichterstatter: Prof. Dr. K. Ziegler
2. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Eigenbrodt

Tag der mündlichen Prüfung: 04.04.2001

Für meine Familie

INHALTSVERZEICHNIS

Verzeichnis der Abkürzungen.....	VII
1 Einleitung.....	1
1.1 Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonisten: eine neue Klasse antihypertensiver Wirkstoffe	1
1.1.1 Das Renin-Angiotensin-System und seine pharmakologische Blockade	1
1.1.2 Entwicklung der Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonisten	4
1.1.3 Pharmakologisches Profil des Angiotensin-II-Typ1-Rezeptor-Antagonisten Valsartan	7
<i>1.1.3.1 Bindungseigenschaften von Valsartan zum AT₁-Rezeptor im Vergleich zu Losartan</i>	8
<i>1.1.3.2 Pharmakokinetische Daten von Valsartan</i>	9
1.2 Zur Rolle der Leber für die Aufnahme und die biliäre Elimination endogener Substrate und Xenobiotika	11
1.2.1 Funktion und histologischer Aufbau der Leber	11
1.2.2 Überblick der komplexen molekularen Mechanismen des Stofftransportes der Hepatozytenmembran	13
<i>1.2.2.1 Hepatozelluläre Aufnahme organischer Anionen und Kationen über die sinusoidale Plasmamembran</i>	13
<i>1.2.2.2 Die hepatobiliäre Elimination organischer Anionen und Kationen</i>	15
1.3 Das kanalikuläre Multidrug resistance-associated protein (cMRP)	18
1.3.1 Aufbau des MRP2 / Mrp2 und Sequenzvergleich mit anderen Mitgliedern der MRP-Familie	19
1.3.2 Lokalisation des MRP2 / Mrp2	21
1.3.3 Substratspezifität des MRP2 / Mrp2	21
1.3.4 Das Dubin-Johnson-Syndrom des Menschen	23
1.3.5 Klinische Bedeutung des cMRP	23
1.4 Ziele meiner Arbeit	24
2 Versuchstiere.....	25

3	Material.....	26
3.1	Chemikalien	26
3.2	Zentrifugen und Rotoren	28
3.3	Lösungen für die Plasmamembranpräparation	28
3.3.1	Homogenisationspuffer	28
3.3.2	Saccharoselösungen	28
3.3.3	Vesikelpuffer	28
3.4	Lösungen für die Präparation kanalikulärer „inside-out“- und „right side-out“-Vesikel	29
3.4.1	Aktivierungspuffer zur Vorbereitung der Con A-Sepharose	29
3.4.2	Kopplungspuffer zum Binden der „right side-out“-Vesikel	29
3.4.3	Elutionspuffer zum Ablösen der „right side-out“-Vesikel	29
3.5	Lösungen für die Proteinbestimmung	29
3.6	Lösungen für die Enzymbestimmungen	30
3.6.1	5'-Nukleotidase	30
3.6.1.1	<i>Tris-Puffer</i> 100 mM	30
3.6.1.2	<i>Substratlösung</i>	30
3.6.1.3	<i>Stopplösung</i>	30
3.6.2	Glukose-6-Phosphatase	30
3.6.2.1	<i>Imidazolpuffer</i> 100 mM	30
3.6.2.2	<i>Substratlösung</i>	30
3.6.2.3	<i>Stopplösung</i>	30
3.6.3	Na ⁺ /K ⁺ -ATPase und Mg ²⁺ -ATPase	30
3.6.3.1	<i>Reaktionspuffer</i> Mg ²⁺	30
3.6.3.2	<i>Reaktionspuffer</i> Na ⁺ /K ⁺ /Mg ²⁺	31
3.6.3.3	<i>Reaktionspuffer</i> Na ⁺ /K ⁺ /Mg ²⁺ mit Ouabain	31
3.6.3.4	<i>Substratlösung</i>	31
3.6.3.5	<i>Stopplösung</i>	31
3.6.4	Chen-Reagenz	31
3.7	Lösungen für die Schnellfiltration	32
3.7.1	ATP-abhängige Aufnahme	32
3.7.1.1	<i>Inkubationsmedium</i> mit regenerierendem System	32
3.7.1.2	<i>Inkubationsmedium</i> ohne regenerierendes System	32
3.7.1.3	<i>Stopplösung</i> für die ATP-abhängige Aufnahme	32

3.7.2	Bestimmung des Bindungsanteils	33
3.7.2.1	<i>Inkubationsmedium</i> mit einer Osmolarität von 450 mosm	33
3.7.2.2	<i>Inkubationsmedium</i> mit einer Osmolarität von 600 mosm	33
3.7.2.3	<i>Inkubationsmedium</i> mit einer Osmolarität von 900 mosm	33
3.7.2.4	<i>Stopplösung</i>	33
3.7.3	Na ⁺ -abhängige Aufnahme	34
3.7.3.1	<i>Inkubationsmedium</i> mit Na ⁺	34
3.7.3.2	<i>Stopplösung</i> / Na ⁺ -freies <i>Inkubationsmedium</i>	34
3.7.4	Szintillationsflüssigkeit	34
3.8	Dünnschichtchromatographie	34
4	Methoden.....	35
4.1	In-vivo-Galleausscheidungs- und -Organverteilungsstudien in Wistar-Ratten und TR⁻-Ratten	35
4.1.1	Durchführung der Gallengangskanülierung	35
4.1.2	Probenentnahme zur Organverteilungsstudie	37
4.2	Modifizierte Präparationsmethode zur Isolierung von kanalikulären Plasmamembranvesikeln aus der Rattenleber	39
4.2.1	Durchführung der Präparation	39
4.2.2	Übersicht der einzelnen Präparationsschritte in Form eines Flussdiagramms	42
4.3	Affinitätschromatographische Trennung von kanalikulären „inside-out“- und „right side-out“-Plasmamembranvesikeln an Con A-Sepharose	44
4.3.1	Vorbereitung der Con A-Sepharose	44
4.3.2	Durchführung der Trennung von „inside-out“- und „right side-out“-Vesikeln	45
4.3.3	Übersicht der einzelnen Schritte der Trennung von „inside-out“- und „right side-out“-Vesikeln	46
4.4	Proteinbestimmung	47
4.5	Enzymbestimmungen	48
4.5.1	5'-Nukleotidase	48
4.5.2	Glukose-6-Phosphatase	49
4.5.3	Na ⁺ /K ⁺ -ATPase und Mg ²⁺ -ATPase	50
4.5.4	Bestimmung des anorganischen Phosphats nach Chen	51

4.6	Schnellfiltrationstechnik	53
4.6.1	Durchführung der Aufnahmemessungen	53
4.6.2	Berechnung der Substanzaufnahme	55
4.6.3	Besonderheiten bei der Durchführung der Bestimmung des Bindungsanteils von [¹⁴ C]-Valsartan an die kanalikuläre Leberplasmamembran	56
4.7	Nachweis der Stabilität sowie Reinheit von [¹⁴C]-Valsartan und Valsartan	57
4.8	Statistische Methoden	58
5	Ergebnisse.....	59
5.1	Stabilität und Löslichkeit von Valsartan	59
5.2	Vergleich der In-vivo-Galleausscheidung und -Organverteilung von Valsartan in Wistar-Ratten und TR⁻-Ratten	61
5.2.1	Gallefluss bei männlichen Wistar- und TR ⁻ -Ratten nach Injektion von Valsartan bzw. physiologischer Kochsalzlösung	61
5.2.2	Biliäre Elimination und Organverteilung von Valsartan in männlichen Wistar- und transportdefizienten TR ⁻ -Ratten in einer Dosierung von 1 mg / kg KM	63
5.2.3	Biliäre Elimination und Organverteilung von [¹⁴ C]-Valsartan in männlichen Wistar- und transportdefizienten TR ⁻ -Ratten in einer Dosierung von 0,5 µCi / Tier	67
5.2.4	Biliäre Elimination und Organverteilung von [¹⁴ C]-Valsartan in weiblichen Wistar- und transportdefizienten TR ⁻ -Ratten in einer Dosierung von 0,5 µCi / Tier	70
5.3	Die Präparation kanalikulärer Plasmamembranvesikel aus der Leber von normalen Wistar-Ratten und transportdefizienten TR⁻-Ratten	73
5.4	Präparation kanalikulärer „inside-out“- und „right side-out“-Vesikel	77
5.5	ATP-abhängige und Natrium-abhängige Taurocholat-Aufnahme in kanalikuläre Plasmamembranvesikel	79
5.6	Die Charakterisierung des Valsartan-Transportes in kanalikuläre Plasmamembranvesikel, isoliert aus der Leber normaler Wistar-Ratten und transportdefizienter TR⁻-Ratten	81
5.6.1	Die ATP-abhängige Aufnahme von [¹⁴ C]-Valsartan in Abhängigkeit von der Zeit	81

5.6.2	Natrium-Abhängigkeit der [¹⁴ C]-Valsartan-Aufnahme	83
5.6.3	Einfluss der ATP-Konzentration auf die Aufnahme von [¹⁴ C]-Valsartan	84
5.6.4	Konzentrationsabhängigkeit der aktiven ATP-abhängigen Aufnahme von [¹⁴ C]-Valsartan	86
5.6.5	Einfluss von ATP-Analoga und energiereicher Nukleotide auf die Aufnahme von [¹⁴ C]-Valsartan in kanalikuläre Leberplasmamembranvesikel	90
5.6.6	Bestimmung des Bindungsanteils von [¹⁴ C]-Valsartan an die kanalikuläre Leberplasmamembran	93
5.6.7	Einfluss des pH-Wertes des Inkubationsmediums auf die Aufnahme von [¹⁴ C]-Valsartan	97
5.6.8	Die Temperaturabhängigkeit der Aufnahme von [¹⁴ C]-Valsartan	98
5.6.9	Vergleich der Aufnahme von [¹⁴ C]-Valsartan in eine Mischfraktion aus kanalikulären „inside-out“- und „right side-out“-Plasmamembranvesikeln mit der Aufnahme in kanalikuläre „inside-out“-Plasmamembranvesikel	101
5.6.10	Vergleich der ATP-abhängigen Aufnahme von [¹⁴ C]-Valsartan in kanalikuläre Plasmamembranvesikel von Wistar-Ratten und TR ⁻ -Ratten	104
5.7	Einfluss von Hemmstoffen auf den Valsartan-Transport	107
5.7.1	Effekt von Substraten des multispezifischen Anionen-Transporters cMoat / Mrp 2	108
5.7.1.1	<i>Einfluss von GSSG, Pravastatin und BSP</i>	108
5.7.1.2	<i>Einfluss von Leukotriene C₄ auf die Aufnahme von [¹⁴C]-Valsartan</i>	110
5.7.2	Effekt von Substraten des kanalikulären Gallensäuretransporters cBST	113
5.7.3	Effekt von Substraten des P-Glykoproteins (Mdr 1a)	114
6	Diskussion.....	115
6.1	Vergleich der In-vivo-Galleausscheidung und -Organverteilung von Valsartan in Wistar-Ratten und TR⁻-Ratten	115
6.2	Die Charakterisierung der molekularen Mechanismen des Transportes von Valsartan mit Hilfe von kanalikulären Leberplasmamembranvesikeln	118
6.2.1	Die Qualität der kanalikulären Plasmamembranvesikel, isoliert aus der Leber von Wistar- und TR ⁻ -Ratten	118
6.2.2	Die Präparation kanalikulärer „inside-out“- und „right side-out“-Vesikel	120

6.2.3	Die ATP-Abhängigkeit des Valsartan-Transportes	121
6.2.4	Die Konzentrationsabhängigkeit des Valsartan-Transportes	124
6.2.5	Die Membranbindung des Valsartan	126
6.2.6	Einfluss des pH-Wertes auf die Valsartan-Aufnahme	128
6.2.7	Die Temperaturabhängigkeit des Valsartan-Transportes	129
6.2.8	Die Valsartan-Aufnahme in kanalikuläre „inside-out“-Plasmamembranvesikel	130
6.2.9	Die Valsartan-Aufnahme in kanalikuläre Plasmamembranvesikel von TR ⁻ -Ratten	131
6.2.10	Einfluss von Hemmstoffen auf den Valsartan-Transport	132
6.3	Schlussbetrachtung	133
7	Zusammenfassung.....	135
8	Summary.....	137
9	Literaturverzeichnis.....	139

Verzeichnis der Abkürzungen

A _{app} .	scheinbare Aktivierungsenergie
Abb.	Abbildung
ABC	ATP-binding-cassette
ACE	Angiotensin-Converting-Enzym
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
AMP-PCP	Adenosin- 5'-(β, γ- methylene)-diphosphat
Aqua bidest.	Aqua bidestillata (doppelt destilliertes Wasser)
AT ₁ -Rezeptor	Angiotensin-II-Typ1-Rezeptor
AT ₂ -Rezeptor	Angiotensin-II-Typ2-Rezeptor
AT ₃ -Rezeptor	Angiotensin-II-Typ3-Rezeptor
AT ₄ -Rezeptor	Angiotensin-II-Typ4-Rezeptor
ATP	Adenosintriphosphat
ATP-abh. Aufn.	ATP-abhängige Aufnahme
AUC	area under the curve (Fläche unter der Kurve)
bLPM	basolaterale Leberplasmamembran
BSP	Sulfobromophthalein
°C	Grad Celsius
cBST	canalicular bile salt transporter
cDNA	komplementäre Desoxyribonucleinsäure
cLPM	kanalikuläre Leberplasmamembran
cm	Zentimeter
cMOAT / cMoat	canalicular multispecific organic anion transporter
cMRP / cMrp	canalicular Multidrug resistance-associated Protein
Con A-Sepharose	Concanavalin A-Sepharose 4B
CTP	Cytosintriphosphat
DC	Dünnschicht-Chromatographie
dpm	desintegrations per minute (Zerfälle pro Minute)
E	Extinktion
EHBR	Eisai hyperbilirubinemic rats
Endkonz.	Endkonzentration
ER	endoplasmatisches Retikulum
g	Gramm
g	relative Zentrifugalbeschleunigung
GSSG	Glutathiondisulfid
GTP	Guanosintriphosphat
GY	Groningen Yellow
h	Stunde
Hepes	N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HMG CoA	β-Hydroxy-β-methylglutaryl-CoA
HPLC	high performance liquid chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
I	Interphase
K ⁺	Kalium-Ion
kcal	Kilokalorie
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
kJ	Kilojoule
K _m	Affinitätskonstante (Halbsättigungskonstante)

KM	Körpermasse
l	Liter
LPM	Leberplasmamembran
LTC ₄	Leukotriene C ₄
LTD ₄	Leukotriene D ₄
M	Molarität, mol / l
m	milli
μ	mikro
MBq	Megabequerel
μCi	Mikrocurie
MDR / mdr	Multidrug resistance gene product
mg	Milligramm
μg	Mikrogramm
Mg ⁺⁺ / Mg ²⁺	Magnesium-Ion
min	Minute
ml	Milliliter
μl	Mikroliter
mm	Millimeter
μmol	Mikromol
mosm	Milliosmol
mRNA	Messenger-Ribonucleinsäure
MRP / mrp	Multidrug resistance-associated Protein
n	nano
n	Stichprobenumfang
Na ⁺	Natrium-Ion
Na-abh. Aufn.	Natrium-abhängige Aufnahme
nm	Nanometer
NTCP / ntcp	Na ⁺ / taurocholate cotransporting polypeptide
OATP / oatp1	organic anion transporting polypeptide
OCT1 / oct1	organic cation transporter
p	piko
p	statistische Irrtumswahrscheinlichkeit
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PFIC	progressive familiäre intrahepatische Cholestase
P-Glykoprotein	Permeability-Glykoprotein
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoff-Ionen-Konzentration
pKa	negativer dekadischer Logarithmus der Dissoziationskonstante K für Säuren
R	Gaskonstante
RAS	Renin-Angiotensin-System
Reg.	regenerierendes System
restl.	restlich
Rf	Rf-Wert; Quotient der Strecken Startpunkt-Fleckmittelpunkt zu Startpunkt-Fließmittelfront (related to front)
rpm	rotations per minute (Umdrehungen pro Minute)
SD _{n-1}	Standardabweichung
SDS	sodium dodecyl sulfate (Natrium-Dodecylsulfat)
SPGP / spgp	sister-of-p-glycoprotein
T	absolute Temperatur
Tab.	Tabelle
TCE	Trichloressigsäure

TR ⁻	transport negative
TR ⁻ -Ratten	Groningen Yellow / transportdefiziente (GY / TR ⁻) Wistar-Ratten
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tris-ATP	Adenosintriphosphat-Tris-Salz
UTP	Uridintriphosphat
UV	Ultraviolett
v _i	initiale Aufnahmegeschwindigkeit
v _{max}	maximale Aufnahmegeschwindigkeit
Vol.	Volumen
x	arithmetischer Mittelwert

1 Einleitung

1.1 Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonisten: eine neue Klasse antihypertensiver Wirkstoffe

1.1.1 Das Renin-Angiotensin-System und seine pharmakologische Blockade

Das Renin-Angiotensin-System (RAS) ist von großem pharmakologischem Interesse, da ihm eine entscheidende Rolle in der Pathogenese und Pathophysiologie der Hypertonie des Menschen mit den bekannten Folgen von Herzinsuffizienz bis Angina pectoris und Myokardinfarkt sowie Enzephalopathie und Apoplexie zukommt. Es stellt den Hauptkontrollmechanismus zur Regulation des Blutdrucks sowie der Flüssigkeits- und Elektrolythomöostase dar [Criscione et al. 1993].

Renin, ein Enzym, welches in den juxtaglomerulären Zellen der Niere gebildet wird, katalysiert die Umwandlung von Angiotensinogen in eine inaktive Substanz, das Dekapeptid Angiotensin I. Das Angiotensin-Converting-Enzym (ACE) wandelt Angiotensin I in das physiologisch aktive Oktapeptid Angiotensin II um, welches an spezifischen Rezeptorsubtypen seine Wirkung entfaltet. Die Familie der Angiotensin-II-Rezeptoren ist sehr heterogen, es werden bisher vier Angiotensin-II-Rezeptor-Subtypen unterschieden [Griendling et al. 1996]. Die Stimulation des AT₁-Rezeptor-Subtyps ist einzig verantwortlich für die bekannten Wirkungen des Angiotensin II, wie tubuläre Natrium-Rückresorption in der Niere, Vasokonstriktion, Aldosteronausschüttung, sympathische Aktivierung und Verminderung der Barorezeptor-Sensitivität [Bauer & Reams 1995]. All diese Wirkungen stehen in Zusammenhang mit der Entwicklung von Hypertonie [Kirk 1999]. Vom AT₂-Rezeptor-Subtyp ist bekannt, dass er während der fetalen Entwicklung stark exprimiert wird, mit einer starken Abnahme seiner Expression nach der Geburt, doch seine genaue Funktion bleibt zu untersuchen [Griendling et al. 1996]. Über die beiden anderen Subtypen AT₃ und AT₄ ist bisher nur wenig bekannt [Griendling et al. 1996].

Das Renin-Angiotensin-System lässt sich pharmakologisch an verschiedenen Stellen blockieren (Abb.1.1). Die Verhinderung der Bildung von Angiotensin II durch Hemmung des Angiotensin-Converting-Enzyms hat sich im klinischen Einsatz bereits als erfolgreiche Strategie in der Behandlung der Hypertonie und kongestiver Herzinsuffizienz erwiesen [Criscione et al. 1993].

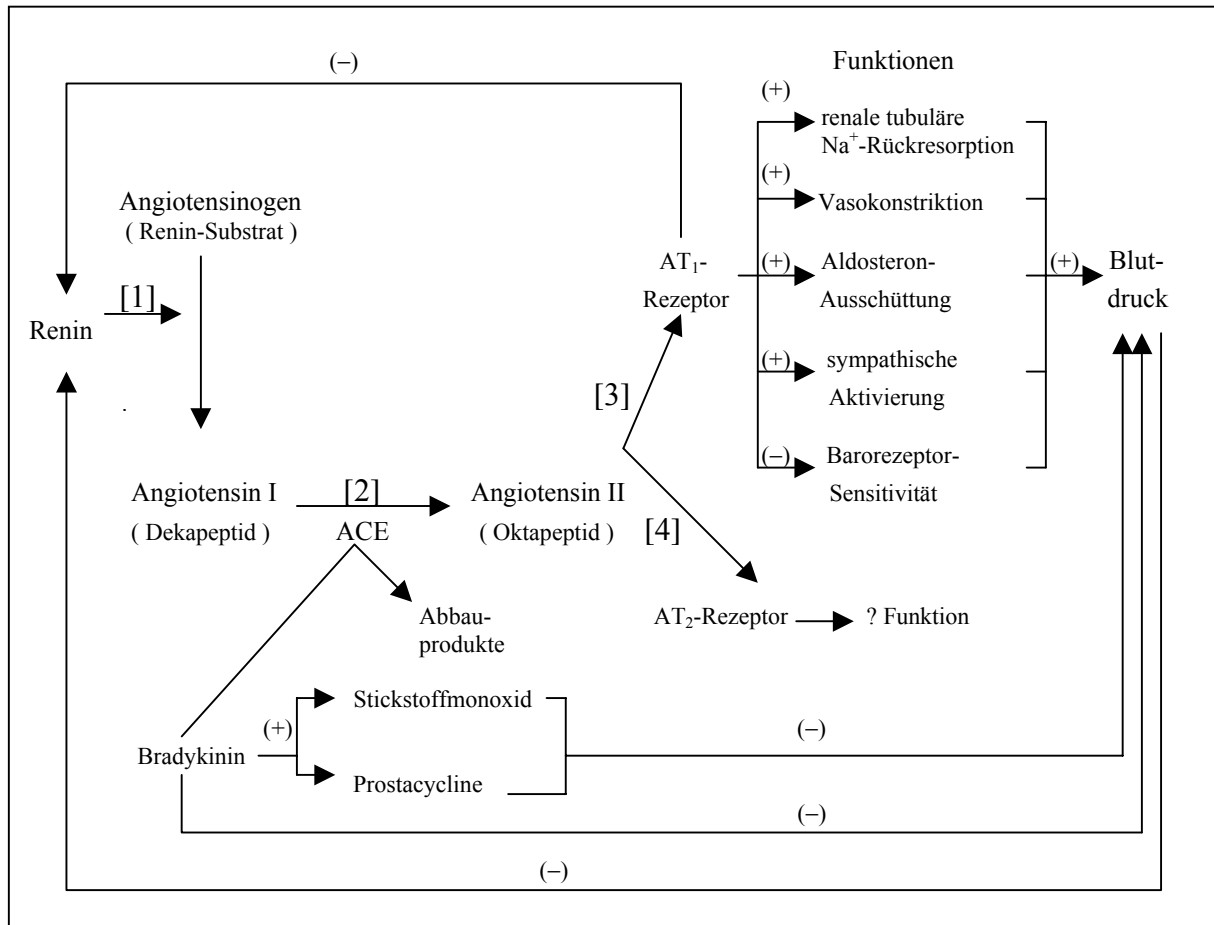


Abb. 1.1 Schematische Darstellung des Renin-Angiotensin-Systems (RAS)

Möglichkeiten seiner pharmakologischen Blockade sind folgende:

[1] Renininhibitoren, [2] Angiotensin-Converting-Enzym-Hemmstoffe, kurz ACE-Hemmer, [3] AT₁-Rezeptor-Antagonisten und [4] AT₂-Rezeptor-Antagonisten
(verändert nach Bauer & Reams 1995)

Neben Angiotensin I findet sich als weiteres Substrat des Angiotensin-Converting-Enzyms Bradykinin, welches über die Bildung von Stickstoffmonoxid und Prostacyclin vasodilatierend wirkt. Bradykinin kontrahiert allerdings die glatte Muskulatur der Bronchien und gehört zu den Entzündungs- und Schmerzmediatoren, wie auch Substanz P, die ebenfalls durch das Konversionsenzym inaktiviert wird [Forth et al. 1992]. Mit der Anreicherung von Bradykinin und Substanz P bei der Anwendung der ACE-Hemmer ist eine Vielzahl von Nebenwirkungen verbunden [Bauer & Reams 1995].

Außerdem wird Angiotensin II im Gewebe auf alternativem Enzymweg gebildet, z.B. durch Kathepsin, eine in Lysosomen sowie allgemein intrazellulär weitverbreitete Proteinase [Roche Lexikon Medizin 1991, Mc Innes 1999]. Dies bedeutet, dass durch Angiotensin-Converting-Enzym-Hemmstoffe keine absolute Blockade des Renin-Angiotensin-Systems erreichbar ist.

Dadurch ist die Entwicklung von renininhibierenden Peptidmimetika zur Blutdrucksenkung besonders interessant geworden. Renin ist nicht nur ein hoch spezifisches Enzym für Angiotensinogen, sondern das erste und zeitbegrenzende Enzym der RAS-Kaskade [Griendling et al. 1993, Hui et al. 1992]. Die Hemmung des Renins repräsentiert somit eine potentielle therapeutische Strategie zur Blockade der Angiotensin-II-Produktion [Bauer & Reams 1995]. Zur Zeit wird diese Methode weiter untersucht, doch hat sie noch keine klinische Bedeutung erlangt [Bauer & Reams 1995].

Eine weitere Möglichkeit ist die Blockade des Angiotensin II auf Rezeptorebene. Die sogenannten Angiotensin-II-Typ1-Rezeptor-Antagonisten mit spezifischer Blockade des Angiotensin II am AT₁-Rezeptor werden bereits erfolgreich zur Behandlung der Hypertonie und Bekämpfung der Folgeerscheinungen eingesetzt [Kirk 1999]. Klinische Studien beweisen ihren Vorteil gegenüber Angiotensin-Converting-Enzym-Hemmstoffen im Hinblick auf ihre Effektivität und Sicherheit in der Anwendung. Wurde den Probanden Valsartan oder Placebo verabreicht, so waren kaum Unterschiede hinsichtlich des Nebenwirkungsprofils feststellbar [Mc Innes 1999a / 1999b]. Allerdings bleibt noch zu klären, wie sich der Anstieg des Renin- und Angiotensin-I-Plasmagehaltes sowie nachfolgend des Angiotensin-II-Plasmaspiegels durch die Rezeptorblockade auswirkt.

Angiotensin-II-Typ2-Rezeptor-Antagonisten mit spezifischer Blockade des Angiotensin II am AT₂-Rezeptor wurden ebenfalls entwickelt, klinisch sind sie jedoch ohne Bedeutung, da sie bei der Regulation des Blutdruckes keine Rolle spielen.

Wie im nachfolgenden Kapitel dargestellt, gelang durch die Entwicklung der Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonisten nicht nur ein gewaltiger Fortschritt in der Therapie des Bluthochdruckes, sondern auch in der Aufklärung der Diversität der Angiotensin-II-Rezeptor-Familie.

1.1.2 Entwicklung der Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonisten

Seit gezeigt wurde, dass die Plasmakonzentration des Oktapeptids Angiotensin II eine Schlüsselrolle im Renin-Angiotensin-System spielt, bestand der Wunsch, pharmakologisch wirksame Substanzen zu finden, die mit Angiotensin II um dessen Bindungsstelle konkurrieren, um so in die Blutdruckregulation eingreifen zu können.

Die ersten Versuche, therapeutisch nutzbare Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonisten zu finden, waren wenig erfolgreich. Diese Substanzen wurden von der Peptidstruktur des Angiotensin II abgeleitet, ihre klinische Effizienz war jedoch sehr limitiert. Saralasin-Acetat (Sar¹-Ala⁸-Angiotensin II) ist unter anderem der am meisten untersuchte Wirkstoff dieser Klasse. Diese Peptidanaloga sind zwar in der Lage, mit dem Angiotensin II um die Rezeptorbindungsstelle zu konkurrieren, doch haben sie den Nachteil, dass sie keine orale Bioverfügbarkeit, eine sehr kurze Halbwertszeit im Blutplasma und zudem unerwünschte agonistische Eigenschaften besitzen [Bauer & Reams 1995, Criscione et al. 1993]. Erst mit der Entdeckung einiger Imidazolderivate mit Angiotensin-II-antagonistischen Eigenschaften wurde es möglich, wirksame, oral anwendbare, nicht peptidische Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonisten zu identifizieren und zu charakterisieren [Furukawa et al. 1982, Bauer & Reams 1995, Criscione et al. 1993]. Prototyp dieser neuen therapeutischen Klasse antihypertensiver Wirkstoffe ist Losartan (DuP753 oder MK954; 2-n-butyl-4-chloro-5-hydroxymethyl-1-[(2'-(1H-tetrazol-5-yl)biphenyl-4-yl)methyl]imidazol-Kaliumsalz), der erste oral aktive und lang wirksame nicht peptidische Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonist [Bauer & Reams 1995, Criscione et al. 1993]. Basierend auf Modifikationen der chemischen Struktur von Losartan wurden nachfolgend zahlreiche andere „sartans“ entwickelt (Abb. 1.2) [Burnier & Brunner 1999, Timmermans 1999]. Gleichzeitig mit der Entdeckung von Losartan wurde unabhängig eine weitere Serie von Wirkstoffen synthetisiert, sogenannte Tetrahydroimidazopyridine (Abb. 1.3), wie z.B. PD 123177 [Wong et al. 1992]. Ebenso patentiert als antihypertensive Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonisten, waren diese Wirkstoffe jedoch nicht in der Lage, in renal hypertensiven Ratten den Blutdruck zu erniedrigen [Smith et al. 1992]. Diese Entdeckung gründete die feste Auffassung, dass es zwei unterschiedliche Angiotensin-II-Rezeptoren geben müsse. Zahlreiche pharmakologische Untersuchungen sowie Klonierungsstudien erbrachten schließlich direkte Beweise für die Vielfalt der Angiotensin-II-Rezeptor-Familie [Smith et al. 1992]. Auf diese Weise konnten die zwei wesentlichen Subtypen AT₁ und AT₂ in Säugern voneinander unterschieden werden. Die pharmakologischen Unterscheidungskriterien für AT₁-Rezeptoren sind die hohe und selektive Affinität für Biphenyl-

imidazole, z.B. Losartan, und die relative Unempfindlichkeit gegenüber Tetrahydroimidazopyridinen.

Diese wiederum besitzen eine hohe und selektive Affinität zum AT₂-Rezeptor und werden daher als Angiotensin-II-Typ2-Rezeptor-Antagonisten bezeichnet. Wie bereits erwähnt, bleibt ihr Einsatz bisher auf die Forschung beschränkt, da sie keine klinische Bedeutung haben.

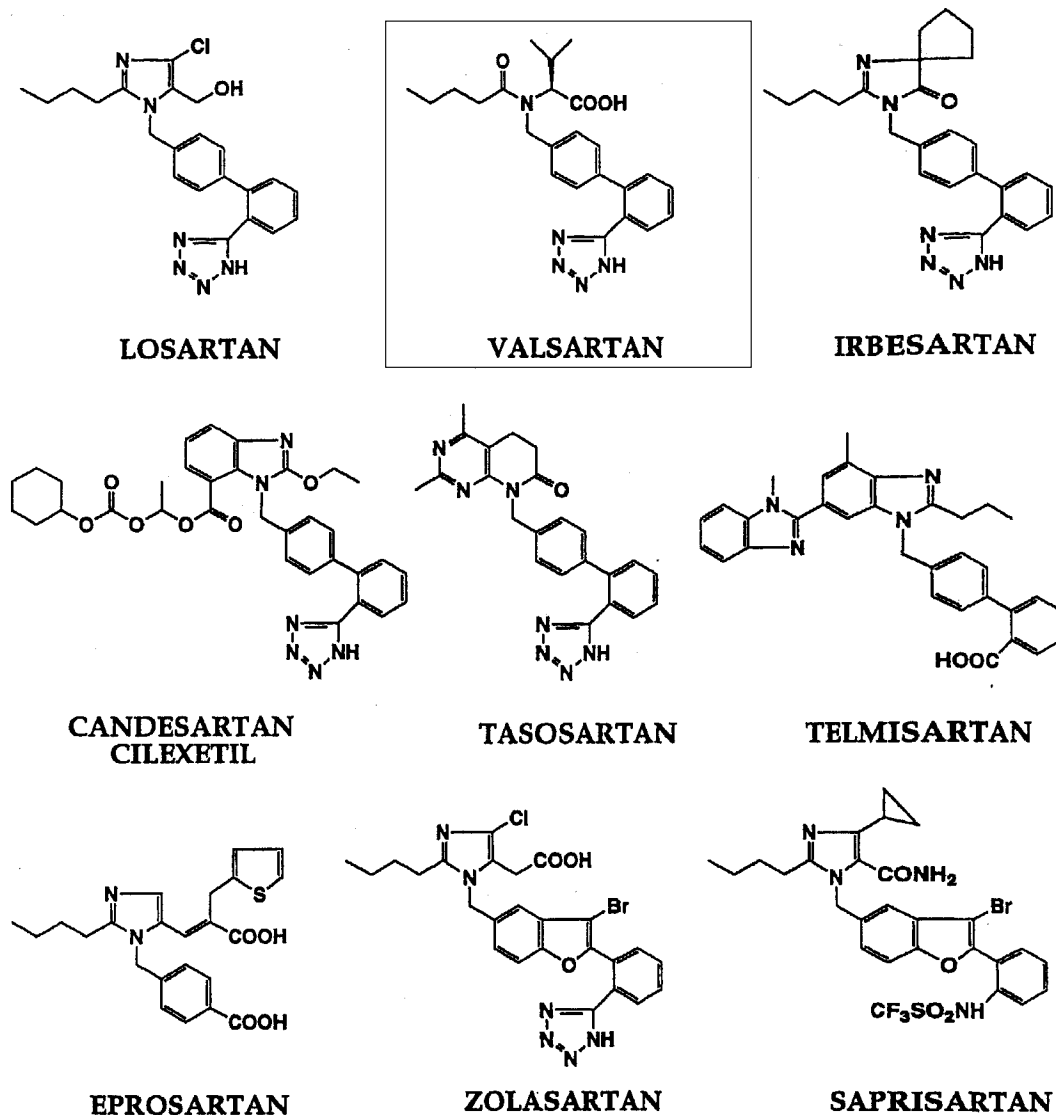
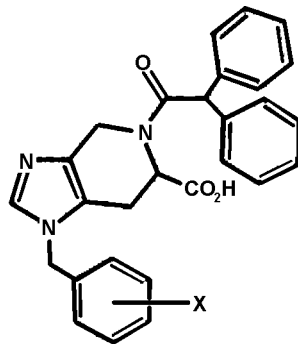


Abb. 1.2 Chemische Strukturformeln der unterschiedlichen AT₁-Rezeptor-Antagonisten *Losartan (E3174) war der erste, doch blieb er nicht der einzige wirksame, selektive, oral aktive und klinisch einsetzbare nicht peptidische AT₁-Rezeptor-Antagonist. Mit Ausnahme von Eprosartan wurden, basierend auf Strukturmodifikationen des Prototyps Losartan, zahlreiche andere Antagonisten entwickelt (verändert nach Timmermans 1999).*



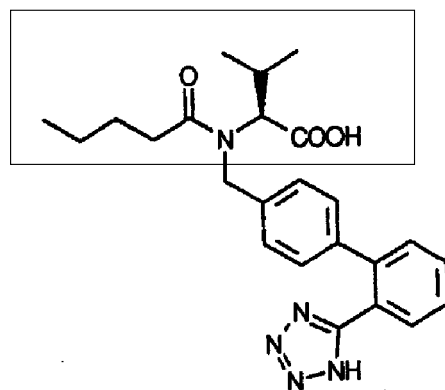
	X
PD121981	3 - CH ₃ , 4 - OCH ₃
PD123177	3 - CH ₃ , 4 - NH ₂
PD123319	3 - CH ₃ , 4 - N(CH ₃) ₂
PD124125	3 - CH ₃ , 4 - H

Abb. 1.3 Chemische Strukturformeln der Tetrahydroimidazopyridine: selektive Antagonisten des AT₂-Rezeptors (nach Wong et al. 1992)

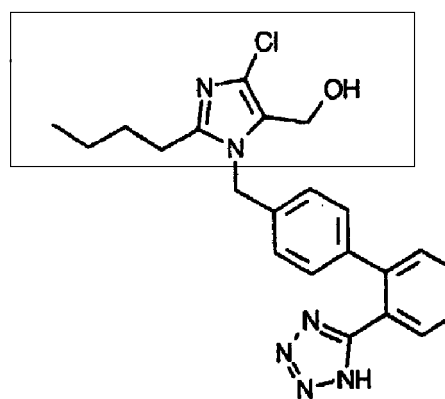
1.1.3 Pharmakologisches Profil des Angiotensin-II-Typ1-Rezeptor-Antagonisten

Valsartan

Valsartan, auch unter der Bezeichnung CGP 48933 bekannt, ist ein wirksamer, oral aktiver, nicht peptidischer und hoch selektiver Antagonist des Angiotensin II am AT₁-Rezeptor. Betrachtet man seine chemische Struktur (Abb. 1.4), so handelt es sich um das S-Enantiomer N-valeryl-N-[[2'-(1H-tetrazol-5-yl)biphenyl-4yl]methyl]valine. Die Neuartigkeit seiner Struktur liegt darin, dass der heterocyclische Imidazolring des Losartan durch eine nicht planare N-acylierte Aminosäure ersetzt wurde [Criscione et al. 1993]. Dadurch besitzt Valsartan anstatt einer Alkoholgruppe eine Carboxylgruppe und liegt bei physiologischem pH-Wert als Di-Anion vor (pK_a der Tetrazolgruppe = 4,73 und pK_a der Carboxylgruppe = 3,9). Aufgrund dieser Strukturmodifikation unterscheidet sich Valsartan in verschiedenen Punkten von Losartan.



Valsartan



Losartan

Abb. 1.4 Strukturformel des AT₁-Rezeptor-Antagonisten Valsartan (CGP 48933) im Vergleich zum Prototyp Losartan (E3174)
Der heterocyclische Imidazolring des Losartan wurde durch eine nicht planare N-acylierte Aminosäure ersetzt (nach De Gasparo & Whitebread 1995).

1.1.3.1 Bindungseigenschaften von Valsartan zum AT₁-Rezeptor im Vergleich zu Losartan

Valsartan ist ein hoch selektiver AT₁-Rezeptor-Antagonist [Mc Innes 1999b]. Bindungsexperimente unter Verwendung von glatten Muskelzellen der Aorta, isoliert aus Ratten (Vorkommen des AT₁-Rezeptors), bzw. des menschlichen Myometriums (Vorkommen des AT₂-Rezeptors) zeigten, dass die Affinität von Valsartan zum AT₁-Rezeptor etwa 30.000fach höher als zum AT₂-Rezeptor ist [Criscione et al. 1993]. In weiteren Bindungsexperimenten wurde die Affinität von Valsartan und Losartan zum AT₁-Rezeptor in Leber und Nebenniere von Ratten und Krallenaffen, menschlichen Nebennieren und glatten Muskelzellen, isoliert aus der Aorta der Ratte, untersucht [De Gasparo & Whitebread 1995]. In allen untersuchten Geweben besaß Valsartan eine etwa fünffach höhere Affinität zum AT₁-Rezeptor als Losartan. Mit Hilfe von Kompetitionsstudien, unter Verwendung des Angiotensin-II-Antagonisten (Sar¹,Ile⁸)Angiotensin II als Hemmstoff, konnte die Bindung von radioaktiv markiertem Valsartan durch (Sar¹,Ile⁸)Angiotensin II komplett verhindert werden. Dies bedeutet, dass Valsartan nur an den AT₁-Rezeptor bindet und somit die blutdrucksenkenden Effekte einzig durch den AT₁-Rezeptor vermittelt werden. Radioaktiv markiertes Losartan dagegen bindet an eine andere Bindungsstelle am AT₁-Rezeptor, die nicht von (Sar¹,Ile⁸)Angiotensin II erkannt wird, denn in einer Kompetitionsstudie vermag selbst ein Überschuss an (Sar¹,Ile⁸)Angiotensin II Losartan nicht von seiner Bindungsstelle zu verdrängen [De Gasparo & Whitebread 1995]. Wird der AT₁-Rezeptor durch (Sar¹,Ile⁸)Angiotensin II blockiert, so konnte in einer Kompetitionsstudie unter Verwendung von radioaktiv markiertem Losartan gezeigt werden, dass Valsartan an diese „Losartan-Bindungsstelle“ ebenfalls binden kann, allerdings mit einer 220fach geringeren Affinität als Losartan selbst [De Gasparo & Whitebread 1995]. Wahrscheinlich erkennt der Imidazolrest des Losartan eine andere Stelle am AT₁-Rezeptor-Protein als der Valinrest des Valsartan.

1.1.3.2 Pharmakokinetische Daten von Valsartan

– Resorption und Bioverfügbarkeit

In einer Studie mit gesunden männlichen Probanden wurde Valsartan nach oraler Verabreichung einer Konzentration von 80 mg rasch resorbiert, mit Erreichen einer maximalen Plasmakonzentration nach 1 - 2 Stunden [Colussi et al. 1997, Waldmeier et al. 1997] und einer mittleren Plasmakonzentration in Abhängigkeit von der Zeit ($AUC_{(24\text{ h})}$) von $19,6 \pm 6,0$ ($\mu\text{mol/l} \times \text{h}$) [Waldmeier et al. 1997]. Verglichen mit der mittleren Plasmakonzentration in Abhängigkeit von der Zeit nach intravenöser Verabreichung einer Konzentration von 20 mg Valsartan ($AUC_{(24\text{ h})} = 21,6 \pm 3,9$ ($\mu\text{mol/l} \times \text{h}$)), entspricht dies nach Korrektur der Dosis einer absoluten oralen Bioverfügbarkeit von 23 ± 7 % [Waldmeier et al. 1997].

– Verteilung und Proteinbindung im Plasma

Die Verteilung von Valsartan nach einer intravenösen Gabe ist durch einen biphasischen Verlauf charakterisiert mit einer Verteilungshalbwertszeit von weniger als 1 Stunde und einer terminalen Halbwertszeit von etwa 6 bis 9 Stunden [Colussi et al. 1997].

Die Proteinbindung von Valsartan [Colussi et al. 1997], untersucht in vitro mittels Gleichgewichts-Dialyse bzw. in vivo im Blut von Mensch, Ratte, Hund, Kaninchen, Affe und Maus, ist hoch und beträgt im Schnitt 94 - 97 %. Valsartan wird im Plasma hauptsächlich an Albumin gebunden (92 %) sowie in geringem Maße an saures α_1 -Glykoprotein (22 %). Die Bindung an γ -Globuline ist vernachlässigbar. Die zusätzliche Verabreichung von Wirkstoffen, die in der Klinik häufig mit blutdrucksenkenden Arzneimitteln kombiniert werden, z.B. Hydrochlorothiazid, Furosemid, Diclofenac-Natrium oder Warfarin, haben keinen Einfluss auf die Plasmaproteinbindung von Valsartan.

– Biotransformation

Valsartan wird nur geringfügig metabolisiert [Brookman et al. 1997, Colussi et al. 1997, Waldmeier et al. 1997]. Ein „minor“-Metabolit konnte in Plasma, Urin und Fäzes nachgewiesen werden. Es handelt sich weder um ein Glukuronsäure-Konjugat noch um ein Sulfat-Konjugat, sondern um das durch Oxidation hydroxylierte Valsartan (valeryl-4-hydroxy-Valsartan oder CGP 71580) (Abb. 1.5) Dieser Metabolit ist etwa 200fach weniger wirksam im Hinblick auf die Bindung am AT_1 -Rezeptor [Brookman et al. 1997]. Dies belegt, dass Valsartan in unveränderter Form für die pharmakologische Wirkung verantwortlich ist.

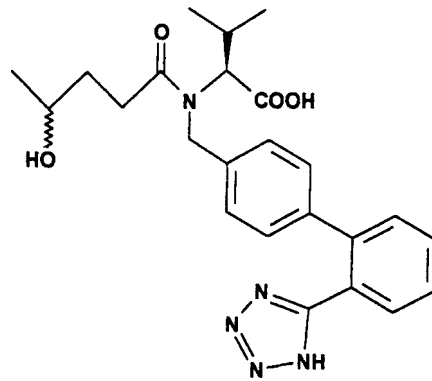


Abb. 1.5 Chemische Strukturformel des Metaboliten M1 (CGP 71580)
(nach Waldmeier et al. 1997)

Im Gegensatz zu Valsartan handelt es sich bei Losartan um ein Pro-Drug. Seine pharmakologische Aktivität erlangt Losartan erst nach hepatischer Umwandlung in seinen aktiven Metaboliten, bezeichnet als EXP 3174, welcher durch einen Carboxylsäure-Rest eine etwa 20fach höhere Wirksamkeit als Losartan am AT_1 -Rezeptor besitzt [Criscione et al. 1993].

– Elimination

Valsartan wird zum größten Teil in unveränderter Form ausgeschieden [Brookman et al. 1997]. Aufgrund seiner doppelt negativen Ladung wurde angenommen, dass Valsartan direkt über Anionen-Transportsysteme in Leber und Niere ausgeschieden wird [Brookman et al. 1997]. Stattdessen ist der Haupteliminationsweg jedoch die Galle. Grund dafür ist die hohe Plasmaproteinbindung, wodurch die freie Fraktion, die zur Filtration in der Niere geeignet ist, sehr gering ist. Nach oraler Verabreichung werden ca. 70 % der systemisch verfügbaren Valsartankonzentration über die Galle und nur 30 % mit dem Urin ausgeschieden [Brookman et al. 1997].

1.2 Zur Rolle der Leber für die Aufnahme und die biliäre Elimination endogener Substrate und Xenobiotika

1.2.1 Funktion und histologischer Aufbau der Leber

Die Leber ist die größte Drüse des Organismus. Neben ihrer Funktion zur Bildung und Ausscheidung der Galle nimmt sie eine zentrale Rolle im Intermediärstoffwechsel ein. Die Leber ist sowohl am Kohlehydrat- als auch am Protein- und Fettstoffwechsel maßgeblich beteiligt, sie synthetisiert Plasmaproteine und dient der Entgiftung und Ausscheidung toxischer Stoffwechselprodukte und Xenobiotika [Pschyrembel 1990].

Nährstoffreiches Blut aus dem Darmbereich gelangt über die Pfortader zur Leber. In der Leber vermischt es sich mit nutritivem, sauerstoffreichem Blut aus der Arteria hepatica propria und gelangt schließlich in die Lebersinusoide. Das Blut verlässt die Leber über die Venae hepaticae, die gesammelt in die Vena cava caudalis münden.

Mikroskopisch betrachtet, kann die Leber in einzelne Leberläppchen unterteilt werden, in denen die Leberzellen (Hepatozyten) radiär zu Leberzellbalken angeordnet sind. Innerhalb des Leberläppchens verlaufen die Sinuskapillaren entlang der Leberzellbalken vom Läppchenrand (periportale Felder) zur Zentralvene. Die Sinuskapillaren sind dünnwandige, weitlumige Gefäße, ausgekleidet mit einem diskontinuierlichen (fenestrierten) Endothel, dem eine Basallamina fehlt. Diese Endothelschicht erlaubt einen intensiven Stoffaustausch zwischen Blut und Leberzelle. Zwischen der Außenfläche der Lebersinusoide und der freien Oberfläche der Leberzellen liegt ein schmaler Spaltraum, der als perisinoidaler Raum oder als Disse-Raum bezeichnet wird. In den Disse-Raum ragen die Mikrovilli der Leberzellen, durch die ein beschleunigter Stoffaustausch ermöglicht wird. An der dem Blutsystem abgewandten Seite der Leberzellen erfolgt die Abgabe der Gallenflüssigkeit in ein gesondertes Drainagesystem. Durch Erweiterungen des interzellulären Raums wird ein tubuläres Gangsystem ausgespart, das die Gallenflüssigkeit aufnimmt und als Gallenkanälchen bezeichnet wird. In den periportalen Feldern vereinigen sich diese Gallenkanälchen zu einem größeren Gallengang, dabei fließt die Gallenflüssigkeit entgegen dem Blutstrom. Mehrere Gallengänge vereinigen sich schließlich zu einem Ausführungsgang (Ductus hepaticus), welcher an der Leberpforte, parallel zur Vena portae, das Organ verlässt. Die einzelnen Hepatozyten kommunizieren über „gap-junctions“ miteinander und sind durch „tight-junctions“ verbunden, die Gallenkanälchen und Disse-Raum gegeneinander abschließen [Liebich 1990].

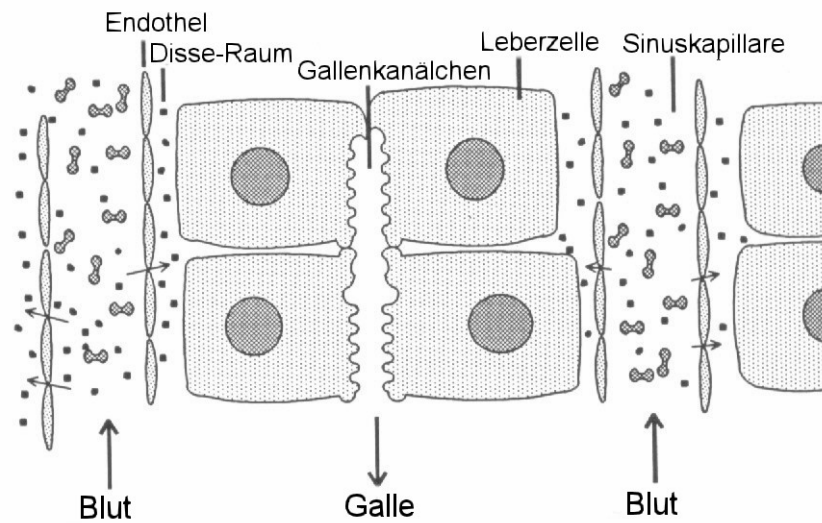


Abb. 1.6 Schematische Darstellung des mikroskopischen Aufbaus der Leber

Das Blut gelangt über Sinuskapillaren zu den Leberzellbalken. Proteine und andere lösliche Substanzen passieren die endotheliale Barriere, während Erythrozyten und andere Blutzellen im Sinus verbleiben. Hepatozyten nehmen Stoffe aus dem Disse-Raum auf bzw. sondern Stoffe in diesen ab. Abfallprodukte werden auf der apikalen Seite der Leberzelle über die Gallenkanälchen ausgeschieden. Die gebildete Galle verlässt das Leberläppchen in entgegengesetzter Richtung zum Blutfluss (verändert nach Heijn 1994).

In der Leberzelle lassen sich zusammenfassend drei verschiedene Membranabschnitte unterscheiden [Meier et al. 1984]:

- Sinusoidale Membranen (70 %) sind mit Mikrovilli ausgestattet, hier findet der Stoffaustausch mit dem Blut statt.
- Laterale Membranen stellen über „gap-junctions“ den interzellulären Kontakt her.
- Kanalikuläre Membranen (13 %), über die die biliäre Sekretion abläuft.

Sinusoidale und laterale Membranen werden zusammen als basolaterale Membranen bezeichnet. Beide Membranabschnitte, die basolateralen und die kanalikulären, werden durch „tight-junctions“ funktionell voneinander getrennt.

Stoffe, die mit der Nahrung aufgenommen werden, passieren zuerst die Leber, bevor sie in den systemischen Blutkreislauf gelangen. Nährstoffe werden metabolisiert, gespeichert und ihre Abgabe zurück in die Zirkulation reguliert. Die meisten toxischen Verbindungen werden zu weniger toxischen Stoffen umgewandelt und in die Galle transportiert oder gelangen zurück in den Blutkreislauf, von wo sie über die Nieren ausgeschieden werden.

1.2.2 Überblick der komplexen molekularen Mechanismen des Stofftransportes der Hepatozytenmembran

So einfach der histologische Aufbau der Leber auch erscheinen mag, umso komplexer sind die molekularen Mechanismen, die für die vielseitigen Transportprozesse der Leber verantwortlich sind. Der Transport organischer Anionen und Kationen sowie Fremdstoffe über die basolaterale und kanalikuläre Plasmamembran der Leberzelle erfolgt über spezifische aktive Transportsysteme. Zahlreiche In-vitro-Modelle wurden zur Erforschung der funktionellen Eigenschaften dieser Transportsysteme benutzt. Hierzu zählen isolierte Rattenhepatozyten, Primärkulturen und Zellkultursysteme [Schwarz et al. 1975, Schwarz & Barth 1979, Anwer et al. 1976a / 1976b, Petzinger & Frimmer 1984 / 1988, Föllmann et al. 1990], isoliert perfundierte Leber [Reichen & Paumgartner 1976] sowie basolaterale und kanalikuläre Plasmamembranvesikel von Leberzellen [Inoue et al. 1982, Meier et al. 1984]. Erst in den letzten zehn Jahren konnten die für den Stofftransport verantwortlichen Carrierproteine mit Hilfe molekularbiologischer Methoden zur Klonierung und molekularen Charakterisierung identifiziert werden. In Abbildung 1.7 sind schematisch zwei benachbarte Hepatozyten mit Gallenkanälchen und die einzelnen Transportsysteme entsprechend ihrer Lokalisation in den verschiedenen Membranabschnitten dargestellt [Kamisako 1999].

1.2.2.1 Hepatozelluläre Aufnahme organischer Anionen und Kationen über die sinusoidale Plasmamembran

Die Aufnahme organischer Anionen und Kationen über die sinusoidale Plasmamembran der Leberzelle erfolgt über unterschiedliche Transportsysteme [Kamisako 1999]:

1. den **Natrium-abhängigen Taurocholat-cotransporter** oder „**Na⁺ / taurocholate cotransporting polypeptide**“ (**NTCP** des Menschen / **ntcp** der Ratte)

Dieses Transportsystem ist hauptverantwortlich für die Aufnahme von konjugierten Gallensäuren, insbesondere Taurocholat, Taurochenodeoxycholat und Chenodeoxycholat. Der für die Aufnahme benötigte Natrium-Gradient wird durch die Aktivität einer Na⁺/K⁺-ATPase, die sich ebenfalls in der sinusoidalen Leberplasmamembran befindet, aufrechterhalten.

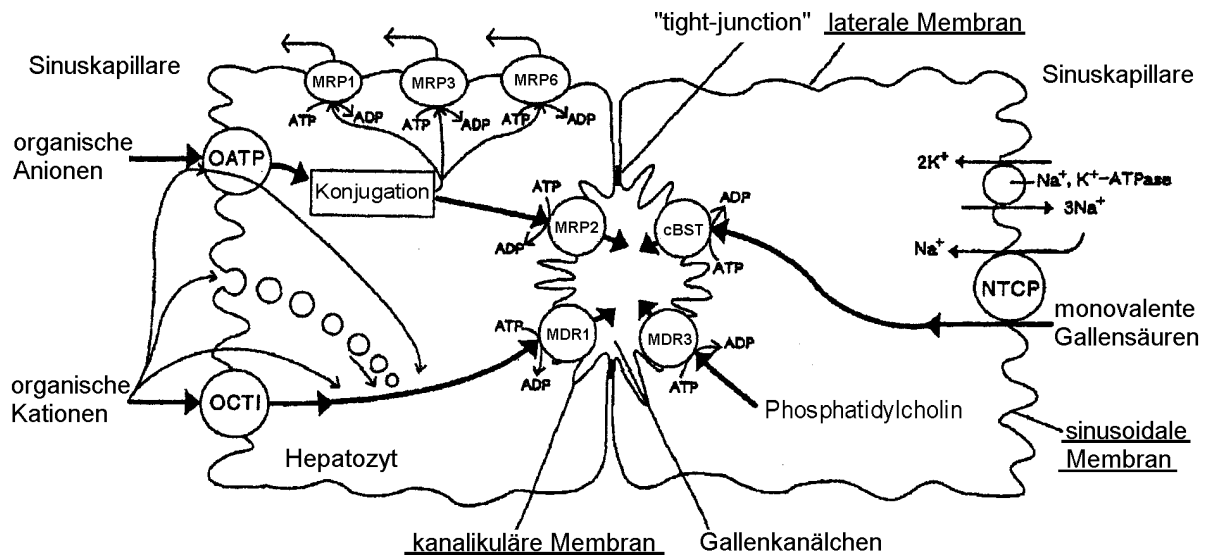


Abb.1.7 Schematische Darstellung des Transportes organischer Anionen und Kationen über die Leberplasmamembran

Transportsysteme, dargestellt als Kreise, sind in der sinusoidalen, lateralen und kanalikulären Plasmamembran der Leberzelle lokalisiert. Die Aktivität des „Multidrug resistance-associated protein“ (MRP), des „Multidrug resistance gene product“ (MDR) und des „canalicular bile salt transporter“ (cBST) ist von der durch Hydrolyse von ATP gebildeten Energie abhängig, so dass sie zur Familie der „ATP-binding cassette“ (ABC)-Transporter zusammengefasst werden. OCT1 ist die Abkürzung für „organic cation transporter“, NTCP steht für „Na⁺ / taurocholate cotransporting polypeptide“ und OATP steht für „organic anion transporting polypeptide“ (verändert nach Kamisako et al. 1999).

2. den **organischen Anionen-Transporter** oder „**organic anion transporting polypeptide**“ (OATP des Menschen / **oatp1** der Ratte)

Ein Transportsystem für organische Anionen, insbesondere Sulfobromophthalein, Bilirubin, neutrale Steroide (Aldosteron, Dexamethason, das Herzglykosid Oubain, Ochratoxin A), Östron-3-sulfat sowie Östron-17 β -Glucuronid. Es ist außerdem beteiligt am Natrium-unabhängigen Transport von Gallensäuren und in Leberzellen der Ratte am Transport höhermolekularer Kationen.

3. den **organischen Kationen-Transporter** oder „**organic cation transporter**“ (OCT1 des Menschen / **oct1** der Ratte)

Das Transportprotein oct1 der Ratte ist verantwortlich für den Transport niedermolekularer organischer Kationen, während der organische Kationen-Transporter des Menschen (OCT1) niedermolekulare als auch höhermolekulare organische Kationen transportiert (z.B. Tetraethylammonium, Cholin).

1.2.2.2 Die hepatobiliäre Elimination organischer Anionen und Kationen

In der kanalikulären Plasmamembran der Leber sind verschiedene ATP-abhängige Transportsysteme für organische Ionen beschrieben worden (Abb. 1.7). Sie gehören aufgrund ihrer enormen Sequenzhomologie, besonders im ATP-Bindungsbereich, zu der Familie der ABC-Transporter („ATP-binding-cassette“-Transporter) [Higgins et al. 1986].

1. Die Elimination organischer Kationen und Phospholipide über die kanalikuläre Leberplasmamembran

Für den hepatobiliären Transport organischer Kationen und Phospholipide ist das „**multidrug resistance gene product**“ (**MDR-Genfamilie**) oder **P-Glykoprotein** verantwortlich. Es handelt sich um ein 170-kDa-Glykoprotein, welches in hoher Konzentration in „multidrug“-resistenten Tumorzellen gebildet wird. Der Name „multidrug resistance“ stammt aus der Tumormedizin und ist auf das Phänomen der Entwicklung einer Resistenz von Tumorzellen gegen eine Vielzahl verschiedener Chemotherapeutika zurückzuführen [Gottesman & Pastan 1993]. Verschiedene Gene können dieser Familie zugeordnet werden. Die *mdr*-Genfamilie von Maus und Ratte wird klassifiziert in *mdr1a*, *mdr1b* und *mdr2*, während die **MDR-Genfamilie** des Menschen in **MDR1** und **MDR3** unterteilt wird [Smit et al. 1994, Niedernhöfer 1996].

Die Genprodukte **MDR1** des Menschen und **mdr1a / mdr1b** von Maus und Ratte sind in der kanalikulären Plasmamembran der Leberzelle lokalisiert [Thiebaut et al. 1987]. Ihre physiologische Rolle in der Leber ist die Exkretion verschiedener organischer Kationen und auch neutraler organischer Verbindungen in die Galle [Kamimoto et al. 1989]. Substrate sind z.B. Daunomycin, die Vinca Alkaloide Vincristin und Vinblastin sowie Verapamil und Cyclosporin A. In normalen Leberzellen werden sie allerdings auf einem viel geringeren Niveau exprimiert als in „multidrug“-resistenten Tumorzellen.

Das **MDR3**-Protein des Menschen ist in seiner Aminosäuren-Zusammensetzung zu 75 % identisch mit dem **MDR1**-Protein, während das **mdr2**-Protein von Maus und Ratte eine zu 69- bis 72-prozentige Übereinstimmung mit *mdr1a* bzw. *mdr1b* aufweist. Trotz ihrer hohen Übereinstimmung vermögen **MDR3**- und *mdr2*-Gene in transfizierten Zellen keine Multiresistenz auszulösen [Buschman & Gros 1994, Schinkel et al. 1991]. Sie sind ebenfalls in der kanalikulären Plasmamembran der Leberzelle lokalisiert [Buschman et al. 1992, Smit et al. 1994], doch im Gegensatz zu **MDR1** bzw. *mdr1a / mdr1b*, welche eine breite Substratspezifität besitzen, ist die physiologische Funktion von **MDR3** bzw. *mdr2* die spezifische Sekretion von Phosphatidylcholin in die Galle [Cohen 1999]. Dies

belegen Studien mit homozygoten *mdr2*-Gen-„knockout“-Mäusen (*mdr2*(-/-)) sowie In-vitro-Studien mit Hilfe von MDR1 bzw. MDR3 überexprimierenden Zellen und kanalikulären Plasmamembranvesikeln, isoliert aus der Rattenleber [Smit et al. 1993, Van Helvoort et al. 1996, Nies et al. 1996]. Interessanterweise konnte außerdem bei Patienten mit dem Krankheitsbild der progressiven familiären intrahepatischen Cholestase (PFIC) ein Zusammenhang mit erblich defekter Expression des MDR3-Gens festgestellt werden [De Vree et al. 1998].

2. Transport organischer Anionen über die kanalikuläre Leberplasmamembran

Die Leber wandelt viele endogene und exogene hydrophobe Substanzen durch Konjugation mit Glukuronsäure, Glutathion oder Schwefelsäure in amphiphile anionische Verbindungen um. Diese Konjugate sind Substrate des kanalikulären „**Multidrug resistance-associated protein**“ (**MRP2 / Mrp2**) oder „**canalicular multispecific organic anion transporter**“ (**cMOAT / cMoat**) [siehe Kapitel 1.3]. In der lateralen und kanalikulären Hepatozytenmembran wurden weitere MRP-Isoformen identifiziert, die als **MRP1 / Mrp1**, **MRP3** und **MRP6** bezeichnet werden. Davon besitzen das MRP1 des Menschen und das Mrp1 der Ratte ein vergleichbares Substratspektrum wie das entsprechende kanalikuläre MRP2 / Mrp2-Protein [Jedlitschky et al. 1994 / 1996 / 1997, Keppler et al. 1997, Leier et al. 1994, Müller et al. 1994]. Die Funktion der anderen beiden MRP-Isoformen des Menschen ist noch unbekannt [König et al. 1999]. MRP1 / Mrp1 wie auch MRP3 und MRP6 werden in der normalen Leber auf einem niedrigen Niveau exprimiert [Kamisako et al. 1999], während eine experimentell induzierte Cholestase, durch Ligatur des Gallenganges oder einer Endotoxämie, zu einer signifikanten „Down-Regulation“ des MRP2 / Mrp2 und einer gleichzeitigen „Up-Regulation“ der lateralen Isoformen führt [König et al. 1999, Vos et al. 1998, Roelofsen et al. 1997, Mayer et al. 1995]. Auch bei dem sogenannten Dubin-Johnson-Syndrom des Menschen und zwei mutanten Rattenstämmen, den GY / TR⁻-Ratten und den „Eisai hyperbilirubinemic rats“ [siehe Kapitel 1.3], die durch einen erblichen Defekt des MRP2 / Mrp2-Proteins charakterisiert sind, konnten die genannten Isoformen verstärkt in der lateralen Leberplasmamembran isoliert werden. Daher wird angenommen, dass diese Transportsysteme im Falle einer gestörten kanalikulären Elimination zum Reflux organischer Anionen, insbesondere konjugiertem Bilirubin, über die basolaterale Membran ins sinusoidale Blut beitragen [König et al. 1999, Keppler & Kartenbeck 1996].

3. Gallensäure-Transport über die kanalikuläre Leberplasmamembran

In der Vergangenheit wurde in zahlreichen Studien versucht, das für den hepatobiliären Gallensäuretransport verantwortliche Transportprotein ausfindig zu machen. Verschiedene Forschergruppen zeigten bereits 1991, dass die Taurocholat-Aufnahme in kanalikuläre Plasmamembranvesikel, isoliert aus der Rattenleber [Adachi et al. 1991, Müller et al. 1991, Nishida et al. 1991, Stieger et al. 1992] als auch aus der Leber des Menschen [Wolters et al. 1992], durch Zusatz von ATP stimuliert werden kann. Heute weiß man, dass zwei unterschiedliche Transportsysteme für den hepatobiliären Transport von Gallensäuren verantwortlich sind:

- der **ATP-abhängige Gallensäuren-Transporter** oder „**canalicular bile salt transporter**“ (**cBST**), ein 160-kDa-Glykoprotein, welches aufgrund seiner großen Ähnlichkeit mit der MDR-Genfamilie (P-Glykoprotein) auch als „**sister-of-p-glycoprotein**“ (**SPGP** des Menschen / **spgp** der Ratte) bezeichnet wird [Childs et al. 1995, Gerloff et al. 1998]. Es wird ausschließlich in der kanalikulären Plasmamembran der Leber exprimiert und ist hauptverantwortlich für den Transport monovalenter Gallensäuren, wie z.B. Taurocholat oder Cholat.
- der Transport divalenter Gallensäuren, z.B. glukuronidierter oder sulfatierter Gallensäuren, erfolgt über das „**Multidrug resistance-associated protein**“ (**MRP2** / **Mrp2**) [Jedlitschky et al. 1996].

1.3 Das kanalikuläre Multidrug resistance-associated protein (cMRP)

Der Transport anionischer Konjugate und amphiphiler Anionen über die kanalikuläre Plasmamembran der Leber erfolgt über eine primär aktive ATP-abhängige Exportpumpe, die erst 1996 am Deutschen Krebsforschungsinstitut in Heidelberg kloniert sowie sequenziert werden konnte und als „Multidrug resistance-associated protein“ (MRP2 / Mrp2) bzw. „canalicular multispecific organic anion transporter“ (cMOAT / cMoat) bezeichnet wurde [Oude Elferink und Jansen 1994].

Das „Multidrug resistance protein“ (MRP) konnte ursprünglich aus „multidrug“-resistenten menschlichen Lungen-Tumorzellen kloniert und sequenziert werden. Es wurde als integrales Membranglykoprotein mit einer molekularen Masse von 190 kDa identifiziert und gehört zur Familie der ATP-binding-cassette-Transporter (ABC-Transporter) [Cole et al. 1992]. Seine Funktion für den primär aktiven ATP-abhängigen Transport amphiphiler Anionen, insbesondere von Konjugaten lipophiler Verbindungen, wurde anhand zahlreicher Studien mit Hilfe von Plasmamembranvesikeln belegt [Jedlitschky et al. 1994 / 1996, Leier et al. 1994 / 1996]. Eine Isoform des MRP fand man in der kanalikulären Leberplasmamembran mit Hilfe von Immunoblots und Immunfluoreszenzmikroskopie sowie Sequenzierung von cDNA-Fragmenten [Müller et al. 1994]. Ein großer Fortschritt in der Charakterisierung dieses Transportproteins gelang mit der Entdeckung zweier Rattenstämme, den sogenannten „Eisai hyperbilirubinemic rats“ (EHBR) und den GY / TR⁻-Ratten [Müller et al. 1994]. Diese mutierten Ratten haben einen Defekt im ATP-abhängigen Transport von Konjugaten aus der Leberzelle in die Galle [Oude Elferink et al. 1995] und aufgrund dessen eine Hyperbilirubinämie (die Abkürzung TR⁻ steht für „transport negative“). Sie sind hochgradig ikterisch; daher auch die Bezeichnung GY, die für „Groningen (Holland)“ und „Yellow“ für die ikterischen Schleimhäute steht. Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) konnte das Fehlen der MRP- verwandten mRNA in der Leber dieser Rattenstämme nachgewiesen werden [Müller et al. 1994, Mayer et al. 1995]. Dies war der Grundstein für die Klonierung und Sequenzierung der kompletten cDNA, die für die kanalikuläre Isoform des Mrp (cMrp) der Rattenleber codiert [Keppler & König 1997, Büchler et al. 1996]. Das *MRP2*-Gen konnte anschließend beim Menschen und bei verschiedenen Tierspezies nachgewiesen werden [Keppler & König 1997].

1.3.1 Aufbau des MRP2 / Mrp2 und Sequenzvergleich mit anderen Mitgliedern der MRP-Familie

Die *MRP2*-cDNA der Ratte codiert für ein Protein, bestehend aus 1.541 Aminosäuren. Die computergestützte Analyse [Persson & Argos 1994] der Aminosäuresequenz führte zu einem Topologiemodell mit 13 transmembranären Domänen (Abb. 1.8) [Keppler & König 1997, Büchler et al. 1996]. Es besitzt die beiden für ABC-Transporter charakteristischen ATP-Bindungsstellen, die sich auf der Innenseite der Plasmamembran befinden und durch das Neun-plus-vier-Verteilungsmuster der transmembranären Domänen voneinander getrennt sind.

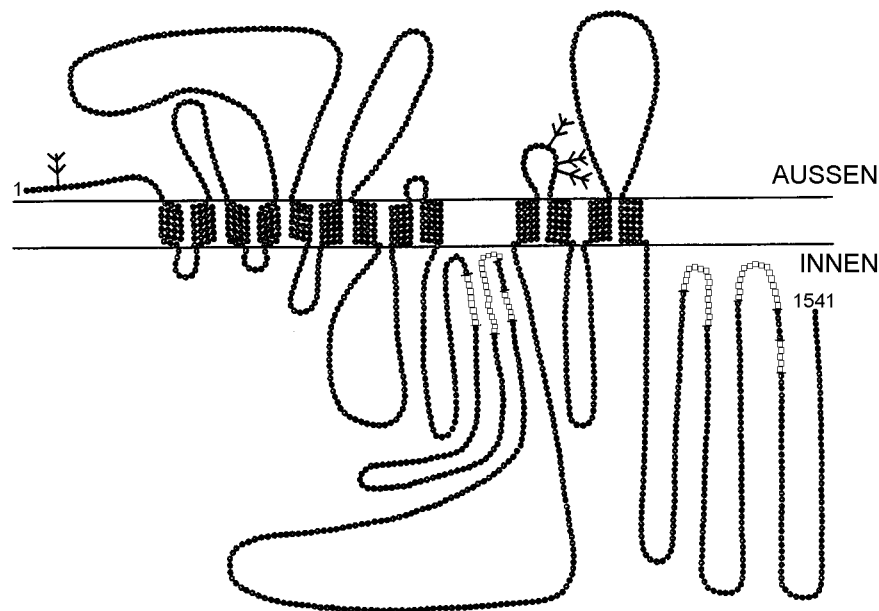


Abb. 1.8 Topologiemodell des Mrp2-Proteins der Ratte

Die beiden charakteristischen ATP-Bindungsregionen, als helle Kreise dargestellt, werden durch das Neun-plus-vier-Verteilungsmuster der transmembranären Domänen voneinander getrennt (verändert nach Keppler & König 1997).

Das MRP2-Protein des Menschen besteht aus 1.545 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von 174 kDa in seiner deglykosilierten Form [Taniguchi et al. 1996]. Vergleicht man die Aminosäure-Sequenz des MRP2 des Menschen mit der des Mrp2 der Ratte (78 % Identität) [Büchler et al. 1996, Paulusma et al. 1996] bzw. mit der des MRP2 oder „epithelial basolateral chloride conductance regulator“ (EBCR) des Kaninchens (82 % Identität) [Van Kuijk et al. 1996], so ist eine starke Homologie festzustellen [Keppler & König 1997].

Ein Vergleich der Aminosäuren-Identität zu weiteren Mitgliedern der MRP-Familie ist in Tabelle 1.1 dargestellt [Keppler & König 1997]. Eine nahe Verwandtschaft besteht zu dem MRP1 des Menschen [Cole et al. 1994] sowie seinen Homologen von Maus [Stride et al. 1996] und Ratte [Büchler et al. 1996, Mayer et al. 1995] (49 % Identität). Die ABC-Transporter MRP1 und MRP2 des Nematoden *Caenorhabditis elegans*, Transportsysteme, die Resistenz gegenüber Schwermetallen auslösen [Broeks et al. 1996], oder der „Conjugate-transporting cadmium resistance factor“ der Hefe (YCF1 oder YDR135c) [Szczypka et al. 1994] sind zu 43 % bzw. 41 % identisch mit dem MRP2-Protein.

Die Mitglieder der P-Glykoprotein-Familie, von denen einige ebenfalls mit dem Phänomen der Multidrug-Resistenz assoziiert sind, werden als weit verwandt mit der MRP-Familie angesehen. Die Aminosäuresequenz zwischen MRP1 und dem MDR1-P-Glykoprotein ist nur zu 15 % identisch [Cole et al. 1992], während zwischen dem MRP2 des Menschen und dem MDR1- und MDR2-P-Glykoprotein eine nur 25%ige bzw. 24%ige Übereinstimmung besteht.

Tab. 1.1 Aminosäurenidentität des MRP2 des Menschen und verwandter Transporter der ATP-binding-cassette-Familie (*verändert nach Keppler & König 1997*)

ABC-Transporter	Aminosäuren	Identität (%)
MRP2 (cMRP / cMoat) <i>Mensch</i>	1.545	100
MRP2 (EBCR) <i>Kaninchen</i>	1.564	82
Mrp2 (cMrp / cMoat) <i>Ratte</i>	1.541	78
MRP1 <i>Mensch</i>	1.531	49
Mrp1 <i>Maus</i>	1.528	49
MRP2 <i>C. elegans</i>	1.525	43
MRP1 <i>C. elegans</i>	1.540	43
YDR135C (YCF1) <i>Hefe</i>	1.515	41
MDR1 <i>Mensch</i>	1.280	25
Mdr1b <i>Ratte</i>	1.277	25
MDR3 <i>Mensch</i>	1.279	24
Mdr2 <i>Ratte</i>	1.278	24

1.3.2 Lokalisation des MRP2 / Mrp2

Zur Feststellung der Lokalisation der beiden Glykoproteine MRP2 und Mrp2 hat sich der Einsatz polyklonaler Antikörper mit hoher Affinität und Selektivität sehr nützlich erwiesen. Beide, MRP2 wie auch Mrp2, kommen hauptsächlich in Hepatozyten vor und sind dort ausschließlich in der kanalikulären Plasmamembran lokalisiert [Büchler et al. 1996, Keppler & Kartenbeck 1996]. Die für Mrp2 codierende mRNA wurde außerdem mit Hilfe des Northernplots in der Niere, im Duodenum und Ileum detektiert. Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass Mrp2 in der Niere ausschließlich in der apikalen Membran proximaler Tubuluszellen [Schaub et al. 1997 / 1999] lokalisiert ist. Da MRP2 / Mrp2 nur in der apikalen Membran vorkommt, ist auch die Bezeichnung „apikale Konjugat-Exportpumpe“ zutreffend. Im Gegensatz dazu kommt das MRP1 / Mrp1-Protein in der Plasmamembran vieler verschiedener Zelltypen vor und ist dort nicht auf der apikalen Membran, sondern auf der lateralen Membran lokalisiert [Keppler & Kartenbeck 1996].

1.3.3 Substratspezifität des MRP2 / Mrp2

Eine elegante Methode zur Feststellung der Substratspezifität des Mrp2 / cMoat ist der Vergleich der ATP-abhängigen Substrataufnahme in kanalikuläre Plasmamembranvesikel isoliert aus normalen und mutanten GY / TR⁻-Ratten oder Eisai-hyperbilirubinemic-Ratten, denen selektiv dieses Transportprotein fehlt [Müller et al. 1994, Oude Elferink et al. 1995]. Der ATP-abhängige Transport von Substraten des MRP2 wurde dagegen an Membranvesikeln von HepG2-Hepatoma-Zellen analysiert, die unter bestimmten Bedingungen MRP2 prädominant überexprimieren [Jedlitschky et al. 1997].

Im Folgenden sind einige Substrate des MRP2 / Mrp2 in Abhängigkeit von ihrer v_{\max} / K_m -Rate aufgeführt:

LTC₄ > LTD₄ > S-(2,4-dinitrophenyl)-Glutathion > Monoglucuronosyl-Bilirubin > Östron-17-β-Glukuronid > 3α-Sulfatolithocholyl-Taurin > GSSG

Der K_m -Wert von Leukotriene C₄ wurde mit 250 nM ermittelt [Ishikawa et al. 1990], der K_m -Wert von GSSG dagegen mit 110 μM [Leier et al. 1996].

Weitere Substrate sind verschiedene divalente amphiphile Anionen und viele Glukuronsäure-, Glutathion- und Sulfatkonjugate (Abb. 1.9) [Oude Elferink 1995].

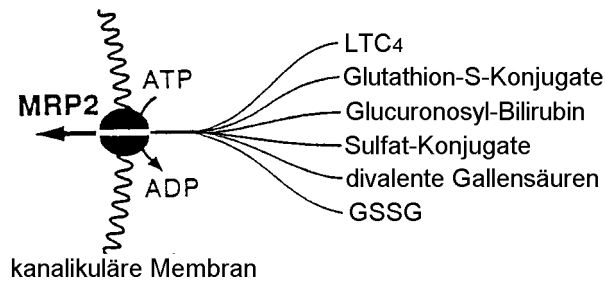


Abb. 1.9 Schema des ATP-abhängigen unidirektionalen Transportes organischer amphiphiler Anionen über die kanalikuläre Leberplasmamembran (*verändert nach Keppler & König 1997*)

Vergleicht man die Substratspezifität zwischen MRP1 und MRP2, so ist eine höhere Affinität und Transportrate des MRP1 für LTC₄ festzustellen, weshalb MRP1 häufig auch als „Leukotriene Exportpumpe“ bezeichnet wird [Jedlitschky et al. 1997]. Ansonsten ist die Substratspezifität von MRP1 und MRP2 trotz ihrer unterschiedlichen Aminosäure-Zusammensetzung ähnlich [Keppler & König 1997].

1.3.4 Das Dubin-Johnson-Syndrom des Menschen

Das menschliche Dubin-Johnson-Syndrom ist durch einen erblichen Defekt in der Sekretion amphiphiler anionischer Konjugate von der Leberzelle in die Galle charakterisiert [Dubin & Johnson 1954, Keppler & Kartenbeck 1996]. Erst durch die Identifizierung des MRP2-Proteins als kanalikuläre „Konjugat-Exportpumpe“, konnte diese Erkrankung mit einem Defekt auf molekularer Ebene, nämlich der Abwesenheit dieses Membranproteins, in Verbindung gebracht werden. Mit Hilfe von Antikörpern, die gegen das C-terminale Ende der Aminosäuresequenz des menschlichen MRP2-Proteins gerichtet sind, konnte gezeigt werden, dass das MRP2-Protein in der normalen Leber, aber nicht in der Leber von Patienten mit Dubin-Johnson-Syndrom vorkommt [Kartenbeck et al. 1996]. Kompensatorisch werden bei diesen Patienten die in der Leberzelle gebildeten Konjugate wahrscheinlich über die in der lateralen Leberplasmamembran lokalisierten Isoformen MRP1, MRP3 und MRP6 ins sinusoidale Blut abgegeben [Keppler & Kartenbeck 1996, Mayer et al. 1995, König et al. 1999, Vos et al. 1998]. Aufgrund dessen leiden diese Patienten an einer sekundären Hyperbilirubinämie, und amphiphile organische Anionen werden anstatt mit der Galle über die Nieren ausgeschieden.

1.3.5 Klinische Bedeutung des cMRP

Das cMRP ist in der Lage eine Vielzahl von Konjugaten endogener und xenobiotischer Verbindungen, die in der Leberzelle durch relativ spezifische Monoxygenasen und Transferasen in Phase-I- und Phase-II-Reaktionen gebildet werden, auszuschleiden. Dies ist lebensnotwendig zur Entgiftung und Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase. Des Weiteren trägt dieses Transportsystem neben dem kanalikulären Gallensäuretransporter (cBST) erheblich zum Gallefluss bei.

Außerdem spielt es in der Pathophysiologie von Tumoren eine Rolle, da es in entarteten Geweben und Tumorzelllinien stark exprimiert wird. Die Frage, inwiefern dieses Transportsystem entsprechend dem P-Glykoprotein in diesen Zellen Multidrug-Resistenz auslösen kann, bleibt noch zu klären [Cui et al. 1999, Schaub et al. 1999].

1.4 Ziele meiner Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollen die molekularen Mechanismen der biliären Elimination des Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonisten Valsartan der Firma Novartis über die kanalikuläre Plasmamembran der Rattenleber charakterisiert werden.

Pharmakokinetische Studien an Menschen [Brookman et al. 1997, Waldmeier et al. 1997] sowie an Ratten und Krallenaffen [vertrauliche Daten der Firma Novartis] belegen, dass Valsartan nach oraler oder intravenöser Verabreichung als unveränderte Substanz zum größten Teil über die Galle ausgeschieden wird. Doch bislang liegen keine Untersuchungen über die molekularen Mechanismen der hepatobiliären Elimination von Valsartan vor. Die anionische Struktur von Valsartan lässt jedoch vermuten, dass das kanalikuläre „Multidrug resistance-associated protein“ (Mrp2) oder „canalicular multispecific organic anion transporter“ (cMoat) an der biliären Ausscheidung eine Rolle spielt. Daher soll nachgewiesen werden, ob dieses Transportsystem tatsächlich am Transport von Valsartan beteiligt ist.

Zur Klärung der oben genannten Fragestellungen sind folgende Untersuchungen notwendig:

1. In-vivo-Galleausscheidungs- und -Organverteilungsstudien von Valsartan in Wistar-Ratten im Vergleich zu transportdefizienten TR⁻-Ratten.
2. Aufnahmemessungen von radioaktiv markiertem Valsartan in kanalikuläre Plasmamembranvesikel, isoliert aus der Rattenleber, sollen über die molekularen Mechanismen Aufschluss geben:
 - Handelt es sich um einen Carrier-vermittelten Transport, d.h. erfolgt die Valsartan-Aufnahme in die Vesikel ATP- abhängig?
 - Feststellung der kinetischen Daten durch Variation der ATP-Konzentration, der Valsartankonzentration, der Temperatur, des pH-Wertes sowie der Osmolarität des Inkubationsmediums.
 - Untersuchung des Einflusses von ATP-Analoga sowie energiereicher Nukleotide auf den Transport.
 - Erzielt man durch die Präparation von „inside-out“-Vesikeln eine höhere Transportrate?
3. Die vergleichende Untersuchung des Transportes von Valsartan in isolierte kanalikuläre Plasmamembranvesikel von Wistar- und TR⁻-Ratten.
4. Schließlich werden durch In-vitro-Aufnahmemhemmversuche weitere Informationen zu dem am Transport beteiligten Carrierprotein erwartet.

2 Versuchstiere

Für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten In-vivo- und In-vitro-Versuche wurden Wistar-Albinoratten aus institutseigener Zucht sowie TR⁻-Wistar-Albinoratten eingesetzt. Zur Präparation kanalikulärer Plasmamembranvesikel wurden nur männliche Tiere verwendet, während die Gallenausscheidungs- und Organverteilungsstudien mit Hilfe von männlichen als auch weiblichen Tieren durchgeführt wurden.

Die TR⁻-Mutanten wurden großzügigerweise von Herrn Dr. Oude Elferink (Academic medical Center, Amsterdam, Niederlande) zur Verfügung gestellt.

Alle Tiere wogen zwischen 280 - 350 g. Sie erhielten Altromin® Standarddiätfutter und Leitungswasser ad libitum. Die Lichtdauer im Tierstall betrug 12 Stunden täglich und die Umgebungstemperatur lag bei 25 °C.

3 Material

3.1 Chemikalien

Adenosin	Serva, Heidelberg
Adenosin-5'-diphosphat-Natriumsalz	Sigma, Deisenhofen
Adenosin- 5'-(β , γ - methylene)diphosphat (Tetralithium-Salz) = AMP-PCP	Calbiochem, Bad Soden
Adenosin-5'-monophosphat	Serva, Heidelberg
Adenosin-5'-triphosphat-Tris-Salz	Sigma, Deisenhofen
Adenosin-5'-triphosphat-Natriumsalz	Serva, Heidelberg
Ammoniumheptamolybdat • 4 H ₂ O	Merck, Darmstadt
Ascorbinsäure	Roth, Karlsruhe
Bovines Serumalbumin	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid • 2 H ₂ O	Merck, Darmstadt
Celluloseacetatfilter Porengröße 0,2 μ m (OE 66)	Schleicher und Schuell, Dassel
Cholsäure-Natriumsalz	Sigma, Deisenhofen
Concanavalin A-Sepharose 4 B	Sigma, Deisenhofen
Cytosin-5'-triphosphat-Natriumsalz	Sigma, Deisenhofen
Cyclosporin A	Sandoz, Basel / Schweiz
Daunomycin-Hydrochlorid	Calbiochem, Bad Soden
Dichlormethan	Merck, Darmstadt
Dioxan	Merck, Darmstadt
Dodecylsulfat-Natriumsalz (SDS)	Serva, Heidelberg
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Folin-Ciocalteu-Reagenz	Merck, Darmstadt
Glucose-6-Phosphat	Sigma, Deisenhofen
Glutathiondisulfid	Sigma, Deisenhofen
HCl 32 %	Merck, Darmstadt
Hepes	Roth, Karlsruhe
Histidin • 1H ₂ O	Fluka, Neu-Ulm
Histoacryl-Gewebekleber	B. Braun, Melsungen
Imidazol	Fluka, Neu-Ulm
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
K ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt

KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
Kaliumhydroxid	Merck, Darmstadt
K/Na-Tartrat	Merck, Darmstadt
Kieselgelplatte 60F-254	Merck, Darmstadt
Kreatinkinase	Boehringer, Mannheim
Kreatinphosphat • 4 H ₂ O	Boehringer, Mannheim
Kupfersulfat	Merck, Darmstadt
Leukotriene C ₄	Calbiochem, Bad Soden
[14,15,19,20- ³ H (N)]-Leukotriene C ₄	NEN, Köln
Magnesiumchlorid • 6 H ₂ O	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat • 7 H ₂ O	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
α-Methyl-D-glucoside	Sigma, Deisenhofen
Natriumcarbonat	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Ouabain	Roth, Karlsruhe
Pefabloc SC	Roth, Karlsruhe
Pravastatin	Bristol-Myers Squibb, München
Propanol	Merck, Darmstadt
Rotiszint eco plus	Roth, Karlsruhe
Saccharose	Roth, Karlsruhe
Sulfobromophthalein	Serva, Heidelberg
Taurocholat	Roth, Karlsruhe
[³ H]-Taurocholat	NEN, Köln
Tris	Roth, Karlsruhe
Trichloressigsäure	Sigma, Deisenhofen
Urethan	Sigma, Deisenhofen
Uridin-5'-triphosphat-Natriumsalz	Sigma, Deisenhofen
Valsartan	Novartis, Basel / Schweiz
[¹⁴ C]-Valsartan	Novartis, Basel / Schweiz
Verapamil-Hydrochlorid	Sigma, Deisenhofen

3.2 Zentrifugen und Rotoren

L8-55-Ultrazentrifuge	Beckman, München
L8-60M-Ultrazentrifuge	Beckman, München
• SW-27-Rotor	Beckman, München
• Sorvall-AH-627-Rotor	DuPont, Bad Homburg
• TFT-45.94-Rotor	Kontron, München
• 50-Ti-Rotor	Beckman, München
Sorvall-RC-5C-Zentrifuge	DuPont, Bad Homburg
• Sorvall-GSA-Rotor	DuPont, Bad Homburg

3.3 Lösungen für die Plasmamembranpräparation

3.3.1 Homogenisationspuffer

Lösung A: NaHCO₃ 1 mM

Pefabloc 50 µM

Lösung B: NaHCO₃ 1 mM

3.3.2 Saccharoselösungen (Kontrolle mittels Refraktometer)

31 %, 34 %, 38 %, 44 %, 56 % (Angaben in w/w)

3.3.3 Vesikelpuffer

Saccharose 250 mM

Hepes 10 mM

CaCl₂ 0,2 mM

MgSO₄ 5 mM mit 1 M Tris auf pH 7,4; Osmolarität 310 mosm

3.4 Lösungen für die Präparation kanalikulärer „inside-out“- und „right side-out“-Vesikel

3.4.1 Aktivierungspuffer zur Vorbereitung der Con A-Sepharose

NaCl	150 mM	
Tris	20 mM	mit HCl auf pH 7,4; Osmolarität 310 mosm

3.4.2 Kopplungspuffer zum Binden der „right side-out“-Vesikel

NaCl	150 mM	
CaCl ₂	0,2 mM	
MgSO ₄	5 mM	
Tris	20 mM	mit HCl auf pH 7,4; Osmolarität 310 mosm

3.4.3 Elutionspuffer zum Ablösen der „right side-out“-Vesikel

α-Methyl-D-glucoside	250 mM	
CaCl ₂	0,2 mM	
MgSO ₄	5 mM	
Tris	20 mM	mit HCl auf pH 7,4; Osmolarität 310 mosm

3.5 Lösungen für die Proteinbestimmung

- **Dioxan**
- **NaOH** 1n
- **Folin-Puffer**
Kupfersulfat 1 %, K/Na-Tartrat 2 %, SDS, Natriumcarbonat 2 % 1 : 1 : 2 : 96
- **Folin-Ciocalteu-Reagenz** 1 : 2,5

3.6 Lösungen für die Enzymbestimmungen

3.6.1 5'-Nukleotidase

3.6.1.1 *Tris-Puffer* 100 mM (50 mM Endkonz.)

Tris	100 mM	(50 mM Endkonz.)	
MgCl ₂	20 mM	(10 mM Endkonz.)	
KCl	200 mM	(100 mM Endkonz.)	
K/Na-Tartrat	20 mM	(10 mM Endkonz.)	mit 1 M Tris auf pH 7,5

3.6.1.2 *Substratlösung*

Adenosin-5'-monophosphat	20 mM	(5 mM Endkonz.)
--------------------------	-------	-------------------

3.6.1.3 *Stopplösung*

Trichloressigsäure	25 % (v/v)
--------------------	--------------

3.6.2 Glukose-6-Phosphatase

3.6.2.1 *Imidazolpuffer* 100 mM, pH 6,5

Imidazol	100 mM
Histidin	100 mM

3.6.2.2 *Substratlösung*

Glukose-6-Phosphat	100 mM
--------------------	--------

3.6.2.3 *Stopplösung*

Trichloressigsäure	25 % (v/v)
--------------------	--------------

3.6.3 Na⁺/K⁺-ATPase und Mg²⁺-ATPase

3.6.3.1 *Reaktionspuffer* Mg²⁺

Tris	50 mM	(25 mM Endkonz.)	
MgCl ₂	10 mM	(5 mM Endkonz.)	
KCl	200mM	(100 mM Endkonz.)	mit HCl auf pH 7,4

3.6.3.2 *Reaktionspuffer $Na^+/K^+/Mg^{2+}$*

Tris	50 mM (25 mM Endkonz.)	
MgCl ₂	10 mM (5 mM Endkonz.)	
KCl	66 mM (33 mM Endkonz.)	
NaCl	132 mM (66 mM Endkonz.)	mit HCl auf pH 7,4

3.6.3.3 *Reaktionspuffer $Na^+/K^+/Mg^{2+}$ mit Ouabain*

Ouabain 20 mM (10 mM Endkonz.)

Ansatz: Unmittelbar vor Versuchsbeginn wird Ouabain im Reaktionspuffer $Na^+/K^+/Mg^{2+}$ gelöst.

3.6.3.4 *Substratlösung*

Tris-ATP 12 mM (3 mM Endkonz.)

3.6.3.5 *Stopplösung*

Trichloressigsäure 25 % (v/v)

3.6.4 **Chen-Reagenz**

Ascorbinsäure 10 % (w/w)

Ammoniummolybdat 0,42 % in 1n H₂SO₄

Ansatz: Unmittelbar vor Versuchsbeginn wird ein Reaktionsgemisch aus einem Teil Ascorbinsäure (1 g / 10 g) und sechs Teilen Ammoniumheptamolybdat hergestellt.

3.7 Lösungen für die Schnellfiltration

3.7.1 ATP-abhängige Aufnahme

3.7.1.1 *Inkubationsmedium* **mit** regenerierendem System

Saccharose	200 mM	
MgCl ₂	10 mM	
Tris	10 mM	mit HCl auf pH 7,4

Zusatz unmittelbar vor Versuchsbeginn:

ATP / ADP / UTP / CTP in entsprechender Konzentration

Kreatinphosphat 10 mM

Kreatinkinase 100 µg / ml

pH-Korrektur mittels 1 n oder 0,2 n KOH bzw. HCl; Osmolarität 310 mosm

3.7.1.2 *Inkubationsmedium* **ohne** regenerierendes System

Saccharose	225 mM	
MgCl ₂	10 mM	
Tris	10 mM	mit HCl auf pH 7,4

Zusatz unmittelbar vor Versuchsbeginn:

AMP / ATP / ADP / AMP-PCP / Adenosin / UTP / CTP in entsprechender Konzentration

pH-Korrektur mittels 1 n oder 0,2 n KOH bzw. HCl; Osmolarität 310 mosm

Ansatz: Unmittelbar vor Versuchsbeginn wird dem Inkubationsmedium mit bzw. ohne regenerierendem System die für die Aufnahmemessung benötigte Substanz zugesetzt.

3.7.1.3 *Stopplösung* für die ATP-abhängige Aufnahme

Saccharose	100 mM	
KCl	100 mM	
Hepes	10 mM	mit 1M Tris auf pH 7,5; Osmolarität 310 mosm

3.7.2 Bestimmung des Bindungsanteils

3.7.2.1 *Inkubationsmedium* mit einer Osmolarität von 450 mosm

Saccharose	300 mM	
MgCl ₂	10 mM	
Tris	10 mM	mit HCl auf pH 7,4

Zusatz unmittelbar vor Versuchsbeginn:

ATP mit regenerierendem System (10 mM Kreatinphosphat und 100 µg / ml Kreatinkinase) bzw. AMP

pH-Korrektur mittels 1 n oder 0,2 n KOH bzw. HCl und anschließender Korrektur der Osmolarität mit Hilfe einer 56%igen Saccharoselösung.

3.7.2.2 *Inkubationsmedium* mit einer Osmolarität von 600 mosm

Saccharose	400 mM	
MgCl ₂	10 mM	
Tris	10 mM	mit HCl auf pH 7,4

Zusatz unmittelbar vor Versuchsbeginn: siehe 3.7.2.1

pH-Korrektur mittels 1 n oder 0,2 n KOH bzw. HCl und anschließender Korrektur der Osmolarität mit Hilfe einer 56%igen Saccharoselösung.

3.7.2.3 *Inkubationsmedium* mit einer Osmolarität von 900 mosm

Saccharose	600 mM	
MgCl ₂	10 mM	
Tris	10 mM	mit HCl auf pH 7,4

Zusatz unmittelbar vor Versuchsbeginn: siehe 3.7.2.1

pH-Korrektur mittels 1 n oder 0,2 n KOH bzw. HCl und anschließender Korrektur der Osmolarität mit Hilfe einer 56%igen Saccharoselösung.

3.7.2.4 *Stopplösung*: siehe 3.7.1.3

3.7.3 Na⁺-abhängige Aufnahme

3.7.3.1 *Inkubationsmedium* mit Na⁺

NaCl	100 mM	
Saccharose	80 mM	
CaCl ₂	0,2 mM	
MgSO ₄	5 mM	
Hepes	10 mM	mit 1M Tris auf pH 7,4; Osmolarität 310 mosm

3.7.3.2 *Stopplösung* / Na⁺-freies *Inkubationsmedium*

KCl	100 mM	
Saccharose	100 mM	
CaCl ₂	0,2 mM	
MgSO ₄	5 mM	
Hepes	10 mM	mit 1M Tris auf pH 7,5; Osmolarität 310 mosm

Ansatz: Unmittelbar vor Versuchsbeginn wird dem Inkubationsmedium mit Na⁺ bzw. ohne Na⁺ die für die Aufnahmemessung benötigte Substanz zugesetzt.

3.7.4 Szintillationsflüssigkeit

Isopropanol	300 ml
Aqua bidest.	300 ml
Rotiszint eco plus ®	6000 ml

3.8 Dünnschichtchromatographie

Platte: Kieselgel 60F-254, MERCK

Laufmittel: Dichlormethan, Methanol, Aqua bidest., Essigsäure 300:50:10:1 Rf: 0,5

Puffer: Phosphatpuffer

50 mM K₂HPO₄ / KH₂PO₄, pH 7,5

Scanner: Isomess IM-3000 Radio-Dünnschicht-Analysator

4 Methoden

4.1 In-vivo-Galleausscheidungs- und -Organverteilungsstudien in Wistar-Ratten und TR-Ratten

4.1.1 Durchführung der Gallengangskanülierung

Die Ratten (Wistar und TR) werden mit 1,8 – 2,8 ml einer 20%igen Urethanlösung intraperitoneal narkotisiert.

Nach Erreichen des Toleranzstadiums (Zwischenzehenreflex nicht mehr auslösbar) wird die Ratte auf einem Präparationstisch fixiert. Die Haut kaudal des Sternums wird ellipsenförmig entfernt und die Bauchhöhle in der Linea alba mit einem kleinen Schnitt eröffnet. Das Duodenum wird mit einer Pinzette erfaßt, vorsichtig vorgelagert und mit einer Moskitoklemme leicht fixiert. Der im Gekröse sichtbare Gallengang wird mit einer Pinzettenschere vorsichtig angeschnitten und ein Teflon-Katheter (0,6 x 0,3 mm) eingeführt.

Um ein Herausgleiten des Katheters zu verhindern, wird dieser mit Histoacryl-Gewebekleber (aus Enbucrilat) fixiert. Anschließend wird eine Dünndarmschlinge vorsichtig vorgelagert. Die radioaktive Substanz (maximal 500 µl) wird langsam in eine Vena jejunalis injiziert und das Gefäß sofort ligiert, um Blutungen zu vermeiden. Ab diesem Zeitpunkt wird die Galle in Eppendorfgefäßen aufgefangen, die in regelmäßigen Zeitabständen zu wechseln sind (zu Beginn alle 4 Minuten, ab der 20. Minute alle 5 Minuten und ab der 60. Minute im Abstand von 10 Minuten). Die eröffnete Bauchhöhle wird mit Gaze, die mit physiologischer Kochsalzlösung durchtränkt ist, abgedeckt und feucht gehalten.

Während des Versuchs wird die Ratte in einem auf 37 °C temperierten Wärmekasten aufbewahrt, da die Narkose einen Verlust der körpereigenen Temperaturregulation bedingt.

Das Versuchsende wurde in dieser Studie nach 180 Minuten festgelegt und die Ratten nach der Blutentnahme aus der kaudalen Hohlvene (s.u. Probenentnahme zur Organverteilungsstudie) schmerzlos getötet.

Die entnommenen Galleproben werden abgewogen (die spezifische Dichte der Galle beträgt 1,0 g / ml nach Poupon et al., 1988) und je 10 µl aus jedem Gefäß zur Radioaktivitätsbestimmung in Minivials überführt (Doppelbestimmung), mit 3 ml Szintillator-Flüssigkeit vermischt und 2 Stunden im Wärmeschrank bei 45 °C aufbewahrt. Die Radioaktivitätsbestimmung der abgekühlten Proben erfolgt im Flüssigkeitsszintillationszähler.

Berechnung der ausgeschiedenen Substanzmenge:

Im Anschluss an die Radioaktivitätsbestimmung der einzelnen Galleproben errechnet sich die ausgeschiedene Substanzmenge pro Zeiteinheit nach folgender Formel:

$$\text{ausgeschiedene Substanzmenge in pmol / Minute} = \frac{\text{dpm pro } \mu\text{l Galle} \times \text{KF} \times \mu\text{l Galle pro ZI} \times \text{Faktor}}{\text{Zeitfaktor in Minuten} \times \text{spezifische Aktivität}}$$

dpm pro μl Galle = gemessenen dpm in 10 μl Galle / 10

KF Korrekturfaktor = theoretisch eingesetzte dpm / tatsächlich eingesetzte dpm
(Pipettierkontrolle) (bezogen auf 10 μl der entsprechenden Stammlösung = [^{14}C]-Valsartan gelöst in Phosphatpuffer)

μl Galle pro ZI Zeitintervall = die Gallenmenge in μl , die pro Zeitintervall
(4 min / 5 min / 10 min) in einem Eppendorfgefäß aufgefangen wurde

Faktor = das gegebenenfalls zu berücksichtigende Verhältnis markierter zu unmarkierter Substanz [(markiert + unmarkiert) / markiert]

Spezifische Aktivität der radioaktiv markierten Substanz in dpm / pmol

4.1.2 Probenentnahme zur Organverteilungsstudie

Zur Feststellung der unterschiedlichen Organverteilung von Valsartan in normalen Wistar-Ratten im Vergleich zu TR⁻-Ratten wurden folgende Proben entnommen und abgewogen: Serum durch die Entnahme von Blut aus der kaudalen Hohlvene, Leber, beide Nieren, Milz, beide Nebennieren, Lunge, Herz, Gehirn und Muskulatur. Teile der Organe werden in Eppendorfgefäßen mit 500 µl 3 M KOH im Wärmeschrank bei 45 °C über 12 Stunden lysiert. Die Proben werden anschließend in Minivials überführt und entsprechend den Galleproben für die Radioaktivitätsbestimmung vorbereitet. Außerdem wird die Radioaktivität in 100 bzw. 10 µl Serum auf die gleiche Weise bestimmt.

Es wird eine Doppelbestimmung aller Organ- und Serumproben durchgeführt.

Berechnung der in jedem Organ enthaltenen Substanzmenge:

$$\text{Substanzmenge pro Organ in pmol} = \frac{\text{dpm der lysierten Organprobe} \times \text{Gesamtgewicht des Organs in mg} \times \text{Faktor}}{\text{Gewicht der lysierten Organprobe in mg} \times \text{spezifische Aktivität}}$$

$$\text{Faktor} = \frac{\text{das gegebenenfalls zu berücksichtigende Verhältnis markierter zu unmarkierter Substanz} [(\text{markiert} + \text{unmarkiert}) / \text{markiert}]}{\text{Spezifische Aktivität der radioaktiv markierten Substanz in dpm / pmol}}$$

Das Gesamtgewicht der Muskulatur lässt sich durch einfaches Auswiegen nicht bestimmen. Zur Berechnung der in der Muskulatur enthaltenen Substanzmenge wurde daher angenommen, dass der Anteil der Muskulatur an der Gesamtkörpermasse der Ratte 45 % beträgt [Donaldson 1924].

Berechnung der im Blut enthaltenen Substanzmenge:

Das Blutvolumen einer Ratte beträgt 6,7 ml pro 100 g Körpermasse [Hagemann & Schmidt 1960].

$$\text{Substanzmenge im Blut in pmol} = \frac{\text{dpm der Serumprobe} \times \text{Blutvolumen der Ratte} \times \text{Faktor}}{\text{Volumen der Serumprobe in ml} \times \text{spezifische Aktivität}}$$

Blutvolumen der Ratte in ml = Körpermasse der Ratte in g x (6,7 ml / 100 g)

Faktor = das gegebenenfalls zu berücksichtigende Verhältnis markierter zu unmarkierter Substanz [(markiert + unmarkiert) / markiert]

Spezifische Aktivität der radioaktiv markierten Substanz in dpm / pmol

4.2 Modifizierte Präparationsmethode zur Isolierung von kanalikulären Plasmamembranvesikeln aus der Rattenleber

Zur Isolierung der kanalikulären Plasmamembranvesikel aus der Rattenleber wurde eine modifizierte Methode erarbeitet, in Anlehnung an die bei der Ratte etablierten Präparationsmethoden nach Neville (1967) und Meier et al. (1984) sowie an die am Institut etablierte Methode der Plasmamembranpräparation aus der Schweineleber (Dissertationen O. Godfroy, S. Niedernhöfer, 1996).

4.2.1 Durchführung der Präparation

Pro Präparation werden 10 männliche Wistar-Ratten mit einem Gewicht von jeweils 250 - 300 g durch Genickschlag getötet. Nach zügiger Entnahme der Lebern werden diese jeweils in 80 ml eiskalter Lösung A aufgenommen und mit einer Schere grob zerkleinert. Alle folgenden Schritte der Präparation werden bei einer Umgebungstemperatur von 4 °C bzw. auf Eis durchgeführt.

Nach 10 Minuten wird die Pufferlösung erneuert und die Lebern nochmals mit einer Schere fein zerkleinert.

Nach weiteren 10 Minuten wird jede Leber einzeln in einem Dounce-Homogenisator (Kontes, Pistill Größe A) mit 3 Strokes, d.h. je 3 Abwärts- und Aufwärtsbewegungen des Pistills, homogenisiert. Anschließend erfolgt eine weitere Homogenisation in einem Dounce-Homogenisator (Braun, Pistill Größe L) mit 4 Strokes, d.h. je 4 Abwärts- und Aufwärtsbewegungen des Pistills. Das gewonnene Leberhomogenat von je 5 Ratten wird vereint und mit Lösung A auf 750 ml aufgefüllt. Danach wird das gesamte Homogenat (1500 ml) durch 2 Lagen Gaze filtriert, um Bindegewebsreste zu entfernen. Für die Protein- und Enzymbestimmungen werden routinemäßig von diesem Gesamthomogenat Proben zurückbehalten (3 Proben zu 500 µl).

Anschließend erfolgt die Zentrifugation in einem GSA-Rotor bei 2.500 g (4.000 rpm) für 20 Minuten ohne Bremse. Der Überstand wird verworfen und der Niederschlag wird nach vorsichtigem Resuspendieren in einem Dounce-Homogenisator (Kontes, Pistill Größe A) in 950 ml Lösung A aufgenommen und erneut in einem GSA-Rotor bei 5.800 g (6.000 rpm) für 20 Minuten ohne Bremse zentrifugiert, um weitere Zelltrümmer zu entfernen.

Die gewonnenen Pellets werden in Lösung B aufgenommen und zur Volumenreduktion in einem TFT-Rotor bei 134.000 g-max (34.000 rpm) für 15 Minuten zentrifugiert.

Zur Gewinnung der gemischten Plasmamembranfraktion (basolaterale und kanalikuläre Membranen) wird eine Flotation durchgeführt. Dazu werden die gewonnenen Pellets resuspendiert und mit einer 56%igen Saccharose-Lösung auf ein Volumen von etwa 190 ml gebracht und 5 Minuten gerührt. Durch Zugabe fester Saccharose (etwa 150 g) wird die Suspension mittels Refraktometer auf 48 % eingestellt. Dabei wird zunächst die Hälfte der Saccharose zugegeben und nach 15 Minuten die restliche Saccharose. Das Volumen der gesamten Suspension beträgt nun etwa 250 - 300 ml. Um eine gute Verteilung und Quellung der Membranen zu erreichen, soll mindestens 1 Stunde gerührt werden.

Die Suspension wird auf 12 Röhren der Schwingbecherrotoren AH 627 und SW 27 aufgeteilt und mit einer 44%igen Saccharose-Lösung überschichtet. Anschließend erfolgt die Flotation in einem AH-627-Rotor bzw. SW-27-Rotor bei 104.000 g-max (24.000 rpm) für 2,5 Stunden.

Die Abbildung 4.1 zeigt die unterschiedliche Schichtung vor bzw. nach der Zentrifugation. In der obersten Schicht (Overlay / Float) befinden sich die gemischten Plasmamembranen. Diese Schicht wird zusammen mit der 44%igen Fraktion vorsichtig abgenommen, damit so wenig Plasmamembranen wie möglich verloren gehen.

Zum Auswaschen des Zuckers erfolgt eine Zentrifugation in einem TFT-Rotor bei 134.000 g-max (34.000 rpm) für 15 Minuten mittels Lösung B.

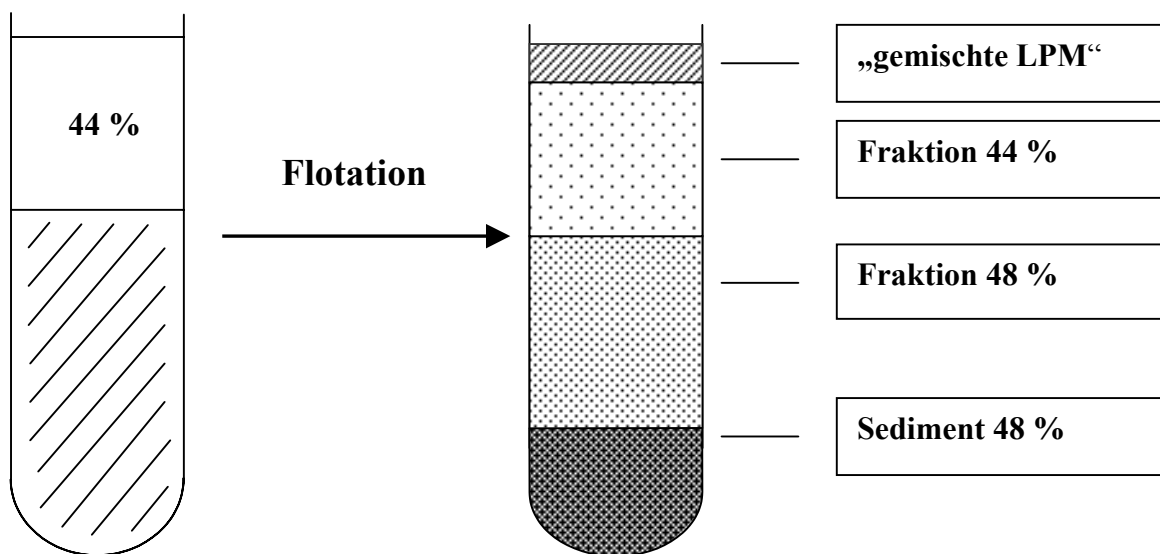


Abb. 4.1 Schichtung vor bzw. nach der Flotation in einem AH-627- / SW-27-Rotor

Der Überstand wird verworfen, die Pellets resuspendiert (circa 35 - 40 ml) und mit einer 56%igen Saccharose-Lösung (etwa 10 ml) mittels Refraktometer auf einen Zuckergehalt von 20 - 22 % eingestellt (maximal 44 - 48 ml). Nach Homogenisation in einem Dounce-Homogenisator (Wheaton, Pistill-Größe A) mit 50 Strokes, d.h. je 50 Abwärts- und Aufwärtsbewegungen des Pistills, erfolgt die weitere Trennung der gewonnenen Plasmamembranen mit Hilfe eines diskontinuierlichen Saccharose-Dichtegradienten.

Die Schichtung des Dichtegradienten erfolgt in 6 AH-627-Röhrchen nach folgendem Schema:

- 7 ml 31%ige Saccharose-Lösung
- 6 ml 34%ige Saccharose-Lösung
- 6 ml 38%ige Saccharose-Lösung
- 5 ml 44%ige Saccharose-Lösung
- 3 ml 56%ige Saccharose-Lösung

Das Plasmamembranhomogenat wird auf den Gradienten geschichtet (circa 6 - 8 ml pro Röhrchen) und bei 122.000 g-max (25.000 rpm) für 7 Stunden (bzw. 26.000 rpm für 6,5 Stunden) in einem AH-627-Rotor zentrifugiert. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte trennen sich bei diesem Zentrifugationsschritt die basolateralen und die kanalikulären Plasmamembranen in verschiedenen Saccharoseschichten auf. Die Abbildung 4.2 zeigt die unterschiedliche Schichtung vor bzw. nach der Zentrifugation.

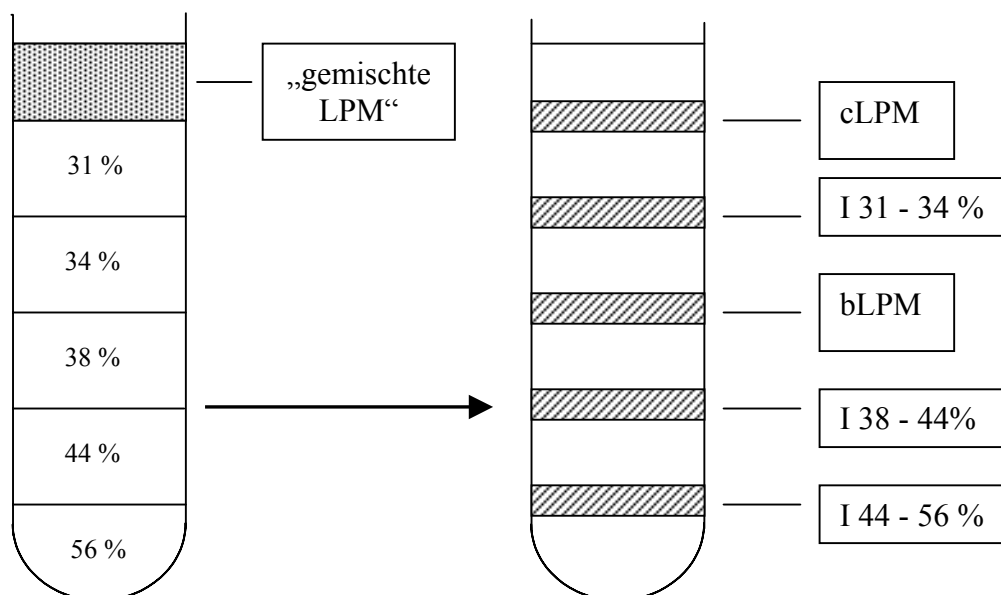


Abb. 4.2 Schichtung vor bzw. nach Zentrifugation in einem AH-627-Rotor mit Hilfe des diskontinuierlichen Saccharosegradienten

Die einzelnen Fraktionen werden getrennt aufgenommen und in einem TFT-Rotor bei 134.000 g-max (34.000 rpm) für 15 Minuten mit Lösung B zum Auswaschen des Zuckers zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes werden die entsprechenden Pellets in circa 3 - 4 ml Vesikelpuffer aufgenommen und zur Volumenreduktion in einem Ti-50-Rotor bei 111.000 g-max (35.000 rpm) für 15 Minuten zentrifugiert.

Die resultierenden Pellets werden in etwa 1 ml Vesikelpuffer aufgenommen und mit einer 25G-Kanüle durch 10-maliges Aufziehen vesikuliert.

Für die Protein- und Enzymbestimmungen werden entsprechende Proben entnommen (je 3 Proben zu 100 - 200 µl).

Die Lagerung der Plasmamembranvesikel erfolgt in flüssigem Stickstoff für maximal 3 Monate.

Die Proben für die Protein- und Enzymbestimmungen sind bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufzubewahren.

4.2.2 Übersicht der einzelnen Präparationsschritte in Form eines Flussdiagramms

10 Lebern von männlichen Wistar-Ratten in je 80 ml **Lösung A**

⇓ klein schneiden, 10 min inkubieren

Wechseln des Puffers (je 80 ml)

⇓ weitere Zerkleinerung, 10 min inkubieren

Homogenisation der Lebern

⇓ 3 Strokes Kontes, Pistill A

4 Strokes Braun, Pistill L

Vereinen von je 5 Lebern, Auffüllen mit **Lösung A** auf 750 ml

Filtration des Homogenates durch 2 Lagen Gaze

⇓

Zentrifugation in einem GSA-Rotor

⇓ bei 2.500 g (**4.000 rpm**), $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, **20 min**, **ohne Bremse**

(6 GSA-Becher; 1500 ml)

Verwerfen des Überstandes, Resuspendieren der Pellets in **Lösung A** (950 ml)

⇓

Zentrifugation in einem GSA-Rotor

⇓ bei 5.800 g (**6.000 rpm**), $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, **20 min**, **ohne Bremse**

(4 GSA-Becher; 950 ml)

Verwerfen des Überstandes, Resuspendieren der Pellets in **Lösung B**

↓

Zentrifugation in einem TFT-Rotor↓ bei 134.000 g (**34.000 rpm**), 4 °C, **15 min**

(6 TFT-Röhrchen; ca. 480 ml)

Verwerfen des Überstandes, Resuspendieren der Pellets und Auffüllen auf ca. 190 ml mit einer **56%igen Saccharose-Lösung**, 5 min Rühren, durch Zugabe fester Saccharose **mittels Rafraktometer auf 48 % einstellen** (zuerst die Hälfte der Saccharose zugeben, nach 15 min die restliche Saccharose; ca. 250 ml insgesamt). Insgesamt soll **1 Stunde** gerührt werden, um eine gute Verteilung zu erreichen.

↓

Flotation in einem AH-627-Rotor / SW-27-Rotor↓ in AH-627- / SW-27-Röhrchen **Überschichtung mit 44%iger Saccharose-Lösung**bei 104.000 g (**24.000 rpm**), 4 °C, **2,5 Stunden**

(6 AH-627-Röhrchen, 6 SW-27-Röhrchen)

↓

Overlay (Float) wird vorsichtig abgenommen und resuspendiert in **Lösung B**

↓

Zentrifugation in einem TFT-Rotor↓ bei 134.000 g (**34.000 rpm**), 4 °C, **15 min**

Verwerfen des Überstandes, Vereinen und Resuspendieren der Pellets (ca. 35 - 40 ml) und **mit einer 56%igen Saccharose-Lösung auf einen Zuckergehalt von 20 - 22 % einstellen** (maximal 44 - 48 ml)

↓

Homogenisieren der Pellets

↓ 50 Strokes Wheaton, Pistill A

Zentrifugation in einem AH-627-Rotor mit Hilfe eines diskontinuierlichen Saccharosegradienten↓ Schichtung: **LPM-Homogenat / 31 % / 34 % / 38 % / 44 % / 56 %**

(ca. 6 ml / 7 ml / 6 ml / 6 ml / 5 ml / 3 ml)

↓ bei 122.000 g (**25.000 rpm**), 4 °C, **7 Stunden (bzw. 26.000 rpm, 6,5 Stunden)**Resuspendieren der einzelnen Fraktionen mit **Lösung B**

↓

⇓

Zentrifugation in einem TTT-Rotor

⇓ bei 134.000 g (**34.000 rpm**), 4 °C, **15 min**

Verwerfen des Überstandes, Aufnehmen der entsprechenden Pellets in **Vesikelpuffer**

⇓

Zentrifugation in einem Ti-50-Rotor

⇓ bei 111.000 g (**35.000 rpm**), 4 °C, **15 min**

Zugabe von etwas Vesikelpuffer und Vesikulieren mit einer 25G-Kanüle

⇓

Lagerung in flüssigem Stickstoff (maximal 3 Monate)

4.3 Affinitätschromatographische Trennung von kanalikulären „inside-out“- und „right side-out“-Plasmamembranvesikeln an Con A-Sepharose

Die Tatsache, dass sich die Kohlenhydratgruppen von Glykoproteinen und Glykolipiden nur auf der Außenseite von Plasmamembranen befinden, erlaubt die weitere Trennung der kanalikulären Plasmamembranvesikel mit Hilfe von Con A-Sepharose in zwei Typen.

Con A-Sepharose bindet die bei „right side-out“-Vesikeln nach außen gerichteten endständigen Kohlenhydratgruppen der Glykoproteine. Bei „inside-out“-Vesikeln ragen die Kohlenhydratgruppen in das Vesikellumen hinein, so dass diese nicht von Con A-Sepharose gebunden werden.

4.3.1 Vorbereitung der Con A-Sepharose

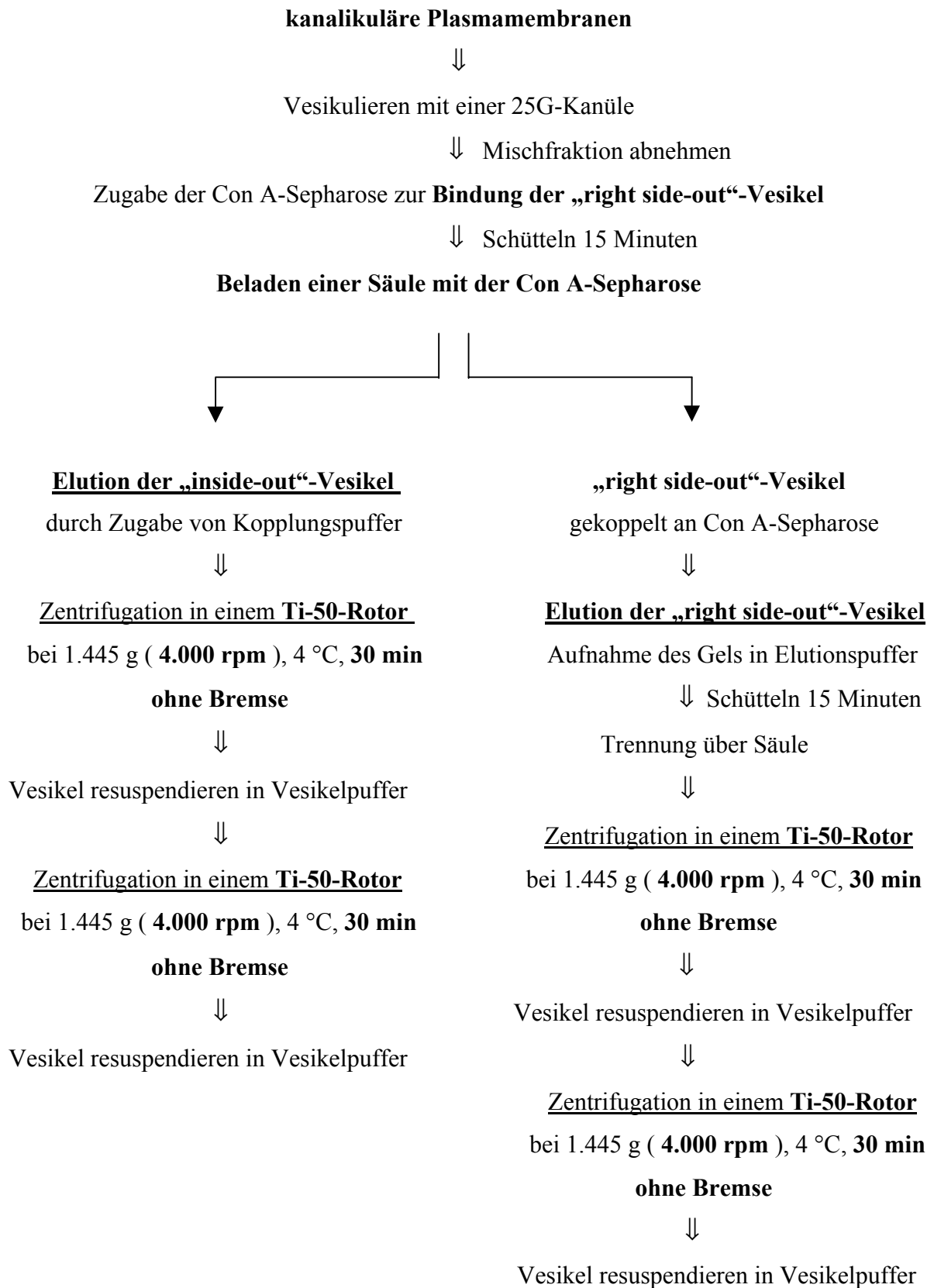
Die benötigte Menge der Gel-Suspension (1 ml Con A-Sepharose auf 5 mg / ml Protein) wird mit dem 10fachen Volumen Aktivierungspuffer über eine Säule gereinigt, um Konservierungsmittel und ungebundenes Con A zu entfernen. Anschließend wird das Gel in etwa 5 ml Kopplungspuffer aufgenommen.

4.3.2 Durchführung der Trennung von „inside-out“- und „right side-out“-Vesikeln

Die im flüssigen Stickstoff gelagerten kanalikulären Plasmamembranen (Mischfraktion aus „inside-out“- und „right side-out“-Vesikeln) werden aufgetaut und mit einer 25G-Kanüle durch 10-maliges Aufziehen vesikuliert. Die zur Kontrollmessung benötigte Menge der Mischfraktion wird abgenommen und mit Vesikelpuffer auf einen Proteingehalt von 3 mg / ml eingestellt. Die verbleibenden Vesikel werden in etwa 3 ml Kopplungspuffer aufgenommen und zusammen mit der vorbereiteten Con A-Sepharose 15 Minuten bei Raumtemperatur langsam geschüttelt, damit eine Bindung der „right side-out“-Vesikel stattfinden kann. Die Vesikel werden anschließend mit der Con A-Sepharose vorsichtig auf eine Säule gegeben und die „inside-out“-Vesikel durch Zugabe von etwa 2 ml Kopplungspuffer aus der Säule eluiert. Zum Umpuffern wird die „inside-out“-Fraktion in einem Ti-50-Rotor für 30 Minuten bei 1.445 g-max (4.000 rpm) ohne Bremse abzentrifugiert, in Vesikelpuffer resuspendiert und erneut in einem Ti-50-Rotor für 30 Minuten bei 1.445 g-max (4.000 rpm) ohne Bremse abzentrifugiert. Die sedimentierten „inside-out“-Vesikel werden in Vesikelpuffer resuspendiert und auf einen Proteingehalt von etwa 3 mg / ml eingestellt.

Zur Isolierung der „right side-out“-Vesikel wird das Gel in etwa 3 ml Elutionspuffer aufgenommen und 15 Minuten bei Raumtemperatur langsam geschüttelt. Anschließend wird das Gel auf die Säule gegeben und die „right side-out“-Vesikel durch Zugabe von etwa 2 ml Elutionspuffer von dem Gel getrennt. Zum Umpuffern werden die „right side-out“-Vesikel entsprechend der „inside-out“-Fraktion behandelt.

4.3.3 Übersicht der einzelnen Schritte der Trennung von „inside-out“- und „right side-out“-Vesikeln



4.4 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wird mit der Methode nach Lowry (1951) durchgeführt. Diese beruht auf der sogenannten Lowry-Reaktion:

Im ersten Schritt wird ein Kupfer-Protein-Komplex in alkalischer Lösung gebildet. Diesen Komplex reduziert ein Phosphomolybdat-Phosphowolframat-Reagenz (Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenz), wobei eine intensiv blaue Färbung entsteht.

Zunächst werden die Fette, die die Bestimmung verfälschen, mit einem organischen Lösungsmittel (Dioxan) aus der Probe entfernt.

Zur Bildung des Kupfer-Protein-Komplexes wird Natronlauge sowie Folin-Puffer zugegeben. Bei der Zugabe des Folin-Reagenzes ist eine wichtige Regel zu beachten: Das Reagenz ist nur in saurem Milieu beständig. Die erwähnte Reduktion erfolgt jedoch bei pH 10. Deshalb muss, sobald das Folin-Reagenz zur alkalischen Kupfer-Protein-Lösung zugefügt wird, sofort kräftig gemischt werden, damit die Reduktion vor der Zersetzung des Phosphomolybdat-Phosphowolframat-(Folin-)Reagenzes stattfindet.

Durchführung der Proteinbestimmung:

0,1 ml **Proteinlösung** (in entsprechender Verdünnung)
+ 1,0 ml **Dioxan**

5 min schütteln
2,5 min bei 10.000 g zentrifugieren
Überstand abnehmen und verwerfen

Sediment
+ 0,02 ml 1n **NaOH**

5 - 10 min schütteln
+ 0,6 ml **Folin Puffer**

10 min schütteln
+ 0,05 ml **Folin-Reagenz**

sofort gut mischen, 30 min stehen lassen, 0,5 min bei 10.000 g zentrifugieren

Die Extinktion wird im Anschluss in einem Beckmann-Spektralphotometer bei 578 nm in einer 1cm-Küvette gemessen. Zur Eichung des Photometers dient die doppelte Menge der eingesetzten Reagenzien.

Der Proteingehalt der Proben wird mittels einer mit Rinderserumalbumin erstellten Eichkurve ermittelt. Dazu werden parallel zu den Proben Standards aus Rinderserumalbumin mitgeführt, welche jeweils auf Konzentrationen von 0,2 mg/ml, 0,4 mg/ml, 0,6 mg/ml und 0,8 mg/ml eingestellt sind.

4.5 Enzymbestimmungen

Zur Überprüfung der Reinheit der gewonnenen Membranen wird die Aktivität bestimmter Markerenzyme bestimmt. Das Prinzip dieser Enzymbestimmungen beruht auf der Freisetzung von anorganischem Phosphat aus dem Substrat. Dieses wird mit Hilfe der Phosphatbestimmung nach Chen ermittelt und daraus die Enzymaktivität berechnet. Da aus dem Substrat freigesetztes Phosphat (Spontanhydrolyse) sowie in der Probe bereits vorhandenes Phosphat eine scheinbar höhere Enzymaktivität vortäuschen würde, wird dieses separat bestimmt und anschließend von dem Ergebnis subtrahiert.

4.5.1 5'-Nukleotidase

Die Bestimmung der 5'-Nukleotidase, Leitenzym der kanalikulären Membranfraktion, wurde nach Michell und Hawthorne (1965) durchgeführt. Dieses Enzym setzt Phosphat aus Adenosin-5'-monophosphat (AMP) frei.

Durchführung der Enzymbestimmung:

Die bei -80 °C aufbewahrten Proben werden in einem 37-°C-Wasserbad aufgetaut (etwa 5 Minuten) und entsprechende Verdünnungen hergestellt. Der Reaktionsansatz erfolgt nach folgendem Pipettierschema, wobei die Reaktion durch Zugabe des Substrates (AMP) gestartet wird. Um die Spontanhydrolyse möglichst gering zu halten, wird das Substrat unmittelbar vor Versuchsbeginn in Aqua bidest. gelöst.

Pipettierschema (Doppelansatz)

	Puffer	Aqua bidest.	Probe	Substrat
Spontanhydrolyse	100 µl	50 µl	—	50 µl
vorh. Phosphat	100 µl	50 µl	50 µl	—
5'-Nukleotidase	100 µl	—	50 µl	50 µl

Die Proben werden einzeln durch Zugabe des Substrates gestartet und bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wird nach 15 Minuten durch Zugabe von je 50 µl 25%iger TCE abgestoppt. Die Proben für Spontanhydrolyse und vorhandenes Phosphat werden ebenfalls bei 37 °C inkubiert und nach 15 Minuten je 50 µl TCE zugegeben.

Das ausgefällte Protein wird abzentrifugiert und 200 µl Überstand für die Phosphatbestimmung nach Chen abgenommen.

4.5.2 Glukose-6-Phosphatase

Die Aktivität der Glukose-6-Phosphatase wird mit der Methode nach Harper und Bergmeyer (1962) bestimmt. Die Glukose-6-Phosphatase ist ein Enzym des endoplasmatischen Retikulums. Ihre Anreicherung gegenüber dem Gesamthomogenat ist somit ein Anzeiger für den Grad der Verunreinigung der Membranfraktionen mit intrazellulären Membranen (ER). Das Prinzip der Reaktion ist die Abspaltung von anorganischem Phosphat aus Glukose-6-Phosphat.

Die Durchführung erfolgt analog der oben beschriebenen Bestimmung der 5'-Nukleotidase, wobei als Substrat Glukose-6-Phosphat unmittelbar vor Versuchsbeginn in Aqua bidest. gelöst wird.

4.5.3 Na⁺/K⁺-ATPase und Mg²⁺-ATPase

Zur Bestimmung der ATPase-Aktivität dient die Methode von Bon, Benedette und Rümke (1964). Mit dieser Methode kann sowohl die Mg²⁺-ATPase, ein Leitenzym der kanalikulären Plasmamembranfraktion, als auch die Na⁺/K⁺-ATPase, ein Leitenzym der basolateralen Plasmamembranfraktion, bestimmt werden. Wie im Materialteil beschrieben sind dazu Reaktionspuffer unterschiedlicher Zusammensetzung zu verwenden, da die einzelnen ATPasen mit Hilfe der entsprechenden Pufferzusammensetzung aktiviert bzw. deaktiviert werden. Die Mg²⁺-ATPase kann einmal mit dem Reaktionspuffer Mg⁺⁺ direkt bestimmt werden, aber auch indirekt, indem man dem Reaktionspuffer Na⁺/K⁺/Mg⁺⁺ Ouabain (G-Strophantin) zusetzt. Durch Ouabain wird die Na⁺/K⁺-ATPase gehemmt und das Messergebnis gibt nur die Aktivität der Mg²⁺-ATPase wieder. Mit Hilfe des Reaktionspuffers Na⁺/K⁺/Mg⁺⁺ lässt sich die Aktivität der Na⁺/K⁺-ATPase allerdings nur als aufsetzbare Aktivität zur Mg²⁺-ATPase bestimmen. Die Aktivität der Na⁺/K⁺-ATPase errechnet sich somit aus der Differenz beider ATPasen und der Mg²⁺-ATPase.

Folgendes Pipettierschema soll die Bestimmung der ATPase-Aktivität verdeutlichen.

Pipettierschema (Doppelansatz)

	Puffer Mg ⁺⁺	Puffer Na ⁺ /K ⁺ /Mg ⁺⁺	Puffer Ouabain	Aqua dest.	Probe	Substrat
Spontanhydrolyse	100 µl	—	—	50 µl	—	50 µl
vorh. Phosphat	100 µl	—	—	50 µl	50 µl	—
Mg ²⁺ -ATPase	100 µl	—	—	—	50 µl	50 µl
Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	—	100 µl	—	—	50 µl	50 µl
Ouabain	—	—	100 µl	—	50 µl	50 µl

Wie bei den vorangegangenen Enzymbestimmungen beschrieben, werden die Proben in einem 37-°C-Wasserbad aufgetaut und entsprechende Verdünnungen hergestellt.

Der Reaktionsansatz erfolgt wie oben beschrieben, wobei die Reaktion durch Zugabe von unmittelbar vor Versuchsbeginn in Aqua bidest. gelöstem Tris-ATP gestartet wird. Die Proben werden anschließend bei 37 °C inkubiert.

Die Reaktion wird nach 15 Minuten durch Zugabe von je 50 µl 25%iger TCE abgestoppt. Das ausgefällte Protein wird abzentrifugiert und 200 µl Überstand für die Phosphatbestimmung nach Chen abgenommen.

4.5.4 Bestimmung des anorganischen Phosphats nach Chen

Bei den durchgeführten Enzymbestimmungen wird aus den Substraten (AMP, Glukose-6-Phosphat, Tris-ATP) anorganisches Phosphat freigesetzt. Die freigesetzte Menge kann mittels einer Farbreaktion im Photometer bestimmt werden.

Das Prinzip der Reaktion ist die Bildung eines Phosphomolybdat-Komplexes mit Ammoniummolybdat und die anschließende Reduktion dieses Komplexes durch Ascorbinsäure.

Durchführung der Phosphatbestimmung:

Nach der durchgeführten Enzymbestimmung wird von jeder zentrifugierten Probe 200 µl Überstand in jeweils 1 ml Chen-Reagenz überführt.

Das Gemisch wird für 20 Minuten im 45-°C-Wasserbad inkubiert und muss anschließend 10 Minuten abkühlen.

Es folgt die Extinktionsmessung in einem Beckmann-Spektralphotometer bei 578 nm in einer 1-cm-Küvette. Zur Eichung des Photometers wird Chen-Reagenz verwendet.

Berechnung des anorganischen Phosphats:

Die freigesetzte Menge an anorganischem Phosphat wird nach folgender Formel berechnet.

$$\frac{\mu\text{M Phosphat}}{\text{mg Protein x Stunde}} = \frac{\Delta E \times \text{Verdünnungsfaktor der Probe} \times 17,63}{\text{Proteingehalt der Probe in mg / ml}}$$

$$\Delta E = E_{\text{Probe}} - E_{\text{vorh. Pi}} - E_{\text{Spontanh.}}$$

Da pro Mol umgesetztes Substrat proportional ein Mol Phosphat freigesetzt wird, ist der berechnete Wert in $\mu\text{M Phosphat pro mg Protein und Stunde}$ mit der Enzymaktivität in $\mu\text{M Substrat pro mg Protein und Stunde}$ identisch.

Faktorberechnung (Faktor 17,63):

$$F = \frac{\text{Zeitfaktor} \times (\text{Endvolumen Reaktion} / \text{Eingesetztes Vol. Chen}) \times F_{\text{Chen}} \times \text{Faktor Proteinvolumen}}{\text{Molekulargewicht des Phosphates}}$$

Zeitfaktor = Umrechnung auf eine Stunde: bei 15 Minuten Inkubation \Rightarrow Faktor 4

Endvolumen Reaktion \Rightarrow 0,25 ml

Eingesetztes Volumen für Chen \Rightarrow 0,2 ml

Faktor Chen (F_{Chen}) = 5,46 für 0,2 ml in 1-cm-Küvetten

Eingesetztes Proteinvolumen \Rightarrow Faktor 20

(Proteinvolumen in absoluten Zahlen

50 μl = 1/20 ml \Rightarrow Faktor 20 , wegen Bezug auf 1 ml)

Molekulargewicht des Phosphats = 30,975

4.6 Schnellfiltrationstechnik

Die Schnellfiltrationstechnik ist eine übliche Methode für Transportstudien an isolierten Plasmamembranvesikeln.

Die Grundlage dafür ist, dass die mit Hilfe der Plasmamembranpräparation gewonnenen Membranen nach Vesikulieren mit einer 25G-Kanüle Bläschen formen. Durch Verwendung eines standardisierten Vesikelpuffers mit einer physiologischen Osmolarität von 270 - 310 mosm bleibt dabei die natürliche Membranintegrität erhalten. Selbst die Aufbewahrung in flüssigem Stickstoff für einige Wochen bedingt keinen Verlust der Transportaktivität.

Wird diesen Vesikeln von außen substrathaltiges Medium zugegeben, so kann die Membran dieses Substrat ins Innere der Vesikel transportieren. Im Anschluss werden die Vesikel auf einen Filter gegeben und durch Spülen über einem Vakuum wird das im Außenmedium verbliebene Substrat entfernt. Da ein radioaktiv markiertes Substrat für diese Messungen eingesetzt wird, kann das in die Vesikel transportierte Substrat mittels Flüssigkeits-Szintillationszähler bestimmt werden.

4.6.1 Durchführung der Aufnahmemessungen

Auftauen der Membranen

Am Tag der Messung werden die im flüssigen Stickstoff gelagerten Vesikel in einem 37-°C-Wasserbad aufgetaut (etwa 5 Minuten) und mittels Vesikelpuffer auf einen Proteingehalt von etwa 4 mg / ml eingestellt. Die Zusammensetzung des Vesikelpuffers entspricht der gewünschten intravesikulären Zusammensetzung zu Beginn des Experiments. Durch 10-maliges Aufziehen durch eine 25G-Kanüle wird erneut vesikuliert und je 25 µl in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert. Die Proteinmenge pro Probe entspricht bei 25 µl etwa 100 µg, doch zur Feststellung der tatsächlich eingesetzten Proteinmenge werden für die Proteinbestimmung 50 bzw. 100 µl zurückbehalten. Die einzelnen Proben werden bis zu Versuchsbeginn auf Eis gelagert.

Inkubationsmedien

Die Zusammensetzung des Inkubationsmediums variiert entsprechend den gewünschten extravesikulären Versuchsbedingungen [siehe 3.7]. Wichtig ist, dass das Inkubationsmedium nach Zusatz der benötigten Substanzen die gleiche Osmolarität wie der Vesikelpuffer besitzt, da sonst die Transportaktivität der Vesikel durch Schrumpfen oder Platzen eingeschränkt

wird. Dies macht z.B. die Verwendung von zwei verschiedenen Inkubationsmedien (Kapitel 3.7.1.1 und 3.7.1.2) für die ATP-abhängige Aufnahme notwendig, da sich nach Zusatz von regenerierendem System (Kreatinphosphat und Kreatinkinase) die Osmolarität des Inkubationsmediums um etwa 30 mosm erhöht. Dagegen wirkt sich z.B. die Erhöhung der ATP-Konzentration von 0,5 mM auf 5,0 mM (Kapitel 5.6.3), trotz starker Beeinflussung des pH-Wertes und damit notwendiger Korrektur, weniger auf die Osmolarität aus (Erhöhung um 5 - 10 mosm).

Die radioaktiv markierte Substanz in entsprechender Konzentration wird unmittelbar vor Versuchsbeginn dem Inkubationsmedium zugegeben. Zur Feststellung der darin tatsächlich vorhandenen Menge radioaktiver Substanz werden jeweils 10 µl als Pipettierkontrolle in ein Szintillationsgefäß (Minivial) pipettiert und der Radioaktivitätsbestimmung zugeführt (Dreifachbestimmung).

Aufbau der Absauganlage zur Schnellfiltration

Die Vorrichtung zur Schnellfiltration besteht aus einer Absaugflasche mit einer Glasfritte Duran P 3 (Durchmesser 25 mm), auf die der Filter aufgelegt wird. Diese Absaugflasche ist über zwei weitere Absaugflaschen, die Kieselgeltrockenperlen (mit Feuchtigkeitsindikator) zum Trocknen der Absaugluft enthalten, mit einer Vakuumpumpe verbunden. Es wird ein Unterdruck erzeugt, so dass die Absauggeschwindigkeit etwa 1 ml / Sekunde beträgt.

Versuchsdurchführung

Alle Transportstudien werden in einem temperaturkontrollierten Wasserbad durchgeführt. Die Vesikel werden jeweils 2 Minuten vor Start der Reaktion in einem temperierten Wasserbad vorinkubiert (in der Regel 37 °C).

Zum Start der Aufnahme werden 100 µl des ebenfalls vortemperierten substrathaltigen Inkubationsmediums zugegeben. Nach den definierten Zeiten wird der Transport durch Zugabe von 1 ml eiskalter Stopplösung beendet. Von diesem Reaktionsgemisch wird 1 ml auf einen mit 2,5 ml Stopplösung vorgespülten Filter pipettiert, welcher auf der Absaugvorrichtung liegt. Anschließend werden die auf dem Filter verbleibenden Vesikel zweimal mit je 2,5 ml eiskalter Stopplösung gespült, um die nicht aufgenommene Substanz zu entfernen. Nach dem Spülen verbleibt der Filter zum Trocknen noch 30 Sekunden auf der Absauganlage. Der Filter wird anschließend in ein Szintillationsgefäß (Minivial) überführt, mit 3 ml Szintillator-Flüssigkeit vermischt und etwa 2 Stunden im Wärmeschrank bei 45 °C aufbewahrt, damit die

gesamte Radioaktivität aus dem Filter gelöst wird. Nach Aufbewahrung von weiteren 12 Stunden bei Raumtemperatur werden die Proben erneut gemischt und die Radioaktivität in einem Flüssigkeits-Szintillationszähler (Wallak 1409/11 LSC Version 1.6) bestimmt.

Unspezifische Filterbindung

Ein Teil der radioaktiven Substanz bindet unspezifisch an den Filter. Daher ist es notwendig, die Filterbindung separat zu bestimmen und von jeder Probe zu subtrahieren, da sonst ein scheinbar höherer Transport vorliegt. Für die Filterbindung wird zu den Vesikeln zuerst 1 ml eiskalte Stopplösung zugegeben, gemischt und erst dann erfolgt die Zugabe des substrathaltigen Inkubationsmediums. Alle anderen Schritte sind exakt die gleichen wie zuvor beschrieben.

4.6.2 Berechnung der Substanzaufnahme

Die absolute Menge der in die Vesikel aufgenommenen Substanz errechnet sich nach folgender Formel:

$$\text{Substanzaufnahme} = \frac{(\text{korrigierte dpm}) \times \text{IMK} \times \text{PWK} \times \text{Faktor}}{\text{spezifische Aktivität in dpm / pmol}}$$

korrigierte dpm = gemessene dpm – Filterbindung

IMK Inkubationsmediumkorrektur = $\frac{\text{theoretisch eingesetzte dpm}}{\text{tatsächlich eingesetzte dpm (Pipettierkontrolle)}}$
(bezogen auf 100 µl Inkubationsmedium)

PWK Proteinwertkorrektur = Umrechnung der eingesetzten Proteinmenge auf
1 mg / ml Protein

Faktor = das gegebenenfalls zu berücksichtigende Verhältnis markierter zu
unmarkierter Substanz [(markiert + unmarkiert) / markiert]

Spezifische Aktivität der radioaktiv markierten Substanz in dpm / pmol

4.6.3 Besonderheiten bei der Durchführung der Bestimmung des Bindungsanteils von [¹⁴C]-Valsartan an die kanalikuläre Leberplasmamembran

Zur Bestimmung des Bindungsanteils (Kapitel 5.6.6) wird die Osmolarität des Inkubationsmediums durch Zugabe von Saccharose auf 450 mosm / 600 mosm / 900 mosm erhöht. Grundlage bleibt das zur ATP-abhängigen Aufnahme verwendete Inkubationsmedium (Kapitel 3.7.1), wobei man eine bestimmte Saccharosemenge vorlegt und die Lösung ohne Zusatz bzw. nach Zugabe von ATP mit regenerierendem System bzw. AMP mit Hilfe einer 56%igen Saccharoselösung auf die gewünschte Osmolarität einstellt (Kapitel 3.7.2).

Damit sich das Vesikellumen bereits vor Start der Reaktion der gewünschten Osmolarität anpassen kann, werden die Membranvesikel in den Inkubationsmedien mit den Osmolaritäten von 300 mosm / 450 mosm / 600 mosm / 900 mosm (50 µl je Probe) 15 Minuten bei 37 °C vorinkubiert. Zur Vorinkubation dient das auf die entsprechende Osmolarität eingestellte Inkubationsmedium ohne Zusatz von ATP mit regenerierendem System bzw. AMP. Zum Start der Aufnahme werden 50 µl substrathaltiges Inkubationsmedium (mit Zusatz von ATP mit regenerierendem System bzw. AMP sowie der zu untersuchenden Substanz) mit der entsprechenden Osmolarität zugegeben und für 60 Sekunden mit den Vesikeln inkubiert. Der weitere Ablauf entspricht der unter Kapitel 4.6.1 beschriebenen Versuchsdurchführung.

4.7 Nachweis der Stabilität sowie Reinheit von [¹⁴C]-Valsartan und Valsartan

Die Identität von radioaktiv markiertem sowie nicht markiertem Valsartan wird mittels Dünnschichtchromatographie und -radiographie festgestellt.

10 µl einer 100 µM Valsartan-Lösung werden neben radioaktiv markierter Substanz auf eine 60F-254-Dünnschicht-Kieselgelplatte (Merck ®, Darmstadt) aufgetragen. Der Versuch wird in einer gesättigten Laufmittelatmosphäre durchgeführt. Die mobile Phase besteht aus Dichlormethan / Methanol / Aqua bidest. / Essigsäure im Verhältnis 300:50:10:1. Befindet sich die Laufmittelfront etwa 1 cm vom oberen Rand entfernt, wird die DC-Platte an der Luft getrocknet und mittels eines Isomess-IM-3000-Radio-Dünnschicht-Analysators die Verteilung der Radioaktivität bestimmt. Das Prinzip dieser Messung beruht auf der Übertragung von ionisierenden Strahlenteilchen in elektrische Signale über ein Zählrohr, in dem sich ein Methan- /Argon-Gemisch befindet. Über einen Drucker wird die Radioaktivitätsverteilung wiedergegeben.

Schließlich wird die Übereinstimmung der radioaktiv markierten Substanz mit der nicht markierten Substanz auf der DC-Platte überprüft. Mit Hilfe einer UV-Lampe können beide Substanzen aufgrund ihrer Fluoreszenz sichtbar gemacht werden. Dabei sollte der Rf-Wert der radioaktiv markierten Substanz mit dem der nicht markierten Substanz übereinstimmen.

4.8 Statistische Methoden

Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogramms Microsoft Excel 7.0 ® sowie Rechnern im lokalen Rechnernetzwerk der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereiches Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen. Die statistischen Auswertungen wurden unter Verwendung des Statistik-Programmpaketes BMDP / Dynamic, Release 7,0 (Dixon 1993) durchgeführt.

Für die Beschreibung der Daten wurden arithmetische Mittelwerte (\bar{x}) und Standardabweichungen (SD_{n-1} , auch angegeben als \pm) berechnet [Lorenz 1996]. Alle Versuche wurden mindestens dreimal durchgeführt (Stichprobenumfang $n \geq 3$).

Die lineare Regression (y) wurde zur Ermittlung sämtlicher Geraden bei den linearisierenden Transformationen (Lineweaver-Burk-Plot, Dixon-Plot und Cornish-Bowden-Plot) sowie zur Bestimmung des Bindungsanteils von Valsartan an die Plasmamembranen (Osmoplot) und zur Ermittlung der scheinbaren Aktivierungsenergie (Arrhenius-Plot) verwendet [Lorenz 1996].

Zur statistischen Prüfung des Einflusses der Behandlung auf Signifikanz wurde eine ein- und zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholungen und anschließendem Paarvergleich (Dunett-Test), multiplen Mittelwertvergleich (Tukey-Test) bzw. Test auf parallelen Verlauf mit den Programmen BMDP7D bzw. BMDP2V durchgeführt.

Die Signifikanzgrenzen betragen: $p < 0,01$ signifikant (**)

$p < 0,05$ schwach signifikant (*)

$p > 0,05$ nicht signifikant (--)

Die Beratung zur statistischen Auswertung erfolgte durch Herrn AkOR Dr. K. Failing, Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereiches Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen.

5 Ergebnisse

5.1 Stabilität und Löslichkeit von Valsartan

Das zu untersuchende Pharmakon Valsartan wurde von der Firma Novartis Pharma AG, Basel (Schweiz) in radioaktiv markierter und unmarkierter Form zur Verfügung gestellt.

Das radioaktiv markierte [¹⁴C]-Valsartan (spezifische Aktivität 1.50 MBq / mg) wurde im Isotopen-Zentrum der Novartis Pharma AG synthetisiert und die radiochemische Reinheit (> 98 %) mittels HPLC überprüft.

Beide Substanzen lagen pulverförmig vor und wurden je nach Gebrauch in Phosphatpuffer (50 mM K₂HPO₄ / KH₂PO₄, pH 7,5) gelöst.

Die Stabilität der radioaktiv markierten wie auch der unmarkierten Substanz wurde in regelmäßigen Abständen dünnschicht-chromatographisch überprüft. Es ist anzumerken, dass es sich dabei jeweils um die gleiche Reinsubstanz handelt, die aber zu unterschiedlichen Zeitpunkten mittels Phosphatpuffer in Lösung gebracht wurde.

Die Abbildung 5.1 zeigt die Radioaktivitätsverteilung von [¹⁴C]-Valsartan nach Auswertung in einem Isomess-IM-3000-Radio-Dünnschicht-Analysator. Es konnten weder Autoradiolyse noch Verunreinigungen festgestellt werden.

Schließlich wurde die Übereinstimmung der radioaktiv markierten Substanz mit der nicht markierten Substanz auf der DC-Platte mittels UV-Lampe überprüft. Beide Substanzen besitzen den gleichen R_f-Wert (R_f: 0,45), der fluoreszierende „Spot“ des radioaktiv markierten Valsartan stimmte mit dem „Spot“ der nicht markierten Substanz auf den DC-Platten exakt überein.

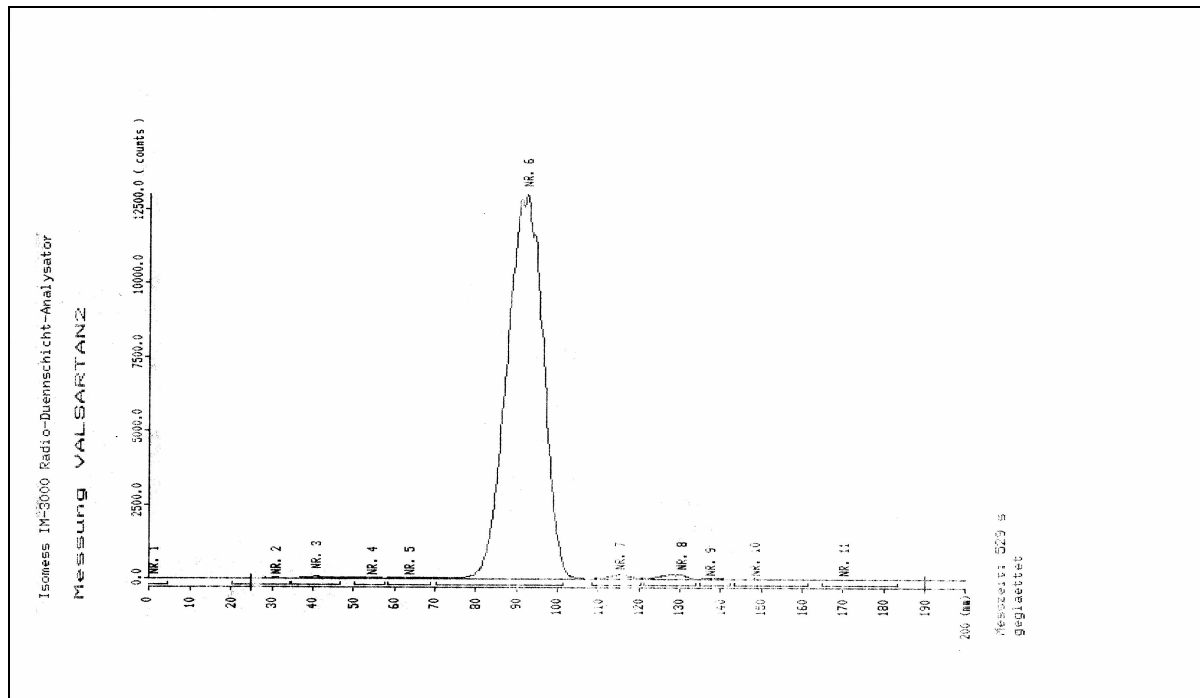


Abb. 5.1 Verteilung der Radioaktivität von [^{14}C]-Valsartan nach Auftrennung mittels Dünnschichtchromatographie; aus einer Stammlösung von 0,5 mg [^{14}C]-Valsartan, gelöst in 0,2 ml Phosphatpuffer, wurden 2,5 μl entnommen und auf die Startlinie einer 60F-254-Dünnschicht-Kieselgelplatte (Merck $\text{\textcircled{R}}$, Darmstadt) aufgetragen. Diese Menge entspricht einer Aktivität von 0,25 μCi . Die DC-Platte wurde in eine Kammer mit gesättigter Laufmittelatmosphäre (Dichlormethan / Methanol / Aqua bidest. / Essigsäure im Verhältnis 300:50:10:1) überführt und bis zu einer Lauffront von 20 cm entwickelt. Die Radioaktivität auf der DC-Platte wurde mittels eines Isomess-IM-3000-Radio-Dünnschicht-Analysators bestimmt. Auf der Ordinate ist die Radioaktivität in counts bei einer Messzeit von 9,5 Minuten und auf der Abszisse die Entfernung vom Auftragungspunkt (0 mm) zur Lauffront (200 mm) aufgetragen.

5.2 Vergleich der In-vivo-Galleausscheidung und -Organverteilung von Valsartan in Wistar-Ratten und TR⁻-Ratten

Die biliäre Ausscheidung und Organverteilung von Valsartan wurde in zwei verschiedenen Rattenstämmen untersucht: normale Wistar-Ratten ohne genetischen Defekt sowie TR⁻ / GY-Wistar-Mutanten, welche einen Transportdefekt für organische Anionen an ihrer kanalikulären Leberplasmamembran aufweisen. Dieser Defekt wird verursacht durch ein Fehlen des ATP-abhängigen „canalicular multispecific organic anion transporter“ cMoat / Mrp2 [Keppler et al. 1997].

Zur Aufklärung des am Transport von Valsartan beteiligten Transportsystems ist der Vergleich der In-vivo-Galleausscheidung und -Organverteilung in Wistar- und TR⁻-Ratten gut geeignet, da in den transportdefekten Ratten in der kanalikulären Plasmamembran das Transportsystem cMoat / Mrp2 fehlt.

5.2.1 Gallefluss bei männlichen Wistar- und TR⁻-Ratten nach Injektion von Valsartan bzw. physiologischer Kochsalzlösung

In Abbildung 5.2 ist die in situ gemessene Galleflussrate bei männlichen Wistar- und transportdefizienten TR⁻-Ratten nach Injektion von Valsartan bzw. physiologischer Kochsalzlösung dargestellt.

Bei den Versuchstieren wurde Valsartan in einer Dosierung von 1 mg / kg Körpermasse (1 mg = $2,3 \times 10^6$ pmol) in eine Mesenterialvene injiziert, nachdem es mit Hilfe physiologischer Kochsalzlösung auf ein Volumen von 500 µl gebracht wurde. Den Kontrolltieren wurde zur Feststellung des physiologischen Galleflusses 500 µl physiologische Kochsalzlösung injiziert. Die Galle wurde über einen Zeitraum von 60 Minuten zu den angegebenen Zeitintervallen fraktioniert gesammelt und die Galleflussrate (µl / min x 100 g Körpermasse) durch Abwiegen bestimmt.

Jede Kurve stellt den mittleren Verlauf des Galleflusses von drei voneinander unabhängigen Versuchen dar.

Die Injektion von Valsartan bewirkt bei den Wistar-Ratten eine Stimulation des Galleflusses (choleretischer Effekt). Die Kurve liegt signifikant höher als die der Kontrolltiere, während sich der Gallefluss bei den TR⁻-Ratten nach Injektion von Valsartan gegenüber den Kontrolltieren nicht wesentlich verändert.

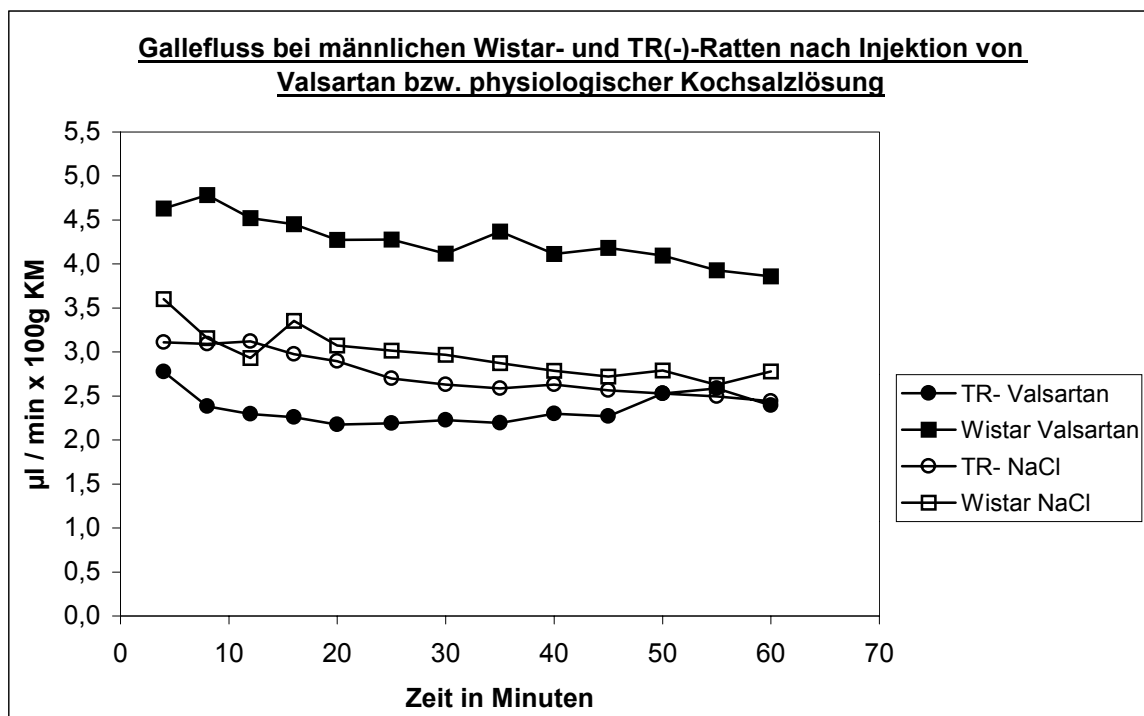


Abb. 5.2 Galleflussrate bei männlichen Wistar- und TR-Ratten nach Injektion von Valsartan bzw. physiologischer Kochsalzlösung, gemessen über 60 Minuten in Narkose; $n = 3$, $SD_{n-1} < 20\%$.

5.2.2 Biliäre Elimination und Organverteilung von Valsartan in männlichen Wistar- und transportdefizienten TR⁻-Ratten in einer Dosierung von 1 mg / kg KM

Nach Applikation von 1 mg [¹⁴C]-Valsartan / Valsartan pro kg Körpermasse (1 µCi markierte Substanz, der Rest unmarkierte Substanz, mit physiologischer Kochsalzlösung auf ein Volumen von 500 µl gebracht) in eine Mesenterialvene wurde die Galle der Ratten über 180 Minuten fraktioniert gesammelt und mittels Radioaktivitätsbestimmung die ausgeschiedene Substanzmenge in pmol berechnet.

Dosierungsbeispiel für eine Ratte mit einer Körpermasse von 250 g :

Bei einer Dosierung von 1 mg [¹⁴C]-Valsartan / Valsartan pro kg Körpermasse ist in eine Mesenterialvene dieser Ratte eine Substanzmenge von insgesamt 0,25 mg = 575.000 pmol zu injizieren. Diese Menge wird aufgeteilt in 1µCi = 0,025 mg = 57.500 pmol markierte Substanz sowie 0,225 mg = 517.500 pmol unmarkierte Substanz, gelöst in Phosphatpuffer und mit physiologischer Kochsalzlösung auf ein Volumen von 500 µl gebracht.

Bei normalen Wistar-Ratten (Abb. 5.3) steigt die Valsartan-Konzentration in der Galle steil an, mit einem Maximum nach etwa 20 Minuten, fällt dann rasch wieder ab und schleicht langsam aus. Nach 3 Stunden werden 81 % der injizierten Substanz über die Galle ausgeschieden (Abb. 5.4).

Bei den TR⁻-Ratten (Abb. 5.3) zeigt sich ein deutlich anderer Verlauf. Die Eliminationskurve steigt langsam an und verläuft bis Ende des Versuchs ohne Maximum auf einem gleichbleibenden Niveau. Nach 3 Stunden werden nur 39 % der injizierten Substanz über die Galle ausgeschieden (Abb. 5.4), wobei diese Menge bei normalen Wistar-Ratten bereits nach 30 Minuten ausgeschieden ist. Dies bedeutet außerdem eine um 50 % reduzierte Ausscheidungsrate gegenüber den normalen Wistar-Ratten.

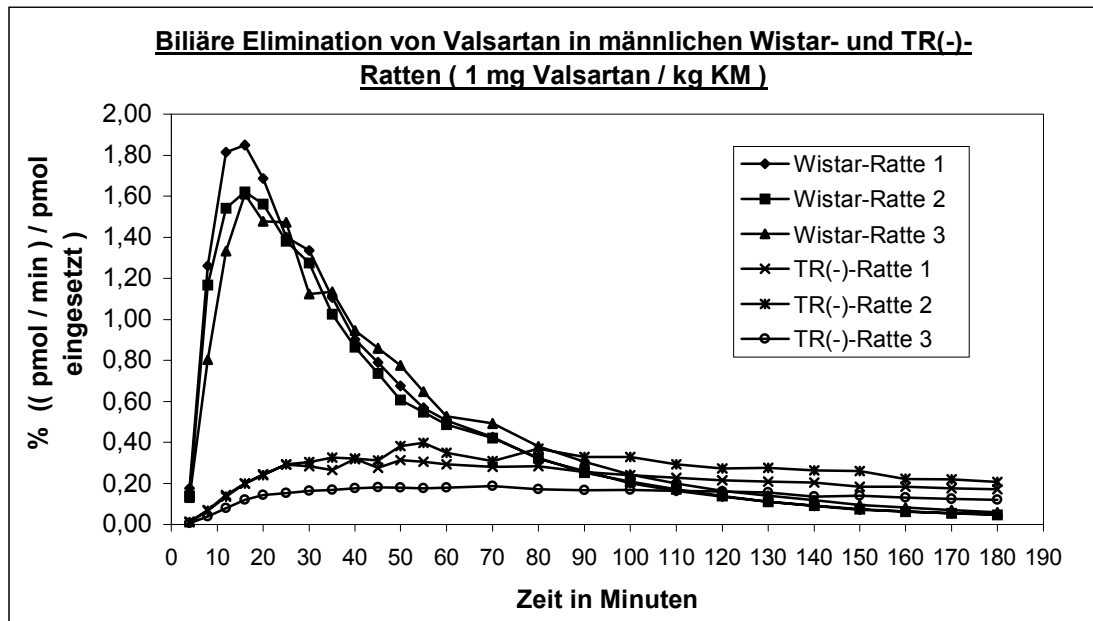


Abb. 5.3 Biliäre Elimination von Valsartan in **männlichen** Wistar- und TR⁻-Ratten in einer Dosierung von 1 mg / kg KM.

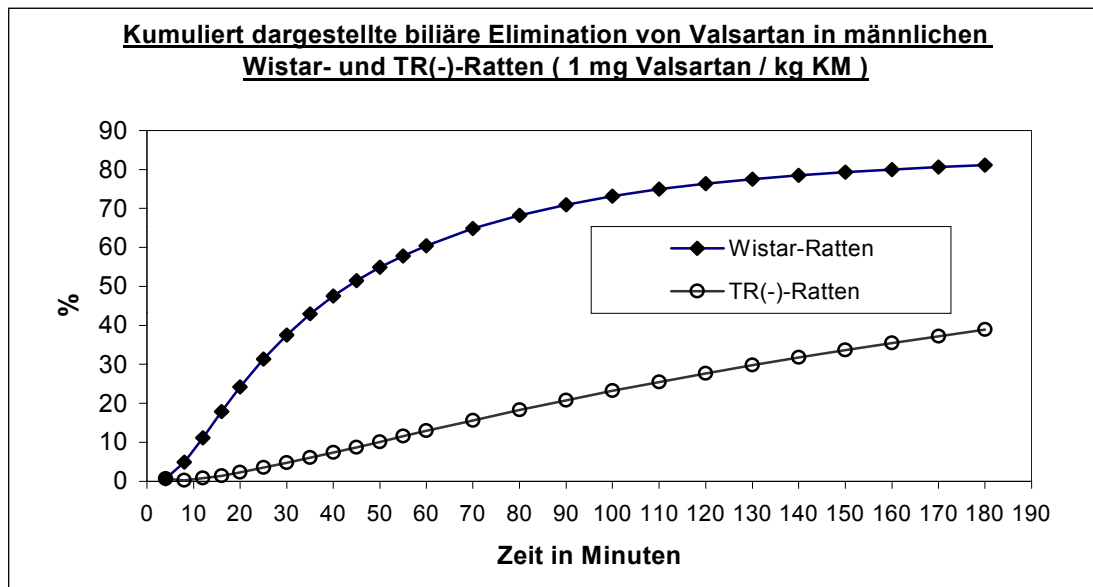


Abb. 5.4 Kumuliert dargestellte biliäre Elimination von Valsartan in männlichen Wistar- und TR⁻-Ratten; Darstellung der zu jedem Zeitpunkt insgesamt ausgeschiedenen Menge in % (zu Grunde gelegt wurden die Messergebnisse aus Abb. 5.3).

Zur Ermittlung der Organverteilung wurde der Gehalt von Valsartan im Blut und verschiedenen ausgewählten Organen bestimmt (Tab. 5.1 sowie Abb. 5.5). Die Bezeichnung „restlicher Körper“ umfasst den Anteil, der sich mit Hilfe der Radioaktivitätsbestimmung nicht direkt bestimmen lässt, z.B. Knochen, Haut, Magen-Darm-Trakt, und errechnet sich aus der Differenz der insgesamt eingesetzten Substanzmenge zu den messbaren Anteilen.

Auch hier wird deutlich, dass bei den Wistar-Ratten ein Großteil des Valsartan (81 %) über die Galle ausgeschieden wird, während nur 2,2 % im Blut und ein geringer Anteil in den Organen (< 1 %) zu messen ist.

Dagegen wird bei den TR-Ratten im Vergleich zu den Wistar-Ratten fast 50 % weniger über die Galle ausgeschieden (39 %). Hier verbleibt ein deutlich höherer Anteil im Blut (18 %) und in den Organen, besonders in der Leber (1,7 %), in der Muskulatur (0,8 %) und im restlichen Körper (40,2 %).

Tab. 5.1 *Prozentuale Organverteilung von Valsartan in männlichen Wistar- und TR-Ratten 3 Stunden nach Injektion von 1 mg Valsartan / kg KM (pmol in % der insgesamt eingesetzten Substanzmenge; n = 3, x ± SD_{n-1}).*

Organe	Wistar-Ratten	TR-Ratten
Galle	81,13 ± 2,54	38,87 ± 11,53
Blut	2,21 ± 0,17	17,98 ± 1,99
Leber	0,54 ± 0,16	1,72 ± 0,74
Herz	0,01 ± 0,00	0,03 ± 0,03
Nieren	0,05 ± 0,02	0,25 ± 0,07
Milz	0,003 ± 0,001	0,006 ± 0,004
Gehirn	0,01 ± 0,00	0,02 ± 0,00
Lunge	0,02 ± 0,01	0,11 ± 0,05
Nebennieren	0,002 ± 0,001	0,008 ± 0,000
Muskulatur	0,15 ± 0,03	0,80 ± 0,33
restlicher Körper	15,87 ± 2,74	40,21 ± 9,88

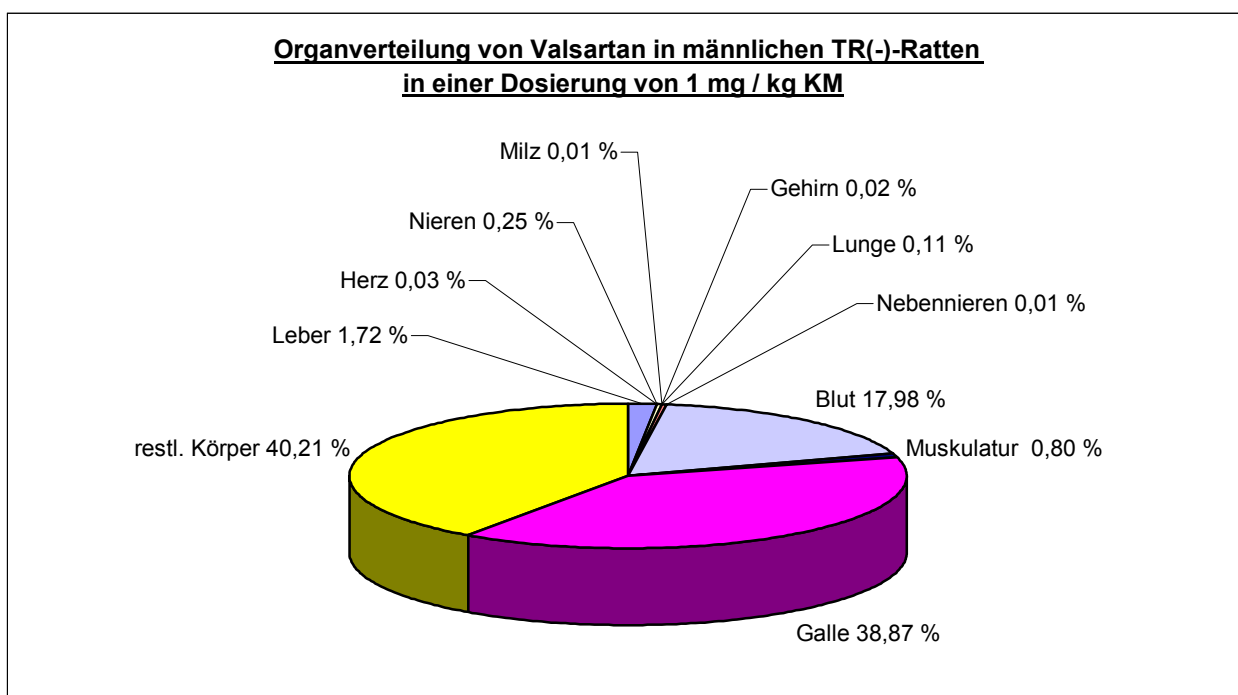
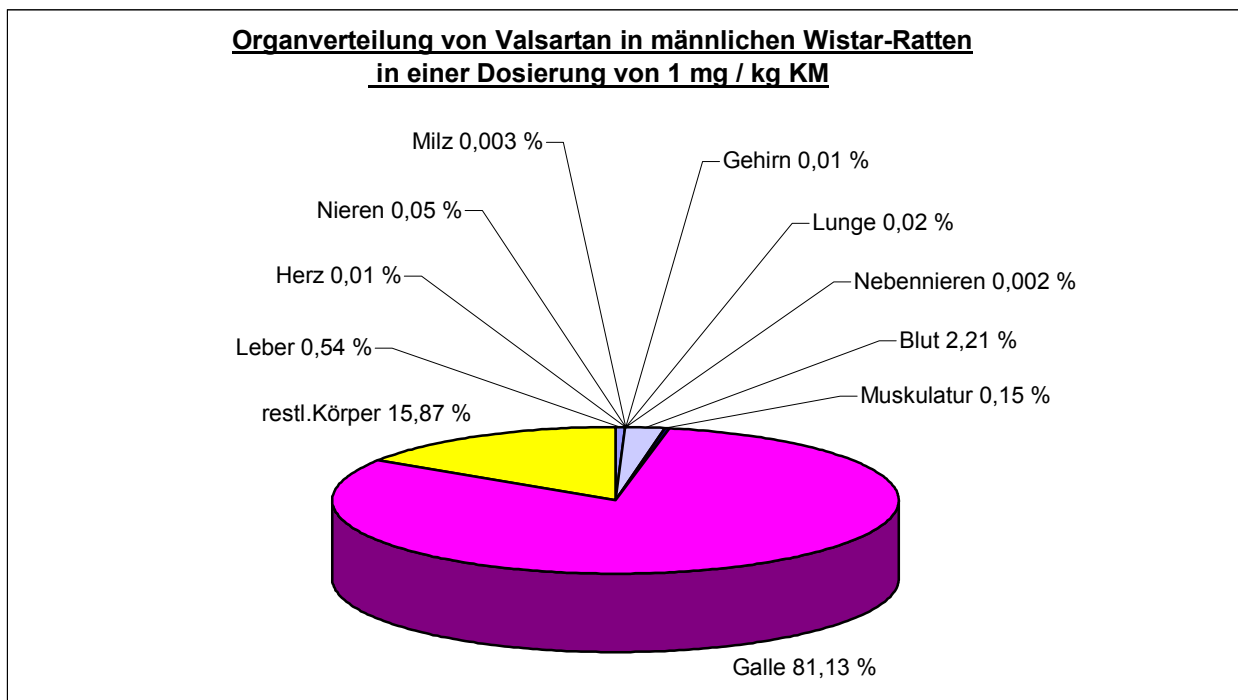


Abb. 5.5 Vergleich der prozentualen Organverteilung von Valsartan in **männlichen** Wistar- und TR-Ratten; Valsartan-Konzentrationen in Galle, Blut und ausgewählten Organen 3 Stunden nach Injektion von **1 mg / kg KM** in eine Mesenterialvene. Alle Werte wurden Tabelle 5.1 entnommen.

5.2.3 Biliäre Elimination und Organverteilung von [¹⁴C]-Valsartan in männlichen Wistar- und transportdefizienten TR⁻-Ratten in einer Dosierung von 0,5 µCi / Tier

Unter gleichen Versuchsbedingungen wie in Kapitel 5.2.2 wurde [¹⁴C]-Valsartan in einer Dosierung von 0,5 µCi / Tier (0,5 µCi = 0,0125 mg = 28.750 pmol) in eine Mesenterialvene injiziert, die Galle über 180 Minuten fraktioniert gesammelt und die enthaltene Radioaktivität bestimmt (Abb. 5.6). Das Gewicht der Wistar-Ratten lag zwischen 270 und 310 g, das der TR⁻-Ratten zwischen 330 und 350 g.

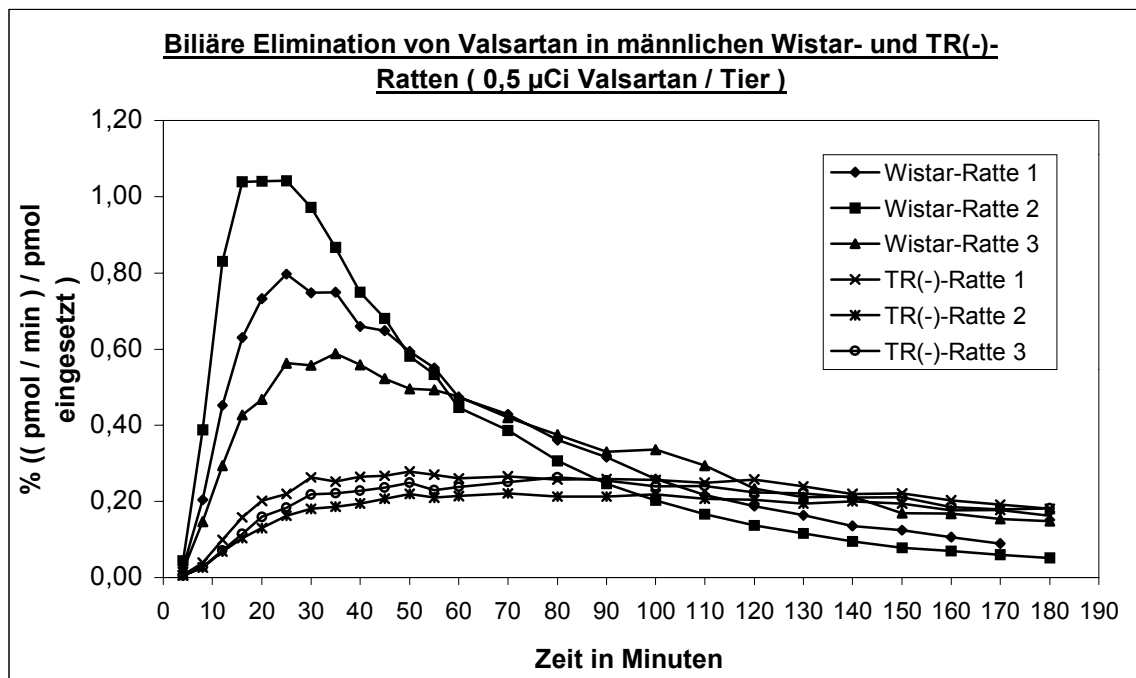


Abb. 5.6 Biliäre Elimination von [¹⁴C]-Valsartan in **männlichen** Wistar- und TR⁻-Ratten in einer Dosierung von 0,5 µCi / Tier.

Bei normalen Wistar-Ratten tritt nach 15 bis 30 Minuten ein initialer Ausscheidungspeak auf. Da [¹⁴C]-Valsartan ohne Berücksichtigung des Gewichtes des Einzeltieres in einer Dosierung von 0,5 µCi / Tier injiziert wurde, unterliegt die Höhe dieses Peaks einer gewissen Schwankungsbreite. Bei TR⁻-Ratten ist dagegen kein Ausscheidungsmaximum feststellbar. Außerdem ist die absolut ausgeschiedene prozentuale Menge von 66,64 ± 14,24 % ermittelt in Wistar-Ratten, bei TR⁻-Ratten mit 36,87 ± 3,70 % auf etwa die Hälfte reduziert (Abb. 5.7 und Tabelle 5.2).

Die prozentuale Organverteilung von [^{14}C]-Valsartan in männlichen Wistar- und TR⁻-Ratten in einer Dosierung von 0,5 μCi / Tier ist in Tabelle 5.2 sowie Abbildung 5.7 aufgeführt.

Die Ergebnisse sind mit denen der Organverteilung von Valsartan bei männlichen Wistar- und TR⁻-Ratten in einer Dosierung von 1 mg / kg KM vergleichbar (Kapitel 5.2.2), jedoch werden die Unterschiede zwischen Wistar- und TR⁻-Ratten aufgrund der höheren Standardabweichungen bei den Wistar-Ratten nicht so deutlich.

Tab. 5.2 *Prozentuale Organverteilung von [^{14}C]-Valsartan in männlichen Wistar- und TR⁻-Ratten 3 Stunden nach Injektion von 0,5 μCi Valsartan / Tier (pmol in % der insgesamt eingesetzten Substratmenge; $n = 3, x \pm SD_{n-1}$).*

Organe	Wistar-Ratten	TR⁻-Ratten
Galle	66,64 \pm 14,24	36,87 \pm 3,70
Blut	3,70 \pm 2,01	21,83 \pm 1,32
Leber	2,16 \pm 1,98	2,93 \pm 1,75
Herz	0,04 \pm 0,02	0,05 \pm 0,02
Nieren	0,21 \pm 0,14	0,34 \pm 0,05
Milz	0,009 \pm 0,001	0,011 \pm 0,001
Gehirn	0,04 \pm 0,02	0,03 \pm 0,01
Lunge	0,13 \pm 0,04	0,17 \pm 0,01
Nebennieren	0,013 \pm 0,01	0,011 \pm 0,002
Muskulatur	0,54 \pm 0,17	1,04 \pm 0,21
restlicher Körper	26,52 \pm 17,38	36,71 \pm 1,61

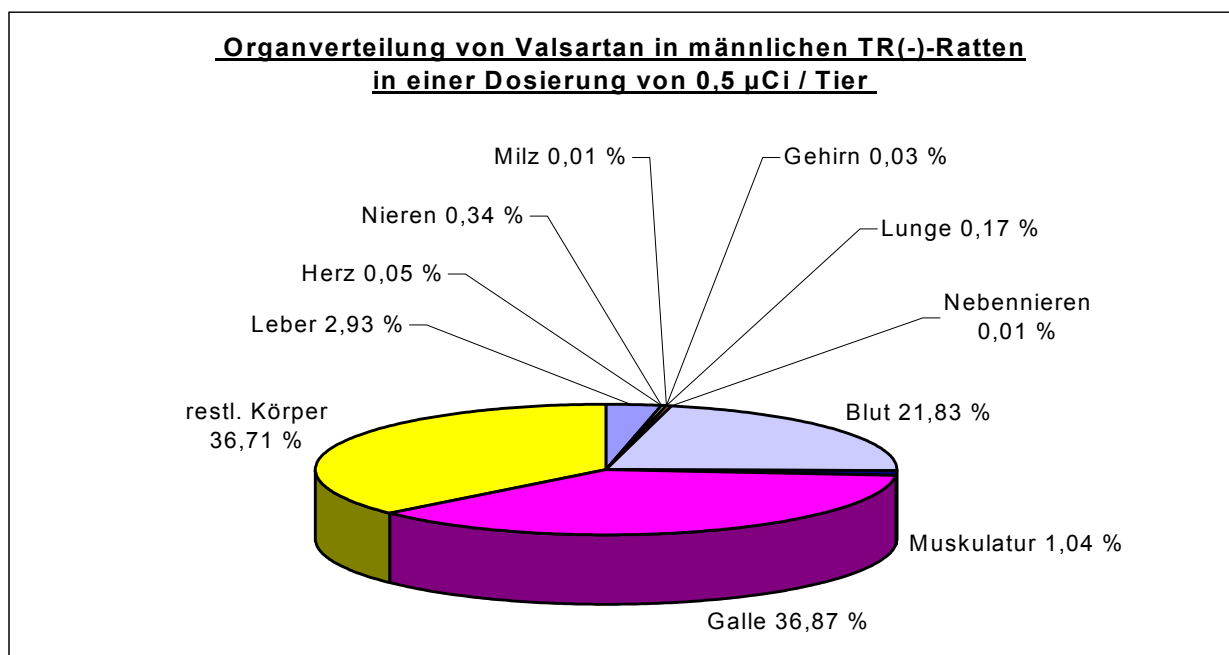
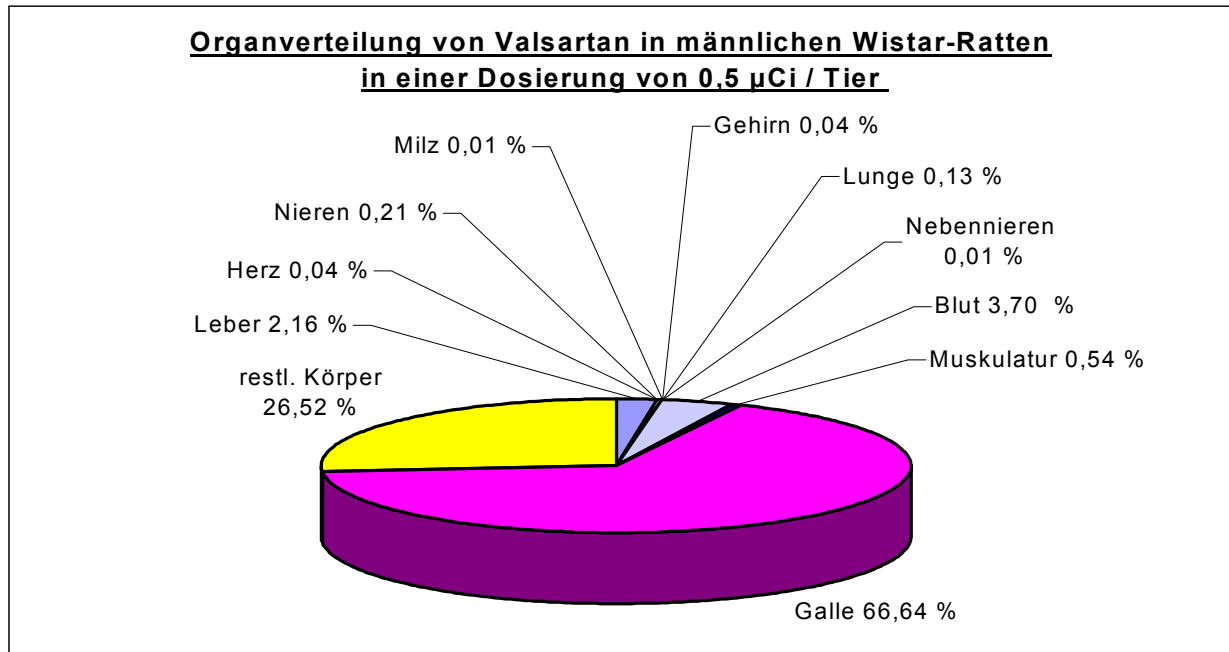


Abb. 5.7 Vergleich der prozentualen Organverteilung von [¹⁴C]-Valsartan in **männlichen** Wistar- und TR-Ratten; Valsartan-Konzentrationen in Galle, Blut und ausgewählten Organen 3 Stunden nach Injektion von **0,5 µCi / Tier** in eine Mesenterialvene. Alle Werte wurden Tabelle 5.2 entnommen.

5.2.4 Biliäre Elimination und Organverteilung von [¹⁴C]-Valsartan in weiblichen Wistar- und transportdefizienten TR⁻-Ratten in einer Dosierung von 0,5 µCi / Tier

Bei weiblichen Wistar- und TR⁻-Ratten (Abb. 5.8 und 5.9) ergeben sich unter den gleichen Versuchsbedingungen (Kapitel 5.2.3) keine signifikanten Unterschiede zu den männlichen Versuchstieren (Abb. 5.6 und Tabelle 5.2).

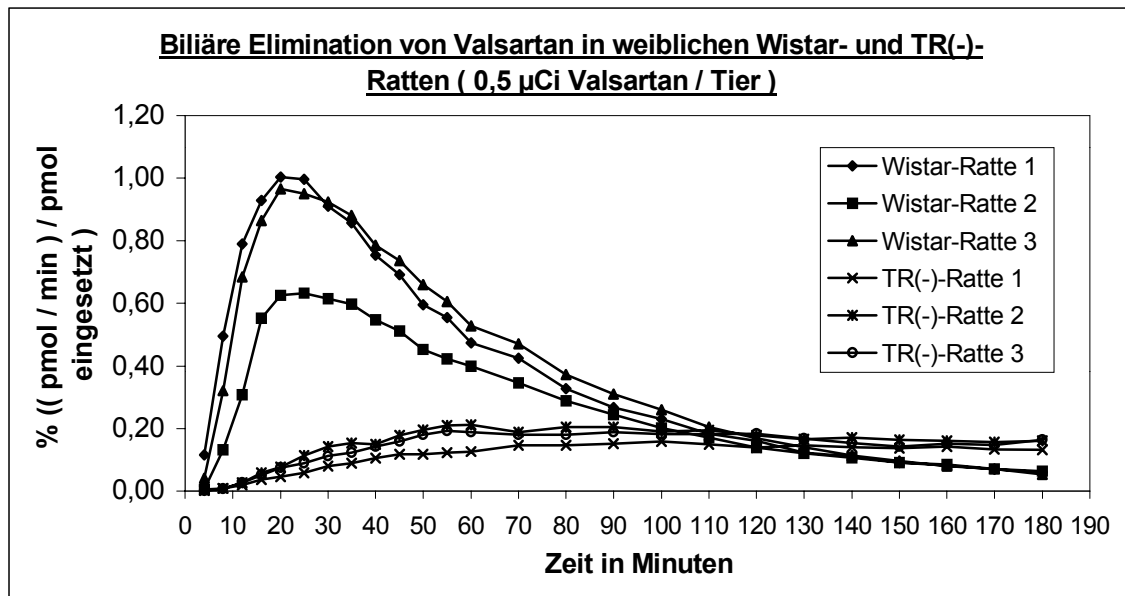


Abb. 5.8 Biliäre Elimination von [¹⁴C]-Valsartan in weiblichen Wistar- und TR⁻-Ratten in einer Dosierung von 0,5 µCi / Tier.

Tab. 5.3 *Prozentuale Organverteilung von [¹⁴C]-Valsartan in weiblichen Wistar- und TR-Ratten 3 Stunden nach Injektion von 0,5 µCi Valsartan / Tier (pmol in % der insgesamt eingesetzten Substratmenge; n = 3, x ± SD_{n-1}).*

Organe	Wistar-Ratten	TR-Ratten
Galle	58,63 ± 10,36	25,84 ± 3,65
Blut	1,62 ± 0,28	24,55 ± 1,66
Leber	0,99 ± 0,28	3,39 ± 0,93
Herz	0,028 ± 0,012	0,062 ± 0,004
Nieren	0,17 ± 0,07	0,40 ± 0,13
Milz	0,010 ± 0,002	0,013 ± 0,001
Gehirn	0,05 ± 0,01	0,06 ± 0,03
Lunge	0,10 ± 0,04	0,22 ± 0,04
Nebennieren	0,021 ± 0,002	0,021 ± 0,004
Muskulatur	0,46 ± 0,15	1,00 ± 0,21
restlicher Körper	37,93 ± 10,85	44,45 ± 1,66

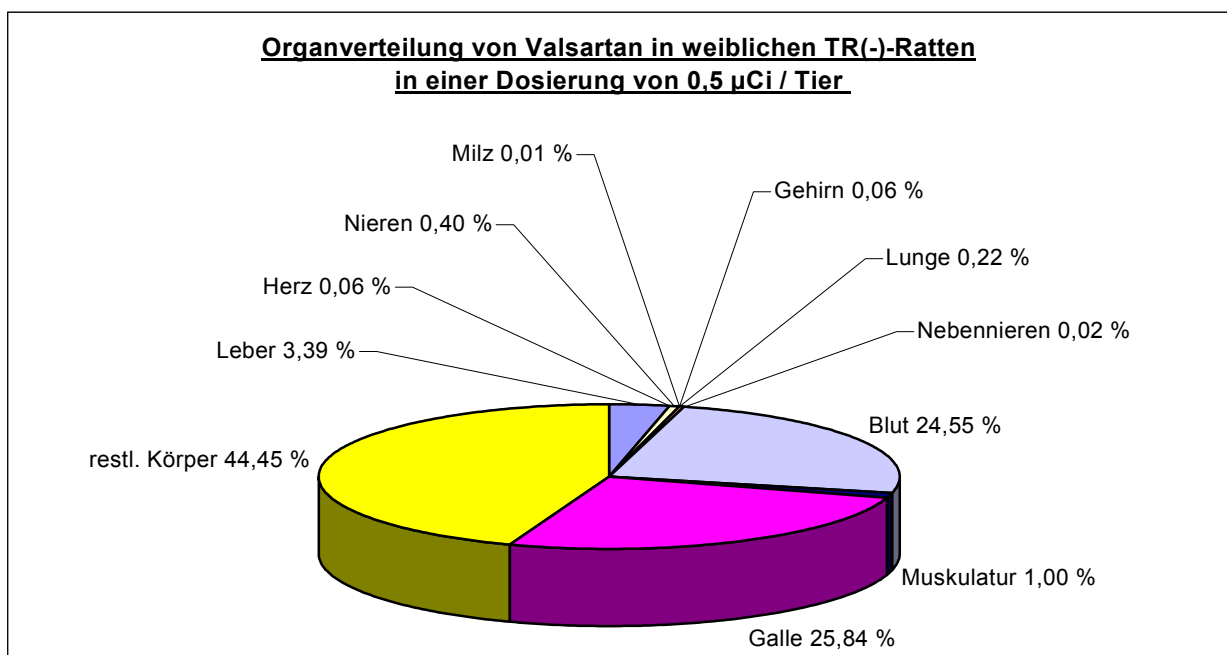
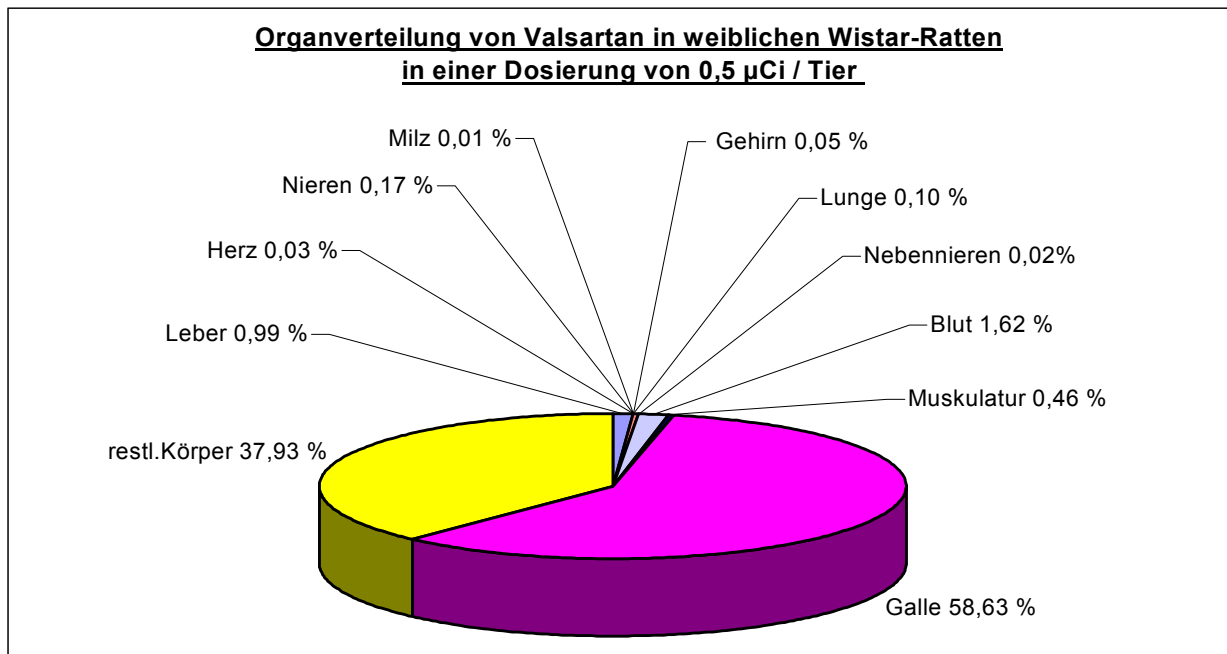


Abb. 5.9 Vergleich der prozentualen Organverteilung von [^{14}C]-Valsartan in weiblichen Wistar- und TR(-)-Ratten; Valsartan-Konzentrationen in Galle, Blut und ausgewählten Organen 3 Stunden nach Injektion von 0,5 µCi / Tier in eine Mesenterialvene. Alle Werte wurden Tabelle 5.3 entnommen.

5.3 Die Präparation kanalikulärer Plasmamembranvesikel aus der Leber von normalen Wistar-Ratten und transportdefizienten TR⁻-Ratten

Zur Charakterisierung der Transportmechanismen der biliären Elimination des Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonisten Valsartan sollen Aufnahmestudien an isolierten kanalikulären Plasmamembranvesikeln durchgeführt werden. Dazu ist eine Präparationsmethode notwendig, die es erlaubt, die Membranen der Hepatozyten von den restlichen Zellbestandteilen zu isolieren und im Anschluss die gewonnenen Plasmamembranen in basolaterale und kanalikuläre Membranen aufzutrennen. Eine geeignete Methode stellt die Plasmamembranpräparation nach Meier et al. (1984) dar.

Diese Methode konnte jedoch nicht ohne Modifikation übernommen werden, da der dazu benötigte Zonalrotor nicht zur Verfügung stand. Die Gewinnung der gemischten Plasmamembranfraktion erfolgte daher durch Flotation in einem Saccharose-Dichtegradienten in Schwingbecher-Rotoren (AH-627- und SW-27-Rotor) in Anlehnung an die ebenfalls bei der Ratte etablierte Methode nach Neville (1968).

Für jede Präparation wurden durchschnittlich 120 g Leber eingesetzt. Aus diesem Material konnten zwischen 25 und 30 mg kanalikuläre Plasmamembranen gewonnen werden. Zur Feststellung der Ausbeute wurden nach jedem Trennungsschritt die Proteinmengen der erhaltenen Fraktionen mit der Proteinmenge der Ausgangsfraktion verglichen. Bei dieser sogenannten Protein-Recovery soll nach einer Zentrifugation die Summe der Proteinmengen von Überstand und Niederschlag der Proteinmenge vor der Zentrifugation entsprechen. Die Recovery wird in Prozent der Ausgangsfraktion angegeben (Abb. 5.10).

Analog zu der Protein-Recovery wurden während der Präparation von den einzelnen Zwischenschritten Proben für Enzymbestimmungen entnommen. Als Leitenzyme der kanalikulären Plasmamembran wurden die 5'-Nukleotidase und die Mg²⁺-ATPase bestimmt sowie die Na⁺/K⁺-ATPase als Leitenzym der basolateralen Plasmamembran und die Glukose-6-Phosphatase als Leitenzym der Mikrosomenfraktion. Zur Überprüfung der Aufreinigung wurden die Gesamtaktivitäten der jeweiligen Fraktionen mit der Aktivität der Ausgangsfraktion verglichen, wobei sich die Gesamtaktivität aus der Enzymaktivität, multipliziert mit der Gesamtproteinmenge dieser Fraktion, berechnet. Mit Hilfe dieser sogenannten Enzym-Recovery konnte weder ein Verlust noch eine Inaktivierung der Enzyme festgestellt werden.

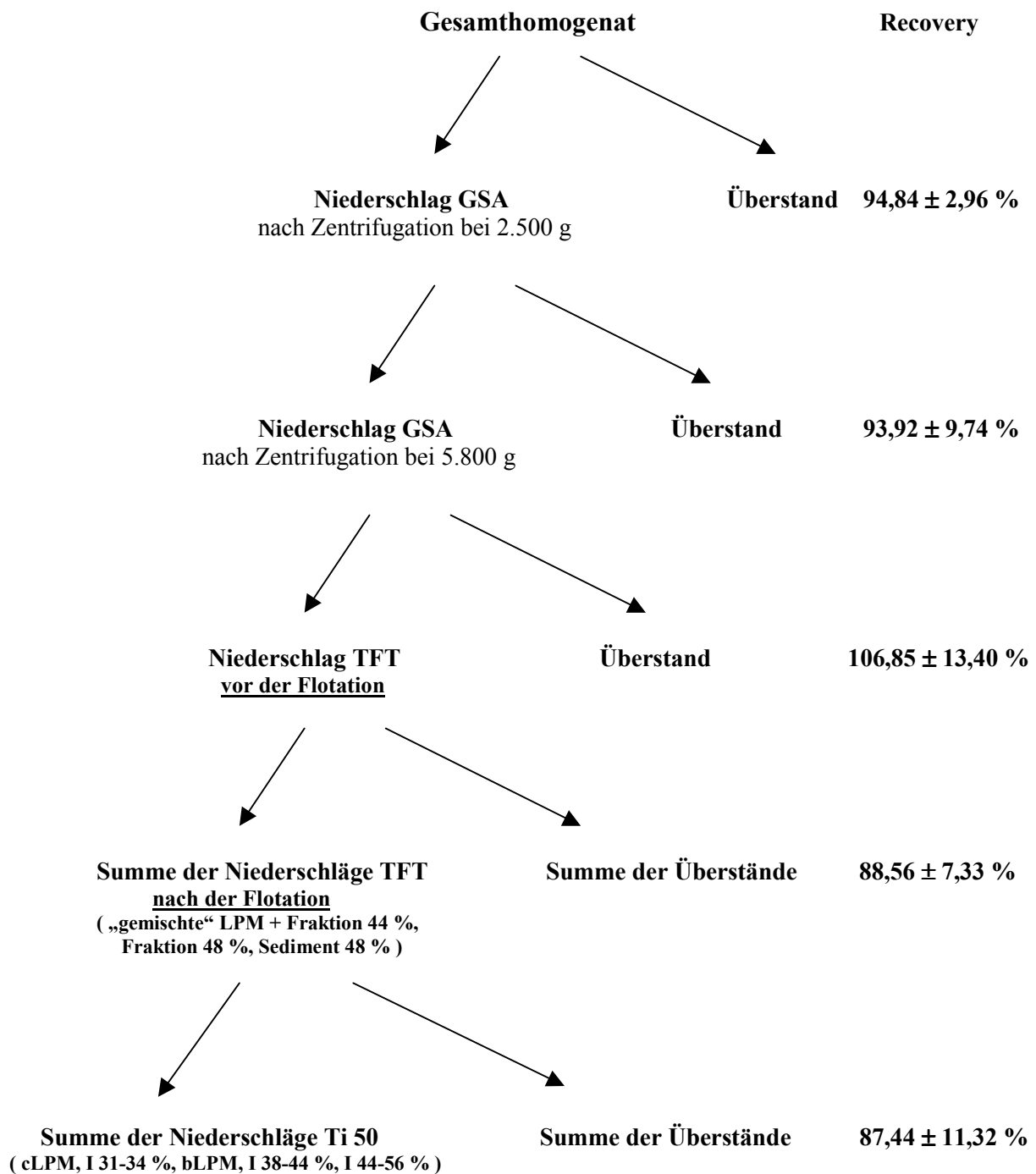


Abb. 5.10 Übersicht über den Präparationsverlauf mit Angabe der Protein-Recovery in Prozent ($x \pm SD_{n-1}$ von 3 repräsentativen Präparationen bei Wistar-Ratten, Präparationen bei TR-Ratten lieferten entsprechende Ergebnisse).

Zur Qualitätskontrolle der aufgereinigten Membranfraktionen wurden schließlich die Anreicherungen der entsprechenden Leitenzyme gegenüber dem Gesamthomogenat herangezogen. In Tabelle 5.4 sind die Enzymaktivitäten sowie deren Anreicherung bei Wistar- als auch bei TR⁻-Membranpräparationen dargestellt.

Tab.5.4 Darstellung der Enzymaktivitäten in μM Substrat pro mg Protein und Stunde sowie deren Anreicherung gegenüber dem Gesamthomogenat (*Präparationen-Wistar: n = 10, Präparationen-TR: n = 3, $x \pm SD_{n-1}$*). *Signifikante Unterschiede zwischen Wistar- und TR⁻-Membranpräparationen sind durch (**) für ($p < 0,01$) gekennzeichnet.*

	Wistar		TR ⁻	
	Aktivität	Anreicherung	Aktivität	Anreicherung
5'-Nucleotidase				
GH	1,66 ± 0,69	1	1,70 ± 0,02	1
bLPM	10,49 ± 7,18	5,79 ± 2,48	22,33 ± 2,40	13,17 ± 1,25
cLPM	60,78 ± 15,31	42,98 ± 23,91	133,16 ± 4,35	78,55 ± 1,58**
I 31-34 %	54,48 ± 12,75	37,82 ± 14,56	63,06 ± 8,79	37,24 ± 5,65
Mg²⁺-ATPase				
GH	4,46 ± 0,64	1	4,53 ± 1,07	1
bLPM	65,20 ± 27,50	14,46 ± 6,00	86,83 ± 20,84	19,16 ± 0,06
cLPM	129,89 ± 34,66	29,91 ± 10,06	297,59 ± 115,89	64,47 ± 10,28**
I 31-34 %	139,84 ± 40,84	31,76 ± 9,63	152,10 ± 60,65	32,92 ± 5,58
Na⁺/K⁺-ATPase				
GH	0,56 ± 0,21	1	0,76 ± 0,21	1
bLPM	9,11 ± 6,52	16,49 ± 11,74	15,76 ± 0,96	21,86 ± 7,21
cLPM	4,30 ± 3,87	7,91 ± 7,23	11,95 ± 0,41	16,36 ± 3,90**
I 31-34 %	9,04 ± 5,13	18,56 ± 12,30	14,05 ± 5,35	20,32 ± 12,61
Glucose-6-Phosphatase				
GH	4,48 ± 0,69	1	3,21 ± 0,13	1
bLPM	0,77 ± 0,30	0,17 ± 0,06	1,02 ± 0,88	0,31 ± 0,26
cLPM	2,78 ± 0,61	0,63 ± 0,17	2,27 ± 0,18	0,71 ± 0,03
I 31-34 %	2,37 ± 0,66	0,54 ± 0,16	1,84 ± 0,16	0,58 ± 0,07

In isolierten kanalikulären Plasmamembranfraktionen von Wistar-Ratten war die 5'-Nukleotidase ~ 43 fach angereichert, die Mg^{2+} -ATPase ~ 30 fach und die Na^+/K^+ -ATPase ~ 8 fach. Keine Anreicherung wurde für die Glukose-6-Phosphatase festgestellt. Die spezifische Aktivität der 5'-Nukleotidase sowie der Mg^{2+} -ATPase und der Na^+/K^+ -ATPase war signifikant höher in der Plasmamembranfraktion, isoliert aus der Leber von TR⁻-Ratten, im Vergleich zu der in Wistar-Ratten.

Betrachtet man die Anreicherung dieser Enzyme in der basolateralen Plasmamembranfraktion, so ist festzustellen, dass neben einer ~ 16 fachen Anreicherung der Na^+/K^+ -ATPase auch die 5'-Nukleotidase (~ 6 fach) und die Mg^{2+} -ATPase (~ 14 fach) angereichert sind. Dies deutet auf eine Verunreinigung dieser Fraktion mit kanalikulären Plasmamembranen hin.

Die Interphase 31 - 34 % stellt aufgrund der hohen Anreicherung der Leitenzyme 5'-Nukleotidase (~ 38 fach), Mg^{2+} -ATPase (~ 32 fach) und Na^+/K^+ -ATPase (~ 19 fach) eine Mischfraktion aus kanalikulären und basolateralen Plasmamembranen dar. Dies entspricht ihrer Lokalisation nach Dichtezentrifugation im Saccharosegradienten (Abb. 4.2).

5.4 Präparation kanalikulärer „inside-out“- und „right side-out“-Vesikel

Kanalikuläre „inside-out“- und „right side-out“-Vesikel werden affinitätschromatographisch mittels Con A-Sepharose getrennt (Kapitel 4.3.2.).

Pro Präparation werden insgesamt etwa 40 mg Plasmamembranprotein aus verschiedenen Präparationen aufgetaut und vereinigt, nach dem Vesikulieren wird die zur Aufnahmemessung benötigte Mischfraktion abgenommen und mit der verbleibenden Proteinmenge die affinitätschromatographische Trennung durchgeführt.

Tabelle 5.5 enthält eine Übersicht der Proteingehalte der einzelnen Fraktionen während einer Präparation von kanalikulären „inside-out“- und „right side-out“-Vesikeln:

- Die Aufreinigung einer Mischfraktion kanalikulärer „inside-out“- und „right side-out“-Vesikel mit einem Proteingehalt von 30,28 mg führte zu einer Ausbeute an kanalikulärem „inside-out“-Plasmamembranprotein von 9,45 mg / 3,5 ml bzw. 2,70 mg / ml. Dies entspricht 31,21 % der Ausgangsfraktion.
- Bestimmt man die Proteinmenge des Überstandes kanalikulärer „inside-out“-Vesikel, so ist festzustellen, dass ein Großteil der kanalikulären „inside-out“-Vesikel im Überstand verbleibt (35,83 %).
- Die Fraktion „Restprotein auf Säule“ erhält man anschließend durch 1 - 2 Auswaschschritte mit Kopplungspuffer, um restliches ungebundenes Protein von der Säule zu lösen. Der Proteingehalt dieser Fraktion entspricht 21,80 % der Ausgangsfraktion.
- Wird die Säule anschließend mit Elutionspuffer behandelt, so erhält man eine geringe „right side-out“-Fraktion von 11,16 % der Ausgangsfraktion. Dies entspricht einer Proteinmenge von insgesamt 3,38 mg.

Tab. 5.5 Übersicht der Proteingehalte der einzelnen Fraktionen während einer Präparation von kanalikulären „inside-out“- und „right side-out“-Vesikeln; *als Ausgangsfraktion wurde die zur Präparation insgesamt benötigte Proteinmenge, bestehend aus „inside-out“- und „right side-out“-Vesikeln, bezeichnet, die zusammen mit der Con A-Sepharose auf die Säule aufgetragen wurde. Nachfolgend sind die Fraktionen nach der Trennung hinsichtlich ihrer Ausbeute und Angabe einer Protein-Recovery in % aufgeführt.*

	<u>Proteingehalt in mg</u>	<u>Recovery in %</u>
Ausgangsfraktion	30,28 mg	100 %
kanalikuläre „inside-out“-Vesikel	9,45 mg	31,21 %
Überstand kanalikulärer „inside-out“-Vesikel	10,85 mg	35,83 %
Restprotein auf Säule	6,60 mg	21,80 %
kanalikuläre „right side-out“-Vesikel	3,38 mg	11,16 %

5.5 ATP-abhängige und Natrium-abhängige Taurocholat-Aufnahme in kanalikuläre Plasmamembranvesikel

Neben der Enzymbestimmung lässt sich die Qualität der präparierten kanalikulären Plasmamembranvesikel anhand der ATP-abhängigen sowie der Natrium-abhängigen Taurocholat-Aufnahme bestimmen. Bei der Ratte wird Taurocholat über die kanalikuläre Plasmamembran ausschließlich ATP-abhängig transportiert, während an der sinusoidalen Membran ein Natrium-abhängiger Transport stattfindet.

Die Höhe des Natrium-abhängigen Taurocholat-Transportes spiegelt somit den Grad der Verunreinigung der kanalikulären Plasmamembranfraktion mit basolateralen Membranen wieder.

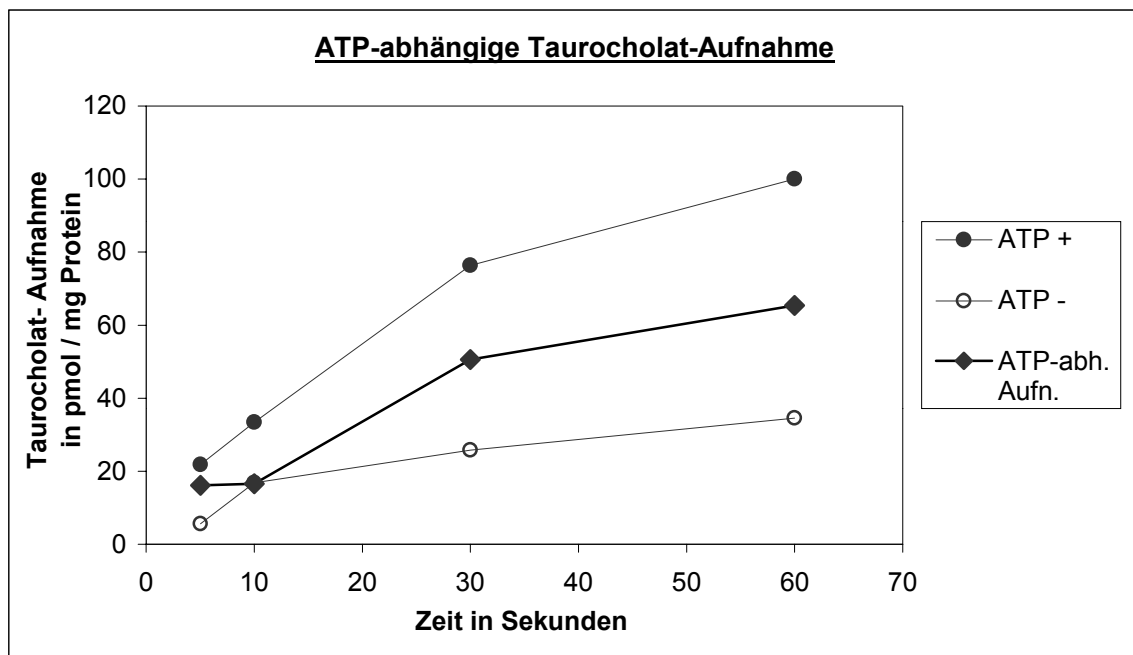


Abb. 5.11 ATP-abhängige Taurocholat-Aufnahme in kanalikuläre Plasmamembranvesikel; die Membranvesikel (100 µg Protein) wurden mit [³H]-Taurocholat in einer Konzentration von 1 µM plus Taurocholat in einer Konzentration von 4 µM (Gesamtkonzentration 5 µM) bei 37 °C inkubiert. Der ATP-abhängige Transport errechnet sich aus der Differenz der Taurocholat-Aufnahme, gemessen in Anwesenheit von 1,2 mM ATP plus regenerierendes System bzw. 1,2 mM 5'-AMP. Die Abbildung stellt ein repräsentatives Ergebnis dar.

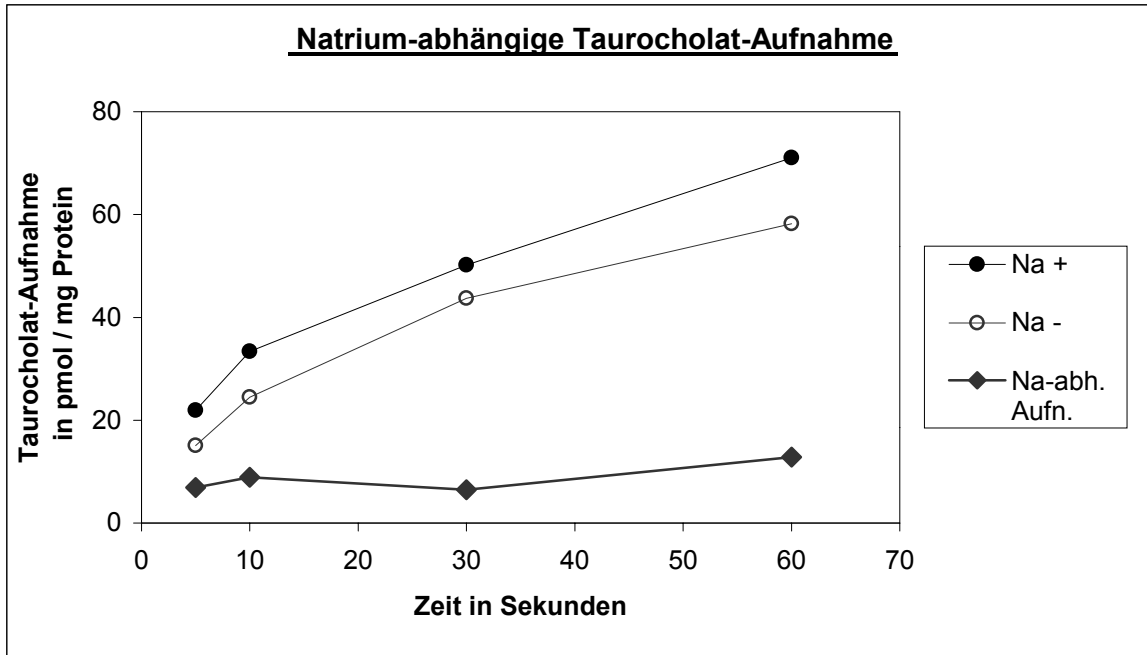


Abb. 5.12 Natrium-abhängige Taurocholat-Aufnahme in kanalikuläre Plasmamembranvesikel; die Membranvesikel (100 µg Protein) wurden mit [³H]-Taurocholat in einer Konzentration von 1 µM plus Taurocholat in einer Konzentration von 4 µM (Gesamtkonzentration 5 µM) bei 37 °C inkubiert. Der Na⁺-abhängige Transport errechnet sich aus der Differenz der Taurocholat-Aufnahme, gemessen in Anwesenheit bzw. Abwesenheit von Natriumionen. Die Abbildung stellt ein repräsentatives Ergebnis dar.

Zur Charakterisierung der Valsartan-Aufnahme wurden nur solche Präparationen verwendet, die eine ATP-abhängige Taurocholat-Aufnahme im Bereich von 40 - 70 pmol / mg Protein pro Minute sowie eine minimale Verunreinigung mit basolateralen Membranen aufweisen.

5.6 Die Charakterisierung des Valsartan-Transportes in kanalikuläre Plasmamembranvesikel isoliert, aus der Leber normaler Wistar-Ratten und transportdefizienter TR⁻-Ratten

Über die molekularen Mechanismen der hepatobiliären Elimination des Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonisten Valsartan ist bisher nichts bekannt. Die In-vivo-Galleausscheidungsstudien und -Organverteilungsstudien (Kapitel 5.2) zeigten jedoch bereits, dass an der biliären Elimination von Valsartan das Transportprotein Mrp2 / cMoat beteiligt ist. Ein Carrier-vermittelter Transport kann somit angenommen werden.

Zur Aufklärung der molekularen Mechanismen der Ausscheidung von Valsartan wird die Aufnahme von Valsartan in kanalikuläre Plasmamembranvesikel isoliert aus der Leber normaler Wistar-Ratten gemessen. Zur weiteren Identifikation und Charakterisierung sollen Hemmstoffversuche mit bekannten Substraten von in der kanalikulären Plasmamembran vorkommenden Carriern sowie Aufnahmestudien an kanalikulären Plasmamembranvesikeln, isoliert aus der Leber von TR⁻-Ratten, durchgeführt werden.

Die Aufnahme von Valsartan wurde in eine Mischfraktion aus kanalikulären „ inside-out“- und „ right side-out“-Vesikeln gemessen, es sei denn, es ist ausdrücklich erwähnt, dass es sich um eine „inside-out“-Fraktion handelt. Außerdem wurde für jede Aufnahmemessung Protein aus 2 - 3 Präparationen gemischt, da die Erfahrung zeigte, dass unter gleichen Versuchsbedingungen Aufnahmemessungen mit Protein aus einer einzelnen, aber jeweils unterschiedlichen Präparation eine hohe Standardabweichung ergibt.

5.6.1 Die ATP-abhängige Aufnahme von [¹⁴C]-Valsartan in Abhängigkeit von der Zeit

Ein Charakteristikum der in der kanalikulären Plasmamembran der Rattenleber beschriebenen membranständigen Transportproteine (siehe Einleitung) besteht in dem ATP-abhängigen Transport von Substraten.

Daher wurde zunächst untersucht, ob Valsartan in die kanalikulären Membranvesikel ATP-abhängig aufgenommen wird (Abb. 5.13).

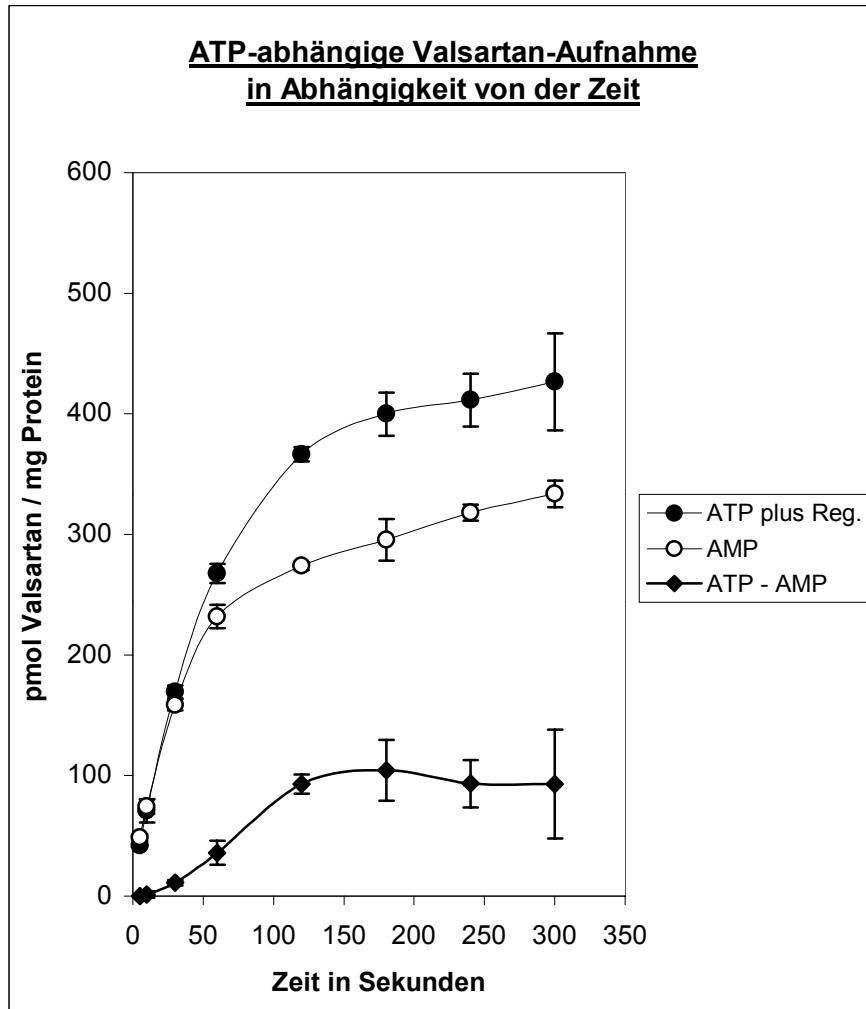


Abb. 5.13 Darstellung der Aufnahme von [^{14}C]-Valsartan in Abhängigkeit von der Zeit; die Membranvesikel (100 μg) wurden mit [^{14}C]-Valsartan in einer Konzentration von 57 μM bei 37 $^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Der ATP-abhängige Transport errechnet sich aus der Differenz der Valsartan-Aufnahme, gemessen in Anwesenheit von 3,0 mM ATP plus regenerierendes System bzw. 3,0 mM 5'-AMP ($n = 3$; $x \pm SD_{n-1}$).

Die Aufnahme von [^{14}C]-Valsartan wurde in kanalikuläre Leberplasmamembranvesikel mit ATP-haltigem und ATP-freiem (AMP) Inkubationsmedium gemessen. Dem Inkubationsmedium mit ATP wurde zusätzlich regenerierendes System (10 mM Kreatinphosphat mit 100 μg / ml Kreatinkinase) zugesetzt, um zu jedem Zeitpunkt der Reaktion ATP bereitzustellen. Sowohl die Aufnahme in ATP-haltigem Inkubationsmedium plus regenerierendes System als auch die Aufnahme in ATP-freiem Inkubationsmedium verlief in der ersten Minute linear und erreichte nach 120 Sekunden ein Maximum. Durch die Zugabe von ATP plus regenerierendes System erhöhte sich die Aufnahme um durchschnittlich 30 %.

5.6.2 Natrium-Abhängigkeit der [¹⁴C]-Valsartan-Aufnahme

Entsprechend der Untersuchungen der Aufnahme von Taurocholat in isolierte Leberplasmamembranvesikel (Kapitel 5.5) wurde die Aufnahme von [¹⁴C]-Valsartan in Abhängigkeit von der Zeit in Anwesenheit bzw. Abwesenheit von Natriumionen (Inkubationsmedium mit Na⁺ bzw. Na⁺-freies Inkubationsmedium, Kapitel 3.7.3) untersucht.

Ein Natrium-abhängiger Transport von [¹⁴C]-Valsartan in isolierte kanalikuläre Plasmamembranvesikel der Rattenleber findet nicht statt (Abb. 5.14).

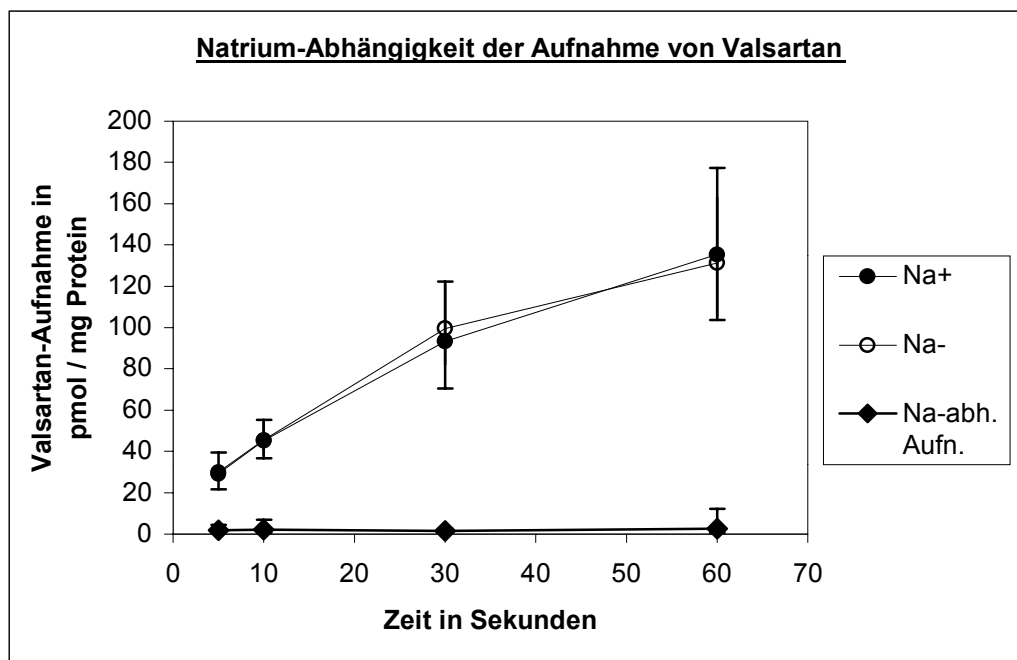


Abb. 5.14 Natrium-abhängige [¹⁴C]-Valsartan-Aufnahme in kanalikuläre Plasmamembranvesikel; die Membranvesikel (100 µg Protein) wurden mit [¹⁴C]-Valsartan in einer Konzentration von 57 µM bei 37 °C inkubiert. Der Na⁺-abhängige Transport errechnet sich aus der Differenz der Valsartan-Aufnahme, gemessen in Anwesenheit bzw. Abwesenheit von Natriumionen (n = 3; x ± SD_{n-1}).

5.6.3 Einfluss der ATP-Konzentration auf die Aufnahme von [¹⁴C]-Valsartan

Der Transport von [¹⁴C]-Valsartan in kanalikuläre Leberplasmamembranvesikel wurde in Anwesenheit von steigenden ATP-Konzentrationen gemessen.

Die Differenz zwischen der Aufnahme in Anwesenheit von ATP plus regenerierendes System und der Abwesenheit von ATP (Anwesenheit von AMP) repräsentiert die ATP-abhängige Aufnahme. Wie die Abbildung 5.15 zeigt, nimmt die ATP-abhängige Valsartan-Aufnahme mit steigender ATP-Konzentration (0,5 / 1,2 / 2,0 / 3,0 mM) zu. Bei einer ATP-Konzentration von 5,0 mM tritt eine Sättigung ein.

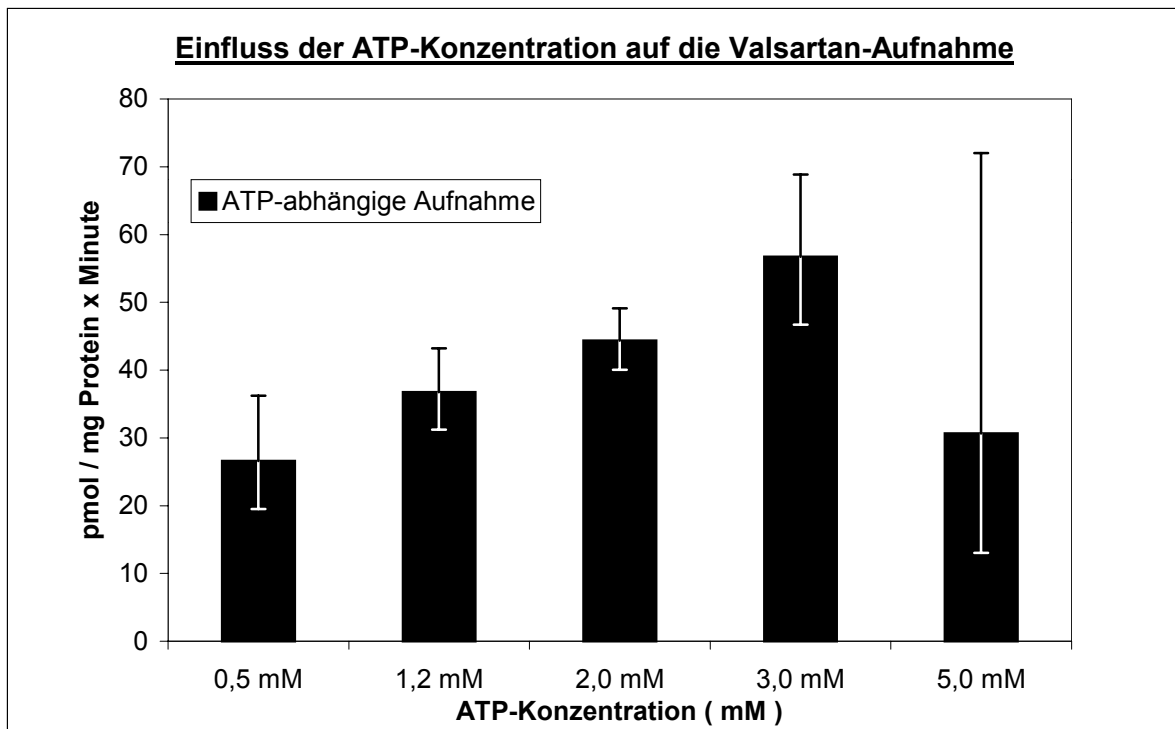


Abb. 5.15 Einfluss steigender ATP-Konzentrationen auf die [¹⁴C]-Valsartan-Aufnahme; die Aufnahmestudien wurden mit 0,5 / 1,2 / 2,0 / 3,0 / 5,0 mM ATP plus regenerierendes System bzw. 0,5 / 1,2 / 2,0 / 3,0 / 5,0 mM AMP bei 37 °C durchgeführt, aus deren Differenz sich die ATP-abhängige Aufnahme errechnet. Die [¹⁴C]-Valsartan-Konzentration betrug 57 μM (n = 3, $\bar{x} \pm SD_{n-1}$).

Nach Lineweaver-Burk (doppelt reziproke Auftragung der Aufnahmegeschwindigkeit gegen die ATP-Konzentration) wurde eine **Michaelis-Konstante von $K_m (ATP) = 1,449 \text{ mM}$** und eine **maximale Reaktionsgeschwindigkeit $v_{max} (ATP) = 62,22 \text{ pmol / mg Protein x Minute}$** ermittelt (Abb. 5.16).

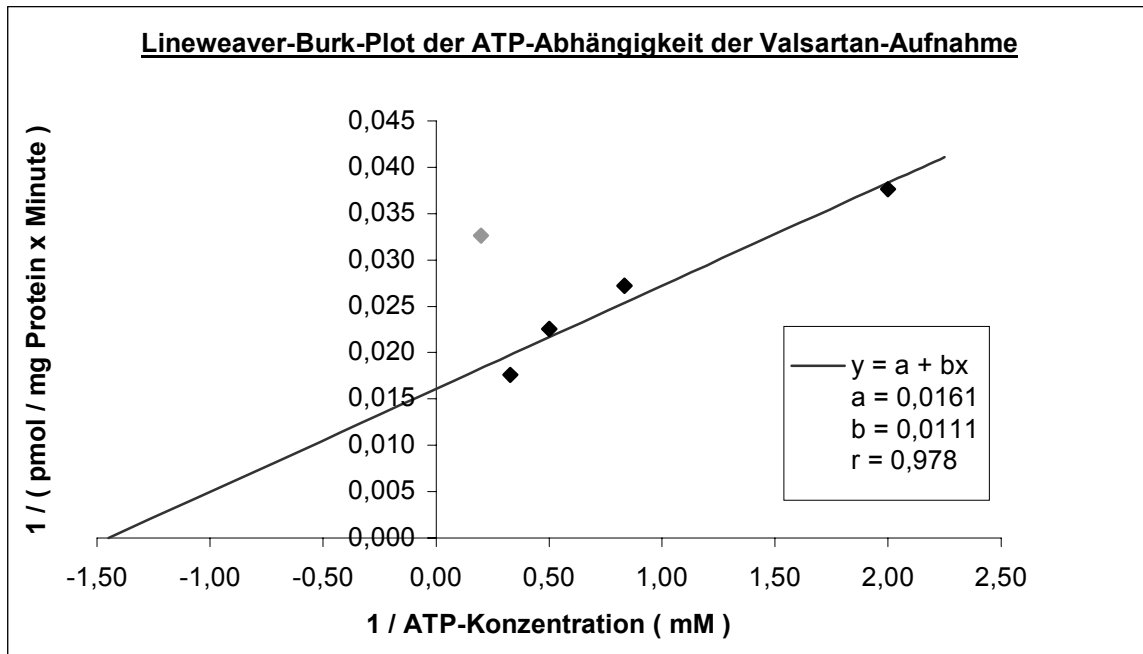


Abb. 5.16 Lineweaver-Burk-Plot der ATP-Abhängigkeit der [¹⁴C]-Valsartan-Aufnahme; die Daten der ATP-abhängigen [¹⁴C]-Valsartan-Aufnahme aus Abb. 5.15 wurden doppelt reziprok aufgetragen und nach linearer Regression die Michaelis-Konstante $K_m (ATP)$ und die Reaktionsgeschwindigkeit $v_{max} (ATP)$ ermittelt.

Die [¹⁴C]-Valsartan-Aufnahme bei 5,0 mM ATP wurde nicht in die Regressionsanalyse mit einbezogen, da dieser Wert aufgrund seiner hohen Standardabweichung das Ergebnis verfälschen würde.

5.6.4 Konzentrationsabhängigkeit der aktiven ATP-abhängigen Aufnahme von [¹⁴C]-Valsartan

Die Konzentrationsabhängigkeit des ATP-abhängigen [¹⁴C]-Valsartan-Transportes wird durch Transportmessungen bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen untersucht. Zur Feststellung der **aktiven (energieabhängigen) Aufnahme** werden alle Aufnahmemessungen nicht nur bei 37 °C, sondern auch bei 7 °C unter gleichen Versuchsbedingungen durchgeführt.

Bei einer Temperatur von 7 °C findet kein aktiver Transport mehr statt, so dass man hier nicht von ATP-abhängiger Aufnahme, sondern von Bindung sprechen kann. Subtrahiert man den **Bindungsanteil** (ATP-Aufnahme plus regenerierendes System – AMP-Aufnahme bei 7 °C) von der **ATP-abhängigen Aufnahme** (ATP-Aufnahme plus regenerierendes System – AMP-Aufnahme bei 37 °C), so erhält man die tatsächliche **aktive Aufnahme**:

$$\text{Aktive Aufnahme} = [\text{ATP} - \text{AMP bei } 37 \text{ °C}] - [\text{ATP} - \text{AMP bei } 7 \text{ °C}]$$

In Abbildung 5.17 sind die Ergebnisse der Transportmessungen von [¹⁴C]-Valsartan in kanalikuläre Leberplasmamembranvesikel bei steigender Substratkonzentration (10 μM / 20 μM / 40 μM / 50 μM / 100 μM / 250 μM / 500 μM) dargestellt. Die Aufnahmemessungen wurden in Anwesenheit von ATP plus regenerierendes System bzw. AMP im Inkubationsmedium bei 37 °C respektive 7 °C durchgeführt.

Die Aufnahmemessungen bei 37 °C zeigen eine deutliche Abhängigkeit von der Substratkonzentration. Die [¹⁴C]-Valsartan-Aufnahme mit ATP plus regenerierendes System als auch mit AMP im Inkubationsmedium steigt linear mit zunehmender Konzentration an, wobei beide Kurven mit zunehmender Konzentration annähernd parallel verlaufen. Bei 7 °C konnte dagegen keine Aufnahme festgestellt werden.

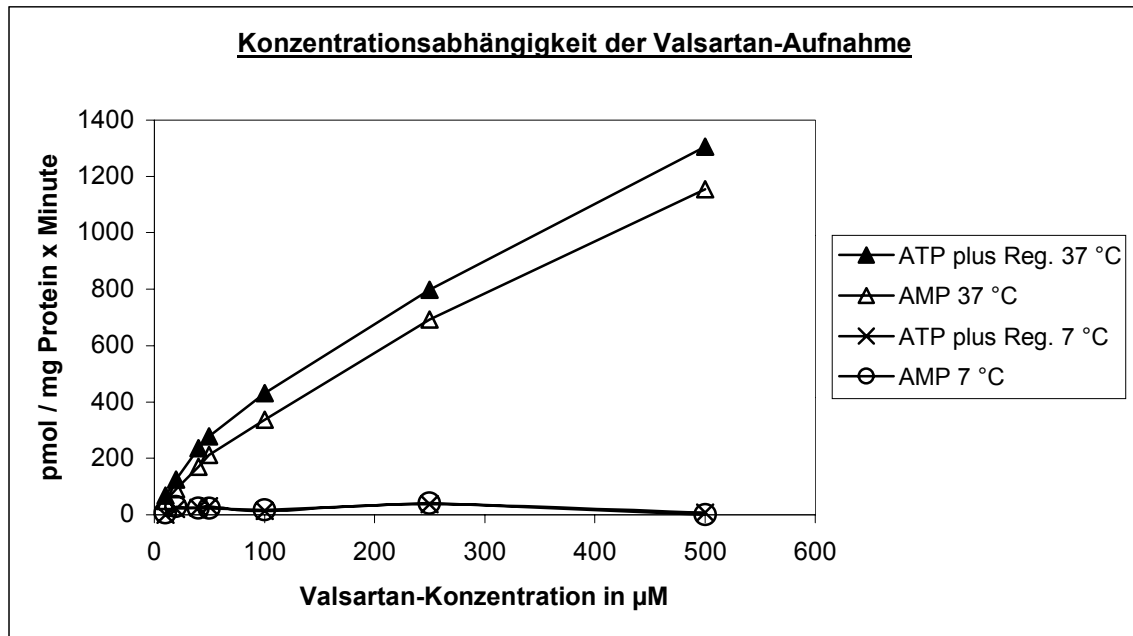


Abb. 5.17 Dargestellt ist die Aufnahme von [¹⁴C]-Valsartan in kanalikuläre Leberplasmamembranvesikel in Abhängigkeit von der Substratkonzentration; die Membranvesikel (100 µg) wurden mit [¹⁴C]-Valsartan in unterschiedlicher Konzentration (10 µM / 20 µM / 40 µM / 50 µM / 100 µM / 250 µM / 500 µM), gelöst in Inkubationsmedium, welches 3,0 mM ATP plus regenerierendes System bzw. AMP enthält, bei 37 °C bzw. 7 °C für 60 Sekunden inkubiert (n = 3).

An Hand der Ergebnisse aus Abbildung 5.17 wurde die aktive (energieabhängige) Aufnahme von [¹⁴C]-Valsartan in kanalikuläre Plasmamembranvesikel gemäß der angegebenen Formel berechnet und in Abbildung 5.18 dargestellt. Die aktive (energieabhängige) Aufnahme von [¹⁴C]-Valsartan steigt linear mit zunehmender Konzentration bis 50 µM an, um dann bei 100 µM langsam in eine Sättigung überzugehen.

Nach Transformation der Daten nach Lineweaver und Burk (doppelt reziproke Auftragung der Aufnahmegeschwindigkeit gegen die Substratkonzentration) wurde nach linearer Regression eine **Michaelis-Konstante von $K_m = 65,91 \mu\text{M}$** und eine **maximale Reaktionsgeschwindigkeit $v_{\text{max}} = 145,83 \text{ pmol} / \text{mg Protein} \times \text{Minute}$** ermittelt (Abb. 5.19).

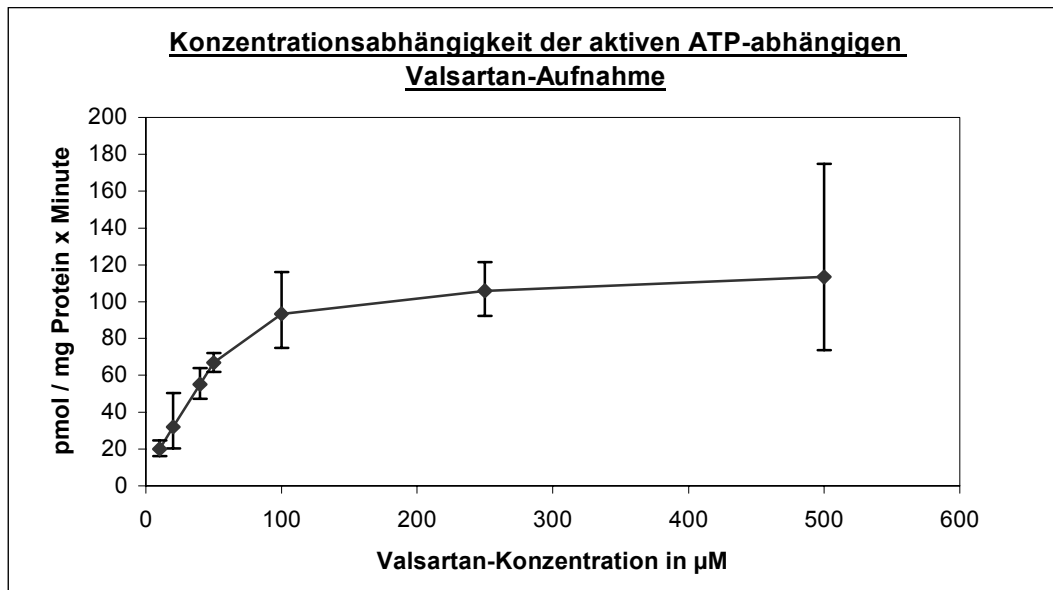


Abb. 5.18 Konzentrationsabhängigkeit der $[^{14}\text{C}]$ -Valsartan-Aufnahme; die ATP-abhängige Aufnahme ($37\text{ }^\circ\text{C}$) und Proteinbindung ($7\text{ }^\circ\text{C}$), aus deren Differenz sich die aktive ATP-abhängige Aufnahme ergibt, wurden in Anwesenheit verschiedener Valsartan-Konzentrationen (von 10 bis $500\text{ }\mu\text{M}$) zum Zeitpunkt 60 Sekunden gemessen. Die Konzentration von ATP plus regenerierendem System respektive AMP betrug $3,0\text{ mM}$ ($n = 3, x \pm SD_{n-1}$).

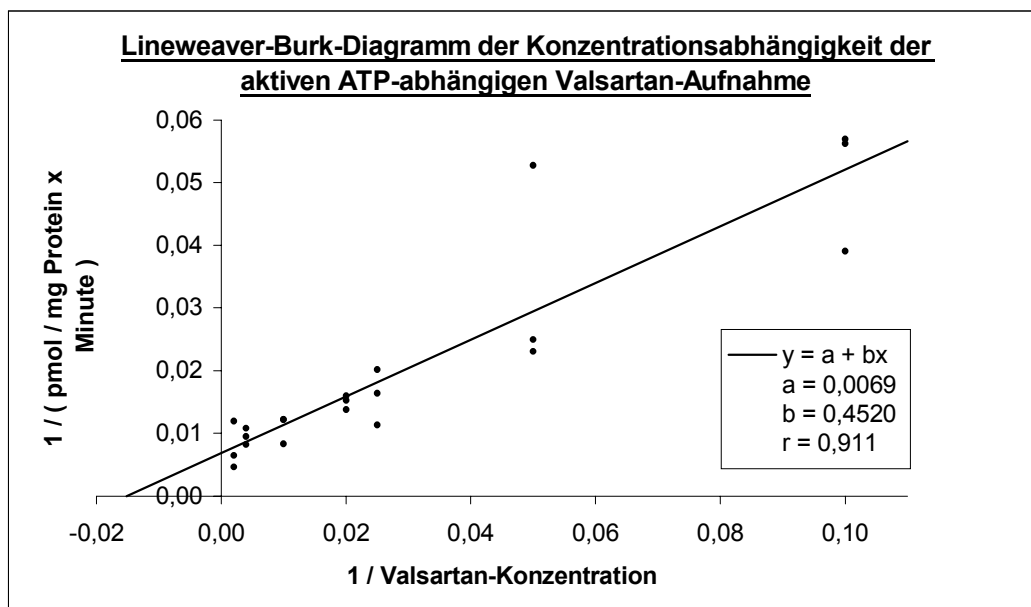


Abb. 5.19 Lineweaver-Burk-Plot der Konzentrationsabhängigkeit der $[^{14}\text{C}]$ -Valsartan-Aufnahme; die Daten der aktiven ATP-abhängigen $[^{14}\text{C}]$ -Valsartan-Aufnahme aus Abb. 5.18 wurden doppelt reziprok aufgetragen und nach linearer Regression die Michaelis-Konstante K_m und die Reaktionsgeschwindigkeit v_{max} ermittelt.

Da die [^{14}C]-Valsartan-Aufnahme bei 37 °C auch in Anwesenheit von AMP im Inkubationsmedium linear mit zunehmender Konzentration ansteigt, stellt sich die Frage, ob dieser Anteil entsprechend der aktiven ATP-abhängigen [^{14}C]-Valsartan-Aufnahme einer Sättigungskinetik unterliegt. Nach Übertragung der entsprechenden Daten in ein Lineweaver-Burk-Diagramm (Abb. 5.20) ließ sich tatsächlich nach linearer Regression für diesen **ATP-unabhängigen Anteil der [^{14}C]-Valsartan-Aufnahme eine Michaelis-Konstante von $K_m = 264,94 \mu\text{M}$ und eine maximale Reaktionsgeschwindigkeit $v_{\text{max}} = 1322,69 \text{ pmol} / \text{mg Protein} \times \text{Minute}$ ermitteln.**

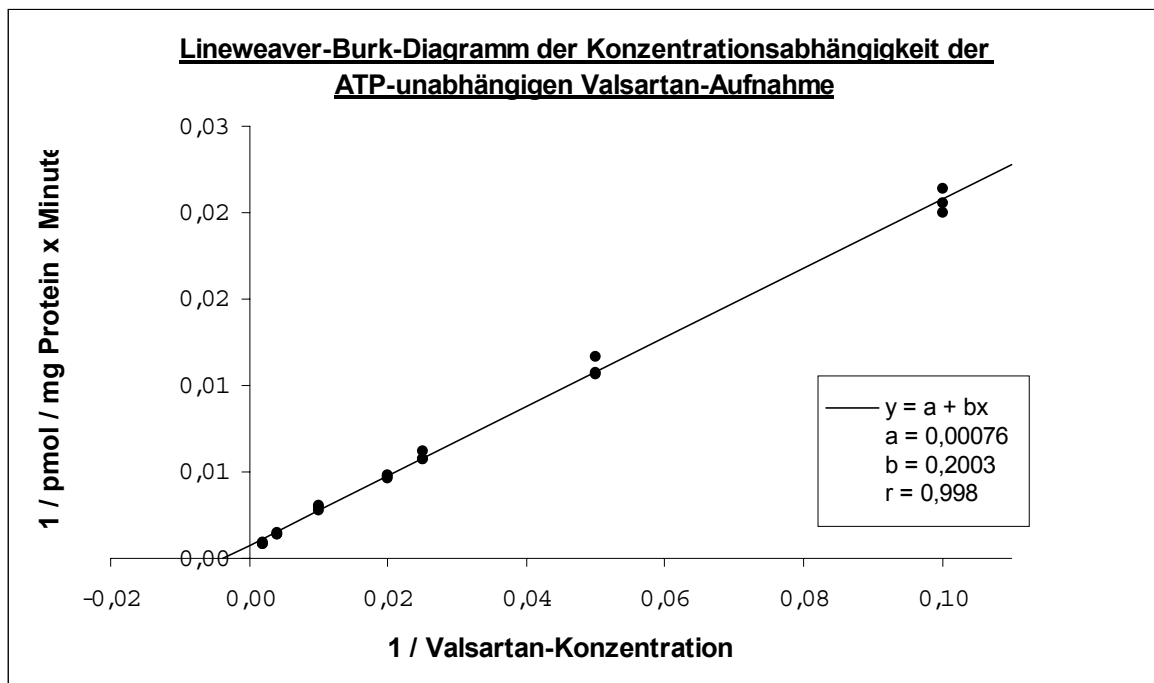


Abb. 5.20 Lineweaver-Burk-Plot der Konzentrationsabhängigkeit der ATP-unabhängigen [^{14}C]-Valsartan-Aufnahme; die Daten der ATP-unabhängigen [^{14}C]-Valsartan-Aufnahme (AMP bei 37 °C) aus Abb. 5.17 wurden doppelt reziprok aufgetragen und nach linearer Regression die Michaelis-Konstante K_m und die Reaktionsgeschwindigkeit v_{max} ermittelt.

5.6.5 Einfluss von ATP-Analoga und energiereicher Nukleotide auf die Aufnahme von $[^{14}\text{C}]$ -Valsartan in kanalikuläre Leberplasmamembranvesikel

Um zu ermitteln, ob die Energie für den $[^{14}\text{C}]$ -Valsartan-Transport nur aus ATP gewonnen werden kann, wurde der Transport in Anwesenheit unterschiedlicher ATP-Analoga und Nukleotide gemessen. Den Ansätzen wurde zum Teil regenerierendes System (Kreatinphosphat und Kreatinkinase) zugesetzt, um festzustellen, inwiefern der Transport durch ständige Bereitstellung von Energie in Form von ATP, UTP bzw. CTP steigerbar ist. Die Nukleotide wurden jeweils in einer Konzentration von 3,0 mM eingesetzt und der Transport pro Minute gemessen.

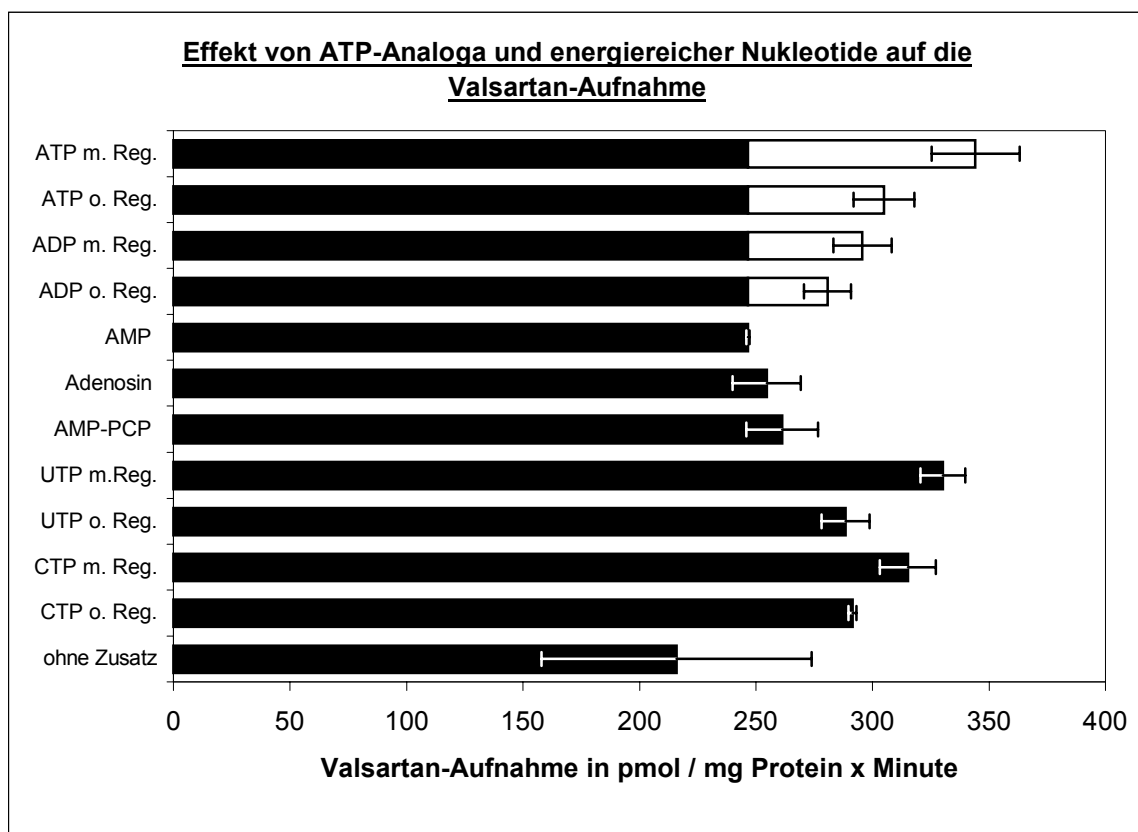


Abb. 5.21 Effekt von ATP-Analoga und energiereicher Nukleotide auf die $[^{14}\text{C}]$ -Valsartan-Aufnahme; die Konzentration der Substrate betrug 3,0 mM, $57 \mu\text{M}$ $[^{14}\text{C}]$ -Valsartan bei 37°C ($n = 3$, $x \pm SD_{n-1}$).

(m. Reg. = mit regenerierendem System, o. Reg. = ohne regenerierendes System, „ohne Zusatz“ = Ansatz mit reinem Inkubationsmedium [Kapitel 3.7.1.2])

Der Einfluss der ATP-Analoga lässt sich wie folgt beschreiben:

- Die Aufnahme von [¹⁴C]-Valsartan ist stimulierbar durch ATP und ADP.
- Die Aufnahme ist nicht stimulierbar durch AMP, Adenosin und das nicht spaltbare ATP-Analogon AMP-PCP.
- Eine einfaktorielle Varianzanalyse mit anschließendem multiplen Mittelwertvergleich (Tukey-Test) lieferte folgende Ergebnisse (siehe dazu Tabelle 5.6):
 - Die Aufnahme ist im Vergleich zu AMP signifikant stimulierbar durch ATP mit regenerierendem System, ATP ohne regenerierendes System und ADP mit regenerierendem System ($p < 0,01$) sowie schwach signifikant stimulierbar durch ADP ohne regenerierendes System ($p < 0,05$).
 - Der Einsatz des regenerierenden Systems bei ATP erhöht die [¹⁴C]-Valsartan-Aufnahme im Vergleich zu ATP ohne regenerierendes System auf dem 5-%-Niveau ($p < 0,05$).
 - ATP mit regenerierendem System ist im Vergleich zu ADP, egal ob regenerierendes System eingesetzt wurde oder nicht, signifikant erhöht ($p < 0,01$).
 - Vergleicht man ATP ohne regenerierendes System mit ADP mit bzw. ohne regenerierendes System, so ist keine signifikante Aufnahmesteigerung festzustellen ($p > 0,1$).
 - ADP mit regenerierendem System im Vergleich zu ADP ohne regenerierendes System zeigt keinen signifikanten Unterschied ($p > 0,1$).

Tabelle 5.6 Ergebnisse des Tukey-Tests nach statistischer Auswertung der Aufnahmemessungen ausgewählter ATP-Analoga im Überblick

	Mittelwert pmol / mg Protein x min	n	AMP	ATP m. Reg.	ATP o. Reg.	ADP m. Reg.	ADP o. Reg.
ATP m. Reg.	344,18	3	**		*	**	**
ATP o. Reg.	304,95	3	**	*		--	--
ADP m. Reg.	295,65	3	**	**	--		--
ADP o. Reg.	280,78	3	*	**	--	--	
AMP	246,58	3		**	**	**	*

Auswirkungen der energiereichen Nukleotide auf die [¹⁴C]-Valsartan-Aufnahme:

- Die energiereichen Nukleotide UTP bzw. CTP ohne Einsatz des regenerierenden Systems ermöglichen eine [¹⁴C]-Valsartan-Aufnahme, vergleichbar mit der Aufnahme durch ADP ohne regenerierendes System.
- Eine Steigerung der Aufnahme kann durch Zusatz des regenerierenden Systems erzielt werden.
- Wird UTP bzw. CTP mit Hilfe des regenerierenden Systems zu jedem Zeitpunkt der Aufnahme bereitgestellt, so wird eine Energiestufe erreicht, die über ATP ohne regenerierendes System, nicht aber über ATP mit regenerierendem System liegt.

Vergleich der Aufnahme ohne Zusatz eines Nukleotids mit AMP:

Es ist auffallend, dass die Substanz auch ohne ATP (Anwesenheit von AMP) und sogar ohne Zusatz eines Nukleotids die Vesikelmembran zu durchdringen vermag.

Ob es sich tatsächlich um einen ATP-unabhängigen Transport handelt oder ob diese Aufnahme durch Bindung vorgetäuscht wird, ist im nächsten Kapitel dargestellt (Bestimmung des Bindungsanteils, Kapitel 5.6.6).

5.6.6 Bestimmung des Bindungsanteils von [¹⁴C]-Valsartan an die kanalikuläre Leberplasmamembran

Der Bindungsanteil des [¹⁴C]-Valsartans an die kanalikuläre Membran wurde durch die Erhöhung der Osmolarität des Inkubationsmediums auf 450 mosm, 600 mosm und 900 mosm bestimmt. Die Erhöhung der Osmolarität bewirkt das Schrumpfen der Vesikel und damit eine verminderte Substanzaufnahme. Der Bindungsanteil wird graphisch mittels Osmoplot ermittelt. Die reziproke Osmolarität wird gegen die Aufnahmegeschwindigkeit aufgetragen. Durch lineare Regression wird der Schnittpunkt der resultierenden Geraden mit der y-Achse bestimmt. Bei diesem Schnittpunkt ist theoretisch die Osmolarität unendlich groß und das Vesikellumen minimal, so dass die Aufnahme als Bindung an die Membran angenommen wird.

Der Osmoplot der ATP-abhängigen [¹⁴C]-Valsartan-Aufnahme ist in Abbildung 5.22 dargestellt. Die Regressionsgerade schneidet die y-Achse nicht im positiven Bereich, der Bindungsanteil der ATP-abhängigen Aufnahme wäre demnach < 0 %. Um dieses Ergebnis zu bestätigen, wurden die Messergebnisse der [¹⁴C]-Valsartan-Aufnahme mit ATP plus regenerierendem System und mit AMP jeweils getrennt mit Hilfe des Osmoplots dargestellt (Abb. 5.23 und 5.24).

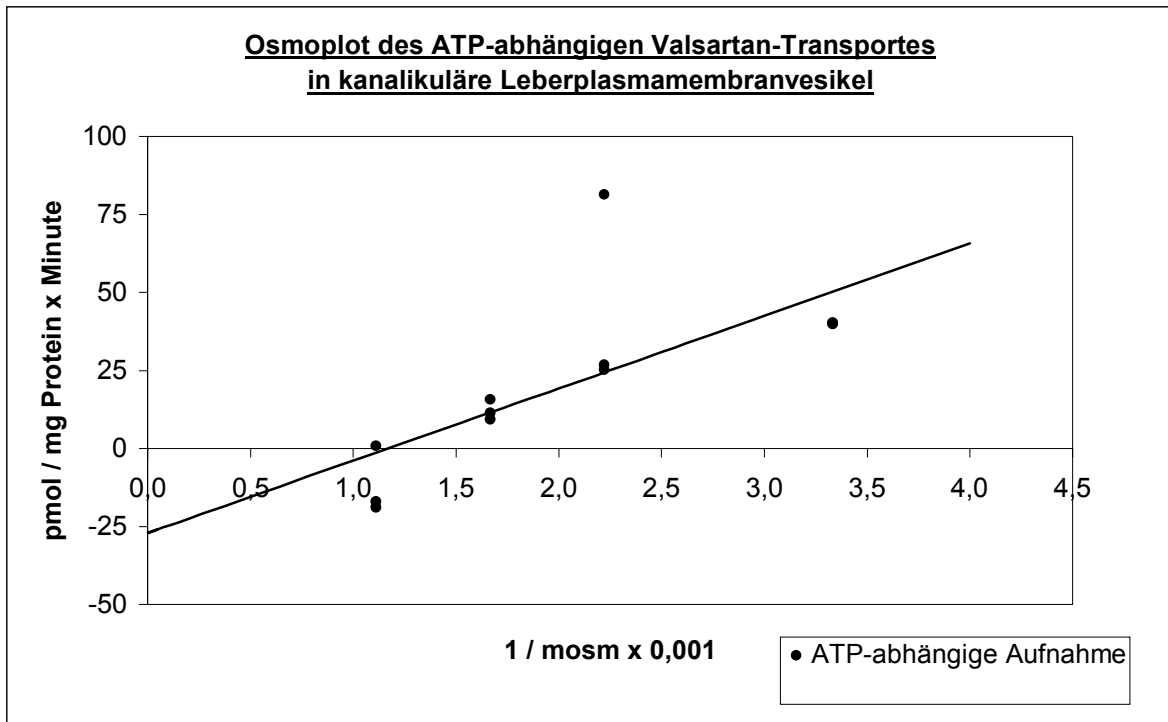


Abb. 5.22 Osmoplot zur Bestimmung des Bindungsanteils der ATP-abhängigen Aufnahme von [^{14}C]-Valsartan; die Membranvesikel (100 μg) werden in Inkubationsmedien mit den Osmolaritäten von 300 mosm, 450 mosm, 600 mosm und 900 mosm (50 μl je Probe) 15 Minuten bei 37 $^{\circ}\text{C}$ vorinkubiert, damit sich das Vesikelvolumen bereits vor Start der Reaktion der gewünschten Osmolarität anpassen kann. Anschließend werden 50 μl [^{14}C]-Valsartan in einer Konzentration von 57 μM , gelöst in ATP-haltigem Inkubationsmedium mit regenerierendem System bzw. ATP-freiem Inkubationsmedium, zugesetzt und für 60 Sekunden mit den Vesikeln inkubiert.

ATP mit regenerierendem System und AMP wurden in einer Konzentration von 6,0 mM (3,0 mM Endkonzentration) eingesetzt und aus deren Differenz die ATP-abhängige Aufnahme berechnet ($n = 3$).

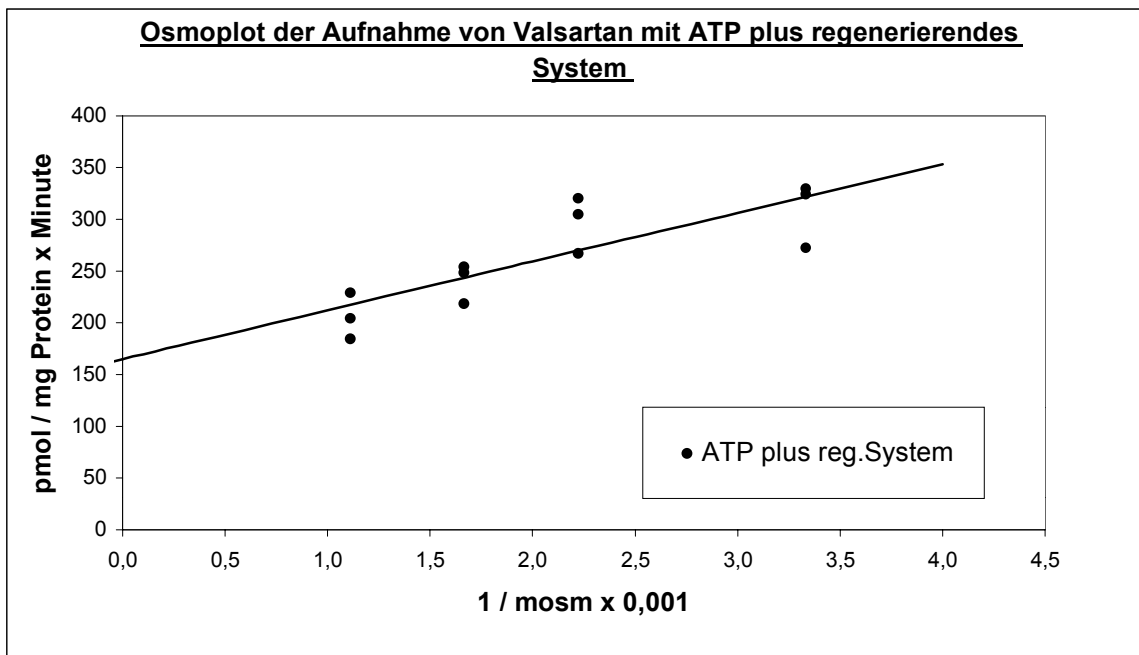


Abb. 5.23 Dargestellt ist das Ergebnis des Osmoplots zur Bestimmung des Bindungsanteils der [¹⁴C]-Valsartan-Aufnahme mit ATP plus regenerierendes System; zu Grunde gelegt wurde die Aufnahme von [¹⁴C]-Valsartan in Gegenwart von ATP plus regenerierendes System des Versuchs aus Abb. 5.22.

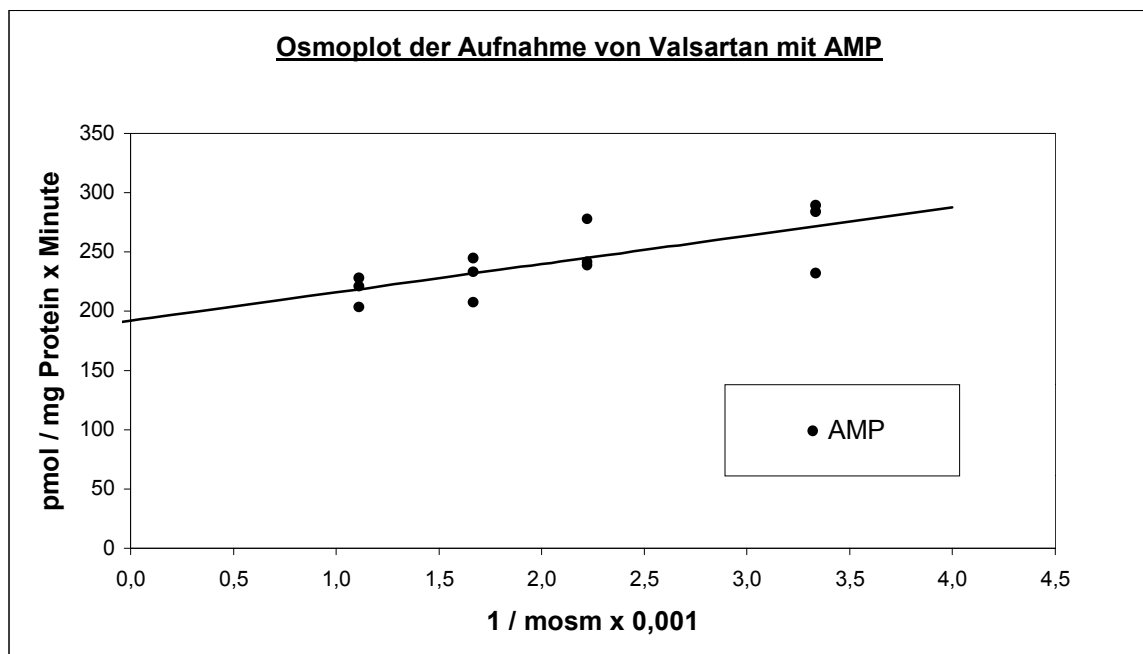


Abb. 5.24 Dargestellt ist das Ergebnis des Osmoplots zur Bestimmung des Bindungsanteils der [¹⁴C]-Valsartan-Aufnahme mit AMP; zu Grunde gelegt wurde die Aufnahme von [¹⁴C]-Valsartan in Gegenwart von AMP des Versuchs aus Abb. 5.22.

Der Bindungsanteil für die Aufnahme mit ATP plus regenerierendes System beträgt $53,93 \pm 5,87 \%$ (Abb. 5.23). Für die ATP-unabhängige Aufnahme (Anwesenheit von AMP) konnte ein Bindungsanteil von $72,32 \pm 9,13 \%$ ermittelt werden (Abb. 5.24).

Da sich die ATP-abhängige [^{14}C]-Valsartan-Aufnahme aus der Differenz ATP plus regenerierendes System und AMP errechnet und dieser höhere Bindungsanteil bei AMP unberücksichtigt bleibt, erniedrigt sich die tatsächliche ATP-abhängige Aufnahme fälschlicherweise.

Daher ist es notwendig, den Bindungsanteil in die Berechnung der ATP-abhängigen [^{14}C]-Valsartan-Aufnahme mit einzubeziehen, indem man vor Bildung der Differenz den entsprechenden Bindungsanteil von der Aufnahme mit ATP plus regenerierendes System bzw. AMP subtrahiert.

Zur Berechnung der tatsächlichen ATP-abhängigen Aufnahme unter Berücksichtigung des Bindungsanteils ergibt sich nun folgende Beziehung:

$$\begin{aligned} & (\text{ATP plus Reg.} - (\text{ATP plus Reg.} \times 0,5393)) - (\text{AMP} - (\text{AMP} \times 0,7232)) \\ & \qquad \qquad \qquad = \text{ATP-abhängige Aufnahme} \end{aligned}$$

Nach Umformung der Gleichung erhält man jeweils einen Faktor für ATP plus regenerierendes System bzw. AMP:

$$(\text{ATP plus Reg.} \times \mathbf{0,4607}) - (\text{AMP} \times \mathbf{0,2768}) = \text{ATP-abhängige Aufnahme}$$

Diese beiden Faktoren wurden in den nachfolgenden Versuchen in die Berechnung der ATP-abhängigen Aufnahme einbezogen.

5.6.7 Einfluss des pH-Wertes des Inkubationsmediums auf die Aufnahme von $[^{14}\text{C}]$ -Valsartan

Um festzustellen, bei welchem pH-Wert im Inkubationsmedium die $[^{14}\text{C}]$ -Valsartan-Aufnahme in isolierte Leberplasmamembranvesikel optimal verläuft, wurde die $[^{14}\text{C}]$ -Valsartan-Aufnahme in die kanalikulären Plasmamembranvesikel bei variierenden pH-Werten des Inkubationsmediums gemessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.25 dargestellt.

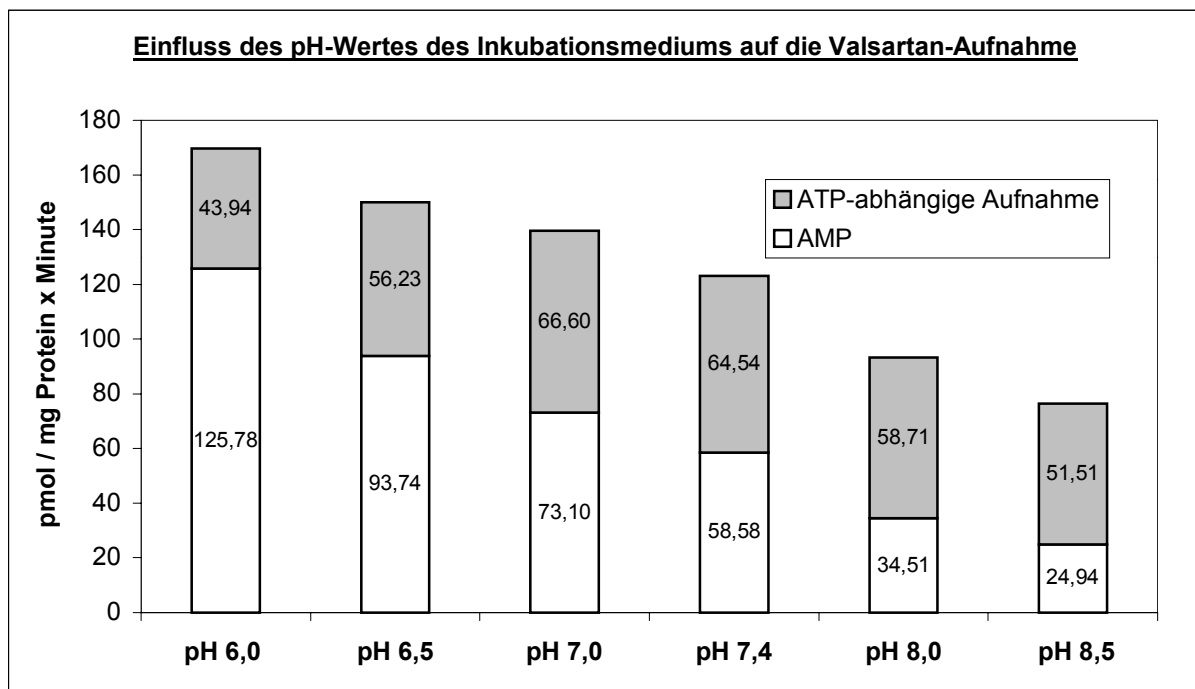


Abb. 5.25 Dargestellt ist die $[^{14}\text{C}]$ -Valsartan-Aufnahme bei unterschiedlichen pH-Werten des Inkubationsmediums (pH 6,0 / 6,5 / 7,0 / 7,4 / 8,0 / 8,5); die Aufnahmemessungen wurden mit 3,0 mM ATP plus regenerierendes System bzw. 3,0 mM AMP bei 37 °C durchgeführt. Der zu jedem pH-Wert dargestellte Balken veranschaulicht insgesamt die $[^{14}\text{C}]$ -Valsartan-Aufnahme mit ATP plus regenerierendes System. Subtrahiert man davon die ATP-unabhängige Aufnahme (AMP; weiß dargestellter Teil jedes Balkens), so erhält man die ATP-abhängige Aufnahme (grau dargestellter Teil jedes Balkens). Der Bindungsanteil wurde entsprechend Kapitel 5.6.6 berücksichtigt. Die $[^{14}\text{C}]$ -Valsartan-Konzentration betrug 57 μM ($n = 3$, $SD_{n-1} < 20\%$).

Das pH-Optimum liegt bei pH 7,4. Bei diesem pH-Wert ist zwar die ATP-abhängige Aufnahme kleiner im Vergleich zu pH 7,0, dafür ist die ATP-unabhängige Aufnahme niedriger als die ATP-abhängige Aufnahme ($\text{AMP} < \text{ATP-abhängige Aufnahme}$).

5.6.8 Die Temperaturabhängigkeit der Aufnahme von [¹⁴C]-Valsartan

Zur Untersuchung der Temperaturabhängigkeit des [¹⁴C]-Valsartan-Transportes wurde die Aufnahme von Valsartan in die Plasmamembranvesikel bei 7 °C, 17 °C, 27 °C sowie 37 °C gemessen (Abb. 5.26).

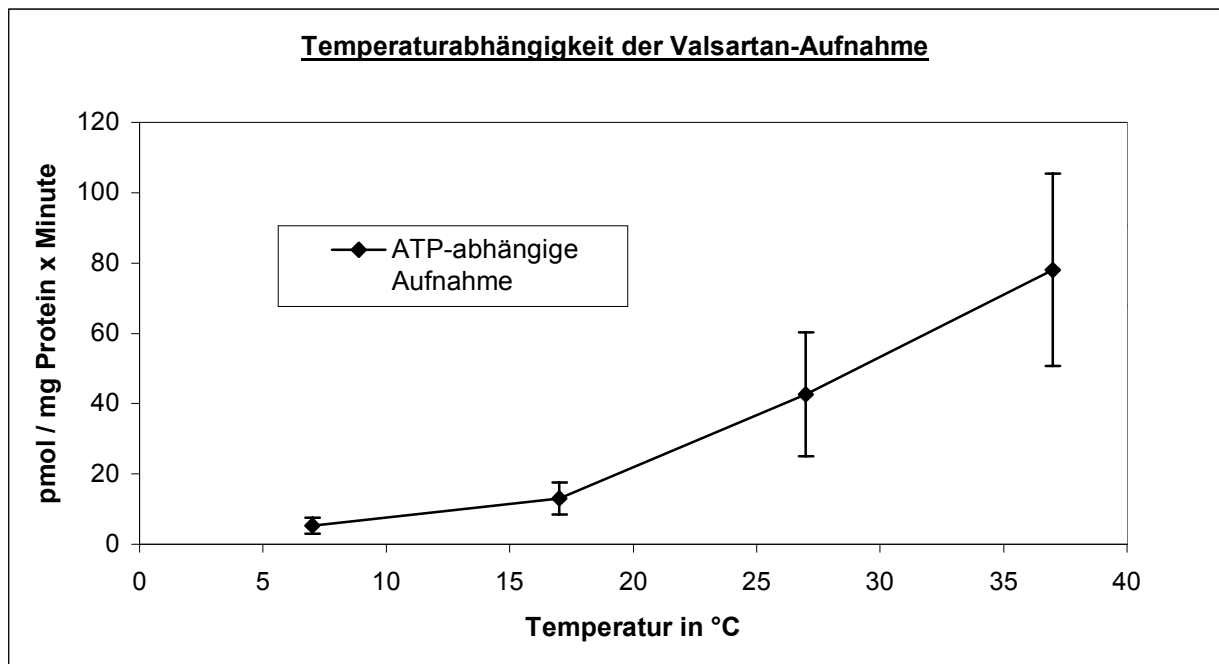


Abb. 5.26 Einfluss verschiedener Temperaturen auf die ATP-abhängige [¹⁴C]-Valsartan-Aufnahme in kanalikuläre Plasmamembranvesikel; 57 μM [¹⁴C]-Valsartan wurden für 60 Sekunden bei 7 °C, 17 °C, 27 °C sowie 37 °C mit ATP plus regenerierendes System (1,2 mM) respektive AMP (1,2 mM) inkubiert und nach Korrektur des Bindungsanteils aus deren Differenz die ATP-abhängige Aufnahme berechnet ($n = 3$; $x \pm SD_{n-1}$). Die Vesikel wurden 2 Minuten bei der jeweiligen Temperatur vorinkubiert.

Bei 7 °C findet keine ATP-abhängige Aufnahme statt. Mit steigenden Temperaturen erhöht sich die Aufnahme bis zu den maximalen Aufnahmewerten bei 37 °C. Die Zunahme der ATP-abhängigen [¹⁴C]-Valsartan-Aufnahme mit steigender Temperatur ist von Bedeutung für die Bestimmung der $\Delta 10$ °C-Temperaturquotienten (Q_{10} -Werte) der Aufnahme sowie der scheinbaren Aktivierungsenergie (A_{app}).

Temperaturquotient (Q_{10} -Wert):

Der $\Delta 10$ °C-Temperaturquotient der Aufnahme lässt sich durch folgende Gleichung ermitteln:

$$Q_{10} = V_{(T+10\text{ °C})} / V_{(T)}$$

$V_{(T)}$ = initiale Aufnahmegeschwindigkeit bei einer bestimmten Temperatur (T).

Bei chemischen Reaktionen liegen die Q_{10} -Werte zwischen 1,4 und 7; bei physikalischen Vorgängen zwischen 1,03 und 1,3 [Höfer 1977].

In Tabelle 5.7 sind die Q_{10} -Werte der ATP-abhängigen [^{14}C]-Valsartan-Aufnahme für alle Temperaturintervalle dargestellt.

Tab. 5.7 Q_{10} -Werte der ATP-abhängigen [^{14}C]-Valsartan-Aufnahme; zur Berechnung wurden die Aufnahmewerte aus Abb. 5.26 zu Grunde gelegt.

Temperaturintervall	Q_{10} -Werte
7 °C – 17 °C	2,458
17 °C – 27 °C	3,267
27 °C – 37 °C	1,830

Scheinbare Aktivierungsenergie (A_{app}):

Die scheinbare Aktivierungsenergie dient zur Beschreibung der Temperaturabhängigkeit physikochemischer Vorgänge und erlaubt eine Unterscheidung zwischen aktiven und passiven Vorgängen. Erfahrungsgemäß besitzen enzymkatalysierte Reaktionen und Transportvorgänge eine scheinbare Aktivierungsenergie zwischen 29 und 105 kJ / mol. Dagegen wird bei physikalischen Vorgängen (Diffusion) ein Wert von 17 kJ / mol nicht überschritten [Höfer 1977].

Trägt man den Logarithmus der Aufnahme gegen die reziproke Temperatur (als absolute Temperatur in Kelvin) auf, so ergibt sich eine Gerade. Dieses Diagramm wird als Arrhenius-Diagramm bezeichnet (Abb. 5.27). Aus der Steigung der Geraden lässt sich nach der Arrhenius-Gleichung die scheinbare Aktivierungsenergie ($A_{app.}$) berechnen [Höfer 1977]:

$$A_{app.} = 2,303 \times R \times \frac{\Delta \log V_i}{\Delta (1/T)}$$

R = Gaskonstante (8,314 Joule / Kelvin x mol)

T = absolute Temperatur (Kelvin = T °C + 273)

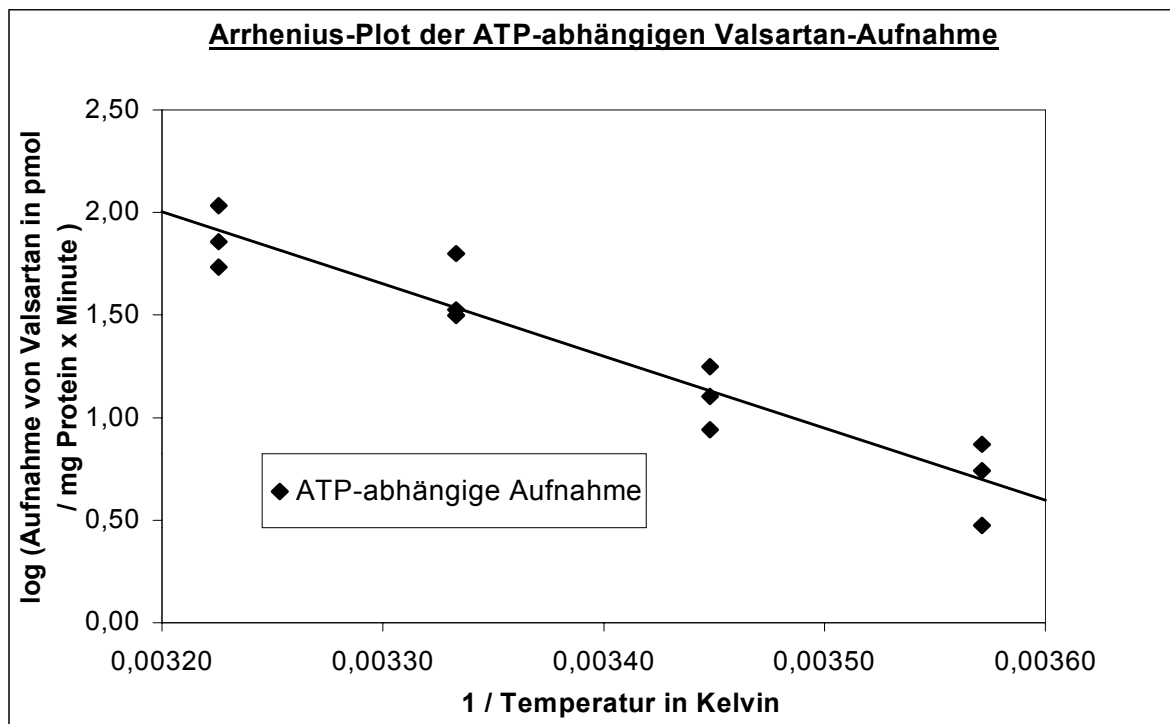


Abb. 5.27 Arrhenius-Diagramm der ATP-abhängigen Aufnahme von [^{14}C]-Valsartan in kanalikuläre Plasmamembranvesikel; zu Grunde gelegt wurden die Messergebnisse aus Abb. 5.26.

Eingesetzt in die Arrhenius-Gleichung ergibt sich eine **scheinbare Aktivierungsenergie** für den ATP-abhängigen [^{14}C]-Valsartan-Transport von **67,342 kJ / mol (16,087 kcal / mol)**.

5.6.9 Vergleich der Aufnahme von [¹⁴C]-Valsartan in eine Mischfraktion aus kanalikulären „inside-out“- und „right side-out“-Plasmamembranvesikeln mit der Aufnahme in kanalikuläre „inside-out“-Plasmamembranvesikel

Die Aufnahme des Angiotensin-II-Antagonisten Valsartan in eine Mischfraktion, bestehend aus „inside-out“- und „right side-out“-Vesikeln, sowie in eine reine „inside-out“-Vesikelfraktion wurde in Abhängigkeit von der Zeit unter gleichen Versuchsbedingungen gemessen (Abb. 5.28 und Abb. 5.29).

Beide Vesikelfraktionen zeigen annähernd gleiche Kurvenverläufe, wobei die ATP-abhängige [¹⁴C]-Valsartan-Aufnahme in beiden bis zu einer Inkubationszeit von 120 Sekunden ansteigt und dann auf einem gleichbleibenden Niveau verläuft.

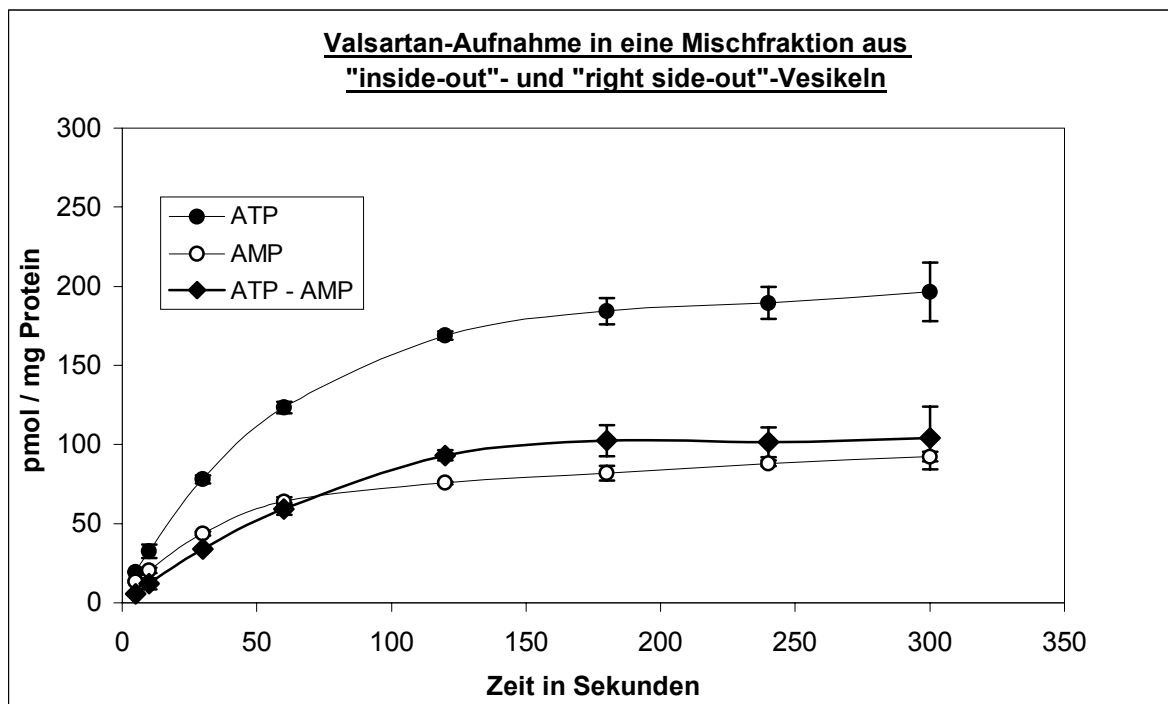


Abb. 5.28 Darstellung der Aufnahme von [¹⁴C]-Valsartan in eine Mischfraktion aus kanalikulären „inside-out“- und „right side-out“-Vesikeln; die Membranvesikel (100 µg) wurden mit [¹⁴C]-Valsartan in einer Konzentration von 57 µM bei 37 °C inkubiert. Der ATP-abhängige Transport errechnet sich nach Korrektur des Bindungsanteils aus der Differenz der [¹⁴C]-Valsartan-Aufnahme, gemessen in Anwesenheit von 3,0 mM ATP plus regenerierendes System bzw. 3,0 mM 5'-AMP (n = 3; x ± SD_{n-1}).

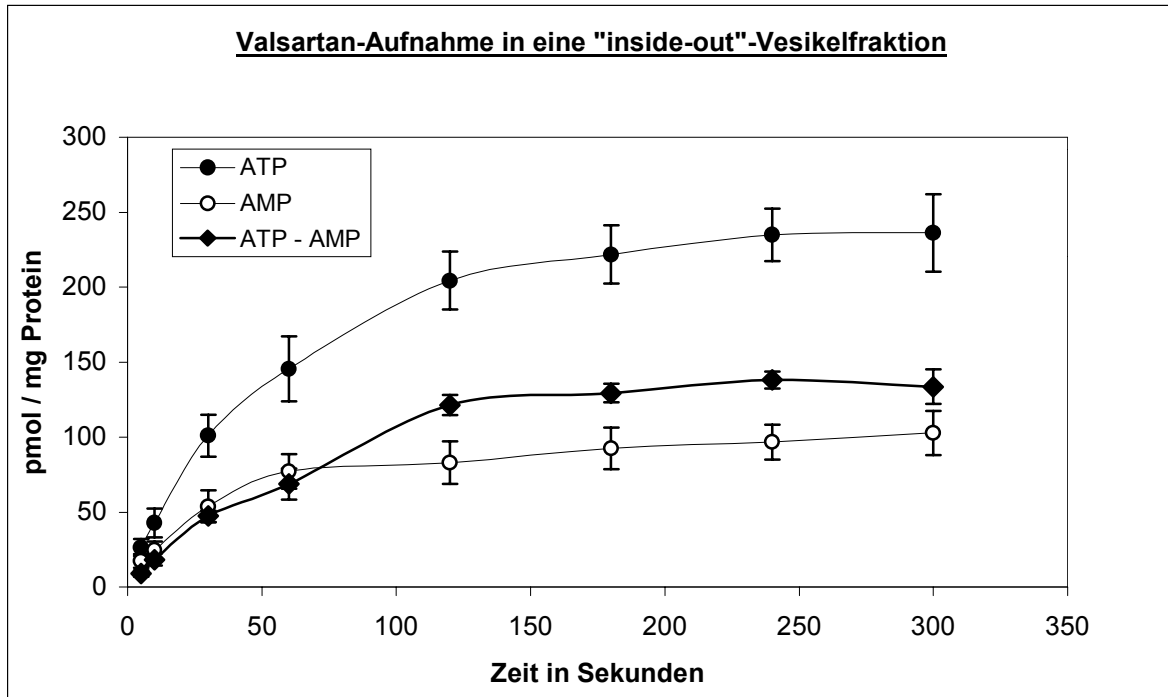


Abb. 5.29 Darstellung der Aufnahme von [^{14}C]-Valsartan in kanalikuläre „inside-out“-Vesikel; die Membranvesikel (100 μg) wurden mit [^{14}C]-Valsartan in einer Konzentration von 57 μM bei 37 $^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Der ATP-abhängige Transport errechnet sich nach Korrektur des Bindungsanteils aus der Differenz der [^{14}C]-Valsartan-Aufnahme, gemessen in Anwesenheit von 3,0 mM ATP plus regenerierendes System bzw. 3,0 mM 5'-AMP ($n = 3$; $x \pm SD_{n-1}$).

Eine Gegenüberstellung der ATP-abhängigen Aufnahme beider Fraktionen (Abb. 5.30) mit anschließender zweifaktorieller Varianzanalyse mit Messwiederholungen in den Faktoren Zeit und Vesikelart ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Verläufen ($p = 0,05$ für den Fehler 1. Art).

Die Präparation kanalikulärer „inside-out“-Vesikel bewirkt somit keine signifikante ATP-abhängige Aufnahmesteigerung und ist zudem mit einem sehr hohen Proteinverlust verbunden (siehe Kapitel 5.4).

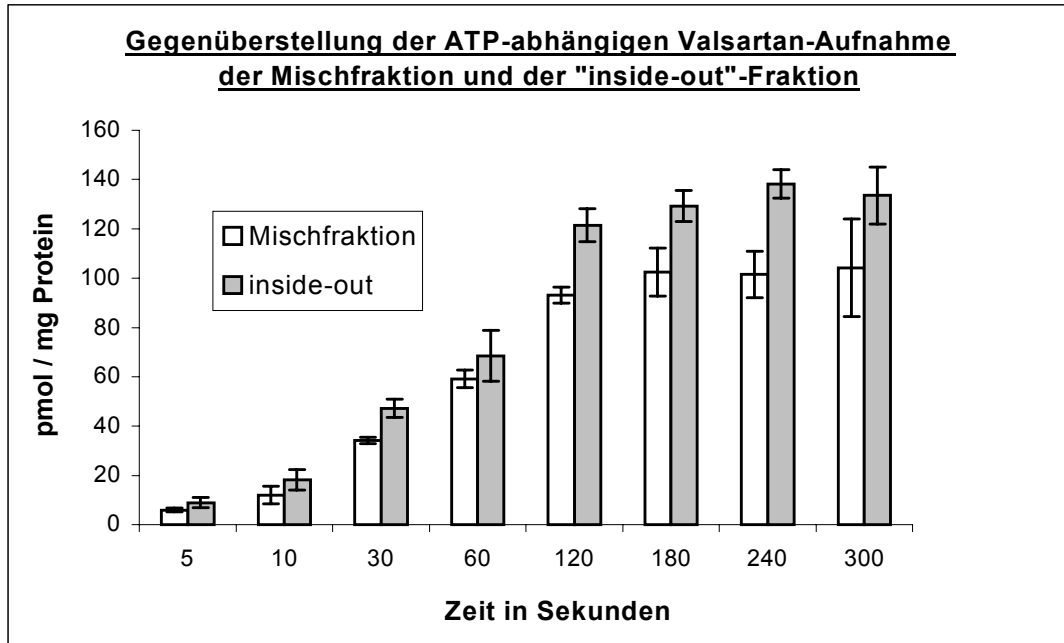


Abb. 5.30 Darstellung der ATP-abhängigen [¹⁴C]-Valsartan-Aufnahme der Mischfraktion (Abb. 5.28) bzw. der „inside-out“-Fraktion (Abb. 5.29); *eine zweifaktorielle Varianzanalyse ergab keinen signifikanten Unterschied in den Verläufen.*

5.6.10 Vergleich der ATP-abhängigen Aufnahme von [¹⁴C]-Valsartan in kanalikuläre Plasmamembranvesikel von Wistar-Ratten und TR⁻-Ratten

Die Aufnahme von [¹⁴C]-Valsartan wurde in isolierte kanalikuläre Leberplasmamembranvesikel von normalen Wistar-Ratten und transportdefizienten TR⁻-Ratten in Abhängigkeit von der Zeit gemessen (Abb. 5.31 bzw. Abb. 5.32).

Vergleicht man die Transportraten von [¹⁴C]-Valsartan beider Rattenstämme, so ist festzustellen, dass die Transportraten bei den TR⁻-Ratten insgesamt niedriger sind als bei den Wistar-Ratten. Betrachtet man die ATP-abhängige Aufnahme, so liegt diese bei den TR⁻-Ratten sogar unter der ATP-unabhängigen Aufnahme (AMP). Außerdem ist in den Vesikeln der TR⁻-Ratten die ATP-abhängige Aufnahme von [¹⁴C]-Valsartan im Vergleich zu denen der normalen Wistar-Ratten um etwa 50 % reduziert.

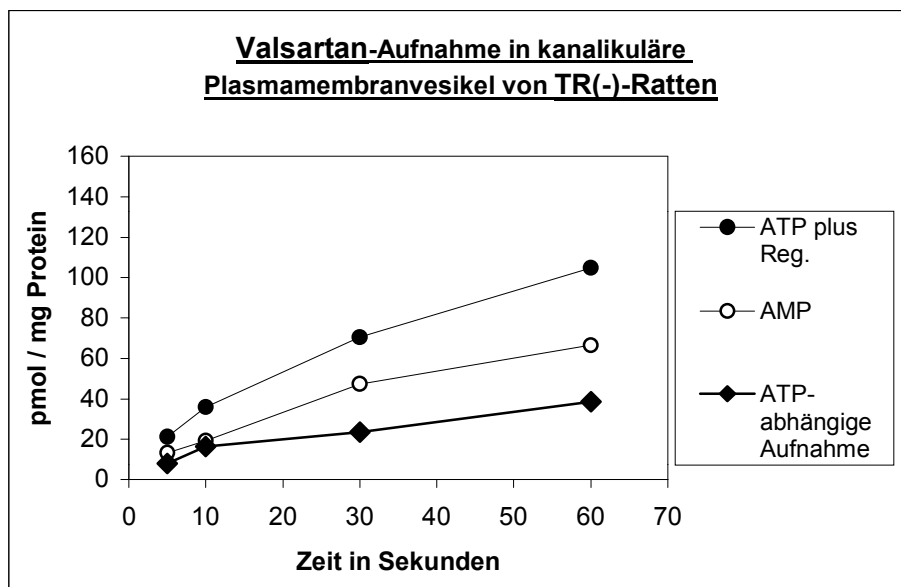


Abb. 5.31 Dargestellt ist die ATP-abhängige [¹⁴C]-Valsartan-Aufnahme in kanalikuläre Plasmamembranvesikel von TR⁻-Ratten; die Membranvesikel (100 µg) wurden mit [¹⁴C]-Valsartan (57 µM) bei 37 °C inkubiert. Der ATP-abhängige Transport errechnet sich aus der Differenz des [¹⁴C]-Valsartan-Transportes bei 1,2 mM ATP plus regenerierendes System respektive 1,2 mM 5'-AMP nach Korrektur des Bindungsanteils.

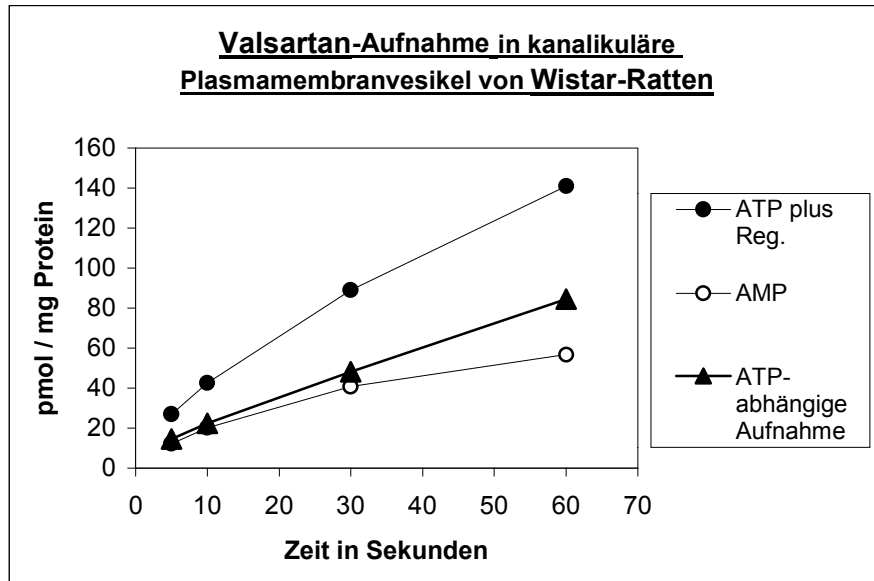


Abb. 5.32 Dargestellt ist die ATP-abhängige Aufnahme von [^{14}C]-Valsartan in kanalikuläre Plasmamembranvesikel von Wistar-Ratten; der Versuchsaufbau entspricht dem bei TR⁻-Ratten (Abb. 5.31).

Um zu zeigen, dass sich der Transportdefekt des cMoat / Mrp2 der TR⁻-Ratten tatsächlich auf die Aufnahme von [^{14}C]-Valsartan auswirkt, wurde zur Kontrolle die Aufnahme von [^3H]-Taurocholat in kanalikuläre Plasmamembranvesikel von TR⁻ - und Wistar-Ratten gemessen.

Eine Gegenüberstellung der Messergebnisse nach 60 Sekunden Inkubation (Abb. 5.33) bestätigt, dass der Transportdefekt der TR⁻-Ratten keinen signifikanten Einfluss auf die Transportrate von [^3H]-Taurocholat im Vergleich zu den Wistar-Ratten besitzt (zwischen beiden Rattenstämmen ein schwach signifikanter Unterschied mit $p = 0,049$). Dagegen zeigt sich bei [^{14}C]-Valsartan ein signifikanter Unterschied zwischen Wistar- und TR⁻-Ratten (bei TR⁻-Ratten eine um 50 % reduzierte Transportrate im Vergleich zu den Wistar-Ratten).

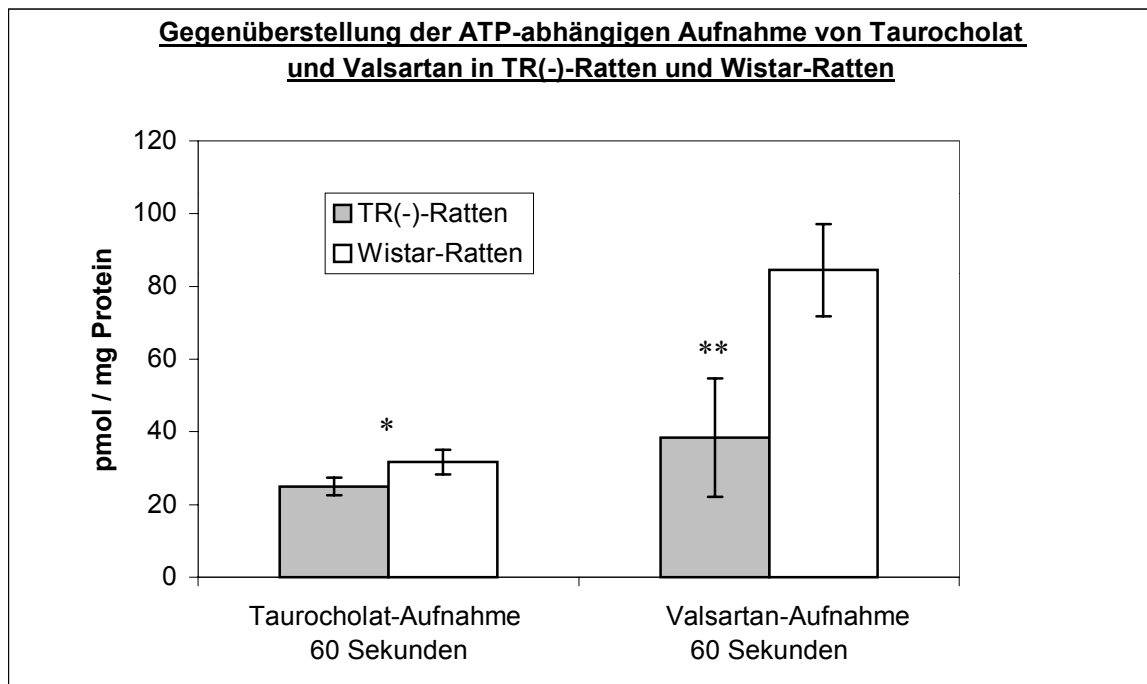


Abb. 5.33 Dargestellt ist die ATP-abhängige [^3H]-Taurocholat- bzw. [^{14}C]-Valsartan-Aufnahme bei TR⁻- und Wistar-Ratten; *entsprechend [^{14}C]-Valsartan (Messergebnisse aus Abb. 5.31 und 5.32) wurden Plasmamembranvesikel von TR⁻- und Wistar-Ratten für 60 Sekunden mit [^3H]-Taurocholat inkubiert und die ATP-abhängige Aufnahme berechnet.*

5.7 Einfluss von Hemmstoffen auf den Valsartan-Transport

Um die Affinität des Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonisten Valsartan zu einem bestimmten Carrierprotein näher zu charakterisieren, wurden Aufnahmemessungen in Gegenwart von Hemmstoffen durchgeführt.

Das Prinzip eines Aufnahmehemmversuchs ist, dass der Vesikelsuspension 30 Sekunden vor dem Zusatz des radioaktiv markierten [¹⁴C]-Valsartan ein ausgewähltes nicht markiertes Substrat (Hemmstoff) zugegeben wird. Durch diese Vorinkubation von 30 Sekunden besetzt das ausgewählte Substrat das für seinen Transport spezifische Carrierprotein. Gibt man anschließend das radioaktiv markierte [¹⁴C]-Valsartan hinzu, so konkurrieren entweder beide Substrate um das gleiche Transportsystem und der messbare [¹⁴C]-Valsartan-Transport wird gehemmt oder beide Substrate werden über verschiedene Transportsysteme in die Vesikel aufgenommen und der messbare [¹⁴C]-Valsartan-Transport bleibt somit unbeeinflusst.

Als Hemmstoffe wurden spezifische Substrate der jeweiligen in der kanalikulären Plasmamembran vorkommenden Transportsysteme ausgewählt:

- ◆ **Glutathiondisulfid (GSSG), HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor Pravastatin, Sulfobromophthalein (BSP), Leukotriene C₄**; Substrate des kanalikulären multispezifischen organischen Anionen-Transporters cMoat / Mrp2
[Keppler 1996 / 1997, Kolac 1995]
- ◆ **Taurocholat, Cholat**; Substrate des ATP-abhängigen Gallensäure-Transporters cBST
[Müller et al. 1991, Nishida et al. 1991, Adachi et al. 1991, Stieger et al. 1992]
- ◆ **Verapamil, Daunomycin**; Substrate des P-Glykoproteins (mdr1a Genprodukt)
[Gottesman und Pastan 1993]

5.7.1 Effekt von Substraten des multispezifischen Anionen-Transporters cMoat / Mrp2

Um zu ermitteln, ob [¹⁴C]-Valsartan eine Affinität zu dem Transportsystem cMoat / Mrp2 besitzt, wurde der Einfluss der cMoat- / Mrp2-spezifischen Substrate GSSG, Pravastatin, BSP sowie Leukotriene C₄ auf die ATP-abhängige [¹⁴C]-Valsartan-Aufnahme in die kanalikulären Plasmamembranvesikel untersucht.

5.7.1.1 Einfluss von GSSG, Pravastatin und BSP

Die Substanzen wurden in den Konzentrationen 100 µM und 1 mM unmittelbar vor Versuchsbeginn im Inkubationsmedium gelöst (siehe Kapitel 3.7.1.2), bei 4 °C aufbewahrt und 10 Minuten vor Gebrauch im temperierten Wasserbad (37 °C) vorinkubiert.

Die Versuchsdurchführung entspricht der in den vorhergehenden Versuchen angewandten Schnellfiltrationstechnik (siehe Kapitel 4.6), wobei die kanalikulären Plasmamembranvesikel 30 Sekunden vor dem Zusatz des radioaktiv markierten [¹⁴C]-Valsartan mit 50 µl des nicht markierten Substrates (Hemmstoff) in entsprechender Konzentration vorinkubiert werden. Anschließend werden 50 µl [¹⁴C]-Valsartan in einer Konzentration von 57 µM, gelöst in ATP-haltigem Inkubationsmedium plus regenerierendes System bzw. ATP-freiem Inkubationsmedium, zugesetzt und für 60 Sekunden mit den Vesikeln inkubiert.

Sowohl GSSG als auch Pravastatin und BSP hemmten die Aufnahme des Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonisten Valsartan in kanalikuläre Plasmamembranvesikel (Abb. 5.34).

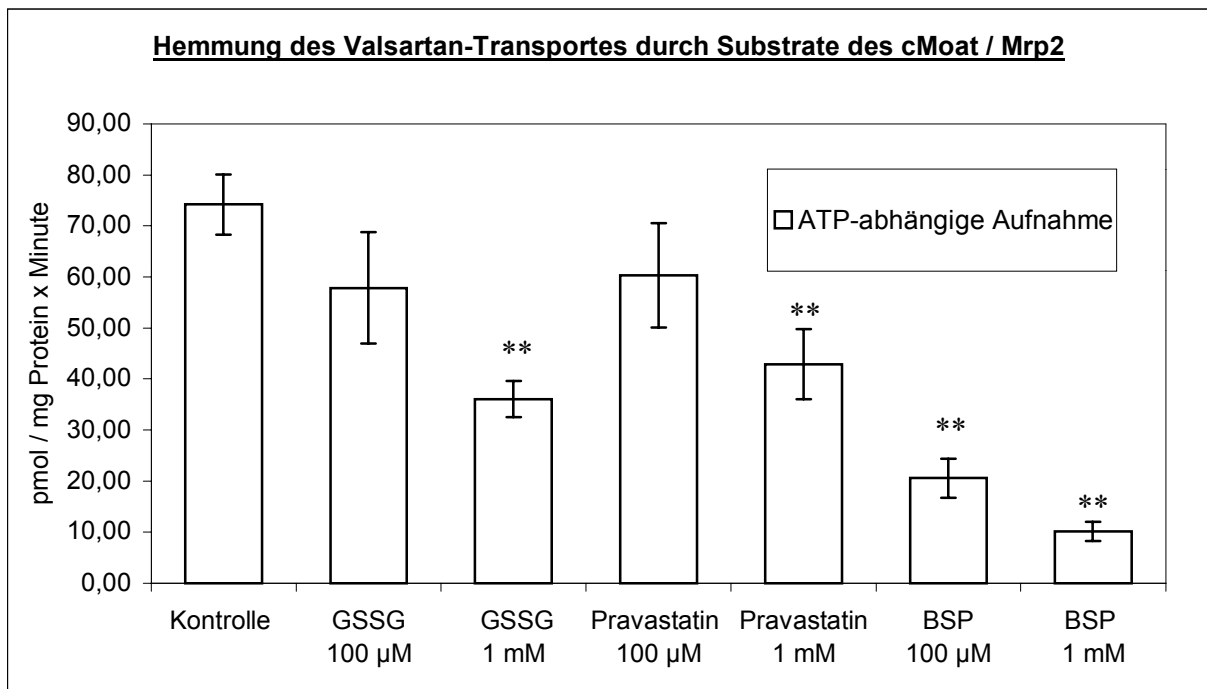


Abb. 5.34 Effekt von Substraten des cMoat / Mrp2 auf die ATP-abhängige Aufnahme von [^{14}C]-Valsartan; *Hemmung der [^{14}C]-Valsartan-Aufnahme in kanalikuläre Plasmamembranvesikel durch die angegebenen Substrate (100 μM und 1 mM). Die Hemmstoffe (50 μl) wurden den Membranvesikeln 30 Sekunden vor Zugabe von 50 μl [^{14}C]-Valsartan (57 μM), gelöst in 6,0 mM (3,0 mM Endkonzentration) ATP-haltigem Inkubationsmedium plus regenerierendes System respektive 6,0 mM (3,0 mM Endkonzentration) 5'-AMP-haltigem Inkubationsmedium, zugesetzt. Der ATP-abhängige Transport errechnet sich aus der Differenz des [^{14}C]-Valsartan-Transportes bei ATP plus regenerierendes System bzw. 5'-AMP nach Korrektur des Bindungsanteils.*

Kontrolle: [^{14}C]-Valsartan-Aufnahme ohne Hemmstoffzusatz (30 Sekunden Vorinkubation mit Inkubationsmedium ohne Hemmstoff)

5.7.1.2 Einfluss von Leukotriene C₄ auf die Aufnahme von [¹⁴C]-Valsartan

Da die Substrate GSSG, Pravastatin und BSP einen hemmenden Effekt auf die Valsartan-Aufnahme hatten (Kapitel 5.7.1.1), soll im Folgenden untersucht werden, wie sich die Vorinkubation mit dem Glutathion-S-Konjugat Leukotriene C₄, dem Substrat mit der höchsten Affinität (K_m-Wert von 250 nM) zu dem Transportsystem cMoat / Mrp2 [Ishikawa et al. 1990], auf den Valsartan-Transport auswirkt.

Leukotriene C₄ wurde in den Konzentrationen 2 μM / 4 μM / 6 μM / 8 μM eingesetzt, um die Aufnahme von 50 μM bzw. 100 μM [¹⁴C]-Valsartan zu hemmen. Die Versuchsbedingungen entsprechen Kapitel 5.7.1.1. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.35 dargestellt.

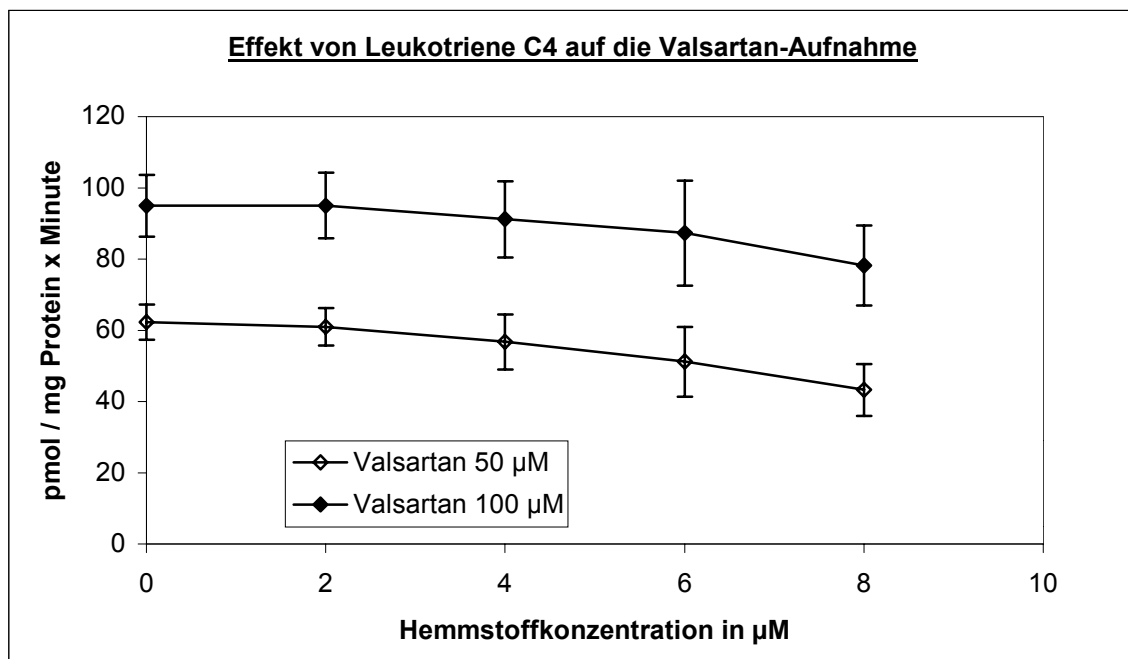


Abb. 5.35 Effekt von Leukotriene C₄ auf die ATP-abhängige Aufnahme von [¹⁴C]-Valsartan; Hemmung der [¹⁴C]-Valsartan-Aufnahme (50 μM / 100 μM) in kanalikuläre Plasmamembranvesikel durch Leukotriene C₄ (2 μM / 4 μM / 6 μM / 8 μM). Zu den Versuchsbedingungen siehe Abb. 5.34.

Leukotriene C₄ hemmt den Transport von [¹⁴C]-Valsartan in die kanalikulären Plasmamembranvesikel, dabei ist die Abnahme der ATP-abhängigen Valsartan-Aufnahme mit steigender Hemmstoffkonzentration statistisch signifikant ($p = 0,002$ für [¹⁴C]-Valsartan in einer Konzentration von 50 μM bzw. $p = 0,043$ für [¹⁴C]-Valsartan in einer Konzentration von 100 μM). Die Übertragung der kinetischen Daten in ein Diagramm nach Cornish-Bowden (Abb. 5.36) oder nach Dixon (Abb. 5.37) soll Aufschluss über den vorliegenden Hemmtyp geben [Cornish-Bowden 1974, Dixon 1953].

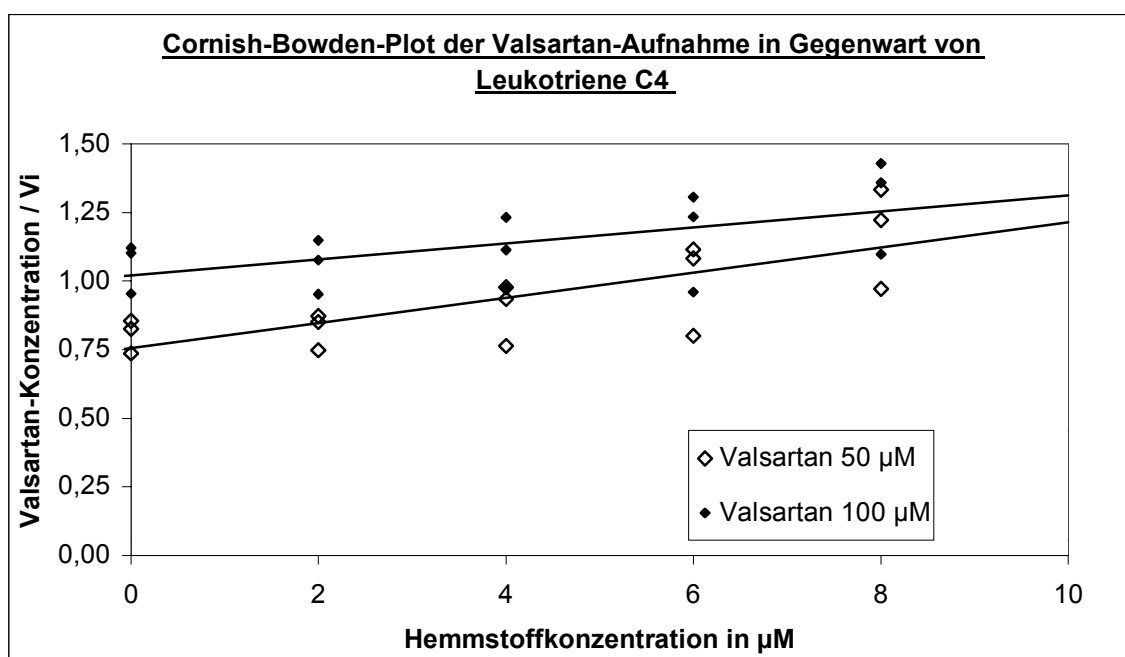


Abb. 5.36 Auftragung der kinetischen Daten der [¹⁴C]-Valsartan-Aufnahme in kanalikuläre Leberplasmamembranvesikel in Gegenwart von Leukotriene C₄ nach Cornish-Bowden; die Aufnahme von 50 μM und 100 μM [¹⁴C]-Valsartan wurde 30 Sekunden nach Zugabe der verschiedenen Leukotriene-Konzentrationen (2 μM / 4 μM / 6 μM / 8 μM) gemessen. Die Daten wurden Abbildung 5.35 entnommen und die Geraden mittels linearer Regression ermittelt.

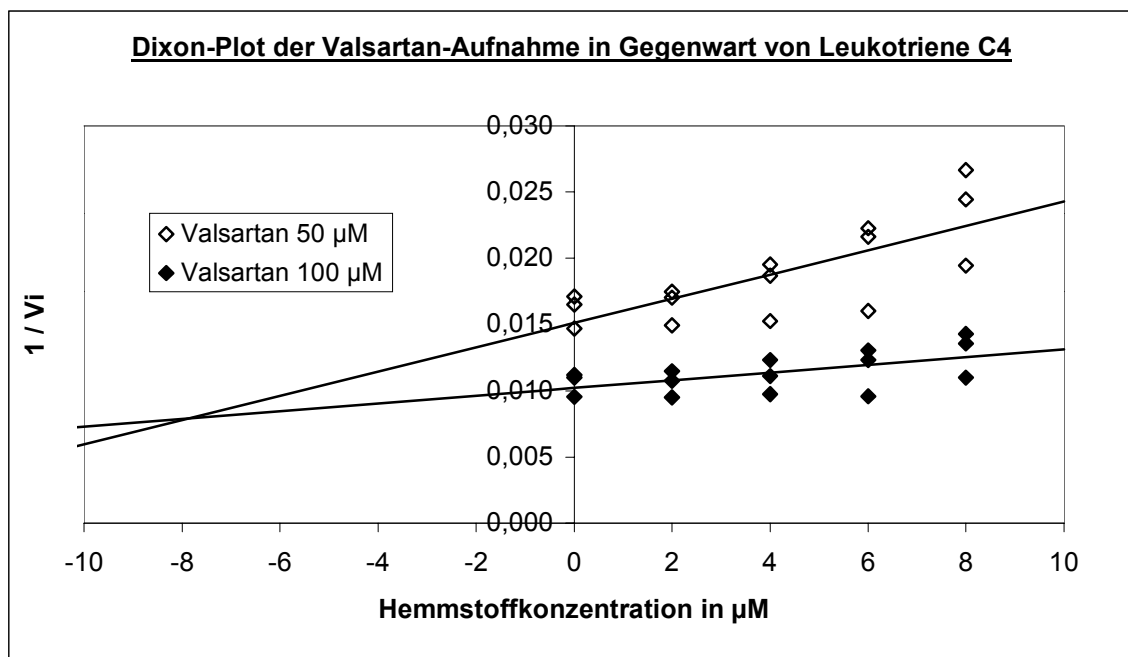


Abb. 5.37 Auftragung der kinetischen Daten der [^{14}C]-Valsartan-Aufnahme in kanalikuläre Leberplasmamembranvesikel in Gegenwart von Leukotriene C₄ nach Dixon; die Aufnahme von 50 μM und 100 μM [^{14}C]-Valsartan wurde 30 Sekunden nach Zugabe der verschiedenen Leukotriene-Konzentrationen (2 μM / 4 μM / 6 μM / 8 μM) gemessen. Die Daten wurden Abbildung 5.35 entnommen und die Geraden mittels linearer Regression ermittelt.

In dem Diagramm nach Dixon ergibt sich eindeutig ein kompetitiver Hemmtyp der [^{14}C]-Valsartan-Aufnahme durch Leukotriene C₄, die beiden Geraden schneiden sich im (- x / + y)-Bereich. Nach Cornish-Bowden müsste entsprechend eine Parallelität der Geraden vorliegen, doch in diesem Fall schneiden sich die Geraden im (+ x / + y)-Bereich. Bei dieser Auftragsart der kinetischen Daten lässt sich der Hemmtyp nicht eindeutig ermitteln.

5.7.2 Effekt von Substraten des kanalikulären Gallensäuretransporters cBST

Die Aufnahme von [¹⁴C]-Valsartan wurde in Anwesenheit von 100 µM und 1 mM Taurocholat bzw. Chololat nach 30 Sekunden Vorinkubation, unter gleichen Versuchsbedingungen wie in Kapitel 5.7.1 beschrieben, gemessen (Abb. 5.38).

In einer Konzentration von 100 µM wird der ATP-abhängige [¹⁴C]-Valsartan-Transport weder durch Taurocholat noch durch Chololat gehemmt. Die Messungen bei einer Hemmstoffkonzentration von 1 mM lieferten keine auswertbaren Ergebnisse, da Taurocholat als auch Chololat in dieser Konzentration eine zu hohe Detergenzwirkung auf die Vesikel haben.

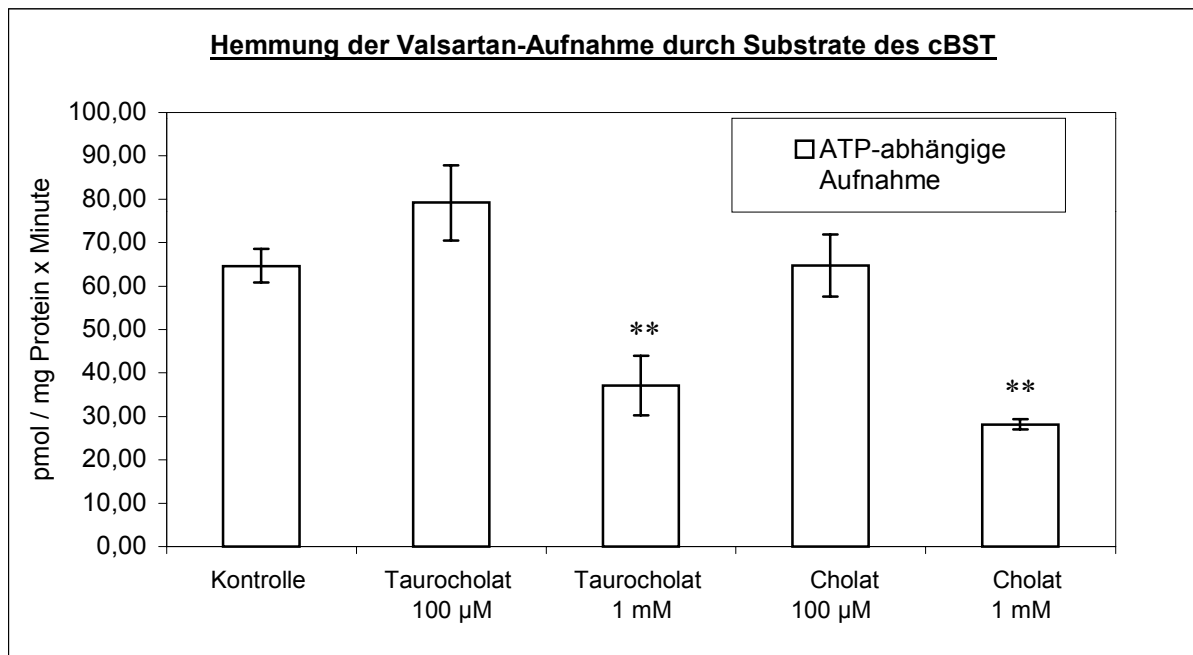


Abb. 5.38 Effekt von Taurocholat und Chololat auf die ATP-abhängige Aufnahme von [¹⁴C]-Valsartan; Aufnahmebedingungen wie in Abb. 5.35 beschrieben.

5.7.3 Effekt von Substraten des P-Glykoproteins (Mdr 1a)

Zur Hemmung des [^{14}C]-Valsartan-Transportes in die kanalikulären Plasmamembranvesikel, wurden als Substanzen, die mit P-Glykoprotein interagieren, Verapamil und Daunomycin ausgewählt.

Unter gleichen Versuchsbedingungen wie in Kapitel 5.7.1 beschrieben, vermögen weder Verapamil noch Daunomycin in den Konzentrationen 100 μM und 1 mM die Aufnahme von [^{14}C]-Valsartan zu hemmen (Abb. 5.39).

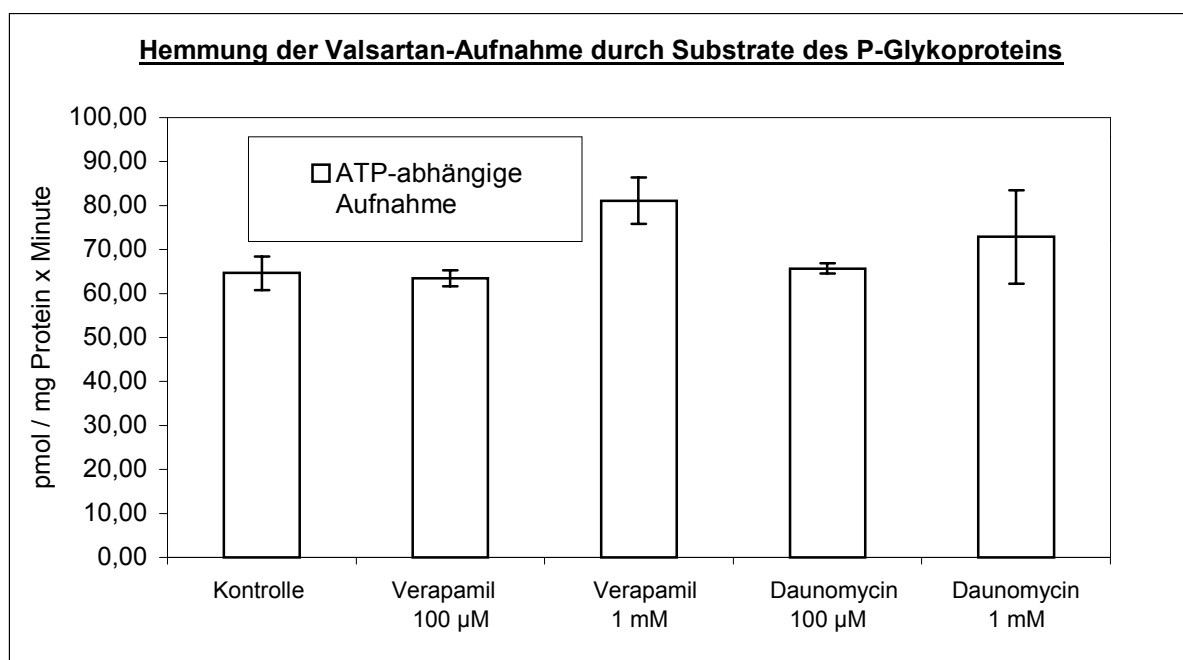


Abb. 5.39 Effekt von Verapamil und Daunomycin auf die ATP-abhängige Aufnahme von [^{14}C]-Valsartan; *Aufnahmebedingungen wie in Abb. 5.35 beschrieben.*

6 Diskussion

Der Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonist Valsartan zählt zu einer neuen Klasse antihypertensiver Arzneimittel, die erfolgreich zur Behandlung des Bluthochdruckes des Menschen eingesetzt werden [Timmermans et al. 1999]. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung der molekularen Mechanismen seiner biliären Elimination über die kanalikuläre Plasmamembran der Rattenleber. Valsartan wird zum größten Teil (70 %) über die Galle ausgeschieden, wobei nur eine minimale Metabolisierung stattfindet [Brookman et al. 1997, Colussi et al. 1997, Waldmeier et al. 1997]. Dies liegt daran, dass Valsartan bei physiologischem pH-Wert als Di-Anion mit einer Carboxylgruppe (pK_a 3,9) und einer Tetrazolgruppe (pK_a 4,7) vorliegt. Dadurch wird es zu einem schlecht zugänglichen Substrat für metabolisierende Enzyme. Die überwiegende biliäre Elimination lässt auf eine aktive Beteiligung eines Anionen-Transportsystems in der Leber schließen. Es handelt sich um das „Multi-drug resistance-associated protein“ (Mrp2), auch „canalicular multispecific organic anion transporter“ (cMoat) genannt, welches für die biliäre Elimination von vielen anionischen Endo- und Xenobiotika, insbesondere Di-Anionen, verantwortlich ist [Meier 1993, Oude Elferink & Jansen 1994].

6.1 Vergleich der In-vivo-Galleausscheidung und -Organverteilung von Valsartan in Wistar-Ratten und TR⁻-Ratten

Die durchgeführten In-vivo-Galleausscheidungsstudien und -Organverteilungsstudien in Wistar-Ratten im Vergleich zu TR⁻-Ratten lieferten wichtige Hinweise auf eine Beteiligung des kanalikulären Mrp2 / cMoat am Transport des Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonisten Valsartan. Zu einem Zeitpunkt, als Mrp2 / cMoat auf dem Proteinlevel noch nicht charakterisiert war, wurden mit diesem Tiermodell zahlreiche In-vivo-Studien durchgeführt, um die biliäre Elimination organischer Anionen zu charakterisieren. Huber et al. (1987) untersuchten z.B. die biliäre Elimination von Leukotriene C₄ in Sprague-Dawley- und TR⁻-Ratten nach einer intravenösen Injektion von [³H]-LTC₄. Sie stellten fest, dass die über die Galle ausgeschiedene Leukotriene-Radioaktivität, die sich aus LTC₄ und seinen Metaboliten LTD₄, LTE₄ und NAcLTE₄ zusammensetzt, bei den TR⁻-Ratten bis auf 1,8 % gegenüber den Kontrolltieren erniedrigt war. Sie schlossen daraus, dass Leukotriene physiologische Substrate

des primär aktiven Transportsystems der kanalikulären Leberplasmamembran sind, welches bei den mutierten Rattenstämmen defekt ist [Huber et al. 1987]. Auch GSSG und S-(2,4-dinitrophenyl)-Glutathion werden nicht in die Galle von TR⁻-Ratten sezerniert [Oude Elferink et al. 1989].

Die biliäre Elimination von Valsartan zeigt bei Wistar-Ratten ebenfalls deutliche Unterschiede im Vergleich zu TR⁻-Ratten. Valsartan wurde in verschiedenen Dosierungen bei männlichen und weiblichen Versuchstieren nach Kanülierung des Gallenganges in eine Mesenterialvene injiziert. Die Galle der Ratten wurde fraktioniert gesammelt und mittels Radioaktivitätsbestimmung die ausgeschiedene Substanzmenge in pmol berechnet.

In einer Dosierung von 1 mg Valsartan / kg KM ergibt sich bei männlichen Wistar-Ratten im Vergleich zu TR⁻-Ratten ein deutlich anderer Kurvenverlauf. Der bei den Wistar-Ratten nach etwa 20 Minuten auftretende Ausscheidungspeak fehlt bei den TR⁻-Mutanten. Bei letzteren steigt die Eliminationskurve langsam an und die ausgeschiedenen Konzentrationen bleiben über einen langen Zeitraum auf demselben Niveau. Darüber hinaus liegt die über den Messzeitraum insgesamt ausgeschiedene Menge um die Hälfte niedriger als bei normalen Wistar-Ratten. Nach 3 Stunden werden bei den Wistar-Ratten 81 % und bei den TR⁻-Ratten dagegen nur 39 % der injizierten Substanz mit der Galle ausgeschieden. Dies spiegelt auch die ermittelte Organverteilung wieder, denn bei TR⁻-Ratten befindet sich ein höherer Anteil der applizierten Valsartan-Konzentration im Blut (18 % gegenüber 2,2 % bei Wistar-Ratten) sowie in den untersuchten Organen.

Wurde Valsartan bei männlichen Versuchstieren zum Vergleich in einer Dosierung von 0,5 µCi / Tier eingesetzt, so erhält man ähnliche Kurvenverläufe. Allerdings unterliegt die Ausscheidungsrate bei den Wistar-Ratten trotz relativ niedriger Gewichtsunterschiede höheren Schwankungen, besonders innerhalb der ersten 60 Minuten nach der Injektion, während sich die Gewichtsschwankungen bei den TR⁻-Ratten nicht auf die Ausscheidungsrate auswirken. Auch die Ergebnisse der Organverteilung sind mit denen der männlichen Versuchstiere, die Valsartan in einer Dosierung von 1 mg / kg KM erhielten, vergleichbar, wobei die Unterschiede zwischen Wistar- und TR⁻-Ratten aufgrund der höheren Standardabweichungen bei den Wistar-Ratten nicht so deutlich sind.

Unter den gleichen Versuchsbedingungen wurde schließlich die biliäre Elimination von Valsartan bei weiblichen Wistar- und TR⁻-Ratten untersucht. In einer Dosierung von 0,5 µCi / Tier ergeben sich jedoch keine signifikanten Unterschiede zu den männlichen Versuchstieren. Eine Geschlechtsspezifität lässt sich daher ausschließen.

In früheren Studien wurde allerdings berichtet, dass der Gallefluss bei TR⁻-Ratten um etwa 50 % gegenüber Wistar-Ratten reduziert sei [Oude Elferink et al. 1990, Jansen et al. 1985]. Um auszuschließen, dass die festgestellte reduzierte biliäre Elimination des Valsartan auf eine Reduktion des Galleflusses bei den TR⁻-Mutanten zurückzuführen ist, wurde in der vorliegenden Studie der Gallefluss bei männlichen Wistar- und TR⁻-Ratten nach Injektion von Valsartan bzw. physiologischer Kochsalzlösung in eine Mesenterialvene untersucht. Nach Injektion von physiologischer Kochsalzlösung lässt sich jedoch kein reduzierter Gallefluss bei TR⁻-Ratten im Vergleich zu Wistar-Ratten feststellen. Dagegen führt die Injektion von Valsartan bei den Wistar-Ratten zu einem signifikanten choleretischen Effekt, während bei den TR⁻-Ratten wiederum kein Unterschied zu den Kontrolltieren besteht.

Diese Ergebnisse belegen, dass das Transportprotein Mrp2 / cMoat am Transport von Valsartan über die kanalikuläre Leberplasmamembran beteiligt ist. Es scheint allerdings noch ein weiteres Transportsystem eine Rolle zu spielen, da noch bis zu 40 % der injizierten Valsartan-Konzentration über die Galle von TR⁻-Ratten ausgeschieden wird. Auf die hier in Frage kommenden Transporter wird später eingegangen (Kapitel 6.3).

Die biliäre Elimination des Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonisten Telmisartan wurde ebenfalls untersucht [Kato et al. 2000]. Die Struktur von Telmisartan leitet sich entsprechend Valsartan von dem Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonisten Losartan ab (siehe Einleitung). Doch im Gegensatz zu Valsartan wird Telmisartan in der Leber zum größten Teil glukuronidiert. Nach einer intravenösen Applikation von radioaktiv markiertem Telmisartan wurden über einen Messzeitraum von 240 Minuten nur 45 % der Gesamtdosis über die Galle von Sprague-Dawley-Ratten ausgeschieden. Zudem konnte im Vergleich zu Mrp2-defekten „Eisai hyperbilirubinemic rats“ kein Unterschied im Ausscheidungsverhalten festgestellt werden. Dies liegt an einer 2 bis 3fach erhöhten mikrosomalen Glukuronidierungsrate bei den transportdefizienten Ratten gegenüber Sprague-Dawley-Ratten [Kato et al. 2000]. Wurde nämlich aufgrund dieser Feststellung beiden Rattenstämmen reines Telmisartan-Glukuronid intravenös verabreicht, so war die biliäre Elimination bei den „Eisai hyperbilirubinemic rats“ im Vergleich zu den normalen Ratten um die Hälfte reduziert. Kato et al. (2000) schlussfolgerten daraus, dass am Transport von Telmisartan-Glukuronid über die kanalikuläre Plasmamembran das Transportprotein Mrp2 / cMoat wie auch ein zweites Transportsystem, welches in der Leber von „Eisai hyperbilirubinemic rats“ exprimiert wird, beteiligt sind.

Um die molekularen Mechanismen des Valsartan-Transportes weiter aufzuklären, wurden nachfolgend Aufnahmemessungen in kanalikuläre Plasmamembranvesikel, isoliert aus der Leber von Wistar-Ratten und TR⁻-Ratten, sowie Hemmstoffversuche durchgeführt.

6.2 Die Charakterisierung der molekularen Mechanismen des Transportes von Valsartan mit Hilfe von kanalikulären Leberplasmamembranvesikeln

6.2.1 Die Qualität der kanalikulären Plasmamembranvesikel, isoliert aus der Leber von Wistar- und TR-Ratten

Die bei der Ratte etablierte Präparationsmethode nach Meier [Meier et al. 1984], welche auf einer Kombination aus Zonal-Dichtegradienten-Zentrifugation und einem diskontinuierlichen Saccharose-Gradienten-Ultrazentrifugationsschritt beruht, ist einfach reproduzierbar und erlaubt die Gewinnung kanalikulärer Plasmamembranfragmente in hohem Reinheitsgrad. Leider stand der dazu benötigte Zonalrotor nicht zur Verfügung, so dass die Präparationstechnik, wie im Methodenteil beschrieben, modifiziert werden musste.

Mit Hilfe der so erstellten Präparationsmethode konnten aus durchschnittlich 120 g Leber 25 - 30 mg kanalikuläre Plasmamembranen ohne wesentlichen Proteinverlust bei den einzelnen Schritten der Präparation (Protein-Recovery) gewonnen werden. Dies ist eine sehr hohe Ausbeute im Vergleich zur Methode nach Meier, die aus 100 - 110 g Rattenleber 9 - 16 mg kanalikuläre Plasmamembranen liefert. Zudem konnte die durchgeführte Enzym-Recovery weder einen Verlust noch eine Inaktivierung von Enzymen aufdecken.

Die Qualität der Präparation wurde anhand von Enzymtests und der Aufnahme von Taurocholat in isolierte Plasmamembranvesikel überprüft. Die spezifischen Aktivitäten der verschiedenen Markerenzyme und ihre Anreicherung gegenüber dem Gesamthomogenat sind in Tabelle 5.4 (Seite 75) dargestellt. Für die Leitenzyme der kanalikulären Plasmamembranfraktion von Wistar-Ratten, 5'-Nukleotidase und Mg^{2+} -ATPase, konnte eine ~ 43fache bzw. ~ 30fache Anreicherung festgestellt werden. Die Na^+/K^+ -ATPase, Leitenzym der basolateralen Plasmamembranfraktion, war ~ 8fach angereichert, während keine Anreicherung der Glukose-6-Phosphatase, Leitenzym der Mikrosomenfraktion, feststellbar war. Die Plasmamembranpräparation nach Meier erreicht dagegen für die 5'-Nukleotidase eine 64fache Anreicherung und für die Mg^{2+} -ATPase eine 83fache Anreicherung. Die in der vorliegenden Arbeit gemessenen Werte lagen somit deutlich unter den von Meier ermittelten Werten, wobei die Anreicherung der Na^+/K^+ -ATPase außerdem auf eine geringe Verunreinigung dieser Fraktion mit basolateralen Membranen hindeutet.

In der kanalikulären Plasmamembranfraktion, isoliert aus der Leber von TR⁻-Ratten war die spezifische Aktivität der 5'-Nukleotidase sowie der Mg²⁺-ATPase signifikant höher als im Vergleich zu der in Wistar-Ratten, ihre Anreicherung ist somit mit den von Meier angegebenen Werten vergleichbar. Allerdings liegt eine höhere Verunreinigung mit basolateralen Membranen vor, angezeigt durch eine ~ 16fache Anreicherung der Na⁺/K⁺-ATPase.

In der basolateralen Plasmamembranfraktion wurde als Leitenzym die Na⁺/K⁺-ATPase überprüft. Doch neben einer ~ 16fachen Anreicherung dieses Enzyms ist eine ~ 6fache Anreicherung der 5'-Nukleotidase und eine ~ 14fache Anreicherung der Mg²⁺-ATPase, Leitenzyme der kanalikulären Membranfraktion, festzustellen.

Die Interphase 31 - 34 % stellt entsprechend ihrer Lokalisation nach Dichte-zentrifugation im Saccharosegradienten eine Mischfraktion aus kanalikulären und basolateralen Plasmamembranen dar. Dies spiegelt auch die Anreicherung der 5'-Nukleotidase (~ 38fach), der Mg²⁺-ATPase (~ 32fach) und der Na⁺/K⁺-ATPase (~ 19fach) wider.

Die Anreicherung der spezifischen Markerenzyme der einzelnen Fraktionen zeigt an, dass diese modifizierte Methode keine strenge Trennung der Membrananteile im Saccharose-Dichte-Gradienten zulässt. Daher wurde als weiteres Kriterium für die Qualität der kanalikulären Plasmamembranvesikel ihre Fähigkeit zur Aufnahme von Taurocholat herangezogen. Die verwendeten Vesikel wiesen eine ATP-abhängige Taurocholat-Aufnahme im Bereich von 40 - 70 pmol / mg Protein pro Minute auf. Die ATP-abhängige Taurocholat-Aufnahme kanalikulärer Plasmamembranvesikel, präpariert von Nishida et al. (1992b), liegt etwa im gleichen Bereich, obwohl von Nishida et al. [³H]-Taurocholat in einer doppelt so hohen Konzentration (10 µM statt 5 µM) eingesetzt wurde. Der Grad der Verunreinigung der kanalikulären Plasmamembranfraktion mit basolateralen Membranen, gemessen anhand der Natrium-abhängigen Taurocholat-Aufnahme, war zudem minimal. Mit Hilfe der modifizierten Präparationsmethode können somit kanalikuläre Plasmamembranvesikel gewonnenen werden, deren Qualität für Transportmessungen ausreichend ist.

6.2.2 Die Präparation kanalikulärer „inside-out“- und „right side-out“-Vesikel

Die Präparation von reinen „inside-out“-Vesikeln ist mit einem hohen Proteinverlust verbunden, denn aus einer Mischfraktion konnten nur etwa ein Drittel „inside-out“-orientierte Vesikel gewonnen werden. Diese Ausbeute deckt sich jedoch mit den in der Literatur angegebenen Werten [Böhme et al. 1994, Keppler et al. 1998, Ni'inuma et al. 1999]. Ein Großteil der kanalikulären „inside-out“-Vesikel verbleibt zudem nach der Zentrifugation im Überstand (35,83 % der Ausgangsfraktion). Jedoch ist es nicht möglich, die g-Zahl bei der Zentrifugation zu erhöhen, denn dadurch wären die Vesikel einer noch höheren Belastung ausgesetzt, was ein Platzen der empfindlichen Vesikel begünstigen würde.

Als Fraktion „Restprotein auf Säule“ findet man außerdem 21,80 % der Ausgangsfraktion. Es kann sich dabei um restliche „inside-out“-Vesikel als auch um ungebundene „right side-out“-Vesikel handeln.

Die gewonnene „right side-out“-Fraktion ist mit 11,16 % der Ausgangsfraktion absolut unrealistisch, wenn man bedenkt, dass normalerweise der überwiegende Teil der Mischfraktion (etwa 70 %) aus „right side-out“-orientierten Vesikeln besteht. Diese geringe Proteinmenge (insgesamt 3,38 mg) reicht nicht für Aufnahmemessungen aus. Es ist anzunehmen, dass sich ein Großteil der an der Con A-Sepharose gebundenen „right side-out“-Vesikel nicht mehr ablösen lässt.

6.2.3 Die ATP-Abhängigkeit des Valsartan-Transportes

Über den Mechanismus der Ausscheidung des Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonisten Valsartan in die Galle, d.h. den Transport über die kanalikuläre Leberplasmamembran war bislang nichts bekannt. Da nachgewiesen wurde, dass auf der kanalikulären Membran ATP-abhängige Transporte stattfinden, wurde zuerst die ATP-Abhängigkeit des Transportes überprüft und bestätigt. Die Messungen ergaben, dass sich der Transport von Valsartan durch Zugabe von ATP plus regenerierendes System um durchschnittlich 30 % gegenüber der ATP-unabhängigen Aufnahme (Aufnahme durch Zusatz von AMP) steigern lässt. Aus der Differenz beider Transporte ergibt sich eine ATP-abhängige Aufnahme, die in der ersten Minute linear ansteigt und nach 120 Sekunden ein Maximum erreicht.

Wurde dagegen die Aufnahme von Valsartan in Anwesenheit bzw. Abwesenheit von Natriumionen gemessen, so konnte kein Natrium-abhängiger Transport festgestellt werden. Dies war zu erwarten, da in der kanalikulären Plasmamembran kein Natrium-abhängiges Transportsystem beschrieben ist und unter physiologischen Bedingungen auch kein Natriumgradient existiert. In früheren Untersuchungen ging man davon aus, dass Anionengradienten die treibende Kraft für die biliäre Elimination seien. So konnten z.B. Inoue et al. (1984) zeigen, dass Taurocholat über ein Natrium-unabhängiges Transportsystem in kanalikuläre Plasmamembranvesikel, isoliert aus der Rattenleber, transportiert wird.

Nachdem festgestellt wurde, dass 30 % der Valsartan-Aufnahme in die Vesikel ATP-abhängig erfolgt, wurde der Einfluss der ATP-Konzentration auf die Valsartan-Aufnahme untersucht. Die ATP-abhängige Valsartan-Aufnahme lässt sich durch zunehmende ATP-Konzentrationen (0,5 / 1,2 / 2,0 / 3,0 mM) steigern. Nach Transformation der kinetischen Daten nach Lineweaver und Burk wurde eine Michaelis-Konstante von $K_m (ATP) = 1,449 \text{ mM}$ und eine maximale Reaktionsgeschwindigkeit $v_{\max (ATP)} = 62,22 \text{ pmol / mg Protein x Minute}$ ermittelt. Bei einer ATP-Konzentration von 5,0 mM tritt eine Sättigung ein. Da ATP in Lösung stark sauer ist, muss bei dieser Konzentration der pH-Wert erheblich korrigiert werden. Dies kann sich negativ auf die Transportrate als auch auf die Intaktheit der Vesikelmembran auswirken. Außerdem wurde bei Vesikelauftahmemessungen mit anderen Substraten eine ATP-Konzentration von 5,0 mM nie eingesetzt, sondern die übliche ATP-Konzentration lag zwischen 100 μM und 3 mM. Kobayashi et al. (1989) ermittelten z.B. für S-(2,4-dinitro-phenyl)-Glutathion einen $K_m (ATP)$ -Wert von 260 μM und einen $v_{\max (ATP)}$ -Wert von 550 pmol / mg Protein x 3 Minuten. Die $K_m (ATP)$ -Werte weiterer Substrate des Mrp2 / cMoat liegen etwa im gleichen Bereich, wobei man die $v_{\max (ATP)}$ -Werte nicht immer direkt miteinander vergleichen kann, da sie sich auf unterschiedliche Inkubationszeiten beziehen.

Bilirubin-Diglukuronid besitzt z.B. einen $K_m (ATP)$ -Wert von 370 μM und einen $v_{\max (ATP)}$ -Wert von 380 pmol / mg Protein x 20 s [Nishida et al. 1992b], während für Sulfbromophthalein (BSP) ein $K_m (ATP)$ -Wert von 260 μM und ein $v_{\max (ATP)}$ -Wert von 77 ± 22 pmol / mg Protein x 20 s ermittelt wurden [Nishida et al. 1992a]. Für Leukotriene C_4 wurden leider weder Angaben zur Michaelis-Konstante $K_m (ATP)$ noch zur maximalen Reaktionsgeschwindigkeit $v_{\max (ATP)}$ gemacht [Ishikawa et al. 1989 / 1990]. Taurocholat, ein Substrat des kanalikulären Gallensäuretransporters cBST, sei schließlich als Beispiel angefügt, um zu zeigen, dass diese Werte nicht als absolut betrachtet werden dürfen, sondern stark z.B. von der Art der Präparation, der Aufnahmetechnik und der eingesetzten Substratkonzentration abhängen. Adachi et al. (1991) ermittelten für Taurocholat in einer Konzentration von 50 μM eine Michaelis-Konstante $K_m (ATP)$ von 64 μM und eine maximale Reaktionsgeschwindigkeit $v_{\max (ATP)}$ von 142,86 pmol / mg Protein x 20 s, während Nishida et al. (1991) für Taurocholat in einer Konzentration von 5 μM einen $K_m (ATP)$ -Wert von 670 μM und einen $v_{\max (ATP)}$ -Wert von 12 pmol / mg Protein x 20 s feststellten.

Schließlich wurde der Einfluss von ATP-Analoga und energiereicher Nukleotide auf die Aufnahme von Valsartan in die kanalikulären Plasmamembranvesikel untersucht. Die in der kanalikulären Plasmamembran beschriebenen Transportsysteme gehören zur Gruppe der ABC-Transporter. Diese Familie von Transportproteinen besitzt eine oder zwei Nukleotid-Bindungsstellen. Durch ATP-Hydrolyse wird die Energie für den Transport der Substrate bereitgestellt [Higgins et al. 1986].

In Anwesenheit von ATP mit regenerierendem System (Kreatinphosphat und Kreatinkinase) wurde die höchste Transportrate des Valsartan erreicht. Dieser Ansatz spiegelt die In-vivo-Verhältnisse am ehesten wider, da auch in der lebenden Zelle ATP ständig bereitgestellt wird. Setzt man ATP ohne regenerierendes System ein, so liegt die Transportrate nur etwa 5 % darunter. Würde man allerdings längere Zeiten messen, so würde es sich wahrscheinlich bemerkbar machen, dass das verbrauchte ATP nicht mehr zur Energiegewinnung bereitsteht. Die Transportrate würde ab einem gewissen Zeitpunkt abfallen (Overshoot-Phänomene).

Mit ADP mit bzw. ohne regenerierendes System wird etwa die gleiche Transportrate wie mit ATP erreicht. Der Ansatz mit ATP hat allerdings einen kleinen Vorsprung gegenüber ADP mit regenerierendem System. Das kann dadurch erklärt werden, dass das regenerierende System einige Zeit benötigt, bis aus ADP genügend ATP für den Transport gebildet ist.

Die ATP-Analoga mit der niedrigsten Energiestufe AMP, Adenosin sowie das nicht spaltbare AMP-PCP haben keinen stimulierenden Einfluss auf die Valsartan-Aufnahme. Auffallend ist jedoch, dass auch diese Substanzen eine relativ hohe Aufnahme von etwa 250 pmol / mg Protein x Minute bewirken. In den meisten Vesikelauftnahmestudien wird dieser ATP-unabhängige Anteil als Nukleotid-spezifische Bindung betrachtet und in die Berechnung der ATP-abhängigen Aufnahme einbezogen [Leier et al. 1996]. Doch auch ohne Zusatz eines Nukleotids wurden ähnlich hohe Aufnahmewerte gemessen. Die Untersuchungen zur Bestimmung des Bindungsanteils des Valsartan (siehe nachfolgendes Kapitel) belegen, dass es sich zum größten Teil um Bindung an die Plasmamembran handelt. Für die Valsartan-Aufnahme in Anwesenheit von AMP konnte ein Bindungsanteil von $72,32 \pm 9,13$ % ermittelt werden.

Interessant ist außerdem, dass die energiereichen Nukleotide UTP bzw. CTP ebenfalls eine hohe Aufnahme des Valsartan zulassen. Ishikawa et al. (1989) berichten zwar, dass ATP für den Transport von Leukotriene C₄ spezifisch sei und Analoga wie ADP, AMP, Adenosin-5'-[β,γ -methylene]-Triphosphat oder Adenosin-5'-[β,γ -imido]-Triphosphat keinen stimulierenden Effekt haben. Doch liegen keine Untersuchungen zu UTP bzw. CTP vor. Auch die anderen Substrate des Mrp2 / cMoat, wie z.B. Bilirubin-Konjugate [Nishida et al. 1992b] oder Sulfobromophthalein [Nishida et al. 1992a], benötigen zum Transport hydrolysierbares ATP, während weder nicht hydrolysierbare ATP-Analoga noch energiereiche Nukleotide eine Stimulation bewirken. Lediglich Kobayashi et al. (1989) zeigten, dass der Transport von S-(2,4-dinitrophenyl)-Glutathion in kanalikuläre Plasmamembranvesikel auch in Gegenwart von GTP erfolgt, allerdings nur zu einem Anteil von 37 % gegenüber der Aufnahme in Gegenwart von ATP.

6.2.4 Die Konzentrationsabhängigkeit des Valsartan-Transportes

Die Konzentrationsabhängigkeit des Valsartan-Transportes in kanalikuläre Plasmamembranvesikel wurde mit Substratkonzentrationen von 10 bis 500 μM untersucht. Dazu wurden alle Transportmessungen nicht nur bei 37 °C sondern auch bei 7 °C durchgeführt. Bei einer Temperatur von 7 °C sollte kein aktiver Transport stattfinden, so dass die gemessene ATP-abhängige Aufnahme der Bindung des Substrates an die Membranen entspricht [Höfer 1977]. Bei 37 °C stieg die Valsartan-Aufnahme mit ATP plus regenerierendes System als auch mit AMP mit zunehmender Substratkonzentration linear an, während bei 7 °C fast keine Aufnahme festgestellt wurde.

Da jedes Transportsystem eine bestimmte Transportkapazität besitzt, wird erwartet, dass bei Substratkonzentrationen unterhalb der Kapazität die Transportrate stark von der Substratkonzentration abhängig ist. Da die vorgegebene Transportkapazität als maximale Transportleistung jedoch nicht überschritten werden kann, nähert sich die Transportrate mit steigender Substratkonzentration der maximalen Kapazität an. Weitere Steigerungen der Substratkonzentration können die Transportleistung nicht erhöhen, da das Maximum schon erreicht ist. Graphisch dargestellt erscheint eine hyperbole Funktion, d.h. eine im Anfangsteil steile Kurve, die sich asymptotisch der maximalen Transportleistung nähert.

Um festzustellen, ob der Valsartan-Transport einer solchen Sättigungskinetik oder Michaelis-Menten-Kinetik unterliegt, wurde aus der Differenz des **Bindungsanteils** (ATP-Aufnahme plus regenerierendes System – AMP bei 7 °C) und der **ATP-abhängigen Aufnahme** (ATP-Aufnahme plus regenerierendes System – AMP bei 37 °C) die tatsächliche **aktive (energieabhängige) Aufnahme** von Valsartan berechnet. Trägt man diese gegen die Valsartan-Konzentration in einem Diagramm auf, so ergibt sich eine solche für Transportsysteme typische hyperbole Funktion. Die aktive ATP-abhängige Aufnahme von Valsartan stieg linear mit zunehmender Konzentration bis 50 μM an, um dann bei 100 μM langsam in eine Sättigung überzugehen. Diese Sättigbarkeit ist ein wichtiges Kriterium für einen Carrier-vermittelten Transport. Nach Transformation der Daten nach Lineweaver und Burk (doppelt reziproke Auftragung der Aufnahmegeschwindigkeit gegen die Substratkonzentration) wurde nach linearer Regression eine Michaelis-Konstante von $K_m = 65,91 \mu\text{M}$ und eine maximale Reaktionsgeschwindigkeit $v_{\text{max}} = 145,83 \text{ pmol} / \text{mg Protein} \times \text{Minute}$ ermittelt. Leukotriene C₄, das Substrat mit der höchsten Affinität zu MRP2, hat einen K_m -Wert von 250 nM sowie einen v_{max} -Wert von 45 pmol / mg Protein x Minute [Ishikawa et al. 1990].

Der K_m -Wert von S-(2,4-dinitrophenyl)-Glutathion ist im Vergleich zu Leukotriene C₄ bereits um zwei Zehnerpotenzen höher (10 - 20 μM) [Kobayashi et al. 1988, Ishikawa et al. 1989]. Sulfobromophthalein (BSP) ist mit einem K_m -Wert von $31 \pm 4 \mu\text{M}$ ebenfalls ein hoch affines Substrat des Mrp2 / cMoat [Nishida et al. 1992a]. Bilirubin-Diglukuronid, mit einem K_m -Wert von $71 \pm 18 \mu\text{M}$ [Nishida et al. 1992b], besitzt eine mit Valsartan vergleichbare Affinität. Doch GSSG, mit einem K_m -Wert von 110 μM [Leier et al. 1996], oder Pravastatin, mit einem K_m -Wert von 223 μM [Yamazaki et al. 1997], ebenfalls typische Substrate des Mrp2 / cMoat, weisen dagegen sogar eine niedrigere Affinität als Valsartan auf.

Die in den vorangegangenen Versuchen frei gewählte Valsartan-Konzentration von 57 μM erwies sich somit auch für die nachfolgenden Transportmessungen als geeignet, da sie in etwa der Michaelis-Konstante entspricht und nicht im Sättigungsbereich liegt.

Der ATP-unabhängige Anteil der Valsartan-Aufnahme (Aufnahme in Gegenwart von AMP im Inkubationsmedium bei 37 °C) unterliegt ebenfalls einer Sättigungskinetik, mit einer Michaelis-Konstante von $K_m = 264,94 \mu\text{M}$ und einer maximalen Reaktionsgeschwindigkeit von $v_{\max} = 1322,69 \text{ pmol} / \text{mg Protein} \times \text{Minute}$. Im Vergleich zur aktiven ATP-abhängigen Valsartan-Aufnahme weist dieser Anteil zwar eine höhere Effektivität auf, doch ist die Affinität signifikant niedriger. Für Pravastatin wurde ebenfalls eine sättigbare ATP-unabhängige Aufnahme beschrieben [Yamazaki et al. 1997]. Im Vergleich zur ATP-abhängigen Pravastatin-Aufnahme weist dieser ATP-unabhängige Anteil mit einem K_m -Wert von $477 \pm 99 \mu\text{M}$ nur eine halb so hohe Affinität auf. Außerdem ist dieses Transportsystem auch nur halb so effizient, denn die maximale Reaktionsgeschwindigkeit v_{\max} (ATP-unabhängig) beträgt $1000 \pm 221 \text{ pmol} / \text{mg Protein} \times \text{Minute}$ im Vergleich zur maximalen Reaktionsgeschwindigkeit der ATP-abhängigen Pravastatin-Aufnahme (v_{\max} (ATP-abhängig) = $1960 \pm 224 \text{ pmol} / \text{mg Protein} \times \text{Minute}$). Bei Valsartan verhält sich die maximale Reaktionsgeschwindigkeit dagegen umgekehrt. Yamazaki et al. (1997) schlussfolgerten daraus, dass ein Carrier-vermitteltes ATP-unabhängiges Transportsystem an der biliären Elimination von Pravastatin beteiligt ist. Dies trifft auch für Valsartan zu.

6.2.5 Die Membranbindung des Valsartan

Ein Transport erfolgt in den intravesikulären Raum, der ein bestimmtes Volumen einnimmt. Wird dieses Volumen verringert, sollte auch der Transport verringert werden. Bei einem theoretischen Volumen von 0 μl sollte die gemessene Vesikel-assoziierte Radioaktivität der Bindung der Substanz an die Membranen entsprechen. Daher wurde die Aufnahme von Valsartan in Vesikel mit variierendem intravesikulärem Volumen gemessen. Dies erreicht man durch Inkubation der Vesikel in Außenmedien mit steigender Osmolarität. Dies stellt eine genauere Methode der Bestimmung des Bindungsanteils dar.

Die aus der Rattenleber isolierten Plasmamembranvesikel wurden mit Medien der Osmolaritäten 300 mosm, 450 mosm, 600 mosm und 900 mosm vorinkubiert. Die graphische Bestimmung der Membranbindung erfolgt durch einfach reziprokes Auftragen der ATP-abhängigen Valsartan-Aufnahme gegen den Kehrwert der Osmolarität des Mediums (Osmoplot). Der Schnittpunkt im positiven Bereich der y-Achse entspricht der Bindung des Substrates an die Membranen und wird in Relation zur Aufnahme bei der üblichen Osmolarität (300 mosm) angegeben. Bei diesem Schnittpunkt ist theoretisch die Osmolarität unendlich groß und das Vesikellumen minimal.

Die graphische Bestimmung des ATP-abhängigen Anteils der Membranbindung von Valsartan ergab jedoch keinen Schnittpunkt im positiven Bereich der y-Achse, der Bindungsanteil der ATP-abhängigen Valsartan-Aufnahme läge demnach unter 0 %. Da jedoch bekannt ist, dass Valsartan stark an Proteine bindet [Colussi et al. 1997], wurden die Messergebnisse der Valsartan-Aufnahme in Gegenwart von ATP plus regenerierendes System und in Gegenwart von AMP getrennt überprüft. Mit Hilfe des Osmoplots ließ sich für die Aufnahme in Gegenwart von ATP plus regenerierendes System ein Bindungsanteil von $53,93 \pm 5,87$ % bestimmen, während der Bindungsanteil für die ATP-unabhängige Aufnahme (Anwesenheit von AMP) $72,32 \pm 9,13$ % betrug. Bleibt dieser Bindungsanteil bei der Berechnung der ATP-abhängigen Aufnahme (Differenz der Valsartan-Aufnahme in Gegenwart von ATP plus regenerierendes System bzw. AMP im Inkubationsmedium) unberücksichtigt, so erniedrigt sich diese aufgrund des höheren Bindungsanteils bei AMP fälschlicherweise. Dies bleibt unbemerkt, solange die Aufnahme in Gegenwart von ATP plus regenerierendes System größer ist als die Aufnahme in Gegenwart von AMP. Doch im umgekehrten Fall, wenn also die ATP-unabhängige Aufnahme größer ist als die Aufnahme mit ATP plus regenerierendes System, so erhält man negative Werte bei der ATP-abhängigen Aufnahme. In der vorliegen-

den Arbeit tauchte dieses Problem bei einzelnen Versuchen auf. Im Folgenden soll auf die entsprechenden Versuche näher eingegangen werden.

Wurde z.B. die Aufnahme von Valsartan in die kanalikulären Plasmamembranvesikel bei variierenden pH-Werten des Inkubationsmediums gemessen (Kapitel 5.6.7), so lag ohne Korrektur des Bindungsanteils bei pH 6,0 wie auch bei pH 6,5 die ATP-unabhängige Aufnahme über der Aufnahme in Gegenwart von ATP plus regenerierendes System. Nach Bildung der Differenz ergab sich bei pH 6,0 eine ATP-abhängige Aufnahme von $-86,02 \pm 12,53$ pmol / mg Protein x Minute und bei pH 6,5 eine ATP-abhängige Aufnahme von $-13,15 \pm 17,62$ pmol / mg Protein x Minute. In einer Arbeit wurde dieses Problem gelöst, indem negative Werte einfach auf Null gesetzt wurden [Ni'inuma et al. 1999]. Dies ist statistisch nicht erlaubt, da die Ergebnisse des Versuchs insgesamt verzerrt werden. Außerdem ist unklar, wie die Daten anschließend noch logarithmisch umgeformt werden sollen. Denn weder der Logarithmus von Null noch von negativen Werten ist definiert. Dieses Problem trat z.B. bei der Untersuchung der Temperaturabhängigkeit des Valsartan-Transportes auf (Kapitel 5.6.8). Bei einer Temperatur des Inkubationsmediums von 7 °C betrug die ATP-abhängige Aufnahme ohne Korrektur des Bindungsanteils $-1,32 \pm 5,39$ pmol / mg Protein x Minute. Die Ermittlung der scheinbaren Aktivierungsenergie mit Hilfe eines Arrhenius-Diagramms war somit nicht möglich. Des Weiteren traten negative Werte bei den Hemmstoffversuchen auf (Kapitel 5.7), und zwar nur nach Vorinkubation mit Substraten des Mrp2 / cMoat in einer hohen Hemmstoffkonzentration, d.h. 1 mM bei GSSG, Pravastatin und BSP sowie 8 μ M bei Leukotriene C₄. Es müsste demnach bei allen Versuchen zusätzlich die Membranbindung untersucht werden. Zum einen ist dies jedoch versuchstechnisch nicht möglich, denn alle Messungen pro Versuch müssten zusätzlich bei einer Osmolarität von 450 mosm, 600 mosm und 900 mosm durchgeführt werden. Wenn man aber bedenkt, dass ein Versuch bei einer Standardosmolarität von 300 mosm bereits 12 bis 15 Stunden in Anspruch nimmt, so ist dies hinsichtlich der Transportaktivität der Vesikel und hinsichtlich der Versuchsdauer nicht realisierbar. Zum anderen würde dies zu einer immensen Erhöhung der Zahl der benötigten Versuchstiere führen.

Die einzige Möglichkeit, um dennoch die Bindung zu berücksichtigen, bestand darin, den mittels Osmoplot ermittelten Bindungsanteil für ATP mit regenerierendem System bzw. AMP in die Berechnung der ATP-abhängigen Aufnahme mit einzubeziehen. Dies ist gerechtfertigt, da sich dadurch die Tendenz der Versuchsergebnisse nicht verändert. Plasmamembranvesikel stellen an sich ein sehr artifizielles experimentelles System dar, so dass man durch eine quantitative Betrachtung der Versuchsergebnisse nicht exakt auf die In-vivo-Verhältnisse

schließen darf [Yamazaki et al. 1997, Ni'inuma et al. 1999]. Man kann lediglich anhand der Tendenz der Ergebnisse auf die tatsächlichen Transportmechanismen Rückschlüsse ziehen. In der vorliegenden Arbeit wurden daher die im Ergebnisteil näher beschriebenen Korrekturfaktoren eingesetzt.

6.2.6 Einfluss des pH-Wertes auf die Valsartan-Aufnahme

Der pH-Wert des Inkubationsmediums hat einen großen Einfluss auf den Transport in die kanalikulären Plasmamembranvesikel. Da die Zusammensetzung der benötigten Inkubationsmedien bei den einzelnen Versuchsansätzen sehr unterschiedlich war, musste der pH-Wert vor jeder Messung kontrolliert und gegebenenfalls neu eingestellt werden. Außerdem wurde der Valsartan-Transport bei verschiedenen pH-Werten des Inkubationsmediums gemessen, um festzustellen, bei welchem pH-Wert die maximale Transportrate erreicht werden kann. Der pH-Wert des Inkubationsmediums wurde zwischen pH 6,0 und pH 8,5 variiert, wobei das pH-Optimum des Valsartan-Transportes bei pH 7,4 lag. Es ist bekannt, dass Valsartan bei physiologischem pH-Wert vollständig dissoziiert als Di-Anion vorliegt (pK_a der Tetrazolgruppe = 4,73 und pK_a der Carboxylgruppe = 3,9) [Criscione et al. 1993], chemisch betrachtet sogar ab einem pH-Wert von 6,5 [vertrauliche Daten der Firma Novartis]. Man würde also das pH-Optimum bereits in diesem Bereich vermuten. Die kationische Substanz EMD 51921 ($pK_a = 5,8$ und $pK_a = 8,9$), ein Renin-Antagonist, die ebenfalls am Institut untersucht wurde, zeigt in kanalikulären Plasmamembranvesikeln, isoliert aus der Rattenleber, bei einem pH-Wert des Inkubationsmediums von pH 6,0 wie auch bei pH 8,0 die höchsten Aufnahmeleistungen [Ziegler et al. 1994, Kolac 1995]. Diese beiden pH-Optima liegen annähernd im Bereich der Dissoziationskonstanten.

Auffällig ist, dass die ATP-unabhängige Valsartan-Aufnahme (Aufnahme mit AMP) bei einem pH-Wert von 6,0 etwa dreimal so hoch ist wie die ATP-abhängige Valsartan-Aufnahme. Mit zunehmendem pH-Wert nimmt die ATP-unabhängige Aufnahme sukzessive ab. Erst bei einem pH-Wert von 7,4 ist sie schließlich niedriger als die ATP-abhängige Aufnahme. Eine Erklärung dafür ist äußerst schwierig, denn die Auswirkungen einer pH-Änderung sind im Gegensatz zu anderen Transportparametern kaum überschaubar. Schließlich verändert sich nicht nur der Dissoziationsgrad des Valsartan, sondern aller im Inkubationsmedium enthaltenen Substanzen. Auch die Carrierproteine sowie alle anderen Membranbestandteile erfahren eine Ladungsänderung.

6.2.7 Die Temperaturabhängigkeit des Valsartan-Transportes

Charakteristisch für aktive biologische Transportvorgänge ist ihre Abhängigkeit von der Temperatur. Wie bei allen spontan ablaufenden oder katalysierten physikochemischen Vorgängen steigt auch die Transportgeschwindigkeit mit der Temperatur exponentiell an [Höfer 1977]. Hinzu kommt, dass sich die Fluidität der Vesikelmembran an die Temperatur anpasst. Diese Lipid-Doppelmembran ist kein starres System, sondern die eingelagerten Membranproteine sind in einer Ebene beweglich, während sich die Phospholipide innerhalb der Membran drehen oder seitlich verschieben können [Liebich 1990]. Diese Beweglichkeit verändert sich allerdings nicht kontinuierlich mit der Temperatur, sondern es wurden plötzliche temperaturbedingte Phasenänderungen des Membranzustandes beobachtet [Kumamoto et. al. 1970].

Betrachtet man die Aufnahme des Valsartan, so findet bei 7 °C praktisch kein aktiver Transport statt. Mit steigenden Temperaturen wurden höhere Transportraten erreicht, mit einem Maximum bei 37 °C. Für höhere Temperaturen wurde die Transportaktivität nicht bestimmt, da bereits mit einer Denaturierung von Proteinen zu rechnen ist.

Zur Beschreibung der Temperaturabhängigkeit physikochemischer Vorgänge dient der $\Delta 10$ °C-Temperaturquotient (Q_{10} -Wert) sowie die scheinbare Aktivierungsenergie (A_{app}) [Höfer 1977]. Die Q_{10} -Werte der ATP-abhängigen Valsartan-Aufnahme liegen bei allen Temperaturintervallen zwischen 1,4 und 7, dies entspricht den nach Höfer angegebenen Werten für chemische Reaktionen. Bei physikalischen Vorgängen liegt nach Höfer der Q_{10} -Wert zwischen 1,03 und 1,3.

Mittels der Arrhenius-Gleichung wurde die scheinbare Aktivierungsenergie für den ATP-abhängigen Valsartan-Transport in die kanalikulären Plasmamembranvesikel mit 67,342 kJ / mol (16,087 kcal / mol) berechnet. Enzymkatalysierte Reaktionen und Transportvorgänge besitzen in der Regel eine scheinbare Aktivierungsenergie zwischen 29 und 105 kJ / mol (selten auch bis 147 kJ / mol), während die Aktivierungsenergie für passive Vorgänge (einfache Diffusion) einen Wert von 17 kJ / mol nicht übersteigt.

Die ATP-abhängige Aufnahme des im vorangegangenen Kapitel erwähnten EMD 51921 [Ziegler et al. 1994] in kanalikuläre Plasmamembranvesikel nimmt mit einer Temperaturerhöhung von 7 °C auf 17 °C, 27 °C und 37 °C in einer mit Valsartan vergleichbaren Größenordnung zu (7 °C: 9 ± 1 pmol / mg Protein x 30 s; 17 °C: 20 ± 2 ; 27 °C: 53 ± 3 ; 37 °C: 123 ± 6 pmol / mg Protein x 30 s). Die Q_{10} -Werte der angegebenen Temperaturintervalle lagen

zwischen 2,4 und 2,6. Nach Transformation der Daten in Anlehnung an Arrhenius wurde eine scheinbare Aktivierungsenergie von 62 kJ / mol ermittelt.

Substrate des Mrp2 / cMoat, wie z.B. Leukotriene C₄ [Ishikawa et al. 1990], Östron-17β-Glukuronid [Vore et al. 1996], Bilirubin-Diglukuronid [Nishida et al. 1992b] oder Sulfo-bromophthalein [Nishida et al. 1992a] wie auch Taurocholat, ein Substrat des cBST, werden temperaturabhängig in die kanalikulären Plasmamembranvesikel transportiert. Die ATP-abhängige Aufnahme wurde allerdings nur bei einer Temperatur von 37 °C bzw. 0 °C, 4 °C oder 7 °C gemessen, so dass weder die Q₁₀-Werte noch die scheinbare Aktivierungsenergie berechnet werden konnten.

6.2.8 Die Valsartan-Aufnahme in kanalikuläre „inside-out“-Plasmamembranvesikel

In der vorliegenden Arbeit wurde für alle Versuche eine Mischfraktion aus „inside-out“- und „right side-out“-Vesikeln verwendet. Doch nur „inside-out“-orientierte Vesikel, bei denen die ATP-bindende Domäne zur Außenseite gerichtet ist, sind in der Lage, radioaktiv markierte Substanzen ins Vesikelinnere ATP-abhängig zu transportieren [Keppler et al. 1998]. Aus diesem Grund müsste die ATP-abhängige Aufnahme pro mg Protein in reinen „inside-out“-Vesikeln gegenüber einer Mischfraktion aus „inside-out“- und „right side-out“-Vesikeln signifikant höher sein. Doch Aufnahmemessungen von Valsartan in eine reine „inside-out“-Fraktion ergab keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Aufnahme in eine Mischfraktion. Die Ursache dafür liegt sehr wahrscheinlich in der sehr aufwendigen Präparationsmethode von kanalikulären „inside-out“-Vesikeln. Während der affinitätschromatographischen Trennung mit Hilfe von Con A-Sepharose werden die empfindlichen Vesikel sehr stark gestresst. Die Vesikel müssen 15 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt werden, damit eine Bindung der „right side-out“-Vesikel stattfinden kann. Durch diese hohen Temperaturschwankungen verlieren die Vesikel wahrscheinlich bereits an Transportaktivität. Zudem sind die Vesikel während der beiden notwendigen Zentrifugationsschritte zum Umpuffern einer sehr starken Beanspruchung unterworfen.

Nishida et al. (1991 / 1992a) präparierten kanalikuläre „inside-out“-Plasmamembranvesikel nach einer Methode, die von Inoue et al. (1983) und Kamimoto et al. (1989) beschrieben wurde. Diese beruht auf dem Prinzip einer antikörperinduzierten Dichteänderung. Eine Mischfraktion aus kanalikulären „inside-out“- und „right side-out“-Vesikeln wird mit Antikörpern inkubiert, die gegen die auf der Außenseite der kanalikulären Membran lokalisierte

γ -Glutamyltransferase gerichtet sind. Diese Antikörper binden daher nur an „right side-out“-orientierte Vesikel, wodurch diese ein höheres spezifisches Gewicht als „inside-out“-orientierte Vesikel erlangen. Nach weiteren Zwischenschritten und anschließender Zentrifugation mit Hilfe eines kontinuierlichen Saccharosegradienten erhält man schließlich eine Fraktion höherer Dichte, in der sich die „right side-out“-Vesikel angereichert haben, sowie eine Fraktion niedrigerer Dichte, die reine „inside-out“-Vesikel enthält. Mit Hilfe dieser Präparationsmethode konnten durchschnittlich 10 % kanalikuläre „inside-out“-Vesikel und 90 % kanalikuläre „right side-out“-Vesikel gewonnen werden. Obwohl diese Methode ebenfalls sehr aufwendig ist, ließ sich die ATP-abhängige Aufnahme von BSP [Nishida et al. 1992a] in auf diese Art isolierte „inside-out“-Vesikel um das 6fache gegenüber einer Mischfraktion steigern, die ATP-abhängige Aufnahme von Taurocholat [Nishida et al. 1991] sogar um das 10fache. Kanalikuläre „right side-out“-Vesikel zeigten dagegen weder eine Aufnahme von BSP noch eine Aufnahme von Taurocholat.

6.2.9 Die Valsartan-Aufnahme in kanalikuläre Plasmamembranvesikel von TR⁻-Ratten

Mit Hilfe von kanalikulären Plasmamembranvesikeln, isoliert aus der Leber von TR⁻-Ratten, kann eindeutig eine Beteiligung des Mrp2 / cMoat am Transport von Substraten bewiesen werden. Weder Leukotriene C₄ noch GSSG oder S-(2,4-dinitrophenyl)-Glutathion werden in Membranvesikel transportdefizienter Ratten ATP-abhängig transportiert [Fernandez-Checa et al. 1992, Huber et al. 1987, Oude Elferink et al. 1989]. Dagegen bleibt der Transport von Taurocholat, ein spezifisches Substrat des cBST, unbeeinflusst. Eine entsprechende ATP-abhängige Taurocholat-Aufnahme ist zudem beweisend für die funktionelle Intaktheit der Membran [Adachi et al. 1991, Müller et al. 1991, Nishida et al. 1992].

Entsprechende Untersuchungen wurden in der vorliegenden Arbeit durchgeführt. Der Transportdefekt der TR⁻-Ratten hat einen signifikanten Einfluss auf die ATP-abhängige Aufnahme von Valsartan, nicht aber auf die ATP-abhängige Taurocholat-Aufnahme. Die Transportrate von Valsartan in die Vesikel ist bei TR⁻-Ratten im Vergleich zu normalen Wistar-Ratten um 50 % reduziert. Diese Ergebnisse decken sich mit denen der Galleausscheidungsstudie. Wäre einzig das Transportprotein Mrp2 / cMoat am Transport beteiligt, so dürfte gar keine ATP-abhängige Valsartan-Aufnahme messbar sein. Mit Hilfe der durchgeführten Hemmstoffversuche (siehe Kapitel 6.3.11) konnte allerdings eine Beteiligung des P-Glykoproteins und

des kanalikulären Gallensäure-Transporters cBST am Transport von Valsartan ausgeschlossen werden. Verschiedene Studien lassen jedoch darauf schließen, dass neben Mrp1 und Mrp2 andere sogenannte „Mrp-homologe“ organische Anionen-Transporter mit einer unterschiedlichen Substratspezifität in der Leberzelle vorkommen [König et al. 1999, Kool et al. 1999, Ortiz et al. 1999, Madon et al. 2000]. Basierend auf Transportstudien in kanalikuläre Plasmamembranvesikel, isoliert aus der Leber von Mrp2-defizienten Rattenstämmen, wurde ebenfalls wiederholt vermutet, dass an der biliären Elimination von cyclischen und linearen hydrophoben Peptiden ein zusätzliches ATP-abhängiges Carrierprotein beteiligt sein muss [Ziegler et al. 1994, Yamada et al. 1996, Takahashi et al. 1997].

6.2.10 Einfluss von Hemmstoffen auf den Valsartan-Transport

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Hemmstoffversuche belegen ebenfalls eindeutig, dass das Transportsystem Mrp2 / cMoat am Transport von Valsartan beteiligt ist. Sowohl GSSG als auch der HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor Pravastatin und BSP hemmen die Aufnahme von Valsartan in die kanalikulären Plasmamembranvesikel. Zur Feststellung des Hemmtyps wurde der Einfluss von Leukotriene C₄ auf die Aufnahme von Valsartan untersucht. Die Aufnahme von 50 µM bzw. 100 µM [¹⁴C]-Valsartan wurde nach Vorinkubation der Plasmamembranvesikel mit Inkubationsmedium, dem als Hemmstoff Leukotriene C₄ in den Konzentrationen 2 µM / 4 µM / 6 µM / 8 µM zugesetzt wurde, gemessen. Leukotriene C₄ hemmt in steigender Konzentration die Aufnahme von Valsartan in die Plasmamembranvesikel signifikant. Im Vergleich dazu benötigten Leier et al. (1996) nur eine Leukotriene-C₄-Konzentration von 0,5 µM, um den Transport von [³H]-GSSG in Membranvesikel von MRP-transfizierten HeLa-T5-Zellen kompetitiv zu hemmen. Trotzdem lässt sich durch Auftragung der kinetischen Daten nach Dixon eindeutig ein kompetitiver Hemmtyp ermitteln. Dagegen lässt die Auftragung nach Cornish-Bowden keine eindeutige Feststellung des Hemmtyps zu. Es wäre daher interessant gewesen, umgekehrt die Aufnahme von [³H]-Leukotriene C₄ in Gegenwart von Valsartan zu hemmen. Doch ist es nicht gelungen, eine ATP-abhängige [³H]-Leukotriene-C₄-Aufnahme in die isolierten kanalikulären Plasmamembranvesikel entsprechend Ishikawa et al. (1990) zu messen (Diese Ergebnisse wurden nicht veröffentlicht). Dies lag an einer sehr hohen Filterbindung von [³H]-Leukotriene C₄ in allen Ansätzen. Dieses Problem ließ sich weder durch Einsatz verschiedener zur Verfügung stehender Filterarten noch durch Vorinkubation mit GSH beheben. GSH wird bei Vesikelaufnahmen

häufig eingesetzt, um die Bindung von Leukotriene C₄ an membranständige Glutathion-S-Transferasen, die Leukotriene C₄ in seinen Metaboliten Leukotriene D₄ umwandeln, zu verhindern [Böhme et al. 1994]. Sehr wahrscheinlich reicht die Qualität der Plasmamembranvesikel für Transportmessungen mit Substanzen, die eine derart hohe Affinität besitzen, nicht aus.

Die Galleausscheidungsstudie und die Aufnahmemessungen in kanalikuläre Plasmamembranvesikel, isoliert aus der Leber von TR⁻-Ratten, ließen darauf schließen, dass noch ein weiteres Transportprotein am Valsartan-Transport beteiligt ist. Mit Hilfe der durchgeführten Hemmstoffversuche konnte allerdings ausgeschlossen werden, dass es sich um das P-Glykoprotein (Mdr 1a) oder den kanalikulären Gallensäure-Transporter cBST handelt. Als typische Substrate des P-Glykoproteins (Mdr 1a) wurden Verapamil und Daunomycin ausgewählt. Diese beiden Substanzen interferieren nicht mit der ATP-abhängigen Aufnahme von [³H]-Leukotriene C₄ und [³H]-S-(2,4-dinitrophenyl)-Glutathion [Ishikawa et al. 1990]. Der Valsartan-Transport wurde ebenfalls weder durch Verapamil noch durch Daunomycin gehemmt. Auch Taurocholat und Cholat, Substrate des cBST, zeigen in einer Konzentration von 100 µM keine Hemmung. Die festgestellte Hemmung bei einer Konzentration von 1 mM ist auf die hohe Detergenzwirkung beider Substanzen auf die Vesikel zurückzuführen [Boyer und Meier 1990].

6.3 Schlussbetrachtung

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten In-vivo-Galleausscheidungsstudien und -Organverteilungsstudien in Wistar-Ratten im Vergleich zu TR⁻-Ratten als auch Aufnahmemessungen in kanalikuläre Plasmamembranvesikel, isoliert aus der Leber dieser beiden Rattenstämme, haben gezeigt, dass an der biliären Elimination des Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonisten Valsartan ATP-abhängige als auch ATP-unabhängige Transportmechanismen beteiligt sind.

Für die ATP-abhängige Aufnahme von Valsartan ist zum einen das kanalikuläre Transportsystem Mrp2 / cMoat verantwortlich und zum anderen ein zusätzliches ATP-abhängiges Carrierprotein, welches auch in der kanalikulären Plasmamembran von TR⁻-Ratten exprimiert wird. Es handelt sich dabei vermutlich um ein Mrp-homologes Transportsystem, da anhand von Hemmstoffversuchen eine Beteiligung des kanalikulären P-Glykoproteins (Mdr 1a) und des ATP-abhängigen Gallensäuretransporters (cBST) ausgeschlossen werden konnte.

Unter den neuen Mitgliedern der MRP-Familie, die in menschlichem Gewebe und Krebszelllinien identifiziert wurden, werden MRP3 und MRP6 in der Leber exprimiert [Kool et al. 1997 / 1999a]. Das Gleiche gilt für ihre Ratten-Homologe Mrp3 (oder auch MLP-2 genannt) und Mrp6 (oder auch MLP-1 genannt) [Hirohashi et al. 1998 / 1999]. Wie in der Einleitung bereits erwähnt, werden diese beiden Isoformen in der normalen Leber auf einem niedrigen Niveau exprimiert [Kamisako et al. 1999]. Doch in mutanten Rattenstämmen, die einen Defekt des Mrp2 / cMoat aufweisen, sowie während einer experimentellen Cholestase, konnte eine Induktion des Mrp3 festgestellt werden [Hirohashi et al. 1998 / 1999, Ortiz et al. 1999]. Die genaue physiologische Funktion bleibt allerdings noch ungeklärt [Hirohashi et al. 1999]. Auch hinsichtlich der Lokalisation des MRP3 / Mrp3 ist man sich noch nicht einig. König et al. (1999) und Kool et al. (1999b) belegen, dass MRP3 / Mrp3 auf der basolateralen Seite der Leberzelle vorkommt, während Ortiz et al. (1999) von der Expression dieses Transportsystems in der kanalikulären Plasmamembran berichten. Einige Autoren gehen davon aus, dass man den in Mrp2-defizienten Ratten verbleibenden Transport organischer Anionen nicht einfach dem Mrp3 zuschreiben kann [Jansen et al. 1993, Shin et al. 1997, Kusuhara et al. 1998, Akhteruzzaman et al. 1999]. Im Gegensatz dazu konnte Mrp6 als lateraler und kanalikulärer ABC-Transporter in Rattenhepatozyten charakterisiert werden [Madon et al. 2000]. Diese Arbeitsgruppe hat jedoch die Substratspezifität des Mrp6 überprüft und festgestellt, dass keines der typischen Substrate des Mrp2, wie z.B. Leukotriene C₄, S-(2,4-dinitrophenyl)-Glutathion, Östron-17-β-Glukuronid und GSSG, in Vesikel isoliert aus Mrp6-überexprimierenden Sf9-Zellen aufgenommen wird. Daher ist auch unwahrscheinlich, dass Valsartan über dieses Transportsystem transportiert wird. Dies ließe sich allerdings ebenso nur durch Transportstudien mit Hilfe von Mrp6-überexprimierenden Zelllinien nachweisen. Interessant wäre zudem die Entwicklung eines den Mrp2-defizienten Rattenstämmen entsprechenden Tiermodells, wie z.B. Mrp6-„knock-out“-Mäuse.

Außerdem bleibt noch zu klären, wodurch die in der vorliegenden Arbeit festgestellte hohe ATP-unabhängige Aufnahme des Valsartan in die kanalikulären Plasmamembranvesikel verursacht wird. Verunreinigungen der Membranfraktion mit intrazellulären Bestandteilen oder basolateralen Membranen könnten dabei eine Rolle spielen oder vielleicht existiert in der kanalikulären Plasmamembran ein ATP-unabhängiges Transportsystem, welches noch nicht identifiziert werden konnte. Es war jedoch nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit, diesen ATP-unabhängigen Transport näher zu charakterisieren.

7 Zusammenfassung

Die molekularen Mechanismen der biliären Elimination des Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonisten Valsartan wurden in vivo und mit Hilfe von kanalikulären Plasmamembranvesikeln, isoliert aus der Leber von normalen Wistar-Ratten und transportdefizienten TR⁻-Ratten, untersucht.

Nach intravenöser Injektion von [¹⁴C]-Valsartan (1 mg / kg) in eine Mesenterialvene, wurde die radioaktiv markierte Substanz rasch in die Galle von normalen Wistar-Ratten eliminiert. Drei Stunden nach der Injektion konnten 81 % der Substanz in der Galle festgestellt werden. Im Gegensatz dazu wurde [¹⁴C]-Valsartan bei TR⁻-Ratten, die einen Defekt des kanalikulären Transportes organischer Anionen aufweisen (Fehlen des Transportsystems Mrp2 / cMoat), hauptsächlich im Blut angereichert, nur 39 % wurden über die Galle ausgeschieden.

In isolierte kanalikuläre Plasmamembranvesikel von normalen Wistar-Ratten wurde [¹⁴C]-Valsartan ATP-abhängig aufgenommen. Dieser ATP-abhängige Anteil des Transportes war in isolierte Plasmamembranvesikel von TR⁻-Ratten um 50 % vermindert. Dies deutet darauf hin, dass Valsartan ein Substrat des kanalikulären multispezifischen organischen Anionen Transporters cMoat / Mrp2 ist sowie eines anderen ATP-abhängigen Transporters, welcher auch in TR⁻-Ratten exprimiert wird.

Die ATP-abhängige Aufnahme von [¹⁴C]-Valsartan in isolierte kanalikuläre Plasmamembranvesikel von normalen Wistar-Ratten stieg bis zu einer Sättigung an, wenn bei einer Valsartan-Konzentration von 57 µM die ATP-Konzentration von 0,5 auf 3,0 mM erhöht wurde ($K_m (ATP) = 1,449 \text{ mM}$, $v_{max} (ATP) = 62,22 \text{ pmol / mg Protein x Minute}$). ATP in Gegenwart oder Abwesenheit eines ATP-regenerierenden Systems war von den verschiedenen Nucleotiden, die untersucht wurden, für die Valsartan-Aufnahme am effektivsten. Die nicht hydrolysierbaren Analoga (AMP, Adenosin, AMP-PCP) konnten die Aufnahme nicht signifikant steigern.

Für transportkinetische Studien wurde Valsartan in einem weiten Konzentrationsbereich eingesetzt (10 - 500 µM). Eine Sättigung wurde bei der ATP-abhängigen ($K_m = 65,91 \text{ µM}$, $v_{max} = 145,83 \text{ pmol / mg Protein x Minute}$) wie auch bei der ATP-unabhängigen Aufnahme ($K_m = 264,94 \text{ µM}$, $v_{max} = 1322,69 \text{ pmol / mg Protein x Minute}$) beobachtet. Diese ATP-unabhängige Aufnahme wurde in der vorliegenden Studie nicht weiter charakterisiert.

Die ATP-abhängige Valsartan-Aufnahme ist temperaturabhängig. Eine nicht signifikante Vesikel-assoziierte [¹⁴C]-Valsartan-Aufnahme konnte bei einer Temperatur von 7 °C festgestellt werden. Wurde die Temperatur von 7 °C auf 17 °C, 27 °C und 37 °C erhöht, so nahm auch die ATP-abhängige Aufnahme von [¹⁴C]-Valsartan zu. Q₁₀-Werte zwischen 1,4 und 7 sprechen für einen transmembranären Transport. Nach Transformation der Daten in Anlehnung an Arrhenius konnte eine scheinbare Aktivierungsenergie von 67,342 kJ / mol ermittelt werden.

Darüber hinaus wurde die ATP-abhängige Aufnahme von [¹⁴C]-Valsartan durch den pH-Wert und die Osmolarität des Inkubationsmediums beeinflusst. Durch Transformation der Daten in einen Osmoplot konnte die unspezifische Bindung von [¹⁴C]-Valsartan an die Membranen ermittelt werden.

GSSG, Pravastatin und BSP, typische Substrate des kanalikulären multispezifischen Anionen-Transporters Mrp2 / cMoat, sind potentielle Inhibitoren des Transportes von [¹⁴C]-Valsartan. Auch Leukotriene C₄, das Substrat mit der höchsten Affinität, hemmte die ATP-abhängige Aufnahme von [¹⁴C]-Valsartan kompetitiv. Doch weder Taurocholat und Cholat, Substrate des kanalikulären Gallensäuretransporters, noch Daunomycin und Verapamil, Substrate des P-Glykoproteins (Mdr1), zeigten einen hemmenden Effekt.

Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass der Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonist Valsartan über die Galle durch das kanalikuläre multispezifische organische Anionen Transportsystem Mrp2 / cMoat eliminiert wird, und dass darüber hinaus ein zweites ATP-abhängiges Transportsystem beteiligt ist, aller Wahrscheinlichkeit nach eines der neuen Mitglieder der Mrp-Familie.

8 Summary

The molecular mechanisms of the biliary elimination of the angiotensin-II-receptor-antagonist Valsartan were investigated in vivo and in isolated canalicular membrane vesicles from normal Wistar-rat and transport-deficient TR⁻-rat liver.

After intravenous application of [¹⁴C]-Valsartan (1 mg / kg) into a mesenteric vein the radioactive compound was rapidly eliminated into bile of normal Wistar-rats. Three hours after application 81 % of the compound could be detected in bile. In contrast, in TR⁻-rats, defective in the canalicular transport of organic anions (absence of the transport system Mrp2 / cMoat), [¹⁴C]-Valsartan was predominantly found in blood, only 39 % were excreted with the bile.

In isolated canalicular plasma membrane vesicles from normal Wistar-rats [¹⁴C]-Valsartan was taken up in an ATP-dependent manner. This ATP-dependent part of the transport was diminished to 50 % in isolated plasma membrane vesicles from TR⁻-rats. This points to the fact that Valsartan is a substrate of the canalicular multispecific organic anion transporter cMoat / Mrp2 and of another ATP-dependent transporter that is also expressed in TR⁻-rats.

The ATP-dependent transport of [¹⁴C]-Valsartan into isolated canalicular plasma membrane vesicles from normal Wistar-rats increased to the point of saturation when the Valsartan concentration was 57 μM and the ATP concentration was increased from 0,5 to 3,0 mM ($K_m(ATP) = 1,449$ mM, $v_{max(ATP)} = 62,22$ pmol / mg protein x minute). ATP in the presence or absence of an ATP-regenerating system was most effective for Valsartan uptake among the several nucleotides studied. The nonhydrolyzable analogues (AMP, Adenosin, AMP-PCP) could not stimulate the uptake significantly.

Transport kinetic studies were performed over a wide range of Valsartan concentration (10 - 500 μM). Saturation was observed both in the ATP-dependent ($K_m = 65,91$ μM, $v_{max} = 145,83$ pmol / mg protein x minute) and ATP-independent ($K_m = 264,94$ μM, $v_{max} = 1322,69$ pmol / mg protein x minute) uptake. This ATP-independent uptake was not further characterized in this study presented.

The ATP-dependent uptake of Valsartan was temperature dependent. There was little increase in vesicle-associated [¹⁴C]-Valsartan uptake by 7 °C. Increasing the temperature from 7 °C to 17 °C, 27 °C and 37 °C increased the ATP-dependent uptake of [¹⁴C]-Valsartan. Q₁₀ values between 1,4 and 7 indicate transmembrane transport. By transforming the data to Arrhenius, an apparent activation energy of 67,342 kJ / pmol was determined.

Furthermore the ATP-dependent uptake of [¹⁴C]-Valsartan was influenced by the pH value and the osmolarity of the incubation medium. By transforming the data to an osmoplot the non-specific binding of [¹⁴C]-Valsartan to the membranes could be determined.

GSSG, Pravastatin and BSP, typical substrates of the canalicular multispecific anion transporter Mrp2 / cMoat, are potent inhibitors of [¹⁴C]-Valsartan transport. Leukotriene C₄, the substrate with the highest affinity, competitively inhibited the ATP-dependent transport of [¹⁴C]-Valsartan. In contrast taurocholate and cholate, substrates of the canalicular bile salt transporter cBST, as well as Daunomycin and Verapamil, substrates of the P-glycoprotein (Mdr1), did not inhibit Valsartan transport.

These results indicate that the angiotensin-II-receptor-antagonist Valsartan is eliminated via the bile by the canalicular multispecific organic anion transporter Mrp2 / cMoat, and that an additional ATP-dependent transport system is involved, in all probability one of the recently identified members of the Mrp family.

9 Literaturverzeichnis

ADACHI, Y., KOBAYASHI, H., KURUMI, Y., SHOUJI, M., KITANO, M.,
YAMAMOTO, T.

ATP-dependent taurocholate transport by rat liver canalicular membrane vesicles
Hepatology **14**, 655-659 (1991)

AKHTERUZZAMAN, S., KATO, Y., HISAKA, A., SUGIYAMA, Y.

Primary active transport of peptidic endothelin antagonist by rat hepatic canalicular
membrane

J. Pharmacol. Exp. Ther. **288**, 575-581 (1999)

ANWER, M.S., KROKER, K. & HEGNER, D.

Cholic acid uptake into isolated rat hepatocytes

Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **357**, 1477-1486 (1976a)

ANWER, M.S., KROKER, K. & HEGNER, D.

Effect of albumin on bile acid uptake by isolated rat hepatocytes. Is there a common bile acid
carrier ?

Biochem. Biophys. Res. Comm. **73**, 63-71 (1976b)

BALLATOREI, N., TRUONG, A.T.

Multiple canalicular transport mechanisms for glutathione S-conjugates

J. Biol. Chem. **270**, 3594-3601 (1995)

BAUER, J.H., REAMS, G.P.

The Angiotensin II Type 1 Receptor Antagonists: A New Class of Antihypertensive Drugs

Arch. Intern. Med. **155**, 1361-1368 (1995)

BON, C.J., BENEDETTE, E.K., RÜMKE, P.H.

Studies of plasma membranes I. chemical composition and enzyme content of plasma
membranes isolated from rat liver

Biochem. Bioph. Acta **90**, 126 (1964)

BOYER, J.L., MEIER, P.J.

Characterizing mechanisms of hepatic bile acid transport utilizing isolated membrane
vesicles

Methods in Enzymology **192**, 517-533 (1990)

BROEKS, A., GERRARD, B., ALLIKMETS, R., DEAN, M., PLASTERK, R.H.A.

Homologues of the human multidrug resistance genes MRP and MDR contribute to heavy
metal resistance in the soil nematode *Caenorhabditis elegans*

EMBO J. **15**, 6132-6143 (1996)

BROOKMAN, L.J., ROLAN, P.E., BENJAMIN, I.S., PALMER, K.R., WYLD, P.J.,

LLOYD, P., FLESCH, G., WALDMEIER, F., SIOUFI, A., MULLINS, F.

Pharmacokinetics of valsartan in patients with liver disease

Clin. Pharmacol. Ther. **62**, 272-278 (1997)

- BÜCHLER, M., KÖNIG, J., BROM, M., KARTENBECK, J., SPRING, H., HORIE, T., KEPLER, D.
cDNA 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**, 15091-15098 (1996)
- BURNIER, M., BRUNNER, H.R.
Comparative Antihypertensive Effects of Angiotensin II Receptor Antagonists
J. Am. Soc. Nephrol. **10**, 278-282 (1999)
- BUSCHMAN, E., ARCECI, R.J., CROOP, J.M. et al.
Mdr2 encodes P-glycoprotein expressed in the bile canalicular membrane as determined by isoform-specific antibodies
J. Biol. Chem. **267**, 18093-9 (1992)
- BUSCHMAN, E., GROS, P.
The inability of the mouse mdr2 gene to confer multidrug resistance is linked to reduced drug binding to the protein
Cancer Res. **54**, 4892-8 (1994)
- CHILDS, S., YEH, R., GEORGES, E., LING, V.
Identification of a sister gene to P-glycoprotein
Cancer Res. **55**, 2029-2034 (1995)
- COHEN, D.E.
Hepatocellular transport and secretion of biliary lipids
Current Opinion in Lipidology **10**, 295-302 (1999)
- COLE, S.P.C., BHARDWAJ, G., GERLACH, J.H., MACKIE, J.E., GRANT, C.E., ALMQUIST, K.C., STEWART, A.J., KURZ, E.U., DUNCAN, A.M.V., DEELEY, R.G.
Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line
Science **258**, 1650-1654 (1992)
- COLUSSI, D.M., PARISOT, C., ROSSOLINO, M.L., BRUNNER, L.A., LEFEVRE, G.Y.
Protein Binding in Plasma of Valsartan, a New Angiotensin II Receptor Antagonist
J. Clin. Pharmacol. **37**, 214-221 (1997)
- COOPER, T.G.
Biochemische Arbeitsmethoden
Walter de Gruyter-Verlag (1980)
- CRISCIONE, L., DE GASPARO, M., BÜHLMAYER, P., WHITEBREAD, S., RAMJOUE, H.-P.R., and WOOD, J.
Pharmacological profile of valsartan: a potent, orally active, nonpeptide antagonist of the angiotensin II AT₁-receptor subtype.
Br. J. Pharmacol. **110**, 761-771 (1993)
- CUI, Y., KÖNIG, J., BUCHHOLZ, U., SPRING, H., LEIER, I., KEPLER, D.
Drug Resistance and ATP-Dependent Conjugate Transport Mediated by the Apical Multidrug Resistance Protein, MRP2, Permanently Expressed in Human canine Cells
Molecular Pharmacology **55**, 929-937 (1999)

- DE GASPARO, M., WHITEBREAD, S.
Binding of valsartan to mammalian angiotensin AT₁ receptors
Regulatory Peptides **59**, 303-311 (1995)
- DE VREE, J.M.L., JACQUEMIN, E., STURM, E., CRESTEIL, D., BOSMA, P.J., ATEN, J.,
DELEUZE, J.F., DESROCHERS, M., BURDELSKI, M., BERNARD, O. et al.
Mutations in the MDR3 gene cause progressive familial intrahepatic cholestasis
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95**, 282-287 (1998)
- DIXON, M.
The determination of enzyme inhibitor constants
Biochem. J. **55**, 170-171 (1953)
- DONALDSON, H.H.
The rat
Hrsg.-Verlag (1924)
- DUBIN, I.N., JOHNSON, F.B.
Chronic idiopathic jaundice with unidentified pigment in liver cells: a new clinicopathologic
entity with report of 12 cases
Medicine **33**, 155-179 (1954)
- FÖLLMANN, W., PETZINGER, E. & KINNE, R.K.H.
Alteration of bile acid and bumetanide uptake during culturing of rat hepatocytes
Am. J. Physiol. **258** (*Cell. Physiol.* **27**), C700-C712 (1990)
- FORTH, W., HENSCHLER, D., RUMMEL, W., STARKE, K.
Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie
Wissenschaftsverlag, 6.Auflage (1992)
- GERLOFF, T., STIEGER, B., HAGENBUCH, B., MADON, J., LANDMANN, L.,
ROTH, J., HOFMANN, A.F., MEIER, P.J.
The sister of P-glycoprotein represents the canalicular bile salt export pump of mammalian
liver
J. Biol. Chem. **273**, 10046-10050 (1998)
- GODFROY, O.
Induktion eines MDR Genproduktes in der Schweineleber durch Ochratoxin und
Acetylaminofluoren
Dissertation Gießen (1996)
- GOTTESMAN, M.M., PASTAN, I.
Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter
Annu. Rev. Biochem. **62**, 385-427 (1993)
- GRIENDLING, K.K., LASSEGUE, B., ALEXANDER, R.W.
Angiotensin Receptors and their therapeutic implications.
Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. **36**, 281-306 (1996)

GRIENDLING, K.K., MURPHY, T.J., ALEXANDER, R.W.
Molecular biology of the renin-angiotensin system
Circulation **87**,1816-1828 (1993)

HAGEMANN, E., SCHMIDT, G.
Ratte und Maus; Versuchstiere in der Forschung
Walter de Gruyter-Verlag (1960)

HARPER, A.E., BERGMAYER, H.U.
Methoden der enzymat. Analyse
Verlag Chemie, Weinheim (1962)

HEIJN, M.
Characterization of ATP-dependent organic anion transport
Dissertation Amsterdam (1994)

HIGGINS, C.F., HILES, I.D., SALMOND, G.P.C., GILL, D.R., DOWNIE, J.A., EVANS, I.J., HOLLAND, B., GRAY, L., BUCKEL, S.D., BELL, A.W., HERMODSON, M.A.
A family of related ATP-binding subunits coupled to many distinct biological processes in bacteria
Nature **323**, 448-450 (1986)

HIROHASHI, T., SUZUKI, H., ITO, K., OGAWA, K., KUME, K., SHIMIZU, T., SUGIYAMA, Y.
Hepatic expression of multidrug resistance-associated protein-like proteins maintained in Eisai hyperbilirubinemic rats
Mol. Pharmacol. **53**, 1068-1075 (1998)

HIROHASHI, T., SUZUKI, H., SUGIYAMA, Y.
Characterization of the transport properties of cloned rat multidrug resistance-associated protein 3 (MRP3)
J. Biol. Chem. **274**, 15181-15185 (1999)

HÖFER, M.
Transport durch biologische Membranen
Verlag Chemie, 1. Auflage (1977)

HUBER, M., GUHLMANN, A., JANSEN, P.L.M., KEPPLER, D.
Hereditary defect of hepatobiliary cysteinyl leukotriene elimination in mutant rats with defective hepatic anion excretion
Hepatology **7**, 224-228 (1987)

HUI, K.Y., SIRAGY, H.M., HABER, E.
Design of potent substrate-analogue inhibitors of canine renin
Int. J. Peptide Protein Res. **40**, 152-160 (1992)

INOUE, M., KINNE, R., TRAN, T., ARIAS, I.M.
Taurocholat transport by rat liver canalicular membrane vesicles: evidence for the presence of an Na⁺-independent transport system
J. Clin. Invest. **73**, 659-663 (1984)

- INOUE, M., KINNE, R., TRAN, T., BIEMPICA, L., ARIAS, I.M.
Rat liver canalicular membrane vesicles: isolation and topological characterization
J. Biol. Chem. **258**, 5183-5188 (1983)
- INOUE, M., KINNE, R., TRAN, T., ARIAS, I.M.
Taurocholate transport by rat liver sinusoidal membrane vesicles: evidence of sodium cotransport
Hepatology **2**, 572-579 (1982)
- ISHIKAWA, T., MÜLLER, M., KLÜNEMANN, C., SCHAUB, T., KEPPLER, D.
ATP-dependent primary active transport of cysteinyl leukotrienes across liver canalicular membrane. Role of the ATP-dependent transport system for glutathione S-conjugates
J. Biol. Chem. **265**, 19279-19286 (1990)
- ISHIKAWA, T., MÜLLER, M., KLÜNEMANN, C., SCHAUB, T., KEPPLER, D.
ATP-dependent primary active transport of cysteinyl leukotrienes across liver canalicular membrane
J. Biol. Chem. **265**, 1-8 (1990)
- JANSEN, P.L.M., VAN KLINKEN, J.W., VAN GELDER, M., OTTENHOFF, R., OUDE ELFERINK, R.P.J.
Preserved organic anion transport in mutant TR⁻ rats with a hepatobiliary secretion defect
Am. J. Physiol. **265**, G445-452 (1993)
- JANSEN, P.L.M., PETERS, W.H., LAMERS, W.H.
Hereditary chronic conjugated hyperbilirubinemia in mutant rats caused by defective hepatic anion transport
Hepatology **5**, 573-579 (1985)
- JEDLITSCHKY, G., LEIER, I., BUCHHOLZ, U., BARNOUIN, K., KURZ, G., KEPPLER, D.
Transport of Glutathione, Glucuronate, and Sulfate Conjugates by the MRP Gene-encoded Conjugate Export Pump
Cancer Research **56**, 988-994 (1996)
- JEDLITSCHKY, G., LEIER, I., BUCHHOLZ, U., CENTER, M., KEPPLER, D.
ATP-dependent transport of glutathione-S-conjugates by the multidrug resistance-associated protein
Cancer Research **54**, 4833-4836 (1994)
- JEDLITSCHKY, G., LEIER, I., BUCHHOLZ, U., HUMMEL-EISENBEISS, J., BURCHELL, B., KEPPLER, D.
ATP-dependent transport of bilirubin glucuronides by the multidrug resistance protein MRP1 and its hepatocyte canalicular isoform MRP2
Biochem. J. **327**, 305-310 (1997)
- KAMIMOTO, Y., GATMAITAN, Z., HSU, J., ARIAS, I.M.
The function of Gp 170, the multidrug resistance gene product, in rat liver canalicular membrane vesicles
J. Biol. Chem. **264**, 11693-11698 (1989)

- KAMISAKO, T., GABAZZA, E.C., ISHIHARA, T., ADACHI, Y.
Molecular aspects of organic compound transport across the plasma membrane of hepatocytes
Journal of Gastroenterology and Hepatology **14**, 405-412 (1999)
- KARTENBECK, J., LEUSCHNER, U., MAYER, R., KEPPLER, D.
Absence of the canalicular isoform of the MRP gene-encoded conjugate export pump from the hepatocytes in Dubin-Johnson syndrome
Hepatology **23**, 1061-1066 (1996)
- KATO, Y., IGARASHI, T., SUGIYAMA, Y.
Both cMOAT / MRP2 and another unknown transporter(s) are responsible for the biliary excretion of glucuronide conjugate of the nonpeptide angiotensin II antagonist, Telmisartan
Drug Metabolism And Disposition **28**, 1146-1148 (2000)
- KEPPLER, D., JEDLITSCHKY, G., LEIER, I.
Transport function and substrate specificity of multidrug resistance protein
Methods in Enzymology **292**, 607-611 (1998)
- KEPPLER, D., KARTENBECK, J.
The canalicular conjugate export pump encoded by the *cmrp* / *cmoat* gene
Progress in Liver Disease **14** (Boyer, J.L. and Ockner R.K.), 55-67 (1996)
- KEPPLER, D., KÖNIG, J.
Expression and localization of the conjugate export pump encoded by the MRP2 (cMRP / cMOAT) gene in liver
FASEB J. **11**, 509-516 (1997)
- KEPPLER, D., LEIER, I., JEDLITSCHKY, G.
Transport of Glutathione Conjugates and Glucuronides by the Multidrug Resistance Proteins MRP1 und MRP2
Biol. Chem. **378**, 787-791 (1997)
- KIRK, J.K.
Angiotensin-II Receptor Antagonist: Their Place in Therapy
American Family Physician, **59**, 3140-3148 (1999)
- KITAMURA, T., JANSEN, P., HARDENBROOK, P., KAMIMOTO, Y., GATMAITAN, Z., ARIAS, I.M.
Defective ATP-dependent bile canalicular transport of organic anions in mutant (TR⁻) rats with conjugated hyperbilirubinemia
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **87**, 3557-3561 (1990)
- KOBAYASHI, K., SOGAME, Y., HARA, H., HAYASHI, K.
Mechanisms of glutathione S-conjugate transport in canalicular and basolateral rat liver plasma membranes
J. Biol. Chem. **265**, 7737-7741 (1990)

- KOBAYASHI, K., SOGAME, Y., HAYASHI, K., NICOTERA, P., ORRENIUS, S.
ATP stimulates the uptake of S-dinitrophenylglutathione by rat liver plasma membrane vesicles
FEBS Lett. **240**, 55-58 (1988)
- KÖNIG, J., ROST, D., CHIU, Y., KEPPLER, D.
Characterization of the human multidrug resistance protein isoform MRP3 localized to the basolateral hepatocyte membrane
Hepatology **29**, 1156-1163 (1999)
- KOOL, M., DE HAAS, M., SCHEFFER, G.L., SCHEPER, R.J., VAN EIJK, M.J.T., JUIJN, J.A., BAAS, F., BORST, P.
Analysis of 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 (1997)
- KOOL, M., VAN DER LINDEN, M., DE HAAS, M., BAAS, F., BORST, P.
Expression of human MRP6, a homologue of the multidrug resistance protein gene MRP1, in tissues and cancer cells
Cancer Res. **59**, 175-182 (1999a)
- KOOL, M., VAN DER LINDEN, M., DE HAAS, M., SCHEFFER, G.L., DE VREE, J.M.L., SMITH, A.J., JANSEN, G., PETERS, G.J., PONNE, N., SCHEPER, R.J., OUDE ELFERINK, R.P.J., BAAS, F., BORST, P.
MRP3, an organic anion transporter able to transport anti-cancer drugs
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96**, 6914-6919 (1999b)
- KUMAMOTO, J., RAISON, J.K., LYONS, J.M.
Temperature „Breaks“ in Arrhenius Plots: A thermodynamic consequence of a Phase Change
J. theor. Biol. **31**, 47-51 (1971)
- KUSUHARA, H., SUZUKI, H., SUGIYAMA, Y.
The role of P-glycoprotein and canalicular multispecific organic anion transporter in the hepatobiliary excretion of drugs
J. Pharm. Sci. **87**, 1025-1040 (1998)
- LEIER, I., JEDLITSCHKY, G., BUCHHOLZ, U., CENTER, M., COLE, S.P.C., DEELEY, R.G., KEPPLER, D.
ATP-dependent glutathione disulphide transport by the MRP gene-encoded conjugate export pump
Biochem. J. **314**, 433-437 (1996)
- LEIER, I., JEDLITSCHKY, G., BUCHHOLZ, U., COLE, S.P.C., DEELEY, R.G., KEPPLER, D.
The MRP gene encodes an ATP-dependent export pump for leukotriene C₄ and structurally related conjugates
J. Biol. Chem. **269**, 27807-27810 (1994)

LIEBICH, H.G.

Funktionelle Histologie (Farbatlas und Kurzlehrbuch der mikroskopischen Anatomie der Haussäugetiere)

Schattauer Verlag 1. Auflage (1990)

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, H.J., FARR, A.L. and RANDALL, R.J.

Protein measurement with the folin phenol reagent

J. Biol. Chem. **193**, 265-275 (1951)

MADON, J., HAGENBUCH, B., LANDMANN, L., MEIER, P.J., STIEGER, B.

Transport function and hepatocellular localization of mrp6 in rat liver

Molecular Pharmacology **57**, 634-641 (2000)

MAYER, R., KARTENBECK, J., BÜCHLER, M., JEDLITSCHKY, G., LEIER, I.,

KEPPLER, D.

Expression of the MRP gene- encoded conjugate export pump in liver and its selective absence from the canalicular membrane in transport-deficient mutant hepatocytes

J. Cell Biol. **131**, 137-150 (1995)

MC INNES, G.T.

Clinical Advantage of Valsartan

Cardiology **91**(**Suppl. 1**), 14-18 (1999a)

MC INNES, G.T.

Angiotensin II Antagonism in Clinical Practice: Experience with Valsartan

Journal of Cardiovascular Pharmacology **33** (**Suppl. 1**), 29-32 (1999b)

MEIER, P.J.

Canalicular membrane transport processes

In *Hepatic Transport and Bile Secretion: Physiology and Pathophysiology* edited by N. Tavoloni and P.D. Berk

Raven Press, Ltd., New York, 587-596 (1993)

MEIER, P.J., BOYER, J.L.

Preparation of basolateral (sinusoidal) and canalicular plasma membrane vesicles for the study of hepatic transport processes

Methods in Enzymology **192**, 534-545 (1990)

MEIER, P.J., SZTUL, E.S., REUBEN, A., BOYER, J.L.

Structural and Functional Polarity of Canalicular and Basolateral Plasma Membrane; Vesicles Isolated in High Yield from Rat Liver

The Journal of Cell Biology **98**, 991-1000 (1984)

MICHELL, R.H., HAWTHORNE, J.N.

The site of diphosphoinositide synthesis in rat liver.

Biochem. Biophys. Res. Comm. **21**, 333-338 (1965)

- MÜLLER, M., ISHIKAWA, T., BERGER, U., KLÜNEMANN, C., LUCKA, L., SCHREYER, A., KANN ICHT, C., REUTTER, W., KURZ, G., KEPPLER, D.
ATP-dependent transport of taurocholate across the hepatocyte canalicular membrane mediated by a 110 kDa glycoprotein binding ATP and bile salt
J. Biol. Chem. **266**, 18920-18926 (1991)
- MÜLLER, M., MEIJER, C., ZAMAN, G.J.R., BORST, P., SCHEPER, R.J., MULDER, N.H., DE VRIES, E.G.E., JANSEN, P.L.M.
Overexpression of the gene encoding the multidrug resistance-associated protein results in increased ATP-dependent glutathione S-conjugate transport
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91**, 13033-13037 (1994)
- NEVILLE, D.M. jr.
Isolation of an organ specific protein antigen from cell surface membrane of rat liver.
Biochim. Biophys. Acta **154**, 540-552 (1968)
- NI'INUMA, K., KATO, Y., SUZUKI, H., TYSON, C.A., WEIZER, V., DABBS, J.E., FROEHLICH, R., GREEN, C.E., SUGIYAMA, Y.
Primary active transport of organic anions on bile canalicular membrane in humans
Am. J. Physiol. **276** (Gastrointest. Liver Physiol. 39), G1153-G1164 (1999)
- NIEDERNHÖFER, S.
Einfluss oral zugeführter Xenobiotika auf die Transportaktivität des P-Glykoproteins
Dissertation Gießen (1996)
- NIES, A.T., GATMAITAN, S., ARIAS, I.M.
ATP-dependent phosphatidylcholine translocation in rat liver canalicular plasma membrane vesicles
J. Lipid. Res. **37**, 1125-1136 (1996)
- NISHIDA, T., GATMAITAN, Z., CHE, M.X., ARIAS, I.M.
Rat liver canalicular membrane vesicles contain an ATP-dependent bile acid transport system
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88**, 6590-6594 (1991)
- NISHIDA, T., HARDENBROOK, C., GATMAITAN, Z., ARIAS, I.M.
ATP-dependent organic anion transport system in normal and TR⁻ rat liver canalicular membranes
Am. J. Physiol. **262**, G629-G635 (1992a)
- NISHIDA, T., GATMAITAN, Z., ROY-CHOWDHRY, J., ARIAS, I.M.
Two distinct mechanisms for bilirubin glucuronide transport by rat bile canalicular membrane vesicles
J. Clin. Invest. **90**, 2130-2135 (1992b)
- ONDETTI, M.A.
Angiotensin converting enzyme inhibitors: an overview.
Hypertension **18** Suppl. 3. III134-III135 (1991)

ORTIZ, D.F., LI, S., IYER, R., ZHANG, X., NOVIKOFF, P., ARIAS, I.M.
MRP3, a new ATP-binding cassette protein localized to the canalicular domain of the hepatocyte
Am. J. Physiol. **276** (*Gastrointest. Liver Physiol.* **39**), G1493-G1500 (1999)

OUDE ELFERINK, R.P.J., BAKKER, C.T.M., ROELOFSEN, H., MIDDELKOOP, E., OTTENHOFF, R., HEIJN, M., JANSEN, P.L.M.
Accumulation of organic anion in intracellular vesicles of cultered rat hepatocytes is mediated by the canalicular multispecific organic anion transporter
Hepatology **17**, 434-444 (1993)

OUDE ELFERINK, R.P.J., JANSEN, P.L.M.
The role of the canalicular multispecific organic anion transporter in the disposal of endo- and xenobiotics
Pharmacology and Therapeutics **64**, 77-97 (1994)

OUDE ELFERINK, R.P.J., MEIJER, D.K.F., KUIPERS, F., JANSEN, P.L.M., GROEN, A.K., GROOTHUIS, G.M.M.
Hepatobiliary secretion of organic compounds; molecular mechanisms of membrane transport
Biochim. Biophys. Acta **1241**, 215-268 (1995)

OUDE ELFERINK, R.P.J., OTTENHOFF, R., LIEFTING, W.G.M., SCHOEMAKER, B., GROEN, A.K., JANSEN, P.L.M.
ATP-dependent efflux of GSSG and GS-conjugate from isolated rat hepatocytes
Am. J. Physiol. **258**, G699-G706 (1990)

OUDE ELFERINK, R.P.J., OTTENHOFF, R., LIFETING, W., HANN, J., JANSEN, P.L.M.
Hepatobiliary transport of glutathione and glutathione conjugate in rats with hereditary hyperbilirubinemia
J. Clin. Invest. **84**, 476-483 (1989)

PAULUSMA, C.C., BOSMA, P.J., ZAMAN, G.J.R., BAKKER, C.T.M., OTTER, M., SCHEFFER, G.L., SCHEPER, R.J., BORST, P., OUDE ELFERINK, R.P.J.
Congenital jaundice in rats with a mutation in a multidrug-resistance-associated protein gene
Science **271**, 1126-1128 (1996)

PERSSON, B., ARGOS, P.
Prediction of transmembrane segments in proteins utilising multiple sequence alignments
J. Mol. Biol. **237**, 182-192 (1994)

PETZINGER, E. & FRIMMER, M.
Driving forces in hepatocellular uptake of phalloidin and cholate
Biochim. Biophys. Acta. **778**, 539-548 (1984)

PETZINGER, E. & FRIMMER, M.
Comparative investigations on the uptake of phallotoxins, bile acids, bovine lactoperoxidase and horse radish peroxidase into rat hepatocytes in suspension and in cell cultures
Biochim. Biophys. Acta. **937**, 135-144 (1988)

- POUPON, R., CHRETIEN, Y., PARQUET, M., BALLEST, R., REY, C., INFANTE, R.
Hepatic transport of bile acids in the isolated rat liver
Biochem. Pharmacol. **17**, 209-212 (1988)
- PSCHYREMBEL, W.
Klinisches Wörterbuch
Walter de Gruyter-Verlag, 256. Auflage (1990)
- REICHEN, J. & PAUMGARTNER, G.
Uptake of bile acids by perfused rat liver
Am. J. Physiol. **231**, 724-742 (1976)
- ROCHE Lexikon Medizin
Verlag Urban & Schwarzenberg, 2.Auflage (1991)
- ROELOFSEN, H., MÜLLER, M., JANSEN, P.L.M.
Regulation of Organic Anion Transport in the Liver
Yale Journal of Biology and Medicine **70**, 435-445 (1997)
- SCHAUB, T.P., KARTENBECK, J., KÖNIG, J., SPRING, H., DÖRSAM, J., STAEHLER, G., STÖRKEL, S., THON, W.F., KEPPLER, D.
Expression of the MRP2 Gene-Encoded Conjugate Export Pump in Human Kidney Proximal Tubulus and in Renal Cell Carcinoma
J. Am. Soc. Nephrol. **10**, 1159-1169 (1999)
- SCHAUB, T.P., KARTENBECK, J., KÖNIG, J., VOGEL, O., WITZGALL, R., KRIZ, W., KEPPLER, D.
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 (1997)
- SCHINKEL, A.H., ROELOFS, E.M., BORST, P.
Characterization of the human MDR3 P-glycoprotein and its recognition by P-glycoprotein-specific monoclonal antibodies
Cancer Res. **51**, 2628-35 (1991)
- SCHWARZ, L.R. & BARTH, C.A.
Taurocholate uptake by adult hepatocytes in primary culture
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **360**, 1117-1120 (1979)
- SCHWARZ, L.R., BURR, R., SCHWENK, M., PFAFF, E. & GREIM, H.
Uptake of taurocholic acid into isolated rat liver cells
Eur. J. Biochem. **55**, 617-623 (1975)
- SHIN, H.-C., KATO, Y., YAMADA, T., NI'INUMA, K., HISAKA, A., SUGIYAMA, Y.
Hepatobiliary transport mechanism for the cyclopentapeptide endothelin antagonist BQ-123
Am. J. Physiol. **272**, G979-G986 (1997)

SMIT, J.J.M., SCHINKEL, A.H., MOL, C.A.A.M., MAJLOOR, D., MOOI, W.J., JONGSMA, A.P.M., LINCKE, C.R., BORST, P.

Tissue distribution of the human MDR3 p-glycoprotein

Lab. Invest. **71**, 638-649 (1994)

SMIT, J.J.M., SCHINKEL, A.H., OUDE ELFERINK, R.P. et al.

Homozygous disruption of murine mdr2 P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease

Cell **75**, 451-462 (1993)

SMITH, R.D., CHIU, A.T., WONG, P.C., HERBLIN, W.F., TIMMERMANS, P.B.M.W.M.

Pharmacology of nonpeptide angiotensin II receptor antagonists

Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. **32**,135-165 (1992)

STIEGER, B., O'NEILL, B., MEIER, P.J.

ATP-dependent bile-salt transport in canalicular rat liver plasma-membrane vesicles

Biochem. J. **284**, 67-74 (1992)

STRIDE, B.D., VALDIMARSSON, G., GERLACH, J.H., WILSON, G.M., COLE, S.P., DEELEY, R.G.

Structure and expression of the messenger RNA encoding the murine multidrug resistance protein, an ATP-binding cassette transporter

Mol. Pharmacol. **49**, 962-971 (1996)

SZCZYPKA, M.S., WEMMIE, J.A., MOYE-ROWLEY, W.S., THIELE, D.J.

A yeast metal resistance protein similar to human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) and multidrug resistance-associated protein

J. Biol. Chem. **269**, 22853-22857 (1994)

TAKAHASHI, H., KIM, R.B., PERRY, P.R., WILKINSON, G.R.

Characterization of the hepatic canalicular membrane transport of a model oligopeptide: Ditekiren

J. Pharmacol. Exp. Ther. **281**, 297-303 (1997)

TANIGUCHI, K., WADA, M., KOHNO, K., NAKAMURA, T., KAWABE, T., KAWAKAMI, M., KAGOTANI, K., OKUMURA, K., AKIYAMA, S., KUWANO, M.

A human canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) gene is overexpressed in cisplatin-resistant human cancer cell lines with decreased drug accumulation

Cancer Res. **56**, 4124-4129 (1996)

THIEBAUT, F., TSURUO, T., HAMADA, H., GOTTESMAN, M.M., PASTAN, I., WILLINGHAM, M.C.

Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84**, 7735-7738 (1987)

TIMMERMANS, P.B.M.W.M.

Angiotensin II Receptor Antagonists: an Emerging New Class of Cardiovascular Therapeutics

Hypertens. Res. **22**, 147-153 (1999)

- VAN HELVOORT, A., SMITH, A.J., SPRONG, H., FRITSCHKE, I., SCHINKEL, A.H., BORST, P., VAN MEER, G.
MDR1 p-glycoprotein is a lipid translocase of broad specificity, while MDR3 p-glycoprotein specifically translocates phosphatidylcholine
Cell **87**, 507-517 (1996)
- VAN KUIJCK, M.A., VAN AUBEL, R.A., BUSCH, A.E., LANG, F., RUSSEL, F.G., BINDELS, R.J., VAN OS, C.H., DEEN, P.M.
Molecular cloning and expression of a cyclic AMP-activated chloride conductance regulator: a novel ATP-binding cassette transporter
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**, 5401-5406 (1996)
- VORE, M., HOFFMAN, T., GOSLAND, M.
ATP-dependent transport of β -estradiol 17-(β -D-glucuronide) in rat canalicular membrane vesicles
Am. J. Physiol. **271** (Gastrointest. Liver Physiol. 34), G791-G798 (1996)
- VOS, T.A., HOOIVELD, G.J.E.J., KONING, H., CHILDS, S., MEIJER, D.K.F., MOSHAGE, H., JANSEN, P.L.M., MÜLLER, M.
Up-regulation of the Multidrug Resistance Genes, Mrp1 and Mdr1b, and Down-regulation of the Organic Anion Transporter, Mrp2, and the Bile Salt Transporter, Spgp, in Endotoxemic Rat Liver
Hepatology **28**, 1637-1644 (1998)
- WALDMEIER, F., FLESCHE, G., MÜLLER, P., WINKLER, T., KRIEMLER, H.-P., BÜHLMAYER, P., DE GASPARO, M.
Pharmacokinetics, disposition and biotransformation of [¹⁴C]-radiolabelled valsartan in healthy male volunteers after a single oral dose
Xenobiotica **27**, 59- 71 (1997)
- WOLTERS, H., KUIPERS, F., SLOOFF, M.J.H., VONK, R.J.
Adenosine triphosphate-dependent taurocholate transport in human liver plasma membranes
J. Clin. Invest. **90**, 2321-2326 (1992)
- WONG, P.C., CHIU, A.T., DUNCIA, J.V., HERBLIN, W.F., SMITH, R.D., TIMMERMANS, P.B.M.W.M.
Angiotensin II Receptor Antagonists and Receptor Subtypes
Trends. Endocrinol. Metab. **3**, 211-217 (1992)
- YAMADA, T., NI'INUMA, K., LEMAIRE, M., TERASAKI, T., SUGIYAMA, Y.
Mechanism of the tissue distribution and biliary excretion of the cyclic peptide octreotide
J. Pharmacol. Exp. Ther. **279**, 1357-1364 (1996)
- YAMAZAKI, M., AKIYAMA, S., NI'INUMA, K., NISHIGAKI, R., SUGIYAMA, Y.
Biliary excretion of Pravastatin in rats: contribution of the excretion pathway mediated by canalicular multispecific organic anion transporter (cMoat)
Drug Metabolism and Disposition **25**, 1123-1129 (1997)
- ZIEGLER, K., KOLAC, C., ISING, W.
ATP-dependent transport of the linear renin-inhibiting peptide EMD 51921 by canalicular plasma membrane vesicles of rat liver: evidence of drug-stimulatable ATP-hydrolysis
Biochimica et Biophysica Acta **1196**, 209-217 (1994)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen, die zu der Entstehung dieser Arbeit in verschiedenster Art und Weise beigetragen haben, ganz herzlich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Kornelia Ziegler für die Überlassung des interessanten Themas, die intensive Betreuung und ständige Diskussionsbereitschaft sowie für die äußerst zügigen und wertvollen Korrekturen.

Mein besonderer Dank gilt außerdem Herrn Prof. Dr. Ernst Petzinger für die Ermöglichung der Promotion am Institut für Pharmakologie und Toxikologie.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Kurt Stumpf für die Einführung in die „Laborwelt“, seine jederzeit (ich meine damit auch die anfänglichen Plasmamembranpräparationen, die bis in die frühen Morgenstunden gedauert haben) gern gewährte Hilfe und seine Geduld, wenn es mir manchmal nicht schnell genug ging. Auch in weniger guten Laborzeiten oder wenn es mit meinen Versuchen nicht so geklappt hat, wie ich es mir vorgestellt habe, konnte ich immer auf ihn zählen.

Des Weiteren danke ich allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern des Institutes für die kollegiale Zusammenarbeit, besonders Frau Victorine Neh („Bitte Melde Dich!“), Herrn Klaus Schuh (Schade, beim Wichteln Weihnachten 1999 hat jemand anderes den schönen selbstgemachten Fotokalender geschenkt bekommen), Frau Tatjana Andres, Frau Silke Neumann, Frau Kerstin Lischka und Frau Sabine Wagner. Frau Anke Schneider möchte ich ganz herzlich für die Einführung in die Plasmamembranpräparation danken sowie Herrn Dr. Dieter Starke für die Einführung in die Gallengangs-kanülierung. Ganz besonders möchte ich aber auch den Tierpflegern Herrn Walbrecht und Frau Manuela Binz für die gute Zusammenarbeit und die reibungslose Zucht der Laborratten danken.

Herrn AkOR Dr. K. Failing und seinen Mitarbeitern Frau Carola Lehmann und Herrn Horst Heiter danke ich sehr für die kompetente Beratung und Unterstützung bei der statistischen Auswertung meiner Versuchsergebnisse.

Vielen Dank auch an Frau Susanne Garcia Mateos für die zügige und kompetente Durchsicht des Manuskriptes.

Am meisten möchte ich mich bei den Hauptleidtragenden, meinen Eltern und meinem Freund David bedanken, die mir während des Studiums und der Promotion stets zur Seite gestanden haben. Himmel hoch jauchzend, zu Tränen betrübt, Eure Liebe und Euer Verständnis gaben mir die Kraft dies alles durchzustehen.

Jetzt hat das Thema Doktorarbeit endlich ein Ende!