

AG Molekulare Onkologie und Immuntherapie
Abteilung für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und Transplantationschirurgie
Chirurgische Klinik und Poliklinik
Universitätsmedizin Rostock

**Entwicklung und Charakterisierung neuartiger humaner intestinaler
in vitro Modelle für die präklinische Wirkstoffforschung**



Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von

Randy Przybylla

aus Königs Wusterhausen

Hanse- und Universitätsstadt Rostock, 2024

Gutachter:

PD Dr. Michael Linnebacher, Universitätsmedizin Rostock, Molekulare Onkologie und Immuntherapie

Prof. Dr. Reinhard Schröder, Universität Rostock, Institut für Biowissenschaften

Prof. Dr. Mladen V. Tzvetkov, Universitätsmedizin Greifswald, Institut für Pharmakologie

Jahr der Einreichung/Verteidigung: 2024

Abkürzungsverzeichnis

α	alpha
Δ	delta
Λ	Lambda
∞	unendlich
Ω	Ohm
%	Prozent
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar (1 $\mu\text{M/l}$)
μm	Mikrometer
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
5-FU	5-Flourouracil
Abb.	Abbildung
ABC	<i>ATP-binding cassette</i> , ATP-bindende Kasette
<i>A. dest.</i>	<i>Aqua destillata</i> , destilliertes Wasser
<i>ad</i>	auffüllen auf
ADME	Absorption, Distribution, Metabolismus und Exkretion
APC	<i>Adenomatous polyposis coli Protein</i>
BCRP	<i>Breast Cancer Resistance Protein</i>
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ca^{2+}	Calcium
Caco-2	<i>Cancer coli</i> , humane Adenokarzinomzelllinie
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i> , komplementäre DNA
CHGA	Chromogranin A
CO_2	Kohlendioxid
C_t	<i>Cycle threshold</i>
Cy7	Cyanin7
CYP	Cytochrom P450
d	Tag(e)

DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxy-Nukleosid-Triphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
FACS	Durchflusszytometrie
FD4	Fluoresceinisothiocyanat-dextran 4
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GLUT-2	Glucosetransporter Typ 2
GR	Glucocorticoid-Rezeptor
h	Stunde
HROC	Hansestadt Rostock colorectal cancer
HTS	<i>High-Throughput-Screening</i> , Hochdurchsatz-Screening
IC ₅₀	<i>Half maximal inhibitory concentration</i> , mittlere inhibitorische Konzentration
IEC	<i>Intestinal Epithelial Cells</i> , intestinale Epithelzellen
IS	Interner Standard
kDa	Kilodalton
KRAS	<i>Kirsten rat sarcoma</i>
KRK	Kolorektales Karzinom
kV	Kilovolt
KV	Kristallviolett
l	Liter
LC-MS/MS	Flüssigkeitschromatografie-Massenspektrometrie/Massenspektrometrie
LYZ	Lysozym
M	Molar (1 mol/l)
Mg ²⁺	Magnesium
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar (1 mM/l)
MRP	<i>Multidrug Resistance-Related Protein</i>

MSI	Mikrosatelliteninstabilität
MUC2	Mucin 2
m/v	Masse pro Volumen
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
<i>NR1I1</i>	<i>nuclear receptor subfamily 1 group I member 1</i>
<i>NR1I2</i>	<i>nuclear receptor subfamily 1 group I member 2</i>
nM	Nanomolar (1 nmol/l)
nm	Nanometer
OATP	<i>Organic anion transporting polypeptides</i> , Organo-Anion-Transporter
OCLN	Occludin
<i>p</i>	Signifikanzwert
PBS ⁻	Phosphatgepufferte Salzlösung ohne Calcium- und Magnesiumionen
PBS ⁺	Phosphatgepufferte Salzlösung mit Calcium- und Magnesiumionen
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PEPT	Peptidtransporter
PFA	Paraformaldehyd
P-gp	Permeabilitätsglykoprotein
pM	Pikomolar (1 pmol/l)
PXR	Pregnan-X-Rezeptor
RLU	<i>relative light units</i> , Relative Lichteinheit
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
rpm	<i>Rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SLC	<i>Solute Carrier</i> , SLC-Transporter
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TEER	Transepithelialer/transendothelialer elektrischer Widerstand
TJ	Tight Junctions
TP53	Tumorsuppressor p53
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units
u.a.	unter anderem
UGT	UDP-Glucuronosyltransferase

UV	Ultraviolett
V	Volt
VD3	1,25-dihydroxyvitamin D ₃
VDR	Vitamin-D-Rezeptor
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	<i>weight per volume</i> , Masse pro Volumen
ZO-1	Zonula occludens-1

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	IX
1 Zusammenfassung.....	1
2 Einleitung.....	2
2.1 Der Dünndarm	2
2.1.1 Anatomie und Physiologie	2
2.1.2 Das Dünndarmepithel	3
2.2 Biotransformation.....	7
2.2.1 Transportproteine im Dünndarm.....	9
2.3 Präklinische intestinale Modellsysteme	13
2.3.1 In vitro	13
2.3.2 In vivo.....	14
2.3.3 Ex vivo.....	15
2.4 Zielstellung.....	16
3 Material und Methoden	17
3.1 Material.....	17
3.1.1 Biologisches Material.....	17
3.1.2 Geräte, Software und Datenbanken	17
3.1.3 Verbrauchsmaterialien.....	20
3.1.4 Chemikalien und Reagenzien.....	21
3.2 Methoden.....	27
3.2.1 Etablierung von humanen kolorektalen Karzinom-Zelllinien.....	27
3.2.2 Zellkultur.....	28
3.2.3 Charakterisierung	30
3.2.4 Untersuchung der epithelialen Integrität	33
3.2.5 Untersuchung des Differenzierungsgrades.....	34
3.2.6 Expressionsanalysen.....	36
3.2.7 Proteinquantifizierung	42
3.3 Statistische Auswertung.....	43
4 Ergebnisse.....	44
4.1 Auswahl von Zelllinien mit geeigneten morphologischen Charakteristika und intakter Barrierefunktion	44
4.2 Grundlegende zelluläre Eigenschaften.....	46
4.2.1 Zellproliferation und Zellmigration.....	46
4.2.2 Immunphänotypisierung	47
4.2.3 Ansprechen auf klinisch relevante Chemotherapeutika	48

4.3 Untersuchung der Barriereintegrität	50
4.3.1 Einfluss der Kulturzeit auf die Integrität der epithelialen Barriere	50
4.3.2 Untersuchungen zur Bildung von Tight Junction-Komplexen	53
4.3.2.1 Immunfluoreszenzmikroskopische Visualisierung von ZO-1	53
4.3.2.2 Rasterelektronenmikroskopische Detektion von Tight Junctions.....	54
4.3.2.3 Einfluss der Kulturzeit auf die Expression von Occludin.....	54
4.4 Untersuchung des Differenzierungsgrades	56
4.4.1 Differenzierung in spezialisierte intestinale Epithelzellen	56
4.5 Untersuchungen zum intestinalen First-Pass-Metabolismus	62
4.5.1 Bestimmung der basalen CYP3A4-Aktivität	62
4.5.2 Rezeptorabhängige Induktion und Inhibition der CYP3A4-Aktivität.....	63
4.6 Einfluss der Kulturzeit auf die Gen- und Proteinexpression intestinaler Transporter und nukleärer Rezeptoren	66
4.6.1 Genexpression von Transportern, Enzymen und nukleärer Rezeptoren im Vergleich zu humanem Dünndarm	66
4.6.2 Proteinexpression von Transportern im Vergleich zu humanem Jejunum.....	69
4.7 Einfluss auf die Expression von Transportern, Enzymen und nukleären Rezeptoren nach Behandlung mit Rifampicin und Vitamin D3.....	71
5 Diskussion	74
5.1 Hintergrund	74
5.2 Charakterisierung der Zelllinien.....	75
5.3 Epitheliale Barriereintegrität	77
5.4 Differenzierungsgrad.....	82
5.5 Vergleich der Expressionslevel mit humanem Dünndarm	87
5.6 Regulierung von Enzymen, Transportern und nukleären Rezeptoren	89
5.7 Vor- und Nachteile sowie Anwendungsbereiche	92
5.8 Limitationen dieser Arbeit.....	95
5.9 Ausblick	96
6 Literaturverzeichnis	98
7 Anhang.....	125
Lebenslauf	130

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Anatomie des humanen Gastrointestinaltraktes.....	3
Abbildung 2: Zytomorphologie des Dünndarmepithels.....	5
Abbildung 3: Dünndarm-Resorption: Schematische Darstellung intestinaler Transportrouten, die für die Arzneimittelresorption relevant sind..	7
Abbildung 4: Die Phasen der Biotransformation. Übersicht über die wesentlichen Schritte und mitwirkenden Enzyme beim Fremdstoffmetabolismus.....	9
Abbildung 5: Schematische Übersicht über die Verteilung humaner intestinaler Transportproteine.....	10
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Induktion des Membrantransporters P-gp (ABCB1) durch Rifampicin.....	13
Abbildung 7: Schematische Darstellung der verwendeten Methoden.....	27
Abbildung 8: Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen von HROC-Zelllinien mit ungeeigneten morphologischen Charakteristika.....	44
Abbildung 9: Lichtmikroskopische Aufnahmen von HROC-Zelllinien des finalen Zellpanels nach Erreichen einer 100%igen Konfluenz.....	45
Abbildung 10: Zellproliferation und Zellmigration in HROC-Zelllinien und Caco-2.....	47
Abbildung 11: Repräsentative Abbildungen der Wundheilung von HROC-Zelllinien zur Bestimmung der Zellmigration.....	47
Abbildung 12: Expression von Oberflächenmarkern in den HROC-Zelllinien.....	48
Abbildung 13: Ergebnisse der TEER-Messungen zur Untersuchung der Barriereintegrität in HROC-Zelllinien und Caco-2.....	51
Abbildung 14: Ergebnisse des FD4-Permeabilitäts-Assay zur Untersuchung der parazellulären Permeabilität in HROC-Zelllinien und Caco-2.....	52
Abbildung 15: Immunfluoreszenzmikroskopische Visualisierung von ZO-1 in den HROC-Zelllinien und Caco-2 nach Erreichen einer 100%igen Konfluenz.....	54
Abbildung 16: Nachweis von TJ-Strukturen in den HROC-Zelllinien und Caco-2.....	55
Abbildung 17: Immunfluoreszenzmikroskopische Visualisierung von Becherzellen in den HROC-Zelllinien und Caco-2 nach Erreichen einer 100%igen Konfluenz.....	57
Abbildung 18: Immunfluoreszenzmikroskopische Visualisierung von Paneth-Zellen in den HROC-Zelllinien und Caco-2 nach Erreichen einer 100%igen Konfluenz.....	58
Abbildung 19: Immunfluoreszenzmikroskopische Visualisierung von enteroendokrinen Zellen in den HROC-Zelllinien und Caco-2 nach Erreichen einer 100%igen Konfluenz.....	60
Abbildung 20: Repräsentative rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Mikrovilli in den HROC-Zelllinien und Caco-2 nach Erreichen einer 100%igen Konfluenz.....	61
Abbildung 21: Repräsentative rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Arealen mit weniger stark besetzten Mikrovilli und besonderer Morphologie in den HROC-Zelllinien nach Erreichen einer 100%igen Konfluenz.....	62
Abbildung 22: Basale Level der CYP3A4-Aktivität in den HROC-Zelllinien und Caco-2.....	63
Abbildung 23: Veränderung der CYP3A4-Aktivität in den HROC-Zelllinien und Caco-2 nach Behandlung mit CYP3A4-Substraten.....	65
Abbildung 24: Spearman-Korrelation zwischen Veränderungen der CYP3A4-Aktivität in den HROC-Zelllinien und Caco-2 nach Behandlung mit spezifischen Substraten.....	66
Abbildung 25: Genexpression klinisch relevanter Transporter und nukleärer Rezeptoren in Abhängigkeit von der Kulturzeit in den HROC-Zelllinien und Caco-2 im Vergleich zu humanem Dünndarm.....	68
Abbildung 26: Spearman-Korrelation zwischen der Veränderung der Genexpression im Vergleich zum Dünndarm in den HROC-Zelllinien und Caco-2 in Abhängigkeit von der Kulturzeit.....	69

Abbildung 27: Zeitabhängige Proteinexpression von Transportern in den HROC-Zelllinien und Caco-2 im Vergleich zu humanem Jejunum.....	71
Abbildung 28: Veränderung der CYP3A4-Aktivität sowie Genexpression von Phase II-III-Enzymen nach Behandlung mit Rifampicin und Vitamin D3 in den HROC-Zelllinien und Caco-2.....	73
Abbildung A1: Zellviabilität in HROC-Zelllinien und Caco-2 nach Behandlung mit Zytostatika.	126
Abbildung A2: Mutationsprofil des untersuchten HROC-Panels und der Caco-2 Zelllinie....	127

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Biopsien aus humanem Dünndarm für Genexpressionsanalysen.....	17
Tabelle 2: Verwendete humane Jejunum-Biopsien für die Proteinquantifizierung	17
Tabelle 3: Verwendete Online-Datenbanken und Hilfsprogramme.....	19
Tabelle 4: Verwendete Antikörper für immunzytochemische Färbungen	25
Tabelle 5: Verwendete Antikörper für durchflusszytometrische Analysen	25
Tabelle 6: Verwendete Kits für Genexpressionsanalysen und Proteinquantifizierung	26
Tabelle 7: Verwendete Primer für Genexpressionsanalysen.....	26
Tabelle 8: Verwendete proteospezifische Peptide für LC-MS/MS	26
Tabelle 9: Bewertung der morphologischen Eigenschaften und Barriereintegrität für fortführende Analysen ungeeigneter HROC-Zelllinien	45
Tabelle 10: Vergleich der IC ₅₀ -Konzentrationen (µM) der Chemotherapeutika 5-FU, Capecitabin, Irinotecan und Oxaliplatin in den HROC-Zelllinien und der Caco-2	49
Tabelle A1: Verwendete humane Kolorektalkarzinom-Zelllinien mit Patienten- und Tumordaten.....	125
Tabelle A2: Zusammenfassung der Ergebnisse für das HROC-Zellpanel.....	128

1 Zusammenfassung

Der Dünndarm ist gekennzeichnet durch die Ausbildung einer dichten Barriere zur Trennung von Darmlumen und Blutkreislauf. Sein Epithel spielt dadurch eine große Rolle in der Absorption und dem Weitertransport von pharmakologischen Wirkstoffen, bevor diese an ihren Wirkort gelangen. Bisherige zelluläre Modelle zur Untersuchung intestinaler Aufnahme- und Transportprozesse sind in bestimmten Eigenschaften limitiert. Für die Untersuchung spezieller Aufnahmemechanismen, zur Vorhersage der oralen Bioverfügbarkeit neuartiger Arzneistoffe sowie zur Reduzierung von Tierversuchen sind daher verbesserte humane intestinale *in vitro* Modelle mit Ähnlichkeit zur *in vivo* Situation für die präklinische Wirkstoffforschung erforderlich.

Ausgangspunkt dieser Arbeit ist eine umfangreiche Biobank, die kolorektale Patientenproben sowie über 100 daraus abgeleitete primäre, sowie Patienten-abgeleitete Xenograft-Zelllinien enthält. Als grundlegende Anforderung an humane intestinale *in vitro* Modelle wurden im ersten Teil der Arbeit von insgesamt 49 untersuchten Zelllinien 45 als konfluent wachsend identifiziert. Nach der Exklusion weiterer Zelllinien aufgrund unzureichender morphologischer Eigenschaften, fehlender Anwendung für Standard *in vitro* Assays oder eines geringen transepithelialen elektrischen Widerstandes verblieben zehn Zelllinien im finalen Panel. Als Grundvoraussetzung für neuartige *in vitro* Modelle konnte für diese Zelllinien in weiteren Analysen ein Anstieg des epithelialen Widerstandes verbunden mit sinkender parazellulärer Permeabilität bei zunehmender Kulturzeit nachgewiesen werden. Die umfassende Untersuchung des Differenzierungsgrades erbrachte den Nachweis Mikrovilli-reicher Epithelzellen in allen Linien. In weiteren zwei Linien konnten Becher-, Paneth- und enteroendokrine Zellen fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen werden.

Insgesamt gehen aus dieser Arbeit drei Zelllinien hervor, die im Vergleich zum Referenzmodell Caco-2 verbesserte Eigenschaften hinsichtlich des Differenzierungsgrades in intestinale Epithelzellen, dünndarmspezifischer Genexpression, jejunal exprimierter Transportproteine und geeigneter arzneimittelinduzierten Regulierung aufweisen. Diese Modelle sind somit eine wichtige Ergänzung zu bereits etablierten intestinalen *in vitro* Modellen für die simultane Untersuchung intestinaler Zelldifferenzierung, Metabolismus- und Transportprozessen und Testung der Bioverfügbarkeit neuartiger Wirkstoffkandidaten und Arzneimittel.

Zusammenfassend beschreibt diese Arbeit neue zelluläre Modelle mit dünndarmspezifischen Eigenschaften als Ergänzung zu bereits bestehenden *in vitro* Modellen, die in der präklinischen Wirkstoffforschung zur Testung neuartiger Medikamente genutzt werden können.

2 Einleitung

2.1 Der Dünndarm

2.1.1 Anatomie und Physiologie

Der Dünndarm ist Bestandteil des gastrointestinalen Traktes und spielt eine wesentliche Rolle bei der enzymatischen Verdauung von Nahrungsbrei sowie bei der Aufnahme von Wasser, Kohlenhydraten, Proteinen, Fetten, Mineralstoffen, wichtigen Vitaminen und Medikamenten (Fuchs et al. 1990; Rödl et al. 1990). Die hohle, tubuläre Struktur des Dünndarms umfasst bei Erwachsenen durchschnittlich sieben Meter Länge und stellt damit den längsten Abschnitt des gastrointestinalen Traktes dar (Abbildung 1). Der Dünndarm wird in drei Abschnitte unterteilt: Duodenum, Jejunum und Ileum (Koop 2010). Für eine einfache Mahlzeit werden bis zu 5 h benötigt, um die Gesamtlänge des Dünndarms zu passieren und verarbeitet zu werden (Fish und Burns 2023). Dabei wird überschüssiges Wasser aufgenommen, die verbleibenden Speisereste in den Dickdarm befördert und in Stuhl umgewandelt (Volk und Lacy 2017). Der Abtransport sowie die Verteilung aufgenommener Substanzen erfolgen weiter über die Pfortader oder Lymphgefäße (Rödl et al. 1990). Der Dünndarm spielt nicht nur beim Transport und Verdau von Nahrung eine große Rolle, sondern auch als Sekretions- und Immunorgan sowie als Hormonproduzent (Fuchs et al. 1990; Rödl et al. 1990). Die Oberfläche des Dünndarms besteht aus Kerckringschen Falten, Schleimhautzotten und Mikrovilli (Rödl et al. 1990). Zu den Bestandteilen der Darmwand zählen Serosa, Muskularis, Submukosa und Mukosa. Die Mukosa wiederum wird in drei Abschnitte unterteilt: Die Muscularis mucosae bildet eine schmale Gewebeschicht aus glatten Muskelzellen. Daran schließt sich die Lamina propria als Bindegewebsschicht und das hochspezialisierte intestinale Epithel an. Dieses bildet den Abschluss zum Darmlumen hin und vollzieht durch Absorption und Sekretion lebenswichtige Funktionen (Koop 2010). Charakteristisch für die Mukosa in Duodenum und Ileum sind Zotten als fingerförmige Ausbuchtungen von etwa 0,5 bis 1 mm Länge. Zusammen mit dazwischen liegenden Vertiefungen (Krypten) wird die Oberfläche bei einem Verhältnis Zotten zu Krypten von 1:7 bis 1:10 um das 7- bis 14-fache vergrößert (Koop 2010). Somit beträgt die vergrößerte Resorptionsfläche insgesamt ca. 200 m² (Brandes et al. 2019).

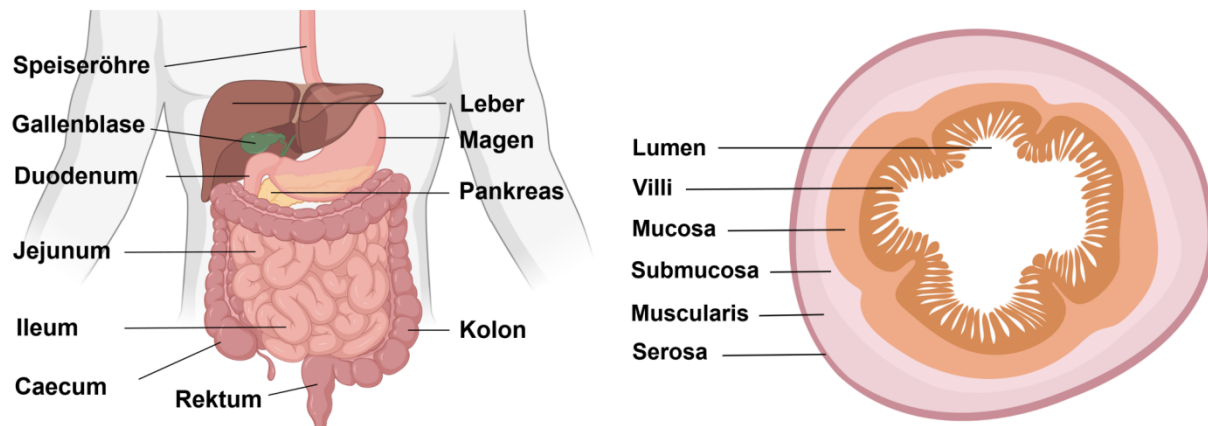


Abbildung 1: Anatomie des humanen Gastrointestinaltraktes. Links: Die verschiedenen Abschnitte des Gastrointestinaltraktes. Der obere Gastrointestinaltrakt wird unterteilt in Speiseröhre, Magen und Duodenum. Der untere Teil gliedert sich in Jejunum, Ileum, Caecum, Kolon und Rektum. Rechts: Querschnitt des Jejunums. Der typische Aufbau aus verschiedenen Gewebeschichten bildet in der Summe die Darmwand. Diese besteht aus der Serosa, Muscularis, Submucosa, Mucosa und den Villi. Adaptiert nach (Ewe und Karbach 1987; Stojanović et al. 2022), erstellt mit BioRender.com (2023).

2.1.2 Das Dünndarmepithel

2.1.2.1 Zelltypen und molekulare Mechanismen

Das Dünndarmepithel besteht aus verschiedenen Zelltypen: absorptive Enterozyten, sekretorische Becher- und enteroendokrine Paneth-Zellen. Diese unterscheiden sich je nach Lage, Anzahl und Verteilung im Dünndarm (Tillmann 2016). Im Epithel der Zotten finden sich überwiegend absorptive Enterozyten, an deren Oberfläche sich zur Vergrößerung der Resorptionsfläche (14- bis 40-fach) 3 000 bis 7 000 Mikrovilli befinden (Koop 2010; Zhu et al. 2017). Enterozyten spielen eine große Rolle bei der Verdauung und der Aufnahme von Wasser, Nährstoffen und Vitaminen sowie unkonjugierten Gallensäuren (Miron und Cristea 2012). Dabei ermöglichen Transportproteine für Kohlenhydrate, Aminosäuren, Peptide und Natrium sowie zahlreiche Verdauungsenzyme wie Laktase und Enterokinase die Absorption sämtlicher Nahrungsbestandteile (Koop 2010). Durch die Enterozyten wird eine selektive Barriere gebildet, die von Arzneimitteln zunächst parazellulär oder transzellulär passiert werden muss, bevor der Wirkort erreicht wird. Somit hat die Barrierefunktion Einfluss auf die Absorption und somit die Bioverfügbarkeit von Medikamenten (Chan et al. 2004). Zusätzlich besitzen Enterozyten durch regulative Mechanismen des apikal lokalisierten Natrium/Glucose-Cotransporters 1, den basolateralen Transporter Na^+/K^+ -ATPase sowie den Glucosetransporter 2 (GLUT-2) eine wichtige Funktion bei der Aufnahme von Nährstoffen und Glucose (Thorsen et al. 2014).

Innerhalb des intestinalen Epithels liegt der Kryptengrund zum Schutz vor Scherstress und toxischen Substanzen in einer geschützten Region. Dort befindet sich das vom endodermalen Keimblatt abstammende Stammzellenkompartiment, bestehend aus pluripotenten Stammzellen an der Basis und stark proliferierenden Vorläuferzellen am Rand des

Kryptengrunds (Abbildung 2). Die Enterozyten des Dünndarmepithels unterliegen somit einer ständigen Erneuerung (Crosnier et al. 2006). Innerhalb von drei Tagen differenzieren sich die Enterozyten in die verschiedenen Epithelzelltypen (van der Flier und Clevers 2009). Die gut organisierte Struktur des Zytoskeletts im humanen Dünndarm sorgt zudem mit einer Wundheilung von fünf bis zehn $\mu\text{m}/\text{h}$ für ein hohes Potential zur Regeneration und Selbstheilung (Heath 1996; Parker et al. 2017).

Becherzellen (Goblet-Zellen) zählen zu den am häufigsten vorkommenden sekretorischen Zelltypen und kommen in etwa 10 bis 15 % des Dünndarmepithels vor (Noah et al. 2011). Sie befinden sich am oberen Ende der Krypten und zwischen den Enterozyten (Koop 2010). Die primäre Funktion von Becherzellen ist die Produktion und Sekretion von u.a. Mucin 2-Glykoprotein (MUC2) und die Aufspaltung von Nahrungsbestandteilen (Kim und Ho 2010; Birchenough et al. 2015; Zhou et al. 2020). Die Mucus-Schicht wirkt für die Epithelzellen zusätzlich als Schutz gegen schädliche luminale Bestandteile (Noah et al. 2011). Becherzellen sorgen zusätzlich für die Regulierung der Immunfunktion und die Aufrechterhaltung der Homöostase innerhalb des intestinalen Epithels (Birchenough et al. 2015).

Paneth-Zellen befinden sich wie die Becherzellen an der Basis der Krypten und haben eine Lebenserwartung von ca. 20 Tagen. Sie sind Drüsenzellen mit hoher biosynthetischer und sekretorischer Aktivität und sezernieren Wachstumsfaktoren, Enzyme (u.a. Lysozym, LYZ), und antimikrobielle Peptide (Koop 2010; Tillmann 2016). Paneth-Zellen sorgen durch die bakteriolytische Funktion von LYZ hauptsächlich für antimikrobiellen Schutz. Dadurch wird eine Abwehrbarriere im Dünndarmepithel aufgebaut und zusätzlich eine modulierende Funktion auf die mikrobiologische Darmflora ausgeübt (Tillmann 2016).

Der Dünndarm gilt als größtes endokrines Organ. Enteroendokrine Zellen liegen eingestreut in das Epithel der Zotten und Krypten im gesamten Darm vor. Sie produzieren zahlreiche Hormone (Chromogranine) wie u.a. Chromogranin A (CHGA) und dienen somit der Regulation und Koordination der Verdauungstätigkeit, durch z.B. der Sekretion von Verdauungssäften, der Resorption und Peristaltik (Tillmann 2016).

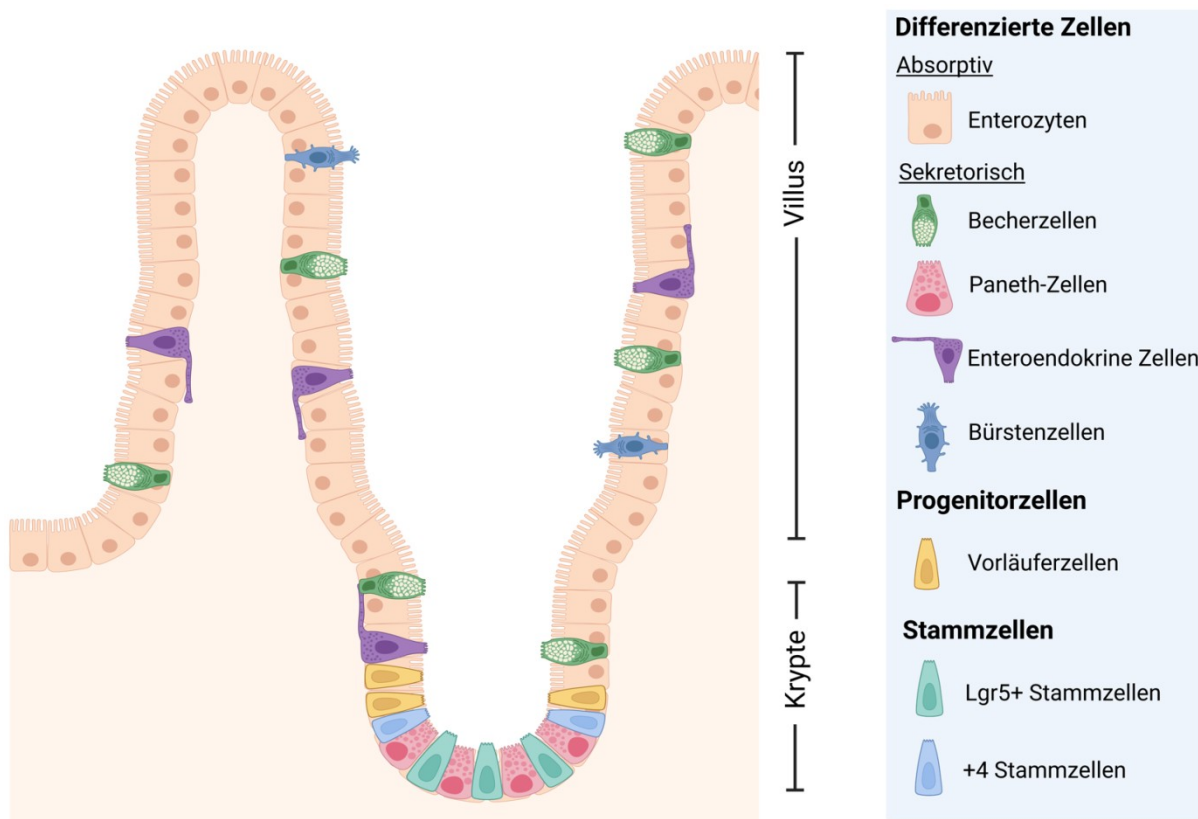


Abbildung 2: Zytomorphologie des Dünndarmepithels. Stammzellen werden unterteilt in Lgr5+ und +4 und liegen zusammen mit den Paneth-Zellen an der Basis der Krypten. Die Stamm- und Vorläuferzellen sorgen durch Differenzierungsprozesse ständig für eine Erneuerung des Epithelbesatzes. Im Bereich des Villus werden die differenzierten Epithelzellen unterteilt in absorptive Enterozyten sowie sekretorische Becher-, Bürsten- und enteroendokrine Zellen. Adaptiert nach (Carulli et al. 2014), erstellt mit BioRender.com (2023). Lgr5+: Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5.

2.1.2.2 Physiologische Barriere und intestinale Transportmechanismen

Innerhalb des Dünndarmepithels sind benachbarte Enterozyten durch Tight Junctions (TJ) miteinander verbunden und bilden somit ein dichtes interzelluläres Netzwerk (Alqahtani et al. 2021). Diese interzellulären adhäsiven Verbindungen sorgen für einen Zusammenhalt des Dünndarmepithels und ermöglichen dadurch die physiologische Barrierefunktion. Der Dünndarm weist eine vergleichsweise hohe Permeabilität auf, die jedoch innerhalb des Gastrointestinaltraktes von proximal nach distal durch die Zunahme abdichtender TJ zunimmt. Dies steht im Einklang mit der biologischen Funktion der jeweiligen Abschnitte (Amasheh et al. 2011). So findet im proximalen Abschnitt die Resorption von Nährstoffen statt, wohingegen der distale Abschnitt für eine Abdichtung und Konzentrierung der Faeces sorgt.

2.1.2.2.1 Parazellulärer Transport

Der parazelluläre Transport ist besonders für kleine hydrophile Arzneimittel von Bedeutung. Der Anteil an parazellulär transportierten Arzneimitteln ist jedoch klein und hat üblicherweise

eine geringere orale Bioverfügbarkeit (Cano-Cebrián et al. 2005). Nur kleine hydrophile Moleküle sind in der Lage, den Intrazellularraum ohne Hindernisse zu passieren (Abbildung 3, A). Die interzellulären Junctions des Darmepithels werden in Adherens Junctions, Desmosome, Gap Junctions und TJ unterteilt (Friend und Gilula 1972). Zumeist gelangen Stoffe durch die TJ zum Intrazellularraum (Abbildung 3, B), die durch fehlende Interaktion mit Membrantransportern vom transzellulären Transport ausgeschlossen werden (Bjarnason et al. 1995; Hayashi et al. 1997). Die Struktur der TJ besteht u.a. aus Transmembranproteinen wie Claudin (Furuse et al. 1998) und Occludin (Furuse et al. 1993) sowie intrazellulären Proteinen wie Zonula Occludens (ZO) (Stevenson et al. 1986). TJ sind in ihrer molekularen Zusammensetzung sehr variabel, wodurch ein selektiver Transport unterschiedlich großer Moleküle geregelt werden kann und somit die parazelluläre Permeabilität bestimmt wird (Heiskala et al. 2001; Chediack et al. 2003). Zusätzlich kann die Regulierung des parazellulären Transports durch die Interaktion von Zonula occludens-1 (ZO-1) mit Occludin und dem Aktin-Cytoskelett erfolgen (Fanning et al. 1998).

2.1.2.2.2 Transzellulärer passiver/aktiver Transport

Transzellulärer Transport von Molekülen durch die apikale als auch die basolaterale Zellmembran kann prinzipiell durch einen passiven- oder trägervermittelten Mechanismus erfolgen. Passive Transportvorgänge (Abbildung 3, A-C) können ohne Energieverbrauch und entlang des Konzentrationsgradienten ablaufen, aktive Transportvorgänge (Abbildung 3, D-F) entgegen dem Konzentrationsgradienten benötigen jedoch Energie. Diese kann beim sekundär aktiven Transport aus dem elektrochemischen Gradienten gewonnen werden, beim primär aktiven Transport wird die Energiebereitstellung durch ATP-Hydrolyse gewährleistet (Chen und Lui 2023).

Ein Großteil der oral verabreichten Medikamente ist lipophil und wird durch passiven transzellulären Transport absorbiert (Hunter und Hirst 1997). Lipophile Stoffe können zwar durch die apikale Zellmembran diffundieren, der weitere Verlauf durch die basolaterale Membran bis in die Blutbahn ist jedoch nicht immer gesichert (Chan et al. 2004). Substanzen, die für die Absorption durch passiven transzellulären Transport geeignet sind, können sowohl Substrate für enterozytischen intrazellulären Metabolismus als auch für apikale Efflux-Mechanismen sein (Hunter und Hirst 1997; Hunter et al. 1993). Natürlich vorkommende Trägersubstanzen wie Nährstoffe, Vitamine und Gallensalze werden über den trägervermittelten transzellulären Transport absorbiert und sind ebenso für bestimmte hydrophile Arzneimittel von Bedeutung (Kim et al. 1993). Die Absorption von Arzneimitteln durch vesikulären Transport (Endozytose) und deren Transport durch die Zelle hindurch (Transzytose) spielt im Darm eine untergeordnete Rolle. Der transzytotische Transport ist jedoch für die Verabreichung von Impfstoffen oder Antigenen relevant (Hunter und Hirst 1997; Jepson et al. 1996).

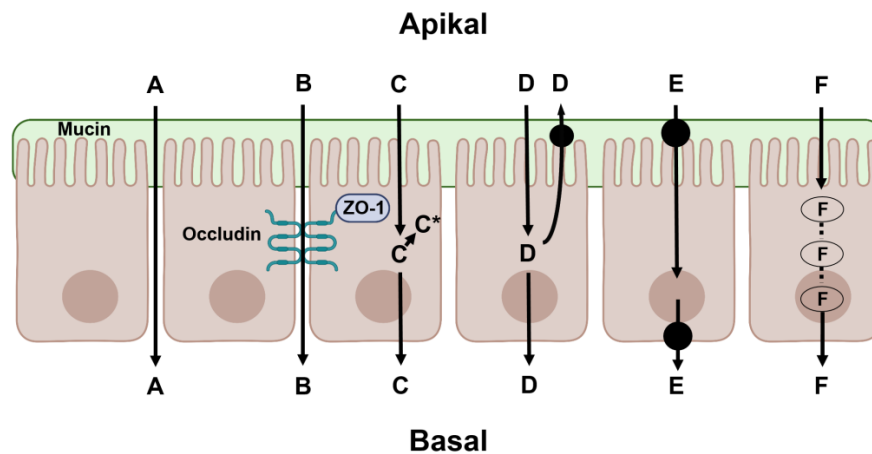


Abbildung 3: Dünndarm-Resorption: Schematische Darstellung intestinaler Transportrouten, die für die Arzneimittelresorption relevant sind. A) parazelluläre Diffusion sowie B) parazelluläre Diffusion reguliert durch TJ, C) transzelluläre passive Diffusion, C*) intrazellulärer Metabolismus, D) transzelluläre Diffusion verändert durch apikale Efflux-Mechanismen, E) trägervermittelter transzellulärer Transport und F) transzelluläre vesikuläre Transzytose. Das intrazelluläre ZO-1 sorgt durch Interaktion u.a. mit Occludin für eine Veränderung der parazellulären Permeabilität und hat neben der Mucinschicht Einfluss auf die Absorption von Arzneimitteln. Verändert nach (Hunter und Hirst 1997; Haroun et al. 2023). Erstellt mit BioRender.com (2023). TJ: Tight Junctions, ZO-1: Zonula occludens-1.

2.2 Biotransformation

Xenobiotika sind körperfremde Stoffe, die nicht vom menschlichen Organismus gebildet werden können und meist anthropogenen Ursprungs sind. Ein großer Teil dieser Stoffe wird durch Medikamente oder über die Nahrung aufgenommen. Da viele Xenobiotika toxische Eigenschaften besitzen, ist die Biotransformation ein essentieller Schritt für die Detoxifikation und Eliminierung lipidlöslicher Xenobiotika. Innerhalb des intestinalen Medikamententransportes werden aufgenommene Xenobiotika über Transportproteine der Lamina epithelialis mucosae resorbiert und in intestinalen Epithelzellen (IECs) durch Biotransformation umgewandelt. Die Bioverfügbarkeit von Arzneimitteln ist dabei abhängig vom Grad der Resorption im Darm, der Biotransformation sowie dem Eliminationsweg (Kullak-Ublick 2021). Diese werden zwar gut resorbiert und im Körper verteilt, nach biliärer Exkretion können diese im Darm allerdings rückresorbiert werden (Rollins und Klaassen 1979). Da ständig lipidlösliche Xenobiotika über die Nahrung aufgenommen werden, ist die Biotransformation für den Körper lebensnotwendig. Der Prozess kann in drei Phasen unterteilt werden (Nakata et al. 2006) (siehe Abbildung 4).

Die erste Phase umfasst den First-Pass-Metabolismus und beinhaltet die Oxidation, Reduktion und Hydrolyse des Ausgangsstoffes. Dieser Prozess findet nach oraler Exposition hauptsächlich in der Leber statt, der Dünndarm gilt jedoch als wichtigster Ort für die extrahepatische Metabolisierung (Lin und Lu 2001; Paine et al. 2006). Der First-Pass-Metabolismus wird als häufiger Grund für eine variable oder unvollständige Bioverfügbarkeit von etwa 50 % aller oral verabreichten Arzneistoffe angesehen (Thummel 2007; Ho et al. 2017). Eine ent-

scheidende Rolle im Metabolismus der meisten Pharmaka spielt die in Phase I stattfindende Oxidation an Cytochrom P450 (CYP). Durch Reaktionen der CYP-Enzyme werden hauptsächlich funktionelle Gruppen in die Substrate eingefügt bzw. reaktive Gruppen geschaffen (Guengerich 2001; Allendörfer et al. 2006). Innerhalb der CYP-Enzyme sind beim Menschen 57 Isoenzyme 18 verschiedener Familien bekannt, die sich in ihrer Substratspezifität und Induzierbarkeit unterscheiden (Sim und Ingelman-Sundberg 2010). Neben den CYPs zählen auch die UDP-Glukuronyltransferasen (UGTs) zu den integralen Bestandteilen des endoplasmatischen Retikulums (ER). Bei der Katalyse ist das Flavoprotein NADPH-Cytochrom-P450-Reduktase beteiligt, welches ebenso in der Membran des ER lokalisiert ist (Lin und Lu 1998). Besondere Bedeutung haben mikrosomale Enzyme, die direkt an das ER gebunden sind. Aufgrund ihrer Unspezifität gegenüber Substraten, können dadurch auch in der Zukunft neu synthetisierte chemische Verbindungen mithilfe der CYPs hydroxyliert werden (Allendörfer et al. 2006). Nach wie vor besitzen die wirkstoffabbauenden Phase I-Enzyme, insbesondere die CYP-Enzyme die größte Bedeutung in der Biotransformation von Arzneimitteln sowie deren Interaktionen, da diese am Metabolismus von über 90 % aller sich auf dem Markt befindlichen Arzneistoffe mitwirken (Lewis 2003). Innerhalb des Dünndarmepithels findet der Metabolismus in den Enterozyten durch das intestinale CYP3A4 statt (Watkins 1997). CYP3A4 ist zwar zu einem Anteil von 70 % an der intestinalen CYP-Aktivität beteiligt, führt jedoch in manchen Fällen zu einer Exposition von weniger als 15 % der verabreichten Dosis (Guengerich 1999; Thummel 2007; Kolars et al. 1992). Im weiteren Verlauf der Absorption von Arzneimitteln durch das intestinale Lumen gelangen diese durch die mesenterischen Kapillargefäße und sind dabei metabolischer Transformation durch zahlreiche Enzyme, insbesondere Phase-II-Enzyme wie den UGTs und Sulfotransferasen ausgesetzt (Shen et al. 1997).

In dieser zweiten Phase findet die Konjugation dieser funktionellen Gruppen neben den UGTs und Sulfotransferasen auch durch Enzymfamilien wie den Methyltransferasen und N-Acetyltransferasen statt. Dabei werden polare Gruppen in das Molekül mit eingeführt und die Polarität von endo- und xenobiotischen Stoffen erhöht. Primäre Metaboliten, die nach Phase I noch nicht ausscheidungsfähig sind, können somit in Phase II einerseits in wasserlösliche Stoffe transformiert und ausscheidungsfähig gemacht, andererseits können toxische Stoffe so detoxifiziert werden (Allendörfer et al. 2006; Jakoby und Ziegler 1990). So wird beispielsweise durch die Enzyme der UGT-Superfamilie die Konjugation der Stoffe mit Uridindiphosphoglukuronat katalysiert und dadurch deren biliäre bzw. renale Ausscheidungsfähigkeit erhöht (Arndt 2019). Innerhalb der UGTs ist das Enzym UGT1A6 am besten untersucht. Es ist u.a. im Dünndarm exprimiert und fungiert z.B. als Ligand für den Pregnan-X-Rezeptor (PXR) (Tukey und Strassburg 2000; Bock und Köhle 2005). Bei der Entgiftung und Eliminierung potentiell schädlicher Stoffe und Arzneimittel besteht zwischen den

Metabolisierungsenzymen und intestinalen Transportproteinen aufgrund sich überschneidender Substratspektren oftmals ein intensives Wechselspiel (Müller et al. 2017).

In der dritten Phase ermöglichen Transporter den Durchtritt der intrazellulär lokalisierten Enzyme durch die Zellmembran. Transporter werden in zwei Gruppen unterteilt: 49 ATP-abhängige (*ATP-binding cassette*, ABC) Efflux-Transporter und 362 *Solute Carrier* (SLC-) Transporter. ABC-Transporter sind unter Energieverbrauch am aktiven Transport beteiligt, die SLCs hingegen ermöglichen passiven Transport durch die Zellmembran (He et al. 2009; Velamakanni et al. 2007).

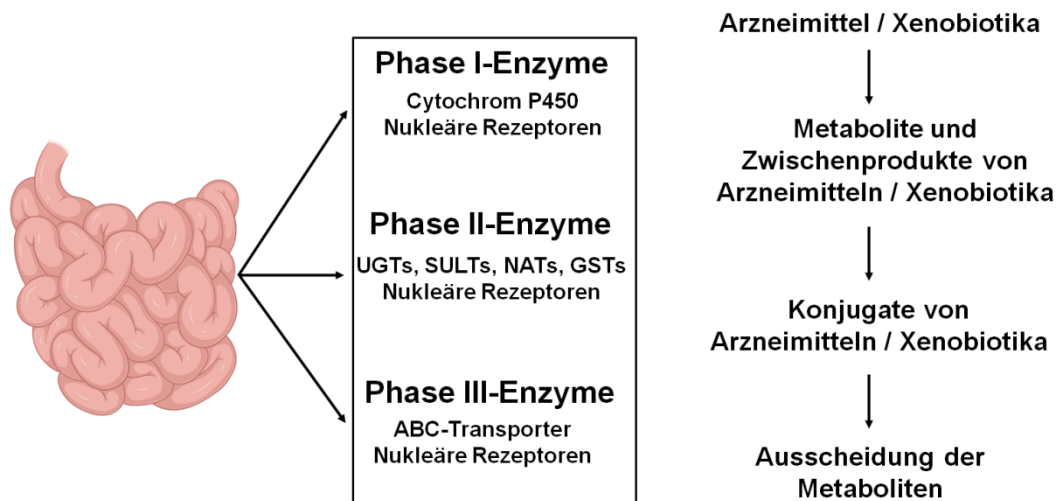


Abbildung 4: Die Phasen der Biotransformation. Übersicht über die wesentlichen Schritte und mitwirkenden Enzyme beim Fremdstoffmetabolismus. Drei unterschiedliche Enzymgruppen (Phase I-III-Enzyme) sowie nukleäre Rezeptoren sind nach der Absorption im Dünndarm in die Verteilung, Metabolisierung und Ausscheidung von Wirkstoffen involviert, adaptiert nach (Mendiratta et al. 2014). Erstellt mit BioRender.com (2023). ABC: ATP-abhängige Efflux-Transporter, GST: Glutathion-S-Transferase, NAT: N-Acetyltransferase, SULT: Sulfotransferase, UGT: UDP-Glukuronyltransferase.

2.2.1 Transportproteine im Dünndarm

Barriere-bildende Zellen stellen durch die Expression von Membrantransportern eine Art duales Filtersystem dar, welches die Pharmakokinetik von Arzneimitteln beeinflusst. Eine schematische Übersicht über die intestinalen Transportproteine und deren Verteilung in Dünndarm und Kolon ist in Abbildung 5 dargestellt. Intestinale Transportproteine (kurz: Transporter) können in Influx- und Efflux-Transporter unterteilt werden. Die Influx-Transporter sind an der Resorption von essentiellen Substanzen wie Nährstoffen aber auch Arzneimitteln beteiligt, während die Efflux-Transporter unerwünschte Xenobiotika aus dem Zellinneren schleusen. Ein Großteil der apikal-lokalisierten Efflux-Transporter zählt zu den ABC-Transportern, welche die Absorption und Distribution von Arzneimitteln limitieren können. Besondere Bedeutung haben apikal-lokalisierte Influx-Transporter, die der Wirkung der ko-lokalisierten Efflux-Transporter entgegenwirken können und so Absorption und Reabsorption fördern (Nagy et al. 2016).

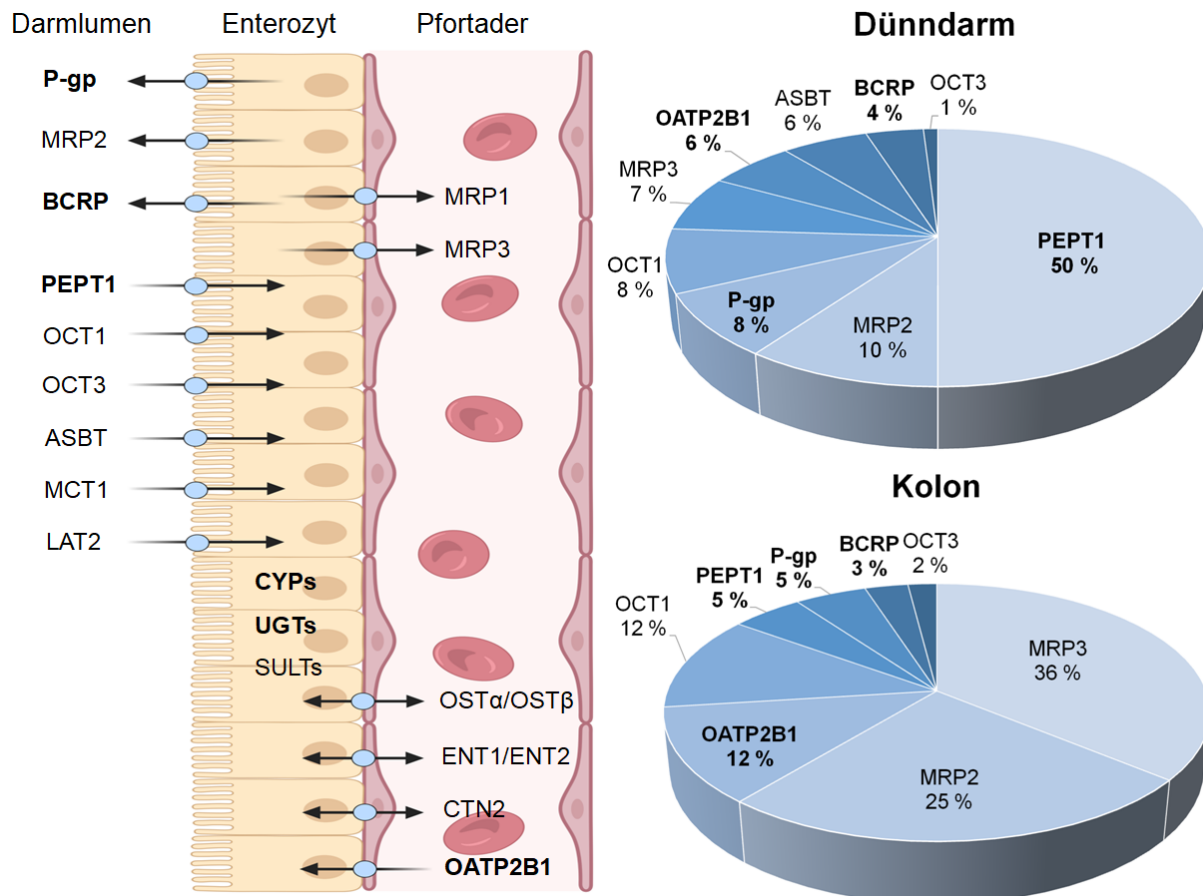


Abbildung 5: Schematische Übersicht über die Verteilung humaner intestinaler Transportproteine. Links: Longitudinale Expression klinisch relevanter Metabolisierungsenzyme, ABC- und SLC-Transporter in Enterozyten entlang des menschlichen Dünndarms, adaptiert nach (Drozdik et al. 2020), erstellt mit BioRender.com (2023). Die in dieser Arbeit untersuchten Enzyme und Transporter sind fett hervorgehoben. Rechts: Prozentuale Zusammensetzung ausgewählter ABC- und SLC-Transportproteine im Dünndarm und im Kolon, adaptiert nach (Drozdik et al. 2014; Oswald et al. 2013). BCRP: *Breast Cancer Resistance Protein*, CYP: Cytochrom P450, MRP: *Multidrug Resistance-Related Protein*, OAT: *Organo-Anion-Transporter*, PEPT: *Peptidtransporter*, P-gp: *Permeabilitätsglykoprotein*, SULT: *Sulfotransferase*, UGT: *UDP-Glukuronyltransferase*.

2.2.1.1 Apikale Influx-Transporter

Viele endo- und xenobiotische Substanzen einschließlich vieler Arzneimittel sind organische Anionen oder Kationen. Diese sind ohne die Absorption durch apikale Aufnahme-Transporter nicht in der Lage, durch die Zellmembran zu diffundieren. Neben den ABC-Transportern sind die SLC-Transporter an der Disposition und Eliminierung von Arzneimitteln beteiligt und vermitteln die Aufnahme von Substanzen in die Zelle. SLC-Transporter werden in die SLCO- und die SLC22A Superfamilie unterteilt, welche die wesentlichen organischen Anionen- oder Kationen-Transporter beinhalten. Zur SLCO-Superfamilie zählen die organisch anionisch transportierenden Polypeptide (OATPs), die SLC22A-Superfamilie wiederum unterteilt sich in die organisch kationischen Transporter und die organisch anionischen Transporter. Individuelle Vertreter beider Superfamilien sind in den meisten Epithelschichten des menschlichen Körpers exprimiert und sorgen dort aufgrund ihrer überschneidenden Substratspezifität für den Transport eines breiten Spektrums an strukturell unterschiedlichen Substanzen. Grund-

sätzlich sind OATPs am Transport größerer hydrophober organischer Anionen, die organisch kationischen Transporter am Transport von Kationen und die organisch anionischen Transporter am Transport kleinerer hydrophiler organischer Anionen beteiligt (Roth et al. 2012). Im menschlichen Darm ist innerhalb der OATPs hauptsächlich der Aufnahmetransporter OATP2B1 (*SLCO2B1*) exprimiert (Drozdik et al. 2014). Der intestinale OATP2B1 ist in den Enterozyten lokalisiert, besitzt eine breite Substratspezifität und ist somit relevant für die intestinale Absorption und Disposition von Xenobiotika (Chen et al. 2020; Zamek-Gliszczyński et al. 2018). Dies zeigt auch die Ernennung von OATP2B1 als Transporter mit zunehmender klinischer Bedeutung durch das Internationale Transporter Consortium (Zamek-Gliszczyński et al. 2018). Bei der Verdauung werden Proteine in kleinere Peptide wie Dipeptide und Tripeptide zerlegt (Wu 2016). Diese werden im Dünndarm durch den Peptidtransporter 1 (PEPT1, *SLC15A1*) aufgenommen. PEPT1 ist daher auch für die Aufnahme strukturell ähnlicher Verbindungen oder Arzneimittel von Bedeutung (Wang et al. 2017a). Die zusätzlich durch die Nahrung aufgenommenen Monosaccharide wie D-Glucose, D-Galaktose und D-Fruktose können aufgrund ihrer hydrophilen Natur das Darmepithel nicht passiv durchdringen (Kellett 2001). Zu diesem Zweck ist GLUT2 (*SLC2A2*) hierbei in den Transport und den bidirektionalen Flux in und aus der Zelle involviert (Leturque et al. 2005).

2.2.1.2 Apikale Efflux-Transporter

Efflux-Transporter auf apikaler Seite der Membran sind ausschlaggebend für die transzelluläre Absorption, Verteilung und Exkretion von Arzneistoffen durch erleichterte Exkretionsprozesse von Xenobiotika oder endogener Substanzen. Innerhalb der Transporter weisen die ABC-Transporter im menschlichen Dünndarm die höchste Expression auf, unter ihnen das Permeabilitätsglykoprotein (P-gp, *ABCB1*), das *Breast Cancer Resistance Protein* (BCRP, *ABCG2*) sowie *Multidrug Resistance-Related Proteine* (MRPs) (Drozdik et al. 2014). Diese bilden zusammen eine wichtige Barriere für intestinale Absorptionsprozesse, die durch ein sich teilweise überlappendes Substratspektrum begünstigt wird (Misaka et al. 2013). ABC-Transporter sind für viele zelluläre Prozesse notwendig, von denen einige von medizinischer Relevanz sind. Im Menschen sind 48 ABC-Transporter bekannt, die je nach Größe und Struktur in sieben Unterfamilien unterschieden werden (Hughes 1994; Allikmets et al. 1996). Die apikalen Efflux-Transporter P-gp, BCRP und MRPs zählen zu den am besten untersuchtesten ABC-Transportern des Gastrointestinaltraktes. Innerhalb des Dünndarms sind diese überwiegend in der apikalen (luminalen) Membran der Enterozyten lokalisiert und limitieren aktiv die orale Bioverfügbarkeit von potentiell toxischen Fremdstoffen, indem diese vom intrazellulären Raum zurück ins intestinale Lumen transportiert werden. Somit wird die Absorption in die Blutbahn verhindert (Taipalensuu et al. 2001; Chan et al. 2004; Estudante et al. 2013). Über den transzellulären Transport werden Stoffe weiterhin über intrazelluläre

Phase I- und Phase II-metabolisierende Enzyme umgewandelt, die wiederum als Substrate für die Efflux-Transporter fungieren können (Chan et al. 2004). P-gp und BCRP liegen zu etwa gleichen Anteilen im Dünndarm und Kolon vor (Drozdik et al. 2014). In Multidrug resistenten Tumorzellen sind P-gp und BCRP als adaptive Antwort der Zellen auf Chemotherapie-induzierten Zelltod jedoch überexprimiert und werden daher zu den Multidrug Transportern gezählt (Robinson und Tiriveedhi 2020; Nakanishi und Ross 2012).

2.2.1.3 Induktion von Enzymen und Transportern

Bestimmte Arzneimittel können eine Veränderung der Expressionsstärke von Enzymen oder Transportern bewirken. Eine Hoch- bzw. Herunterregulation von Enzymen oder Transportern beeinflusst somit die ADME (Absorption, Distribution, Metabolismus und Exkretion)-Prozesse von Arzneimitteln und können zur Veränderung des Wirkungs- bzw. Schädigungsgrades von Xenobiotika führen, die wiederum Substrate der Enzyme und Transporter sind (Liu 2019). Bei diesen entgiftenden Enzym- und Transportvorgängen spielen verschiedene nukleäre Rezeptoren, wie z.B. der PXR (*NR1I2*) und der Vitamin-D-Rezeptor (VDR, *NR1I1*) eine entscheidende regulative Rolle. Dabei handelt es sich um Liganden-aktivierte Transkriptionsfaktoren, die durch eine hohe Zahl an Xenobiotika und endogenen lipophilen Substanzen aktiviert werden (Chawla et al. 2001; Kullak-Ublick 2021). Der PXR ist hierbei als Aktivator für den Abbau zahlreicher Xenobiotika und der PXR-vermittelten Induktion bzw. Inhibition von Proteinen wie z.B. der CYP-, UGT- und ABC-Familie von zentraler Bedeutung. Durch einen Liganden des PXR kann so die Gentranskription des Enzyms oder Transporters induziert werden (Abbildung 6). Nach der Ligandenbindung formt PXR zusammen mit dem Retinoid-X-Rezeptor einen Heterodimer und bindet wiederum an das „*xenobiotic response element*“ im Promotor der Gene (Liddle und Goodwin 2002; Eloranta et al. 2005). Durch die Regulation von *CYP3A4* als auch *ABCB1* durch PXR wird angenommen, dass die Detoxifikation vieler Xenobiotika während der oralen Absorption durch diese Enzyme koordiniert stattfindet und dadurch die intrazelluläre Konzentration von Arzneistoffen reduziert wird (Li et al. 2017; Christians et al. 2005).

Das klinisch relevante Tuberkulostatikum Rifampicin gilt als potentieller Aktivator des PXR und prototypischer Induktor von *CYP3A4* und P-gp (Pan et al. 2021). Das entzündungshemmende Glucocorticoid Dexamethason gehört ebenso zu den Liganden des humanen PXR und fungiert als *CYP3A4*-Substrat als potentieller Induktor von *CYP3A4* (Eloranta et al. 2005).

Natürlicher Ligand des VDR ist $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D_3 (VD₃), die biologisch aktive Form von Vitamin D. VD₃ steuert über die Aktivierung des VDR den Kalzium- und Phosphorhaushalt des menschlichen Körpers und hat Einfluss auf die Immunfunktion, das Zellwachstum, Differenzierungsprozesse und die Regulierung intestinaler Enzyme und Transporter. Eine

hohe Anzahl synthetischer VD3-Analoga wird daher für den therapeutischen Einsatz z.B. zur Behandlung von Krebs, Knochenerkrankungen, Autoimmunerkrankungen und mikrobieller Infektionen eingesetzt (Carlberg und Molnar 2012; Choi et al. 2020).

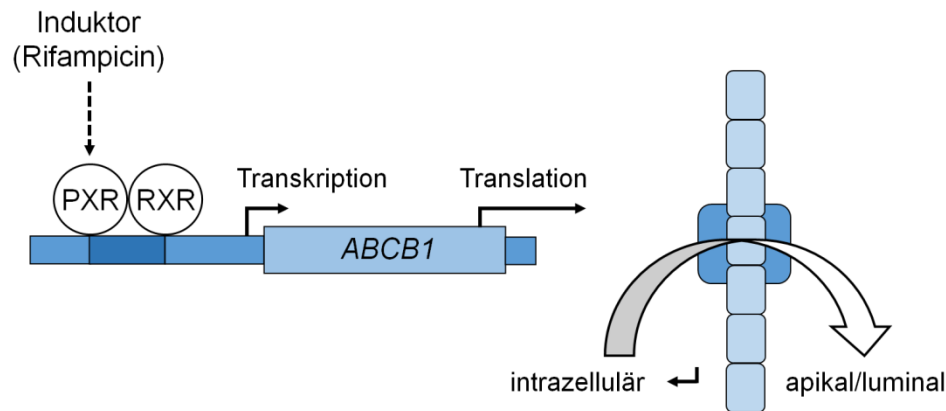


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Induktion des Membrantransporters P-gp (ABCB1) durch Rifampicin. Einer der wichtigsten Efflux-Transporter P-gp limitiert die intestinale Absorption spezifischer Substrate und ist ein typischer Ort von Arzneimittelinteraktionen. Ein prominenter Induktor von P-gp ist Rifampicin, welches intrazellulär an den nukleären Rezeptor PXR bindet. Dieser zählt zu den wesentlichen Regulatoren der P-gp-Expression auf transkriptioneller Ebene. Nach Ligandenaktivierung formt PXR mit RXR ein Heterodimer und bindet an regulative Bereiche der Zielgene (Geick et al. 2001; Kliewer und Willson 2002). Durch die Induktion von P-gp kann der Auswärtstransport von Substanzen aus der Zelle beschleunigt und somit die Bioverfügbarkeit herabgesetzt werden. P-gp, Permeabilitätsglykoprotein, PXR, Pregnan-X-Rezeptor; RXR, Retinoid-X-Rezeptor. Adaptiert nach (Cascorbi 2012).

2.3 Präklinische intestinale Modellsysteme

2.3.1 In vitro

Das am meisten genutzte *in vitro* Modell zur Untersuchung der Permeabilität von Arzneimitteln ist die aus einem kolorektalen Karzinom (KRK) abgeleitete Zelllinie Caco-2. Sie ist als Enterozytenmodell für Untersuchungen von Transportvorgängen im Dünndarm etabliert. Bei erreichter Konfluenz differenzieren die adhärent wachsenden Caco-2-Zellen nach zwei bis drei Wochen zu polarisierten Enterozyten. Unter Bildung von TJ und der Expression intestinaler Enzyme, Transporter und Rezeptoren entsteht ein dichter Monolayer, der auf apikaler Seite einen Bürstensaum aus Mikrovilli besitzt. Dadurch ist im Zellkulturmodell eine große Ähnlichkeit zum physiologischen Dünndarmepithel gegeben (Antunes et al. 2013; Ferruzza et al. 2012; Matsumoto et al. 1990). Erkenntnisse über Differenzierungsprozesse im humanen Kolonkarzinom sind bisher bei einer limitierten Anzahl von Zelllinien bekannt. Obwohl weitere Modelle für die Simulation des intestinalen Epithels beschrieben sind, gilt die Caco-2 bislang als Goldstandard für die Vorhersage intestinaler Permeabilität bei der oralen Verabreichung von Arzneimitteln im menschlichen Körper (Simon-Assmann et al. 2007; Hidalgo et al. 1989; Hilgers et al. 1990). Jedoch ist dieses Modell durch einige Faktoren limitiert. Mittlerweile existieren zahlreiche Subklone in unterschiedlichen Passagen, die der parentalen

Caco-2-Zelllinie entstammen. Durch Veränderungen funktionaler Eigenschaften und Differenzierungsmerkmalen wird der Vergleich von erhobenen Daten mit denen aus der Literatur erheblich erschwert (Sambuy et al. 2005). Dem Zellkulturmodell fehlen zudem sezernierende Becherzellen, wodurch eine Ko-Kultur mit der Mucin-produzierenden Krebszelllinie HT-29 zur Verbesserung der Aussagekraft experimenteller Ergebnisse entwickelt wurde (Li et al. 2013). Zusätzlich ist das Modell durch die Dauer des Differenzierungsprozesses von drei Wochen für die weite Anwendung von Hochdurchsatz-Screening (HTS) bei der Testung neuer Arzneimittel limitiert (Cai et al. 2014). Hierzu wurde durch veränderte Kulturbedingungen versucht, den Zeitraum der Kultur zu verkürzen (Sevin et al. 2013; Lentz et al. 2000). Durch eine schwache Expression und eine geringe Induzierbarkeit des Enzyms CYP3A4 ist das Caco-2-Modell weiterhin in seiner Anwendung für ADME-Studien limitiert (Schmiedlin-Ren et al. 2001; Nakamura et al. 2002).

Weitere KRK-Zelllinien wie HT-29, LS-180 und T84 sowie primäre fetale humane Dünndarmepithelzellen besitzen entweder eine schwache Ausbildung von TJ oder unzureichende CYP3A4-Expression bzw. Induzierbarkeit (Kumar et al. 2010; Yamaura et al. 2016). Human-induzierte pluripotente Stammzell-abgeleitete Enterozyten werden daher als geeigneteres Modell für Arzneimittel-vermittelte CYP3A4-Induzierbarkeit betrachtet (Negoro et al. 2016). Dieses Verfahren gilt jedoch als vergleichsweise aufwendig, zeitintensiv und teuer.

Untersuchungen zur intestinalen Physiologie werden zunehmend an mikrofluidischen Systemen, sogenannten *gut-on-a-chips* durchgeführt. Die Integration von Biosensoren innerhalb dieser Systeme ermöglicht die Überwachung von relevanten physiologischen Parametern wie Permeabilität oder Barriereigenschaften. Die Nutzung dieser Systeme ist aktuell jedoch durch die Anbindung an externe analytische Verfahren stark limitiert (Marrero et al. 2021).

2.3.2 In vivo

Die Durchführung von Tierversuchen gilt wegen des Vorhandenseins von systemischer Blutzirkulation noch immer als Goldstandard präklinischer Wirkstoffforschung. Obwohl sich ADME-Prozesse in Versuchstieren gut reproduzieren lassen, ist es schwierig, alle Parameter beim Durchfluss von Molekülen *in vivo* durch die biologischen Barrieren zu unterscheiden und zu trennen (Dahlgren und Lennernäs 2019; Meigs et al. 2018). Tierversuche scheitern wegen Spezies-spezifischen Unterschieden in der Expression von Transportern, Enzymen oder der Immunabwehr somit oft an der Vorhersage der Arzneimittelabsorption und dem First-Pass-Metabolismus im menschlichen Körper (Negoro et al. 2016; Romero und Vela 2014). Insgesamt gelten *in vivo* Modelle zudem als arbeits- und zeitaufwändig und teuer. Aus diesem Grund ist es notwendig, die Entwicklung alternativer *in vitro* Modelle unter Einhaltung des 3R-Prinzips (*Replace* = Vermeiden, *Reduce* = Verringern, *Refine* = Verbessern) für die

präklinische Wirkstoffforschung voranzutreiben (Dothel et al. 2013; Doke und Dhawale 2015).

2.3.3 Ex vivo

Weitere Untersuchungsmöglichkeiten von intestinalen Transportprozessen ergeben sich durch die Anwendung von *ex vivo* Techniken. Dabei handelt es sich um Modelle, die außerhalb eines Organismus kultiviert werden. Zu den bekanntesten Modellen zählt die Ussing-Kammer, welche für die Untersuchung von Transportvorgängen durch verschiedene Epithelgewebe, wie z.B. unterschiedliche Segmente des Darms, entwickelt wurde. Diese besteht aus zwei Hälften, die durch eine polarisierte Epithelschicht voneinander abgetrennt werden und die Kammer in apikale und basolaterale Einheiten aufteilt. Mittels einer Elektrode kann die Spannung gemessen und dadurch Rückschlüsse auf die Permeabilität und Transportvorgänge des Gewebes getroffen werden (Pearce et al. 2018).

In den letzten Jahren gewann die Verwendung von Organoiden aus adulten Stammzellen zunehmend an Bedeutung. Hierbei handelt es sich um eine Miniatur-Version eines Epithels, das als 3D-Modell kultiviert wird und *ex vivo* expandiert werden kann. Humane intestinale Organoide stellen im Vergleich zu Tiermodellen die *in vivo* Situation weitestgehend dar und eignen sich daher für die Untersuchung von epithelialer Physiologie (Clevers 2016). Der Erhalt der Zelldiversität und Selbsterneuerung gestaltet sich aufgrund ihrer rigiden Abhängigkeit von differenzierungsfördernden Wachstumsfaktoren jedoch als schwierig (Fujii et al. 2018).

2.4 Zielstellung

Die orale Verabreichungsform von Medikamenten wird aufgrund der vereinfachten und nicht-invasiven Anwendung noch immer am häufigsten bevorzugt (Alqahtani et al. 2021). In den letzten Jahren hat daher insbesondere die Absorption und Metabolisierung oral verabreichter Medikamente durch den Dünndarm an Aufmerksamkeit gewonnen (Paine et al. 1996). Die Darmbarriere zählt unter anderem durch die Präsenz regulierender Efflux-Transporter, einer Schleimschicht und der Ausbildung eines Netzwerkes von TJ zu den hauptsächlich limitierenden Faktoren bei der Aufnahme von Arzneistoffen (Azman et al. 2022). In der präklinischen Phase der Arzneimittelforschung spielt daher die Untersuchung der ADME-Parameter zur Verbesserung der Bioverfügbarkeit eine große Rolle (Singh 2006). Durch den Mangel an geeigneten *in vitro* Modellen wurden 2021 jedoch allein in Deutschland dafür mehr als 300 000 Versuchstiere in der Arzneimittelforschung eingesetzt (BfR 2021). In den letzten 40 Jahren wurden Ersatz- und Ergänzungsmethoden zu zeitaufwändigen, teuren und ethisch bedenklichen Tierversuchen zur Untersuchung intestinaler Arzneimittelaufnahme und Transportvorgänge ausführlich beschrieben und erforscht. Entscheidend war dabei die Etablierung der KRK-Zelllinie Caco-2 (Fogh et al. 1977). Entsprechend den Richtlinien der Arzneimittelbehörden FDA und EMA wird Caco-2 bis heute als geeignetes *in vitro* Modell für die Arzneimittelforschung geführt (EMA 2012; FDA 2018). Zahlreiche Untersuchungen belegten jedoch, dass Caco-2-Zellen aufgrund fehlender Vergleichbarkeit zur *in vivo* Situation sowie in ihrer funktionellen Anwendung für ADME-Untersuchungen limitiert sind (Brück et al. 2017; Negoro et al. 2016).

Ausgehend von der einer hohen Anzahl bereits etablierter primärer als auch Patienten-abgeleiteter Xenograft-Zelllinien der BioBank Rostock sollen neu etablierte Zellmodelle hinsichtlich ihrer Eignung als humane intestinale *in vitro* Modelle untersucht werden. Ziel dieser Arbeit ist es konkret, bestimmte Kriterien als Anforderungen an humane intestinale *in vitro* Modelle und deren Anwendbarkeit für ADME-Studien an einer hohen Anzahl von Zelllinien möglichst umfassend zu überprüfen. Dies bedeutetet im Einzelnen:

1. Charakterisierung und Beschreibung der morphologischen Eigenschaften
2. Beurteilung der epithelialen Integrität
3. Überprüfung der Differenzierung in spezialisierte intestinale Epithelzellen
4. Vergleich der konfluenzabhängigen Gen- und Proteinexpressionsdaten mit gesunden normalen Dünndarmproben und jejunalem Gewebe
5. Untersuchung des regulatorischen Einflusses von Arzneimitteln auf die Aktivität bzw. Expression metabolisierender Enzyme, intestinaler Transportproteine und nukleärer Rezeptoren

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Biologisches Material

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien sind in Tabelle A1 aufgeführt. Sämtliche der 49 Zelllinien entstammen der HROC-Kollektion der BioBank Rostock (Nomenklatur: HH, Hansestadt Hamburg, HRO = Hansestadt Rostock, C = KRK, M = Maus, Met = Metastase, T = Transfer, Tu = Tumor, plus fortlaufende Nummerierung) (Mullins et al. 2019). Die kommerziell erhältliche Caco-2-Zelllinie (Martins-Gomes et al. 2022) wurde von der Firma Cell Lines Service erworben. Es handelt sich bei allen Zelllinien um etablierte immortalisierte humane KRK-Zelllinien.

Tabelle 1: Verwendete Biopsien aus humanem Dünndarm für Genexpressionsanalysen

Gewebe	Name	Lokalisation	Herkunft
Humane Dünndarm-Biopsien	HROC345	Jejunum	BioBank Rostock
	HROC381	Ileum	
	HROC503	Ileum	

Tabelle 2: Verwendete humane Jejunum-Biopsien für die Proteinquantifizierung

Gewebe	Alter, Geschlecht	Herkunft	Referenz
Humane Jejunum-Biopsien	24 bis 54 Jahre, 1 x weiblich, 5 x männlich	sechs Organspender polnischen Ursprunges	(Drozdziak et al. 2014)

3.1.2 Geräte, Software und Datenbanken

3.1.2.1 Geräte

Autoklav	Systec
Bio-Print ST4	Vilber Lourmat
Brutschrank	Memmert
CytoViva Hyperspectral Imaging System	CytoViva Inc.
Einfrierboxen	Nalgene® Labware
Eisflockenbereiter	Scotsman
Elektrophorese-Netzgerät	Life Technologies
Epithelial Voltohmmeter EVOM3	World Precision Instruments Europe
FACSVerse™-Durchflusszytometer	BD Biosciences

Gelkammer (groß)	Bio-Rad Laboratories GmbH
Gelkammer (klein)	Analytik Jena AG
HandyStep®	Brand
Heizplatte HT21	Harry Gestigkeit
Homogenisator Precellys® 24	Bertin Instruments
Kühlschrank 4 °C	Liebherr
Laborschüttler Rocker 3D digital	IKA Werke GmbH & Co. KG
Lichtmikroskop PrimoVert	Zeiss
Magnetrührer mit Heizplatte	IKA Werke GmbH & Co. KG
Mikrowelle	Bosch
NanoDrop1000-Spektrophotometer	Thermo Fisher Scientific
PCR UV3-HEPA-Cabinet	Analytik Jena AG
pH-Meter (pH720)	WTW
Pipettierhelfer, Pipetboy acu 2	INTEGRA Biosciences GmbH
Präzisionswaage Kern EW	KERN & Sohn GmbH
Ratiolab® accupetta	Ratiolab
Rollenmischer SRT6	Stuart Scientific Ltd.
Sterile Werkbank	Thermo Fisher Scientific
Tecan Infinite 200 Pro	Tecan
Thermocycler	Bio-Rad Laboratories GmbH
Thermomixer compact	Eppendorf
Tiefkühlschrank -20 °C	Liebherr
Tiefkühlschrank -80 °C	PHCBi
Stickstofftank	Worthington Industries, Inc.
Stickstoffbehälter	KGW Isotherm
Vakuumpumpe VacuSafe	Integra Biosciences AG
ViiA™ 7 Real-Time PCR System	Life Technologies GmbH
Vortex-Genie® 2	Scientific Industries
Wasserbad	Memmert

Zentrifugen:

Mini-Zentrifuge	Labnet
Mikroliterzentrifuge Mikro 200	Hettich
Tischzentrifuge Rotina 420R	Hettich

3.1.2.2 Software

Adobe Photoshop CS5	Adobe Inc.
Citavi 6.14	Swiss Academic Software
FACSSuite™ V1.0.6.5230	BD Biosciences
FlowJo 10.8.1	FlowJo
GraphPad Prism 9.0.0	Graphpad Software Inc.
I control	Tecan
Microsoft Office 2016	Microsoft Corporation
Ocular Software	QImaging
QuantStudio Real-time PCR Software 1.3	Thermo Fisher Scientific
VisionCapt	Vilber Lourmat
ZEN core v.2.7	Zeiss

3.1.2.3 Online-Datenbanken und Hilfsprogramme

Die für diese Arbeit verwendeten Datenbanken und Hilfsmitteln sind in Tabelle 3 aufgeführt. Aufgrund der regelmäßigen Nutzung sind genaue Zeitangaben nicht möglich und sind daher nicht angegeben.

Tabelle 3: Verwendete Online-Datenbanken und Hilfsprogramme

Name	URL (<i>Uniform Resource Locator</i>)
BioRender	https://www.biorender.com/
In-Silico-PCR	https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr
Origene	https://www.origene.com/
Primer-Blast	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/
Pubmed	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/

3.1.3 Verbrauchsmaterialien

Deckgläser, Plastik, 13 mm, rund	Carl Roth GmbH
Deckgläser, Glas, 13 mm, rund	Plano GmbH
Dispenser-Tips	Brand
FACS-Röhrchen, 5 ml, Rundboden	BD Falcon
Kryo-Röhrchen CryoPure	Sarstedt
Mikroplatte, 96-Well, weiß, opak	Greiner Bio-one
Mikroplatte, 96-Well, U-Boden	Greiner Bio-one
Mikro-Schraubröhre, 2 ml	Sarstedt
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld
Objektträger, 76 x 26 x 1 mm	Marienfeld
Pasteurpipetten	Thermo Fisher Scientific
PCR-Platte Halbrand, 96-Well, transparent	Sarstedt
PCR-Tubes, 0,2 ml	Sarstedt
Pipettenspitzen, ohne Filter	divers
Pipettenspitzen, mit Filter	Sarstedt
Reaktionsgefäße, 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Sarstedt
Reaktionsgefäß, 1,5 ml, SafeSeal	Sarstedt
Reaktionsgefäße, Protein LoBind	Eppendorf
Schutzfolien für PCR-Platten	divers
Serologische Pipetten	Sarstedt
2 ml, 5 ml, 10 ml	
Transwell®-24-Well-Zellkultureinsätze, 8 µm Porengröße	Greiner Bio-One
Zellkulturflaschen	Sarstedt
T25, T75, T175	
Zellkulturplatten, F-Boden	Sarstedt
6-, 24-, 96-Well	
Zellschaber	Sarstedt
Zellsieb, 100 µm Porengröße	PluriSelect
Zentrifugenröhrchen PP, konisch	Sarstedt
15 ml, 50 ml	

3.1.4 Chemikalien und Reagenzien

100 bp DNA-Leiter	Bioron
10x PCR-Puffer (inkl. MgCl ₂)	Bioron
1,25-dihydroxyvitamin D3	Hycultec
5x Reverse Transkriptase-Puffer	Bioron
5-FU	Zentralapotheke der Universitätsmedizin Rostock
96 % Ethanol unvergällt	Walter-CMP GmbH & Co. KG
Agarose	Genaxxon BioScience GmbH
Albumin	Carl Roth GmbH
Ameisensäure	Sigma-Aldrich
Ammoniumhydrogencarbonat	Sigma-Aldrich
Azeton	RCI Labscan
Bovines Serumalbumin, Fraktion V	Carl Roth GmbH
Bromphenolblau	AppliChem GmbH
DEPC-behandeltes Wasser	divers
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem GmbH
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck
Dithiothreitol	Sigma-Aldrich
DMEM ohne Phenolrot	PAN-Biotech
DMEM/F12 (1:1)	PAN-Biotech
dNTPs (je 10 mM)	Bioron
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	Carl Roth GmbH
Essigsäure	J.T. Baker
FACSuite™ CS&T research beads	BD Biosciences
FACS™ Sheath Fluid	BD Biosciences
Fetales Kälberserum (FKS)	PAA
Fluoresceinisothiocyanat-konjugiertes Dextran 4000 (FD-4)	Sigma-Aldrich
Glycerin	Merck
Hoechst 33342	Sigma-Aldrich
Iodacetamid	Sigma-Aldrich

Irinotecan	Zentralapotheke der Universitätsmedizin Rostock
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Kristallviolett	Carl Roth GmbH
L-Glutamin (200 mM)	PAA
Methanol	J.T. Baker
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH
NaOH	Carl Roth GmbH
Oligo(dT) ₁₅ -Primer und Random-Primer Mix	Metabion
Paraformaldehyd	Carl Roth GmbH
PBS ⁻ (ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺)	PAN-Biotech
PBS ⁺ (mit Ca ²⁺ und Mg ²⁺)	PAA
ProteaseMAX™	Promega
qPCR Mastermix (2x) Low Rox™ (50 nM)	Genaxxon BioScience GmbH
Universal RNA Purification Kit	Roboklon
Reverse (200 U/μl)	Bioron
Rifampicin	Carl Roth GmbH
Oxaliplatin	Zentralapotheke der Universitätsmedizin Rostock
Taq-Polymerase	Bioron
Tripanblau	AppliChem GmbH
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	AppliChem GmbH
Triton-X 100	AppliChem GmbH
Trypsin / EDTA (1:250)	PAN-Biotech
Xylencyanol	AppliChem GmbH

3.1.4.1 Medien, Puffer und Lösungen**0,2 % Kristallviolett**

Kristallviolett		2 g
Ethanol (96 %)		20 ml
<i>A. dest.</i>	<i>ad</i>	1000 ml

0,5 % Triton-X

1x PBS		50 ml
Triton-X		0,25 ml

1 % SDS

SDS		10 g
<i>A. dest.</i>	<i>ad</i>	1000 ml

1x PBS

10x PBS		9000 ml
<i>A. dest.</i>	<i>ad</i>	1000 ml

1x TAE-Puffer

50x TAE-Puffer		20 ml
<i>A. dest.</i>	<i>ad</i>	1000 ml

10x PBS

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$		18,05 g
NaCl		80 g
KCl		2 g
KH_2PO_4		2 g
<i>A. dest.</i>	<i>ad</i>	1000 ml

Die Pufferlösung wurde mit NaOH auf einen pH von 7,4 eingestellt.

4 % Paraformaldehyd

1x PBS		100 ml
Paraformaldehyd		4 g

Die Lösung wurde mit NaOH auf einen pH von 7,4 eingestellt.

5x Ladepuffer

EDTA (0,5 M, pH 8,0)	1,86 g
Bromphenolblau	0,25 %
Xylencyanol	0,25 %
<i>A. dest.</i>	25 ml
Glycerin	25 ml

Die Pufferlösung wurde mit konzentrierter HCl auf einen pH von 8 eingestellt.

50x TAE-Puffer

Tris-Base	242 g
EDTA (0,5 M, pH 8,0)	100 ml
Essigsäure	57,1 ml
<i>A. dest.</i> <i>ad</i>	1000 ml

Die Pufferlösung wurde mit NaOH auf einen pH von 8 eingestellt.

70 % Ethanol

96 % Ethanol	364,5 ml
<i>A. dest.</i>	135,5 ml

Einfriermedium

FKS	50 ml
Dimethylsulfoxid	10 %

Blockierungspuffer

1x PBS	50 ml
BSA	10 %

Zellkulturmedium 0 % FKS

DMEM/Hams F12	500 ml
L-Glutamin	2 mM

Zellkulturmedium 10 % FKS

DMEM/Hams F12	500 ml
FKS	10 %
L-Glutamin	2 mM

3.1.4.2 Antikörper

Tabelle 4: Verwendete Antikörper für immunzytochemische Färbungen

Name	Hersteller	Verdünnung	Spezies
Muc-2	Santa Cruz Biotechnology	1:50	Mensch
Chromogranin A	Santa Cruz Biotechnology	1:50	Mensch
Lysozym	Santa Cruz Biotechnology	1:50	Mensch
ZO-1	Santa Cruz Biotechnology	1:50	Ratte

Tabelle 5: Verwendete Antikörper für durchflusszytometrische Analysen

Name	Fluorochrom	Isotyp	Hersteller
CD15	PerCP	Maus IgG1	BioLegend
CD24	PE	Maus IgG1	ImmunoTools
CD29	APC	Maus IgG1	BioLegend
CD39	APC-Cy7	Maus IgG1	BioLegend
CD40	APC	Maus IgG1	ImmunoTools
CD43	FITC	Maus IgG1	ImmunoTools
CD44	APC	Maus IgG2b	ImmunoTools
CD50	FITC	Maus IgG1	ImmunoTools
CD54	APC	Maus IgG2b	ImmunoTools
CD55	FITC	Maus IgM	ImmunoTools
CD56	PE	Maus IgG2a	ImmunoTools
CD58	PE-Cy7	Maus IgG1	BioLegend
CD66adeceb	FITC	Maus IgG1	ImmunoTools
CD69	APC-Cy7	Maus IgG1	BioLegend
CD71	APC	Maus IgG1	ImmunoTools
CD86	PE-Cy7	Maus IgG2b	BioLegend
CD102	FITC	Maus IgG2a	Acris
CD152	PE	Maus IgG1	BioLegend
CD171	PE	Maus IgG2a	BioLegend
CD178	PE	Maus IgG1	eBioscience
CD274	PE-Cy7	Maus IgG2b	BioLegend
CD326	APC	Maus IgG2b	Miltenyi

3.1.4.3 Kits

Tabelle 6: Verwendete Kits für Genexpressionsanalysen und Proteinquantifizierung

Name	Hersteller
Bicinchoninsäure-Assay	Thermo Fisher Scientific
CYP3A4/Luciferin-IPA P450-Glo™ Assay	Promega
Precellys Tissue RNA Kit	Peqlab
ProteoExtract Native Membrane Protein Extraction Kit	Merck
Universal RNA Purification Kit	Roboklon

3.1.4.4 Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion synthetisiert. Die für die Genexpressionsanalysen verwendeten Primer sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7: Verwendete Primer für Genexpressionsanalysen

Primer	NCBI Referenz	Sequenz (5'-3')	Fragmentgröße (bp)	Annealingtemperatur (°C)
ABCB1 (P-gp)	NM_000927.5	GCTGTCAAGGAAGCCAATGCCT TGCAATGGCGATCCTCTGCTTC	120	58
ABCG2 (BCRP)	NM_004827.3	GTTCTCAGCAGCTCTTCGGCTT TCCTCCAGACACACCACGGATA	145	58
GAPDH	NM_001357943.2	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC GAAGATGGTGATGGGATTTC	226	58
NR1I1 (VDR)	NM_000376.3	CGCATCATTGCCATACTGCTGG CCACCATCATTACACGAACTGG	101	58
NR1I2 (PXR)	NM_022002.3	GCTGTCCTACTGCTTGGAAAGAC CTGCATCAGCACATACTCCTCC	124	58
OCLN (Occludin)	NM_002538.1	ATGGCAAAGTGAATGACAAGCGG CTGTAACGAGGCTGCCTGAAGT	124	58
SLC2A2 (GLUT-2)	NM_000340.2	ATGTCAGTGGGACTTGTGCTGC AACTCAGCCACCATGAACCAGG	131	58
SLCO2B1 (OATP2B1)	NM_001145212.3	TGGGCACAGAAAACACACCT CGGCTGCCAAAATAGCTCAC	265	58
UGT1A6	NM_001072.4	GCAAAGCGCATGGAGACTAAGG GGTCCTTGTGAAGGCTGGAGAG	148	58

3.1.4.5 Peptide

Tabelle 8: Verwendete proteospezifische Peptide für LC-MS/MS

Protein	Peptidsequenz
BCRP	SLLDVLAAR
OATP2B1	SSPAVEQQLLVSGPGK
PEPT1	TLPVFPK
P-gp	AGAVAEVLAAIR

3.2 Methoden

Sämtliche Experimente erfolgten in den Laboren der Molekularen Onkologie und Immuntherapie (PD Dr. rer. nat. Michael Linnebacher) im BMFZ und im Biomedicum an der Universitätsmedizin Rostock. Eine Übersicht über die einzelnen Arbeitsschritte und verwendeten Methoden ist in Abbildung 7 dargestellt.

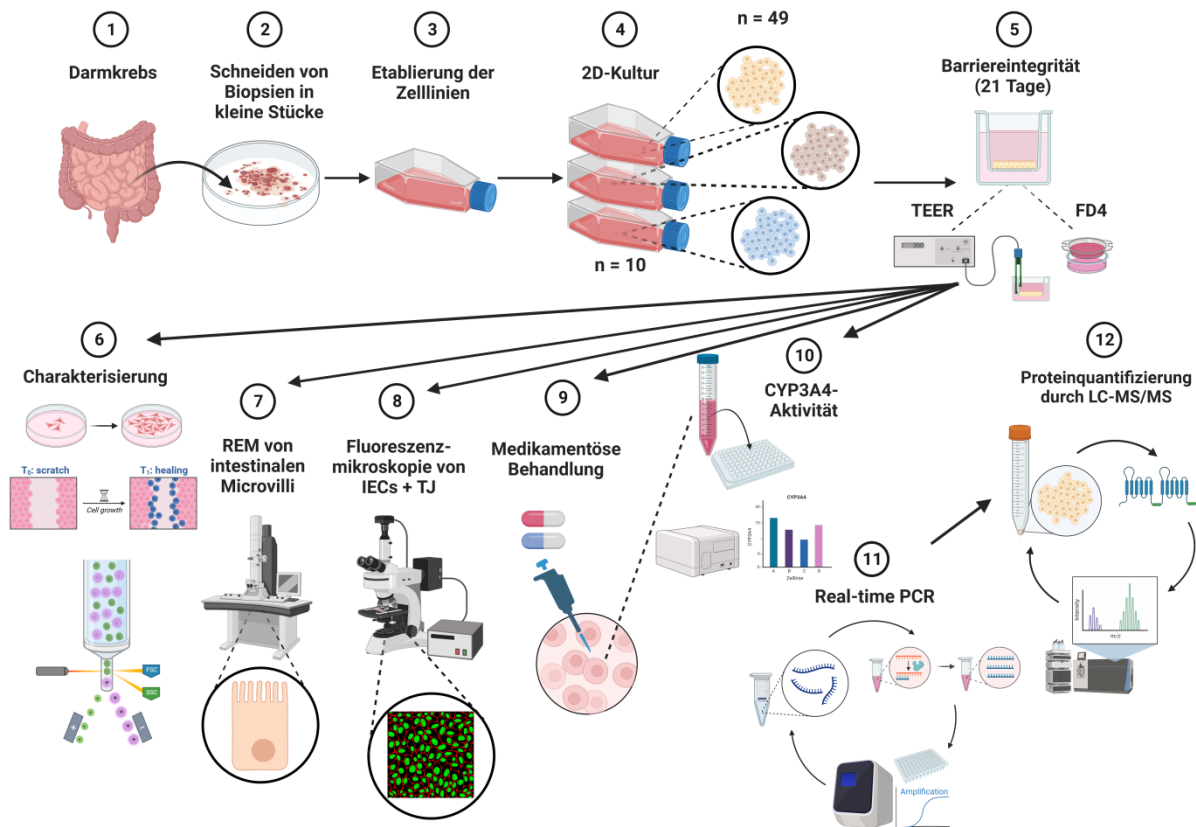


Abbildung 7: Schematische Darstellung der verwendeten Methoden. Dargestellt sind die einzelnen Arbeitsschritte zur Identifizierung und Charakterisierung neuartiger humaner intestinaler *in vitro* Modelle, erstellt mit BioRender.com (2023). CYP3A4: Cytochrom P450 3A4, FD4: Fluoresceinisothiocyanat-dextran 4, IECs: intestinale Epithelzellen, LC-MS/MS: Flüssigkeitschromatografie-Massenspektrometrie/Massenspektrometrie, PCR: Polymerase-Kettenreaktion, REM: Rasterelektronenmikroskopie, TEER: Transepithelialer elektrischer Widerstand, TJ: Tight Junctions.

3.2.1 Etablierung von humanen kolorektalen Karzinom-Zelllinien

Die Etablierung der HROC-Zelllinien erfolgte in der Arbeitsgruppe Molekulare Onkologie und Immuntherapie aus der Abteilung für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und Transplantationschirurgie der Chirurgischen Klinik und Poliklinik der Universitätsmedizin Rostock. Hierzu wurden Gewebestücke aus KRK-Resektaten von Patienten oder aus Xenotransplantaten der Maus mithilfe von Skalpellern zerkleinert, mit einer Pipettenspitze in phosphatgepufferter Saline (*phosphate-buffered saline*, PBS) aufgenommen, durch ein Zellsieb (Porengröße 100 µm, PluriSelect) filtriert und bei 300 g für 7 min zentrifugiert. Die Zellen wurden in Zellkulturmedium aufgenommen, in kollagenbeschichteten 6-Well-Zellkulturplatten ausgesät und in einem

Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Patienten ohne ausdrückliche schriftliche Einwilligung zur Verwendung des Biomaterials wurden von der Probenahme ausgeschlossen. Die Verarbeitung des Patientenmaterials wurde durch die Ethikkommission der Universitätsmedizin Rostock genehmigt (Referenznummer II HV 43/2004 und A 45/2007).

3.2.2 Zellkultur

Für die Kultivierung der HROC- und Caco-2-Zellen sind grundsätzlich aseptische Bedingungen erforderlich. Sämtliche Zellkulturarbeiten fanden daher unter einer Sterilwerkbank (Thermo Fisher Scientific) statt. Alle hitzebeständigen Verbrauchsmaterialien wurden zuvor durch Autoklavieren sterilisiert. Die für die Zellkultur verwendeten Plastikmaterialien waren von Sarstedt, Reagenzien von PAN-Biotech, falls nicht anders angegeben.

3.2.2.1 Kultivierung und Passagieren

Die Zellen wurden in DMEM/F12 (1:1) mit 10 % FKS (fetales Kälberserum) und 2 mM L-Glutamin bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit in Zellkulturflaschen kultiviert. Das Kulturmedium wurde jeden zweiten bis vierten Tag gewechselt. Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von etwa 60 bis 70 % passagiert. Hierzu wurden die Zellen einmal mit PBS⁻ (ohne Ca²⁺ und Mg²⁺) gespült, um Mediumreste zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen für 10 bis 30 min bei 37 °C mit Trypsin / EDTA (1:250) behandelt. Durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren von Zellkulturmedium mit einer Pasteurpipette wurden die Zellen vom Flaschenboden gelöst und die Wirkung des Trypsins durch das FKS inaktiviert. Die geernteten Zellen wurden gezählt und im Anschluss für Experimente oder für die Kryokonservierung genutzt. Für die weitere Kultivierung wurden die Zellen mit einem Verdünnungsfaktor zwischen 1:5 bis 1:10 verdünnt und in die Zellkulturflasche eingesät. Um Veränderungen in Bezug auf die Morphologie, Proliferation und Genexpression zu vermeiden, wurden die Zelllinien maximal bis Passage 45 genutzt und alle Experimente innerhalb von 20 Passagen durchgeführt. Die Zellen wurden in regelmäßigen Abständen auf Kontaminationen mit Mykoplasmen getestet.

3.2.2.2 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl der lebenden Zellen erfolgte mithilfe der Neubauer-Zählkammer und der Trypanblau-Färbung. Bei Trypanblau handelt es sich um einen anionischen Farbstoff, der die Plasmamembran toter Zellen durchdringt und an Proteine bindet. Apoptotische Zellen werden dadurch dunkelblau angefärbt und sind somit mikroskopisch von ungefärbten lebenden Zellen abzugrenzen. Nach der Zellernte wurde die Zellsuspension im Verhältnis von 1:1 mit 0,2 % Trypanblau in einer 96-Well-Zellkulturplatte mit U-Boden (Grei-

ner Bio-One) gemischt. Ein Teil der angefärbten Zellsuspension wurde auf einen Objektträger mit einer Neubauer-Zählkammer (Marienfeld) pipettiert und bei 10-facher Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop (Zeiss) betrachtet. Die Anzahl der lebenden Zellen (N) wurden in zwei Großquadraten (Q) ausgezählt und die Zellkonzentration pro ml (D) unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors V (= 2) anhand folgender Formel verrechnet:

$$D = N/Q \cdot V \cdot 10^4$$

3.2.2.3 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Die Suspensionszellen wurden während der gesamten Zellkulturarbeiten regelmäßig kryokonserviert, um auf Zellen tieferer Passagen zurückzugreifen oder diese im Falle einer Kontamination erneut zu kultivieren. Dazu wurden $3 \cdot 10^6$ Zellen in je 1,5 ml Einfriermedium aufgenommen, in beschriftete Kryo-Röhrchen überführt und mithilfe eines Einfriercontainers auf $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ heruntergekühlt. Das zugesetzte DMSO (Dimethylsulfoxid) wirkt als Frostschutzmittel und sorgt für eine hohe Überlebensrate der Zellen nach dem Auftauen. Die Langzeitlagerung der Suspensionszellen erfolgte in einem flüssigen Stickstofftank bei $-150 \text{ }^\circ\text{C}$. Für die erneute Kultivierung wurden die Kryoröhrchen aufgetaut, die Zellsuspension in 10 ml Zellkulturmedium aufgenommen und in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen transferiert. Nach der Zellzahlbestimmung wurde die Zellsuspension für 7 min bei 300 g zentrifugiert und der Überstand dekantiert, um überschüssiges DMSO zu entfernen. Die Zellen wurden entsprechend der Zellzahl in Zellkulturflaschen mit 5 ml, 10 ml oder 20 ml Zellkulturmedium ausgesät und im Brutschrank inkubiert.

3.2.2.4 Behandlung mit Rifampicin und Vitamin D3

Für die Untersuchung der Medikamenten-Gen-Interaktion von Phase II-III-Enzymen wurden die Zellen mit 20 μM Rifampicin und 100 nM VD3 über einen Zeitraum von 72 h behandelt. Die Zellen wurden mit einer Zelldichte von 2 bis $5 \cdot 10^5$ Zellen pro Well in unbeschichtete 6-Well-Zellkulturplatten ausgesät. Nach Erreichen einer 100%igen Konfluenz wurde das Zellkulturmedium durch die Prüfsubstanzen 20 μM Rifampicin (gelöst in DMSO) und 100 nM VD3 (gelöst in Ethanol) ersetzt und täglich erneuert. Den korrespondierenden Kontrollen wurde Zellkulturmedium mit 0,1 % DMSO (v/v) bzw. 0,1 % Ethanol (v/v) zugeführt. Nach der Inkubation wurden die adhärennten Zellen mithilfe eines Zellschabers schonend abgelöst, mehrmals resuspendiert, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit SafeSeal-Verschluss transferiert und bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ bei 300 g für 7 min abzentrifugiert. Abschließend wurde der Überstand entfernt, die Zellpellets in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Aufarbeitung bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

3.2.3 Charakterisierung

3.2.3.1 Morphologie und Wachstumsverhalten

Die Beurteilung der morphologischen Eigenschaften erfolgte zunächst durch eine Voruntersuchung der Zelllinien, anhand derer einzelne Linien mit ungeeigneten morphologischen Eigenschaften von weiteren Versuchen ausgeschlossen wurden. Hierzu zählten im Einzelnen: langsames Anwachsen der Zellen, Wachsen in inselartigen Kolonien, kein lückenloser epithelartiger Bewuchs, ein rasches Absterben der Zellen nach Erreichen der Konfluenz sowie die übermäßige Bildung domartiger Strukturen. Die Zellen wurden hierzu in einer Dichte von 2 bis $5 \cdot 10^5$ pro Well in unbeschichtete 6-Well-Zellkulturplatten ausgesät und über einen Zeitraum von vier Wochen im Brutschrank inkubiert. Die Morphologie der einzelnen Zelllinien wurde fotodokumentarisch mithilfe eines Lichtmikroskopes mit gekoppelter Kamera und der ZEN core Software (Zeiss) festgehalten.

3.2.3.2 Zellproliferation

Für die Bestimmung der Verdopplungszeit wurden die Zellen je nach Wachstumsverhalten in einer Dichte von $2,5 \cdot 10^3$ bis $5 \cdot 10^4$ pro Well in unbeschichtete 24-Well-Zellkulturplatten ausgesät. Nach 48 h Inkubationszeit im CO_2 -Brutschrank wurden die Zellen täglich an vier aufeinanderfolgenden Tagen mit 0,2 % Kristallviolett (KV) angefärbt. Dabei wurde jeweils das Medium entfernt, die Zellen mit PBS^- gewaschen und mit 500 μl KV für 20 min unter Schütteln bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS^- wurde das mit lebenden Zellen interkalierende KV mit 1 ml 1 % Natriumdodecylsulfat (SDS) gelöst und für 20 min bei RT inkubiert. Die Absorption wurde bei 570 nm am Tecan Infinite 200 Pro gemessen. Die Verdopplungszeit kann mithilfe der Berechnung des exponentiellen Wachstums bestimmt werden. Dabei stellt N_0 den Anfangsbestand, λ die Wachstumskonstante und t die Zeit dar.

$$N(t) = N_0 \cdot e^{\lambda \cdot t}$$

Für die Bestimmung der Verdopplungszeit (T) gilt hierbei:

$$T = \frac{\ln(2)}{\lambda}$$

3.2.3.3 Zellmigration

Der *in vitro wound healing assay* stellt eine schnelle und einfache Technik dar, um die Wundschließungszeit und somit die Zellmigration der Zellen zu bestimmen. Hierzu wurden die Zellen in einer Dichte von 2 bis $5 \cdot 10^5$ pro Well in unbeschichtete 6-Well-Zellkulturplatten

ausgesät. Nach Erreichen der Konfluenz wurde das Medium auf 0 % FKS umgestellt und mittels einer 10 µl Pipettenspitze eine Wunde gekratzt. Um überschüssiges Zellmaterial zu entfernen, wurde vorsichtig mit PBS⁻ gespült. Als Orientierungshilfe wurde eine Linie auf der Rückseite der Platte aufgetragen. Die Weite der Wunde wurde fotodokumentarisch täglich für den Zeitraum von maximal 96 h bei vierfacher Vergrößerung festgehalten. Daraus erfolgte die Berechnung der Zellmigrationsrate R_M durch Subtraktion der initialen Weite der Wunde (W_I) mit der finalen Weite der Wunde (W_F) dividiert durch die Zeit t . Die errechnete Zellmigrationsrate wurde in µm/h angegeben.

$$R_M = \frac{(W_I - W_F)}{t}$$

3.2.3.4 Durchflusszytometrische Analyse von Zelloberflächen-Antigenen

Die Immunphänotypisierung durch Durchflusszytometrie (FACS) mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern erlaubt die Analyse der Expression membrangebundener Glykoproteine, sogenannter CD-Marker (*Cluster of Differentiation*). Es handelt sich zumeist um Antigene mit unterschiedlichen Eigenschaften und Funktionen, darunter Antigene mit therapeutischer Relevanz. Aufgrund des Expressionsmusters kann ein Antigenprofil der jeweiligen Zelllinie erstellt werden, wodurch sich Rückschlüsse auf den Differenzierungsgrad ziehen lassen. Da die Analyse einzig zur Charakterisierung der einzelnen Zelllinien beitragen soll, wurde die Caco-2-Zelllinie als Referenz nicht mitgeführt. Die Zellen wurden für diese Analyse bei 60 bis 70 % Konfluenz geerntet.

Für die durchflusszytometrische Analyse wurden die Zelloberflächen-Antigene durch direkte Antikörperfärbung mithilfe Fluoreszenzfarbstoff-markierter Antikörper markiert und in einem FACSVerseTM-Durchflusszytometer (BD Biosciences) der Core Facility für Zellsortierung und Zellanalyse der Universitätsmedizin Rostock analysiert. Für die Oberflächenfärbung wurden pro Ansatz $2 \cdot 10^5$ Zellen in 500 µl Blockierungspuffer aufgenommen, in ein FACS-Röhrchen überführt und zweimal bei $350 \times g$ für 5 min abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Blockierungspuffer mit jeweils 5 µl Antikörperlösung in einem Gesamtvolumen von 100 µl aufgenommen, gevortext und lichtgeschützt für 15 min bei RT inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen zweimal gewaschen, um nichtgebundene Antikörper zu entfernen. Das Zellpellet wurde in 500 µl Blockierungspuffer aufgenommen und bis zur Messung lichtgeschützt bei 4 °C gelagert. Pro untersuchter Zelllinie wurde eine ungefärbte Probe als Kontrolle mitgeführt. Das FACSVerseTM-Durchflusszytometer ist mit einem blauen (488 nm) und roten (633 nm) Laser ausgestattet und erlaubt die simultane Messung von sechs Fluoreszenzfarbstoffen. Folgende Fluorochrome konnten somit parallel genutzt werden: Allophycocyanin (APC), Fluoresceinisothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE), Peridinin-Chlorophyll-Protein (PerCP),

PE-Cyanin7 (PE-Cy7) und APC-Cy7. Eine Übersicht über die verwendeten Antikörper ist in Tabelle 5 gelistet. Die Messung der Zellen erfolgte mit der Software FACSSuite™ (BD Biosciences) und die Auswertung mit FlowJo (FlowJo). In Vorversuchen wurden Kompensationseinstellungen durchgeführt, um überlagerte Fluoreszenzsignale und somit Fehldetektionen zu vermeiden. Vor Beginn der Messung erfolgte zunächst eine tägliche Qualitätskontrolle mithilfe von einheitlich fluoreszierenden Kalibrierungspartikeln (BD Biosciences). Bei der Auswertung wurde die Zellpopulation der ungefärbten Kontrolle markiert und durch das Auftragen von *Forward Scatter* Fläche (FSC-A) gegen Höhe (FSC-H) Zellaggregate herausgefiltert. Anschließend wurde die *Side Scatter* Fläche (SSC-A) gegen die Höhe (SSC-H) aufgetragen und diese Einstellungen auf alle Messungen angewendet. Nekrotische und apoptotische Zellen sowie Zelldebris wurde somit anhand der Eigenschaften im *Scatter* erfasst und ausgeschlossen und Tumorzellen mit möglichst geringem Hintergrund herausgefiltert. Dadurch konnte aufgrund ihrer Größe und Granularität die typische Tumorzellpopulation markiert werden. Der prozentuale Anteil positiv gefärbter Zellen wurde dann mithilfe von Histogrammen ermittelt.

3.2.3.5 Chemosensitivität-Testung

Für die Bestimmung der Chemosensitivität wurden insgesamt 23 Zelllinien, einschließlich der Caco-2 Zelllinie, bezüglich ihrer Sensitivität auf klinisch zur Therapie des KRK eingesetzten Therapeutika getestet. Hierfür wurden die Wirkstoffe 5-FU, Capecitabin, Irinotecan und Oxaliplatin verwendet. Die jeweiligen Konzentrationen wurden an eine optimale Berechnung der IC_{50} (mittlere inhibitorische Konzentration) angepasst. Für diese Versuche wurden auch einige der zuvor ausgeschlossenen Zellmodelle als Vergleichsgröße mitgeführt. Die Zellen wurden als Triplikate mit einer Zelldichte von 0,5 bis $1 \cdot 10^4$ Zellen pro Well in 150 μ l Zellkulturmedium (10 % FKS) in 96-Well-Zellkulturplatten ausgesät und für 24 h inkubiert. Um die finale Konzentration zu erreichen, wurden die Chemotherapeutika in 50 μ l Zellkulturmedium aufgenommen, in zuvor festgelegten Verdünnungsstufen in die Wells pipettiert und insgesamt für 144 h inkubiert. Nach 72 h Inkubationszeit erfolgte ein Mediumwechsel und die Chemotherapeutika wurden erneut aufgetragen. Die Totkontrolle wurde durch Abtöten der Zellen mit PBS⁻ erreicht. Nach erfolgter Inkubation wurden die Zellen mit PBS⁻ gewaschen und mit 50 μ l 0,2 % KV für 20 min bei RT gefärbt. Im Anschluss wurde das KV entfernt, die Wells dreimal mit PBS⁻ gewaschen und die Platten für die Trocknung bei RT belassen. Das gebundene KV wurde in 100 μ l 1 % SDS gelöst, für 20 min bei RT auf dem Laborschüttler inkubiert und die Absorption bei 570 nm am Tecan Infinite 200 Pro gemessen. Die normalisierte Zellviabilität wurde im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle mithilfe folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellviabilität (\%)} = \frac{(\text{Probe} - \text{Totkontrolle})}{(\text{Lebendkontrolle} - \text{Totkontrolle})} \cdot 100$$

3.2.3.5.1 Bestimmung der IC₅₀

Bei der IC₅₀ handelt es sich um die mittlere Substratkonzentration, die nach entsprechender Inkubationszeit zu einer Hemmung des Zellwachstums von 50 % führt. Die IC₅₀ wurden für die vier Wirkstoffe in den HROC-Zelllinien und der Caco-2 ermittelt. Hierfür wurden die Mittelwerte der um die Lebendkontrolle normalisierten Zellviabilitäten (%) verwendet. Mithilfe der Software GraphPad Prism 9 (Graphpad Software Inc.) wurden diese in logarithmische Werte transformiert und auf einen Wertebereich von 0 bis 100 normalisiert. Im Anschluss erfolgte eine nicht-lineare Regressions-Analyse.

3.2.4 Untersuchung der epithelialen Integrität

Nach Kultivierung der jeweiligen Zellmodelle wurde deren Barriereintegrität anhand der Messung des epithelialen Widerstandes sowie eines Permeabilitätstests analysiert und validiert.

3.2.4.1 Transepithelialer elektrischer Widerstand

Um die Barriereintegrität der in den Transwell kultivierten Zellen zu messen, wurde zunächst der transepitheliale/transendotheliale Widerstand (TEER) der Zellen ermittelt. Hierbei gilt ein TEER $\geq 300 \Omega \cdot \text{cm}^2$ als Evidenz für die Bildung einer funktionellen Barriere mit gut ausgebildeten TJ (Srinivasan et al. 2015; Ghaffarian und Muro 2013). Die TEER-Messung ist eine quantitative nicht-invasive Echtzeitmessung zur Bestimmung der Integrität und Permeabilität eines Epithels bzw. Endothels (Benson et al. 2013; Srinivasan et al. 2015). Der elektrische Widerstand kann hierbei mit handelsüblichen Messsystemen wie dem Epithelial Voltohmmeter EVOM3 (World Precision Instruments) ermittelt werden, wobei eine Elektrode in das apikale Kompartiment und die andere in das basolaterale Kompartiment eingebracht wird (Bednarek 2022). Für die Bestimmung des TEER wurden jeweils $4 \cdot 10^4$ Zellen in 24-Well-Transwell®-Zellkultureinsätze (Greiner) ausgesät. Die basolaterale Kammer wurde dabei mit 750 μl und die apikale Kammer mit 150 μl Zellkulturmedium befüllt. Pro Durchgang wurde ein zellfreies Insert für die Messung des Leerwiderstands der semipermeablen Membran genutzt. Die TEER-Messungen erfolgten von Tag 1 (d1) bis d21 nach Aussaat. Da es sich bei der TEER-Messung um eine temperatursensitive Technik handelt, wurde die Platte für mindestens 20 min vor der eigentlichen Messung bei RT belassen. Zur Vermeidung von Kontaminationen wurden die Elektroden zuvor mit 70 % Ethanol sterilisiert.

Der transepitheliale Widerstand R wird aus der Differenz des Absolutwertes und dem Leerwert (Blank) errechnet.

$$R_{\text{Gewebe}} (\Omega) = R_{\text{Total}} - R_{\text{Blank}}$$

R verhält sich hierbei umgekehrt proportional zur effektiven Fläche der semipermeablen Membran ($M_{\text{Fläche}} = 0,336 \text{ cm}^2$) und wird in cm^2 angegeben (Haorah et al. 2008).

$$R_{\text{Gewebe}} (\Omega) \propto \frac{1}{M_{\text{Fläche}} (\text{cm}^2)}$$

Die finalen TEER-Werte ($\text{TEER}_{\text{Final}}$) werden üblicherweise in $\Omega \cdot \text{cm}^2$ angegeben. Für die Berechnung der $\text{TEER}_{\text{Final}}$ werden die Rohdaten (R_{Gewebe}) mit der effektiven Fläche multipliziert (Haorah et al. 2008; Watson et al. 2013).

$$\text{TEER}_{\text{Final}} = R_{\text{Gewebe}} (\Omega) \cdot M_{\text{Fläche}} (\text{cm}^2)$$

3.2.4.2 FITC-Dextran Permeabilitäts-Assay

Die Untersuchung der parazellulären Permeabilität erfolgte mithilfe des FITC-konjugierten Dextran 4 (FD4) kDa (Kilodalton) Permeabilitäts-Assay. Dextran ist ein Glucosepolymer mit leicht zugänglichen Hydroxyl- und Carbonylgruppen, das häufig als Tracermolekül eingesetzt wird, da es parazellulär durch kultivierte Zellschichten passieren kann (Neely 1960; Miyazaki et al. 2017). Dextran ist zudem gut in Wasser löslich, wird nicht aktiv von Zellen transportiert und findet daher häufig Anwendung in Permeabilitätsstudien (Bednarek 2022). Die Permeabilitäts-Messungen wurden an d3, d5, d7, d9, d14 und d21 im direkten Anschluss an die TEER-Messungen durchgeführt. Hierzu wurden die Zellkultureinsätze mit PBS⁻ gewaschen, die basolaterale Kammer mit 500 μl DMEM ohne Phenolrot und die apikale Kammer mit 150 μl FD4 (0,4 mg/ml, gelöst in PBS⁻) befüllt. Nach 20 min Inkubationszeit bei RT wurden 100 μl der basolateralen Kammer entnommen und als Duplikate in weiße opake 96-Well-Mikroplatten transferiert. Die Fluoreszenzintensität (F) wurde dann mithilfe des Tecan Infinite 200 Pro bei einer Exzitation von 485 nm und Emission von 535 nm bestimmt. Der Leerwert (F_{Blank}) wurde von den Rohdaten subtrahiert und die FD4-Konzentration in Prozent des auf 100 % gesetzten Leerwertes errechnet.

$$\% \text{ Permeabilität} = \frac{F_{\text{Probe}} - F_{\text{Blank}}}{F_{\text{Total}} - F_{\text{Blank}}} \cdot 100$$

3.2.5 Untersuchung des Differenzierungsgrades

3.2.5.1 Immunzytochemische Färbung konfluenten Zellschichten

Die Untersuchung der Expression und der Lokalisation des TJ-Protein ZO-1 sowie der intestinalen Zellmarker MUC2, LYZ und CHGA erfolgte mittels Immunzytochemie. Hierfür wurden

runde unbeschichtete 13 mm-Plastikdeckgläschen (Carl Roth GmbH) mit absolutem Ethanol sterilisiert und in unbeschichtete 24-Well-Zellkulturplatten transferiert. Die Zellen wurden in einer Dichte von 10^4 pro Well ausgesät und bis zum Erreichen der Konfluenz kultiviert. Für ZO-1 erfolgte die Fixierung mit Methanol/Azeton (1:1) für 20 min bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$, die restlichen Proben wurden mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) für 10 min bei RT fixiert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS⁻ gewaschen und mit 0,5 % Triton X-100 (AppliChem) für 5 min bei RT permeabilisiert. Nach erneutem Waschen mit PBS⁻ wurden die Proben mit den primären Antikörpern (verdünnt in PBS⁻, siehe Tabelle 4) für 1 h bei RT und anschließend über Nacht lichtgeschützt bei $4\text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Für die Gegenfärbung der Zellkerne wurden die Proben gewaschen und mit Hoechst 33342 (1:250 in PBS⁻, Hycultec) für 5 min lichtgeschützt bei RT inkubiert. Die Visualisierung erfolgte am hyperspektralen Dunkelfeld-Mikroskop CytoViva® (CytoViva, Inc.) in der Orthopädischen Klinik und Poliklinik der Universitätsmedizin Rostock mit einem 60-fachen Öl-Immersionsobjektiv und der Ocular Software V2.0. (QImaging Ocular Software). Für die Anpassung des Kontrastes sowie die Bildüberlagerung wurde Photoshop CS5 (Adobe Inc.) verwendet.

3.2.5.2 Rasterelektronenmikroskopie

Die konfluenten Zelllayer der HROC-Zelllinien und Caco-2 wurden zur Untersuchung von Zell-Zell-Kontakten und der Bildung von Mikrovilli-Strukturen rasterelektronenmikroskopisch untersucht. Die Zellen wurden hierfür in 24-Well-Zellkulturplatten in einer Dichte von 10^4 pro Well auf 13 mm-Glasdeckgläschen (Plano) ausgesät und bis zum Erreichen einer 100%igen Konfluenz im Brutschrank inkubiert. Nach Entfernung des Zellkulturmediums wurden die Zellen vorsichtig mit PBS⁺ (PAA) gewaschen und anschließend bei $4\text{ }^\circ\text{C}$ in Fixierlösung (2 % Glutaraldehyd-Lösung und 1 % PFA in 0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,3) inkubiert. Die weitere Bearbeitung der Proben erfolgte im Elektronenmikroskopischen Zentrum der Universitätsmedizin Rostock. Nach dreimaligem Waschen mit 0,1 M Natriumphosphatpuffer folgte die Trocknung der Deckgläschen in einer aufsteigenden Ethanolreihe in destilliertem Wasser (30 % für 2 min, 50 % für 5 min und für 15 min in je 70 %, 90 % und absolutem Ethanol). Anschließend wurden die Deckgläschen mit CO₂ nach Herstellerangaben in einem Emitech K850 (Emitech/Quorum Technologies Ltd.) kritisch-Punkt-getrocknet. Die Leitfähigkeit der Oberfläche wurde durch ein Sputter-Beschichtungsverfahren gewährleistet. Dabei wurden die getrockneten Proben mithilfe des Leica SCD 500 sputter coater (Leica Microsystems) mit 10 bis 15 nM Gold überschichtet. Die Zelloberflächen wurden schließlich in einem Merlin VP Compact-Rasterelektronenmikroskop (REM) mit Feldemissionskathode (Zeiss) unter einer Beschleunigungsspannung von 5 kV bei einem Arbeitsabstand von 5 bis 6 mm untersucht. Für die digitale Bilderfassung einer Bildgröße von bis zu 1024·756 Pixel wurde ein hocheffizienter Sekundärelektronendetektor verwendet.

3.2.6 Expressionsanalysen

3.2.6.1 Bestimmung der CYP3A4-Aktivität

Zur Bestimmung der metabolischen Aktivität des CYP3A4-Enzyms wurde der CYP3A4/Luciferin-IPA P450-Glo™ Assay (Promega) genutzt. Bei Luciferin-IPA handelt es sich um ein hochsensitives und selektives System für die Bestimmung der CYP3A4-Aktivität. Die Substrate des Assay sind CYP-Enzym-Substrate, sogenannte Proluciferine. Diese sind Derivate des Leuchtkäfer-Luciferin (D-Luciferin). Das Enzym CYP3A4 katalysiert dabei die Reaktion von Luciferin-IPA in Leuchtkäfer-Luciferin. In einer zweiten Reaktion wird D-Luciferin durch die Luciferin-Detektionsreagenz (Esterase) erkannt, wodurch ein Lichtsignal entsteht. Die Intensität des Lichtes ist proportional zur Menge des D-Luciferin und somit zur CYP3A4-Enzymaktivität. Für diese Arbeit wurde das zellbasierte nicht-lytische Verfahren angewendet und nach Herstellerangaben bei RT durchgeführt.

Die Zellen wurden hierfür als Duplikate mit einer Zelldichte von 0,5 bis $1 \cdot 10^4$ Zellen pro Well in 96-Well-Zellkulturplatten ausgesät. Nach Erreichen einer 100%igen Konfluenz wurde das Zellkulturmedium durch die in Medium gelösten Prüfsubstanzen 20 μ M Rifampicin, 100 nM VD3 und 100 μ M Dexamethason ersetzt und täglich über einen Zeitraum von 72 h erneuert. Als Kontrolle wurde für Rifampicin und Dexamethason Zellkulturmedium mit 0,1 % DMSO, für VD3 mit 0,1 % Ethanol (v/v) genutzt. Nach der Behandlung wurden die Zellen mit PBS⁻ gewaschen und mit 50 μ l pro Well Luciferin-IPA/Medium (1:1000) für 60 min bei RT inkubiert. 25 μ l des Überstandes wurden als Duplikate in weiße opake 96-Well-Mikroplatten transferiert und 25 μ l Detektionsreagenz zugesetzt. Nach 20 min Inkubationszeit bei RT wurde die emittierende Lumineszenz am Tecan Infinite 200 Pro bei einer Integrationszeit von 1 s in relativen Lichteinheiten (*relative light units*, RLU) ausgegeben. Die CYP3A4-Aktivität wurde zwischen der Kontrollgruppe, 24 h, 48 h und 72 h nach Behandlung verglichen. Die Hintergrund-Lumineszenz wurde von allen Werten subtrahiert und die x-fache Veränderung der Aktivität durch Division der gemessenen Werte mit denen der jeweiligen Kontrollgruppe errechnet.

3.2.6.2 mRNA-Quantifizierung

3.2.6.3 Isolierung von Gesamt-RNA aus humanen Dünndarmproben

Als Referenz für die intestinale Genexpression wurde die Gesamt-RNA aus Normalgewebe von drei unterschiedlichen Dünndarmbiopsien isoliert. Die Proben stammten aus der Gewebesammlung der BioBank Rostock und wurden bis zur Aufarbeitung bei -150 °C gelagert. Für die Aufarbeitung wurde das Precellys Tissue RNA Kit (Pepqlab) verwendet. Um die RNA aus dem Gewebe zu isolieren, wurden maximal 20 mg des schockgefrorenen Gewebes mit einem Hammer zerkleinert, mit einer zuvor sterilisierten Pinzette in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und im Anschluss mit Lysepuffer behandelt. Die Proben wurden zweifach bei 6 500

rpm für 20 s im Homogenisator Precellys® 24 (Bertin Instruments) zentrifugiert und erneut mit Lysepuffer versetzt. Nach sorgfältigem Vortexen des Gemisches für 5 s wurde das Puffer-Gewebe-Gemisch unter kontinuierlichem Schütteln (750 rpm) für 1 h bei RT inkubiert. Die Desoxyribonukleinsäure (DNA) wurde durch Zentrifugation für 2 min bei 10 000 g entfernt, die Filtrate nach Zusetzen von 70 % Ethanol auf die RNA-Bindesäulen geladen und für 2 min bei 10 000 g zentrifugiert. Nachdem die RNA für 1 min bei 10 000 g gewaschen wurde, erfolgte die Behandlung mit DNase I, um verbleibende Kontaminationen zu entfernen. Die Proben wurden erneut gewaschen, für 2 min bei 10 000 g trocken zentrifugiert und mit zweifacher Wiederholung in RNase-freiem Wasser für 1 min bei 6 000 g eluiert. Die isolierte RNA wurde im Anschluss für die Synthese komplementärer DNA (cDNA) genutzt und bei -80 °C gelagert.

3.2.6.4 Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen

Für die Analyse der Genexpression in Abhängigkeit von der Kulturzeit sowie nach Behandlung mit Rifampicin und VD3 erfolgte die Isolierung der Gesamt-RNA aus den Zellen. Die jeweiligen Zellpellets wurden mithilfe des Universal RNA Purification Kit (Roboklon) nach Angaben des Herstellers aufgearbeitet. Zur Vermeidung von DNA-Kontamination wurde die isolierte RNA mit DNase I behandelt. Nach der Elution erfolgte die photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration mit Hilfe des NanoDrop1000-Spektrophotometer (Thermo Fisher Scientific). Hierzu wurden 1,5 µl der Probe auf das Spektrophotometer pipettiert und die Absorption des Lichtes bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm und $\lambda = 280$ nm gemessen. Die RNA-Konzentration in ng/µl wurde anhand des für die Konzentrationsbestimmung modifizierten Lambert-Beerschen Gesetzes bestimmt. Die Bestimmung des Leerwertes erfolgte mit DEPC-behandeltem Wasser und wurde für alle Messungen automatisch verrechnet. Die isolierte RNA wurde im Anschluss für die cDNA-Synthese genutzt und bei -20 °C gelagert.

3.2.6.5 cDNA-Synthese

Für die Untersuchung der Genexpression spezifischer Gene ist es notwendig, die isolierte Gesamt-RNA mittels reverser Transkription in komplementäre DNA (*complementary DNA*, cDNA) umzuwandeln. Hierzu wurden folgende Reagenzien in einem 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäß zu einem Gesamtansatz von 8 µl zusammenpipettiert:

Gesamt-RNA (1 µg)		x µl
Oligo(dT) ₁₅ -Primer und Random-Primer Mix		1 µl
Nuklease-freies Wasser	ad	∑ 8 µl

Um Sekundärstrukturen aufzubrechen und deren Neubildung zu verhindern, wurden die Ansätze im ersten Schritt bei 70 °C für 10 min mit anschließender Kühlung bei 4 °C in einem Thermocycler (Bio-Rad Laboratories GmbH) inkubiert. Zu den Ansätzen wurde ein 12 µl Mix aus folgenden Reagenzien pipettiert:

5x Reverse Transkriptase-Puffer	4 µl
dNTP-Mix (je 10 mM)	1 µl
Reverse (200 U/µl)	1 µl
Nuklease-freies Wasser	6 µl
Gesamtvolumen	Σ 12 µl

Die reverse Transkription wurde bei 45 °C für 120 min inkubiert, zur Inaktivierung des Reaktionsgemisches bei 70 °C für 10 min erhitzt und abschließend bei 4 °C gekühlt. Nach Ablauf der Reaktion wurden die Ansätze mit Nuklease-freiem Wasser 1:4 verdünnt und bei -20 °C gelagert.

3.2.6.6 Standard-PCR für Primer-Testung

Die Standard-PCR wurde durchgeführt, um die für diese Arbeit synthetisierten Primer auf Spezifität zu testen und optimale Bedingungen für die Real-time PCR zu gewährleisten. Eine Übersicht über die verwendeten Online-Datenbanken und Hilfswerkzeuge für die Wahl der Primerpaare ist in Tabelle 3 gelistet. Alle verwendeten Primer wurden von der Firma Metabion synthetisiert und sind in Tabelle 7 aufgeführt. Die Sequenzen für *ABCB1*, *ABCG2*, *SLC2A2*, *NR1I2*, *OCNL* und *UGT1A6* wurden von der Firma Origene bereitgestellt und für *GAPDH* sowie *SLCO2B1* zuvor publiziert (Wang et al. 2012; Fujiwara et al. 2014). Für die Kontrolle der Primer-Spezifität wurden die Zielsequenzen mithilfe der bioinformatischen Online-Datenbank In-Silico-PCR (<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>, Juni 2020) überprüft. Diese Datenbank wird genutzt, um PCR-Primer gegen die in der Datenbank gespeicherten Genome zu testen. Zusätzlich wurde mithilfe des Online-Tools Primer-Blast von NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>, Juni 2020) sichergestellt, dass der GC-Gehalt sämtlicher Primer für eine optimale Schmelztemperatur zwischen 40 bis 60 % liegt. Um eine gewünschte Endkonzentration der Primer-Stammlösung von 100 µM zu erreichen, wurden die gefriergetrockneten Primer mit entsprechenden Volumina an DEPC-behandeltem Wasser zugesetzt und hiernach für die Herstellung der 10 µM Arbeitslösung 1:10 verdünnt. Als Positivkontrolle für die Primertestung diente ein cDNA-Pool aus drei normalen Dünndarmepithelien (BioBank Rostock, Tabelle 1). Folgende Reagenzien wurden in einem 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäß zu einem Gesamtansatz von 25 µl zusammenpipettiert:

Template cDNA (50 ng)	x μ l
10x PCR Puffer inkl. MgCl ₂	2,5 μ l
dNTPs (10 mM)	0,5 μ l
Forward primer (10 μ M)	0,5 μ l
Reverse primer (10 μ M)	0,5 μ l
Taq-Polymerase	0,2 μ l
Nuklease-freies Wasser	ad Σ 25 μ l

Die Ansätze wurden im Thermocycler mit folgendem PCR-Programm für 35 Zyklen inkubiert:

5 min	94 °C	Vordenaturierung	
30 s	94 °C	Denaturierung	} x 35
30 s	58 °C	Annealing	
30 s	74 °C	Elongation	
5 min	74 °C	Elongation	

Die Annealing-Temperatur erzielte für alle Primerpaare optimale Ergebnisse und musste somit nicht für jede Primerkombination optimiert werden. Nach der Amplifikation wurde die Spezifität der Produkte anhand der Fragmentlängen mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

3.2.6.7 Agarose-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der horizontalen Agarose-Gelelektrophorese können DNA-Fragmente anhand ihrer Fragmentgröße in einem Agarose-Gelsystem aufgetrennt werden. Hierzu wurden Gele durch Aufkochen von 1 % Agarose (w/v) in 1x TAE-Puffer hergestellt und die flüssigen Gele nach Abkühlung mit dem interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid (10 mg/ml, Carl Roth GmbH) versetzt. Zur Vereinfachung des Beladungsprozesses und Visualisierung der DNA wurden die Reaktionsansätze mit 5x Ladepuffer im Verhältnis 5:1 versetzt und je nach Größe der Kammer 10 bis 12,5 μ l pro Ansatz auf ein 1 % Agarosegel aufgetragen. Um eine Größen- bzw. Konzentrationsabschätzung der DNA vornehmen zu können, wurde pro Lauf zusätzlich ein Längenstandard (100 bp, Bioron) aufgetragen. Die Fragmente wurden bei konstanter Spannung von 70 V für 10 min und 85 V für 30 bis 45 min in 1x TAE-Laufpuffer aufgetrennt. Im Anschluss erfolgte die Visualisierung der Ethidiumbromid gefärbten DNA am UV-Tisch mit der Software VisionCapt (Vilber Lourmat).

1 % Agarosegel

1x TAE-Puffer	45 ml
Agarose	0,45 g
Ethidiumbromid	2,25 μ l

3.2.6.8 Real-time PCR

Die Real-time PCR ermöglicht eine zuverlässige und genaue Quantifizierung spezifischer mRNA. Mithilfe eines Fluoreszenzfarbstoffes kann bei diesem Verfahren die DNA-Amplifikation pro PCR-Zyklus in Echtzeit verfolgt werden. Der Farbstoff SYBR Green interkaliert in doppelsträngige DNA und emittiert nach Anregung mit Licht der Wellenlänge $\lambda = 497$ nm grünes Licht der Wellenlänge $\lambda = 520$ nm. Hierbei wurde der qPCR Mastermix (2x) Low Rox™ (50 nM) (Genaxxon) entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Als Negativkontrolle wurde pro Primerkombination die Template cDNA durch Nuklease-freies Wasser ersetzt. Die Messung erfolgte in technischen Duplikaten. Folgende Reagenzien wurden in einer 96-Well-PCR-Platte (Sarstedt) zu einem Gesamtansatz von 12,5 μ l zusammenpipettiert:

Template cDNA	2 μ l
qPCR Mastermix (2x)	6,25 μ l
Forward primer (10 μ M)	0,625 μ l
Reverse primer (10 μ M)	0,625 μ l
Nuklease-freies Wasser	3 μ l
Gesamtvolumen	Σ 12,5 μl

Für die Real-time PCR wurden die Reaktionsansätze im ViiA™ 7 Real-Time PCR System (Life Technologies GmbH) mit folgendem PCR-Programm für 35 Zyklen inkubiert:

2 min	50 °C	Aktivierung	
10 min	95 °C	Initiale Denaturierung	
15 s	95 °C	Denaturierung	} x 35
1 min	58 °C	Annealing	
45 s	70 °C	Elongation	
15 s	95 °C	Denaturierung	
15 s	60 °C	Annealing	
15 s	95 °C	Schmelzen	

Die Amplifikationsdaten wurden mithilfe der QuantStudio Real-time PCR-Software 1.3 (Thermo Fisher Scientific) ausgewertet. Eine Probe ist als positiv zu werten, wenn die gemessene Fluoreszenz einer Probe von der Hintergrundfluoreszenz durch Überschreiten eines festgelegten Schwellenwertes (*Threshold*) zu unterscheiden ist. Der Schnittpunkt der Fluoreszenzwerte mit dem Schwellenwert wird als *Cycle-threshold* (Ct) bezeichnet. Dieser entspricht der Anzahl an PCR-Zyklen, die notwendig sind, um ein bestimmtes Fluoreszenzniveau zu erreichen. Im Anschluss an die Amplifikation erfolgte pro Durchlauf eine Schmelzkurvenanalyse, um die Spezifität der amplifizierten PCR-Produkte zu überprüfen. Hierbei wird das PCR-Produkt unter langsamer Temperaturzunahme aufgeschmolzen und der Fluoreszenzfarbstoff freigesetzt. Die Schmelzkurvenanalyse erfolgte zusätzlich als Qualitätskontrolle, um die Proben auf Kontaminationen, Primerdimere oder unspezifische Amplifikationsprodukte zu testen.

3.2.6.9 Relative Quantifizierung

Bei der relativen Quantifizierung werden die Veränderungen der mRNA-Level bezogen auf die Menge einer endogenen Kontrolle, eines sogenannten nicht-regulierten Haushaltsgenes berechnet. Die unterschiedlich kultivierten bzw. behandelten Zellen wurden auf ihre Genexpression untersucht und die Veränderungen der mRNA-Level mithilfe der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode nach (Livak und Schmittgen 2001) berechnet. Hierbei wird angenommen, dass die Amplifikationseffizienz des Haushaltsgenes der des gewünschten Zielgenes entspricht. Es wird folglich von einer Amplifikationseffizienz von 100 % oder 2 ausgegangen. Die ausgegebenen Ct-Werte wurden für jede Probe zunächst auf das Referenzgen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) normalisiert, um dadurch die jeweiligen ΔCt -Werte zu ermitteln:

$$\Delta Ct_{\text{Probe}} = Ct_{\text{Zielgen}} - Ct_{\text{Referenzgen}}$$

Die $\Delta\Delta Ct$ -Werte wurden durch Berechnung der Differenz zwischen den ΔCt -Werten der experimentellen Probe und der Kontrollprobe ermittelt:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{experimentelle Probe}} - \Delta Ct_{\text{Kontrollprobe}}$$

Die relative Veränderung der Genexpression zwischen den beiden Proben wurde dann aus der negativen Potenz des $\Delta\Delta Ct$ -Wertes zur Basis 2 berechnet. Hierbei entspricht 2 der auf 100 % festgelegten Amplifikationseffizienz:

$$2^{-\Delta\Delta Ct}$$

3.2.7 Proteinquantifizierung

Die Bestimmung des Proteingehalts der Transporter PEPT1, OATP2B1, P-gp und BCRP in Abhängigkeit von der Kulturzeit erfolgte durch eine validierte Flüssigkeitschromatografie-Massenspektrometrie/Massenspektrometrie (LC-MS/MS)-basierte proteomische Methode (Gröer et al. 2013; Wenzel et al. 2021; Wenzel et al. 2022). Die Proteinlevel wurden mit zuvor publizierten Daten von Proteingehältern relevanter Transporter in humanen Jejunalproben (Tabelle 2) verglichen (Brück et al. 2017). Hierfür wurden die Zellen in einer Dichte von 2 bis $5 \cdot 10^5$ Zellen pro Well in unbeschichtete 6-Well-Zellkulturplatten ausgesät und unter Standardbedingungen kultiviert. Bei Erreichen einer 60 bis 70%igen Konfluenz bzw. zehntägigen 100%igen Postkonfluenz wurden die adhärennten Zellen mithilfe eines Zellschabers schonend abgelöst, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit SafeSeal-Verschluss transferiert und bei 4 °C bei 300 g für 7 min zentrifugiert. Die Proben wurden abschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20 °C gelagert. Die nachfolgenden Analysen wurden mit freundlicher Unterstützung am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universitätsmedizin Rostock durchgeführt. Hierbei wurden die Zellen zunächst für die Extraktion des Membranproteoms mithilfe des ProteoExtract Native Membrane Protein Extraction Kit (Merck) nach Angaben des Herstellers lysiert. Unter Verwendung des Bicinchoninsäure-Assay (Thermo Fisher Scientific) wurde der Gesamtproteingehalt der gewonnenen Membranfraktion bestimmt und auf eine maximale Proteinkonzentration von 2 mg/ml angepasst. Für die Denaturierung wurden 100 µl der jeweiligen Membranfraktion mit 10 µl Dithiothreitol (200 mM, Sigma-Aldrich), 40 µl Ammoniumhydrogencarbonat (50 mM, pH 7,8, Sigma-Aldrich) und 10 µl ProteaseMAX™ (1 %, m/v, Promega) gemischt und für 20 min bei 60 °C inkubiert. Nach dem Abkühlen wurden 10 µl Iodacetamid (400 mM, Sigma-Aldrich) zugegeben und die Proben für die Alkylierung in einem abgedunkelten Wasserbad für 15 min bei 37 °C inkubiert. Der Proteinverdau erfolgte durch Zugabe von 10 µl Trypsin (Promega)

bei einem Verhältnis von Trypsin zu Protein von 1:40. Die Proben wurden bei 37 °C für 16 h inkubiert und der Verdau durch Zugabe von 20 µl Ameisensäure gestoppt (10 % v/v, Sigma-Aldrich). Alle Proben wurden bis zur weiteren Bearbeitung bei -80 °C gelagert. Nach einer Zentrifugation bei 16 000 g für 15 min bei 4 °C wurden 50 µl der verdauten Membranfraktion mit 50 µl eines isotopenmarkierten internen Standards (IS)-Peptidmixes (10 nM pro IS) gemischt. Für die Erstellung der Kalibrierungskurven wurde verdautes humanes Serumalbumin (2 mg/ml) als Leerwertmatrix verwendet und mit den Referenzpeptiden bis zum Erreichen einer Konzentration von 0,1 bis 25 nM sowie dem IS (finale Konzentration: 5 nM pro Peptid) versetzt. Die verwendeten proteospezifischen Peptide sind in Tabelle 8 aufgeführt. Alle Peptide und IS-Peptide wurden auf Nachfrage in hoher analytischer Qualität mit einer Reinheit von 97 bis 99 % von der Firma Thermo Fisher Scientific synthetisiert. Für sämtliche Aufarbeitungsschritte und den Verdau der Proben wurden Protein LoBind Tubes (Eppendorf) verwendet. Die Quantifizierung des Proteingehaltes erfolgte an einem Triple-Quadrupole Massenspektrometer 5500 QTRAP (AB Sciex) mit Ankopplung an das Agilent Technologies 1260 Infinity System (Agilent Technologies). Pro Peptid wurden drei bis vier Massenübergänge überprüft und der Proteingehalt (in pmol/mg Protein) durch Normalisierung auf den Gesamtproteingehalt der isolierten Membranfraktion errechnet.

3.3 Statistische Auswertung

Die für die statistische Auswertung verwendeten Daten sind repräsentativ für mindestens zwei biologisch unabhängige Replikate und wurden als Mittelwerte mit Standardabweichung berechnet. Die statistische Analyse zur Bestimmung signifikanter Genexpressionsunterschiede erfolgte durch den gepaarten zweiseitigen *t*-Test. Die Stärke des Zusammenhangs zwischen genspezifischen Expressionsdaten wurde mithilfe des nicht-parametrischen Rangkorrelationskoeffizienten von Spearman (*r*) und den korrespondierenden *p*-Werten errechnet. Ein *p*-Wert kleiner als 0,05 wurde hierbei als signifikant betrachtet (* *p* < 0,05, ** *p* < 0,01, *** *p* < 0,001). Die Berechnung erfolgte mit GraphPad Prism 9.

4 Ergebnisse

4.1 Auswahl von Zelllinien mit geeigneten morphologischen Charakteristika und intakter Barrierefunktion

Die Fähigkeit, nach mehrwöchiger Kultur einen 100% konfluenten und langlebigen Zellrasen zu bilden, konnte zunächst für 45 der 49 untersuchten HROC-Zelllinien nachgewiesen werden. In weiteren vier Zelllinien bildeten sich im zeitlichen Verlauf Löcher in der Epithelbarriere (siehe Abbildung 8) und eine Linie war durch die übermäßige Bildung domartiger Strukturen gekennzeichnet. Ein starker Abpelleffekt konnte in zwei Zelllinien beobachtet werden, drei weitere Linien waren aufgrund morphologischer Eigenschaften für die Anwendung des *wound healing assay* ungeeignet. Ein kulturzeitabhängiger Verlust der Barriereintegrität sowie eine geringe Proliferationsrate (> 72 h) wurde jeweils in einer Zelllinie festgestellt. Für das direkt Patienten-abgeleitete und Patienten-abgeleitete Xenograft-Zelllinienpaar HROC383 und HROC383 T0 M2 wurde die Linie HROC383 aufgrund verbesserter Performance in das finale Panel aufgenommen. Somit erfüllten 32 der 49 untersuchten HROC-Zelllinien die initialen Anforderungen an humane intestinale *in vitro* Modelle und wurden in weiterführende Analysen eingeschlossen.

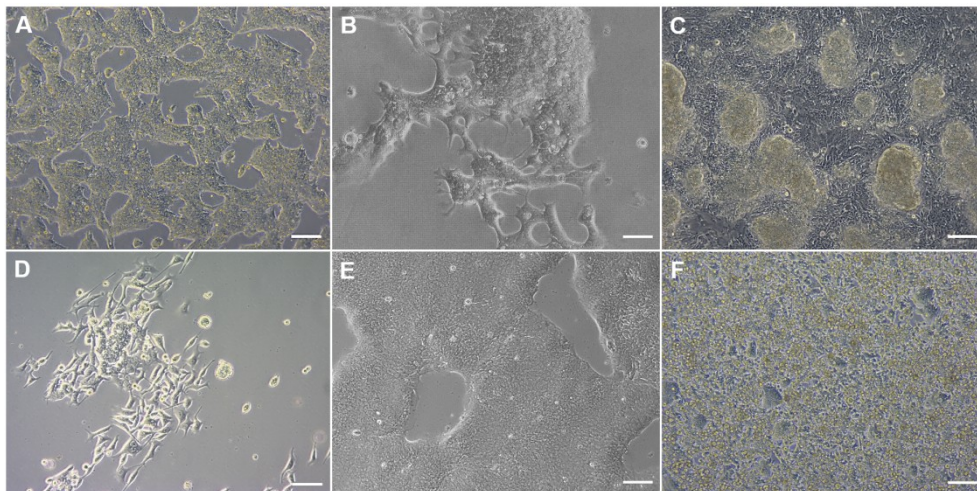


Abbildung 8: Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen von HROC-Zelllinien mit ungeeigneten morphologischen Charakteristika. A) HROC57, B) HROC69, C) HROC113, D) HROC212, E) HROC296 und F) HROC370. 16 der 49 untersuchten HROC-Zelllinien wiesen nach mehrwöchiger Kultur ungeeignete morphologische Charakteristika wie Koloniewachstum, eine löchrige Epithelschicht, eine übermäßige Bildung domartiger Strukturen oder TEER-Werte $< 300 \Omega \cdot \text{cm}^2$ auf. Balken = $100 \mu\text{m}$, Vergrößerung 10x.

Die weitere Untersuchung der Barriereintegrität erfolgte durch TEER-Messungen über den Zeitraum von 21 Tagen. Von den 32 verbliebenen HROC-Zelllinien erreichten zehn maximale TEER-Werte von $\geq 300 \Omega \cdot \text{cm}^2$ bei langanhaltender Konfluenz (siehe Abbildung 9) und wurden in das finale Zellpanel aufgenommen. Die übrigen 22 Zelllinien genügten somit nicht den Anforderungen und wurden von weiteren Untersuchungen ausgeschlossen. Die Ergeb-

nisse zur Untersuchung der morphologischen Eigenschaften und Barriereintegrität sowie die Exklusionsgründe ungeeigneter HROC-Zelllinien sind in Tabelle 9 aufgeführt.

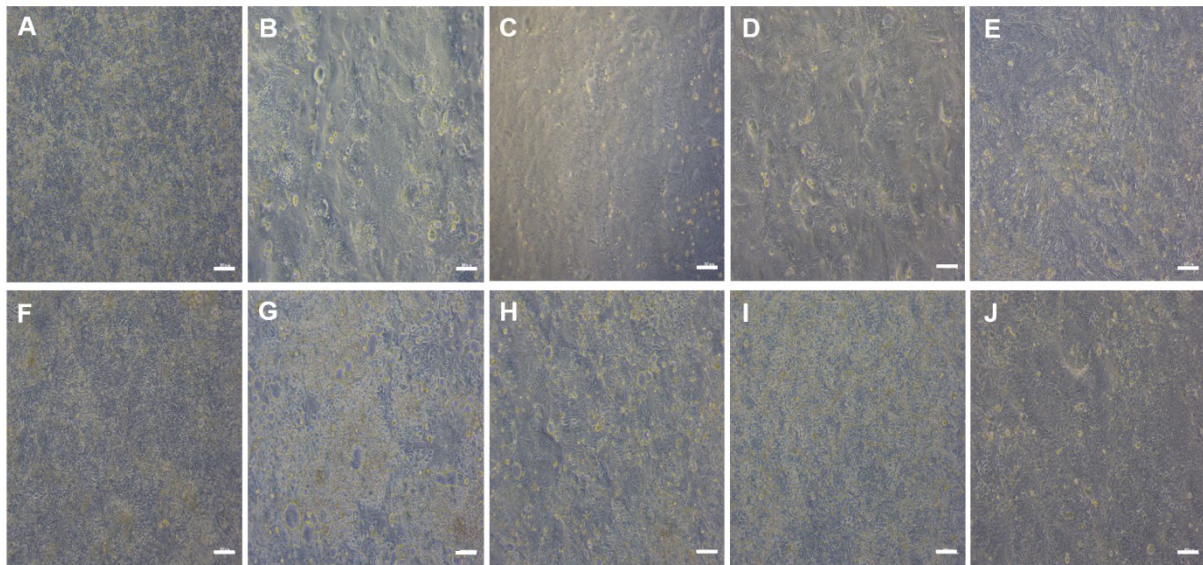


Abbildung 9: Lichtmikroskopische Aufnahmen von HROC-Zelllinien des finalen Zellpanels nach Erreichen einer 100%igen Konfluenz. (A) HROC32, (B) HROC43, (C) HROC60, (D) HROC80 T1 M1, (E) HROC126, (F) HROC159 T2 M4, (G) HROC183 T0 M2, (H) HROC217 T1 M2, (I) HROC239 T0 M1 und (J) HROC383. Balken = 100 µm, Vergrößerung 10x.

Tabelle 9: Bewertung der morphologischen Eigenschaften und Barriereintegrität für fortführende Analysen ungeeigneter HROC-Zelllinien. Die Zellen wurden in 6-Well-Zellkulturplatten und 24-Well-Zellkultureinsätzen kultiviert und hinsichtlich der morphologischen Eigenschaften und Barriereintegrität untersucht. Die Messung des TEER erfolgte täglich über einen Zeitraum von 21 Tagen, angegeben sind die jeweils erreichten Maxima ($TEER_{max}$). Bis auf HROC383 T0 M2 wurden alle aufgeführten Zelllinien aufgrund ungeeigneter morphologischer Eigenschaften oder TEER-Werte $< 300 \Omega \cdot cm^2$ von weiteren Versuchen ausgeschlossen. n.d.: nicht detektiert, TEER: Transepithelialer/transendothelialer elektrischer Widerstand.

Zelllinie	$TEER_{max}$ ($\Omega \cdot cm^2$)	Grund für Exklusion
HROC18	< 100	
HROC24	< 300	
HROC24 T1 M1	0	nicht langlebig, Lückenbildung
HROC39	< 300	
HROC40	0	geringe Proliferation
HROC46 T0 M1	n.d.	Bildung domartiger Strukturen
HROC50 T1 M5	$< 2\ 000$	starker Abpelleffekt
HROC57	< 100	
HROC69	< 100	
HROC87 T0 M2	< 100	
HROC107	< 100	
HROC113	< 300	
HROC131 T0 M3	0	Koloniewachstum
HROC147 T0 M1	0	Koloniewachstum
HROC147Met1	0	Koloniewachstum
HROC173	$< 1\ 500$	Lückenbildung
HROC212	< 100	
HROC222 T1 M2	$< 1\ 000$	nicht langlebig
HROC257	< 100	

Zelllinie	TEER _{max} ($\Omega \cdot \text{cm}^2$)	Grund für Exklusion
HROC252Tu2 T2 M2	< 1 000	nicht langlebig, Lückenbildung
HROC277 T0 M1	< 100	
HROC277Met1 T0 M2	< 1 000	<i>wound healing assay</i> nicht anwendbar
HROC277Met2	< 200	
HROC278 T0 M1	0	Koloniewachstum
HROC278Met T2 M2	< 100	
HROC285 T0 M2	< 3 000	starker Abpelleffekt
HROC296	< 100	
HROC300 T2 M1	< 1 500	<i>wound healing assay</i> nicht anwendbar
HROC300Met1 T3 M4	< 2 000	<i>wound healing assay</i> nicht anwendbar
HROC309	< 100	
HROC315 T1 M2	< 200	
HROC324	< 100	
HROC357	< 300	
HROC370	< 100	
HROC374	< 300	
HROC383 T0 M2	< 3 000	HROC383 im Zellpanel enthalten
HROC415Met1 T0 M4	< 300	
HROC439	< 2 000	nicht langlebig, Lückenbildung
HHC6548 T1 M1	< 200	

4.2 Grundlegende zelluläre Eigenschaften

4.2.1 Zellproliferation und Zellmigration

Im Anschluss an die Auswahl geeigneter Modelle wurden die Zelllinien hinsichtlich Zellproliferation und -migration analysiert.

Die Zellproliferationsanalyse ergab Verdopplungszeiten < 70 h für alle HROC-Zelllinien und der Caco-2 (Abbildung 10, A). Hierbei war die Verdopplungszeit in zwei Zelllinien niedriger (43,9 h für HROC183 T0 M2 und 44,5 h für HROC126) als in Caco-2 (52,1 h). Mit der Caco-2 vergleichbare Verdopplungszeiten wurden in HROC239 T0 M1 (50,9 h) und HROC80 T1 M1 (52,4 h) festgestellt. Höhere Verdopplungszeiten von 64,5 bis 68,4 h wurden in den Zelllinien HROC60, HROC217 T1 M2 und HROC43 nachgewiesen.

Die Ermittlung der Zellmigrationsrate durch Anwendung des *wound healing assay* zeigte insgesamt die Migrationsfähigkeit aller HROC-Zelllinien (Abbildung 10, B). Repräsentative Abbildungen der Zellmigrationsraten von HROC-Zelllinien sind in Abbildung 11 dargestellt. Die Wundschließungszeiten der Zelllinien wiesen starke Unterschiede auf. Die höchste Zellmigrationsrate im Vergleich zur Caco-2 (7,7 $\mu\text{m}/\text{h}$) wurde für HROC60 (6,2 $\mu\text{m}/\text{h}$) festgestellt. Mittlere Zellmigrationsraten (4,7 bis 4,4 $\mu\text{m}/\text{h}$) wurden für HROC159 T2 M4, HROC383 und HROC126 detektiert, wohingegen eine langsame Zellmigration in der Zelllinie HROC239 T0 M1 (0,7 $\mu\text{m}/\text{h}$) beobachtet wurde.

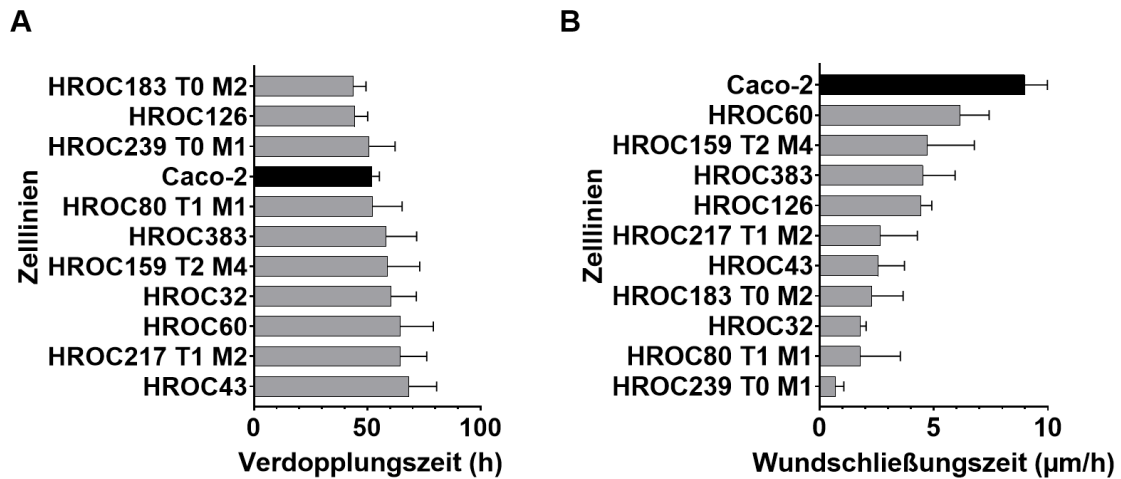


Abbildung 10: Zellproliferation und Zellmigration in HROC-Zelllinien und Caco-2. A) Ermittlung der Zellproliferationsrate über den Zeitraum von 144 h nach Aussaat in 24-Well-Zellkulturplatten. B) Ermittlung der Zellmigrationsrate durch Anwendung des *wound healing assay* in 6-Well-Zellkulturplatten über den Zeitraum von 96 h. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD, $n = 3$.

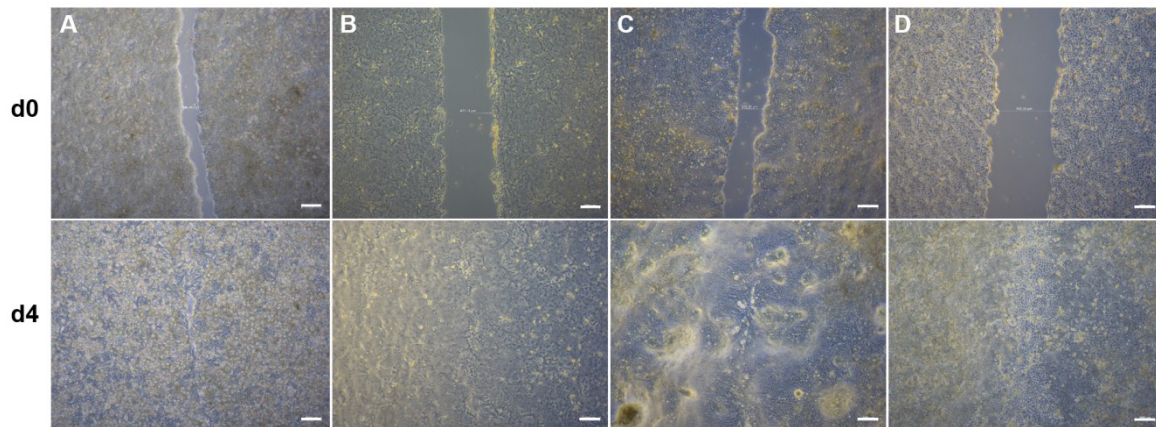


Abbildung 11: Repräsentative Abbildungen der Wundheilung von HROC-Zelllinien zur Bestimmung der Zellmigration. A) HROC32, B) HROC60, C) HROC159 T2 M4 und D) Caco-2 an Tag 0 (d0) und Tag 4 (d4) nach Kratzen der Wunde. Balken = 200 μm , Vergrößerung 4x.

4.2.2 Immunphänotypisierung

Zur näheren Charakterisierung der HROC-Zelllinien hinsichtlich ihrer Oberflächenstruktur und Funktion wurden diese extrazellulär mit verschiedenen fluoreszenzmarkierten Antikörpern markiert. Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Immunphänotypisierung sind in Abbildung 12 dargestellt.

Insgesamt zeigten die Linien HROC383 und HROC60 die höchsten Expressionslevel, in den Linien HROC32 und HROC159 T2 M4 wurden die schwächsten Expressionslevel festgestellt. Innerhalb des HROC-Zellpanels wiesen die Linien HROC43 und HROC183 T0 M2 vergleichbare Antigenprofile auf.

Der Lymphozyten-Marker CD58, das Zelladhäsionsmolekül CD29 sowie der Epithelzell-Marker CD326 war in allen Zelllinien erhöht exprimiert ($\geq 71\%$). Die Expression der Marker CD39, CD86 und CD69 lag in allen Linien bei $\geq 38\%$, die Marker CD71 und CD274 waren

mit einem Anteil von $\geq 25\%$ exprimiert. Der Epithel- bzw. Tumormarker CD66adeceb zeigte die höchste Expression in HROC239 T0 M1 (67 %) und war in HROC60 am schwächsten exprimiert (1 %). Eine erhöhte Expression des Zelladhäsionsmoleküls CD54 wurde in HROC383 (79 %) und HROC60 (67 %) festgestellt, die schwächste Expression wurde in HROC239 T0 M1 (4 %) und HROC159 T2 M4 (3 %) registriert. Auffällig war eine höhere Expression des Granulozyten-Markers CD15 in HROC32 (55 %), HROC239 T0 M1 (47 %), HROC217 T1 M2 (36 %), HROC43 (33 %) und HROC183 T0 M2 (27 %) mit schwächerer Expression in den übrigen Linien ($\leq 16\%$). Markant war zudem eine erhöhte Expression des Progressions-Markers CD171 in HROC383 (37 %) im Vergleich zu den restlichen Linien ($\leq 3\%$). In allen Linien waren die Marker CD178, CD55, CD56, CD43 und CD50 am schwächsten exprimiert ($\leq 6\%$).

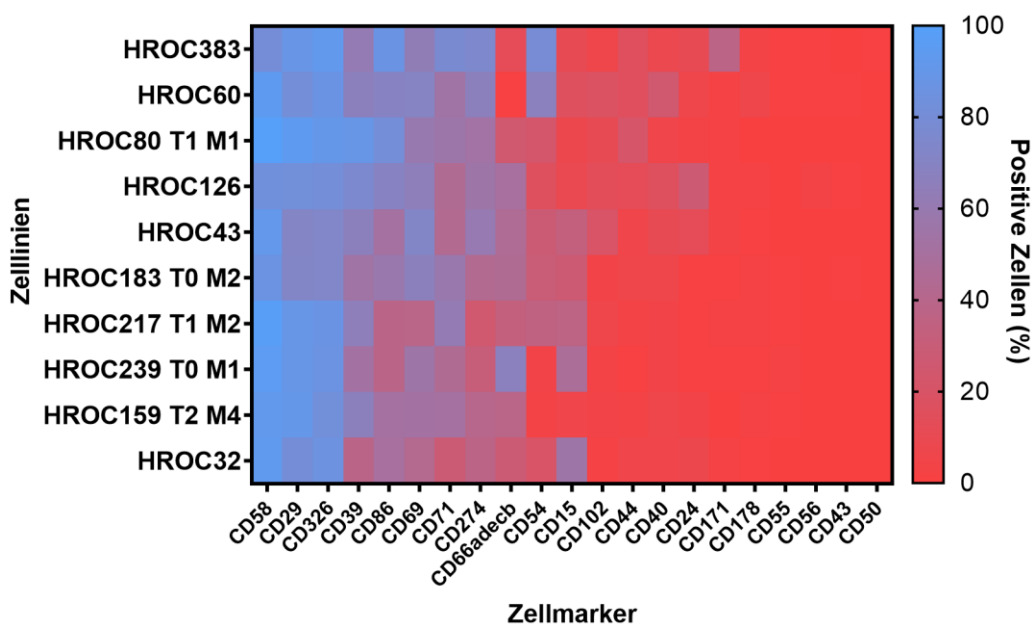


Abbildung 12: Expression von Oberflächenmarkern in den HROC-Zelllinien. Analyse von Oberflächenantigenen durch Durchflusszytometrie nach extrazellulärer Färbung der Zellen. Heatmap zeigt die Expression der einzelnen Marker als prozentualen Anteil positiver Zellen der jeweiligen Zellpopulation als Mittelwerte, sortiert nach Stärke der Expressionslevel, $n = 2-3$.

4.2.3 Ansprechen auf klinisch relevante Chemotherapeutika

Um das Ansprechen der Zelllinien auf klinisch relevante Chemotherapeutika zur Behandlung des KRK zu untersuchen, wurde ein Chemosensitivitäts-Assay durchgeführt. Hierbei wurden die Zellen mit den Wirkstoffen 5-FU, Capecitabin, Irinotecan und Oxaliplatin behandelt. Die Ergebnisse der Zellviabilität nach Zytostatika-Behandlung sind in Abbildung A1 dargestellt. Die daraus ermittelten IC_{50} sind in Tabelle 10 aufgeführt.

Insgesamt zeigte sich bei allen Linien eine Verminderung der Zellviabilität bei steigender Konzentration der Wirkstoffe. Die IC_{50} lagen im Bereich von $0,2\ \mu\text{M}$ bis $2,2\ \mu\text{M}$ für Oxaliplatin, $0,4\ \mu\text{M}$ bis $6,3\ \mu\text{M}$ für Irinotecan, $1,3\ \mu\text{M}$ bis $26,9\ \mu\text{M}$ für 5-FU und $9,1\ \mu\text{M}$ bis $158,3\ \mu\text{M}$ für

Capecitabin. Die IC_{50} für Capecitabin bei HROC60 und Caco-2 konnten aufgrund zu hoher Resistenzen nicht ermittelt werden. Für Caco-2 wurde ein starkes Ansprechen auf 5-FU (1,7 μ M) und Oxaliplatin (0,4 μ M) festgestellt, wohingegen die Sensitivität gegenüber Irinotecan (2,4 μ M) reduziert war. Innerhalb der HROC-Zelllinien zeigte HROC32 die höchste Sensitivität und ein hohes Ansprechen auf die Chemotherapeutika selbst in geringsten Konzentrationen (Zellviabilität \leq 85 %). Für HROC60 wurde hingegen eine starke Resistenz gegenüber 5-FU (26,9 μ M), Irinotecan (3,2 μ M) und Oxaliplatin (2,2 μ M) beobachtet. Ähnlich hohe Resistenzen gegenüber Irinotecan (6,3 μ M) und Oxaliplatin (1,6 μ M) wurden für HROC383 erfasst, für diese Linie konnte jedoch ein stärkeres Ansprechen auf 5-FU (1,3 μ M) und Capecitabin (9,1 μ M) festgestellt werden. HROC126 und HROC239 T0 M1 reagierten sensitiv auf Irinotecan (0,4 μ M), für HROC126 wurde dagegen eine höhere Sensitivität gegenüber Capecitabin (18,1 μ M) und Oxaliplatin (0,5 μ M) registriert. HROC80 T1 M1 und HROC239 T0 M1 zeigten ähnlich starke Resistenzen gegenüber 5-FU (4,2 μ M und 5,1 μ M) und Capecitabin (155,2 μ M und 129,9 μ M). Die höchste Sensitivität gegenüber Oxaliplatin wurde in HROC43 (0,2 μ M) beobachtet, wohingegen eine erhöhte Resistenz gegenüber Irinotecan (1,6 μ M) in dieser Linie vorlag. In den Linien HROC183 T0 M2 und HROC217 T1 M2 wurde insgesamt ein ähnliches Therapieansprechen beobachtet, welches zusammen mit der Linie HROC43 am ehesten mit Caco-2 vergleichbar war.

Tabelle 10: Vergleich der IC_{50} -Konzentrationen (μ M) der Chemotherapeutika 5-FU, Capecitabin, Irinotecan und Oxaliplatin in den HROC-Zelllinien und der Caco-2. Die Ermittlung der IC_{50} (Mittelwerte) erfolgte aus der Reduktion der Zellviabilität nach 144 h Inkubation, n = 2-3. n.d.: nicht detektiert.

Zelllinie	IC_{50} (μ M)			
	5-FU	Capecitabin	Irinotecan	Oxaliplatin
HROC32	8,9	158,3	0,6	1,7
HROC43	3,5	35,2	1,6	0,2
HROC60	26,9	n.d.	3,2	2,2
HROC80 T1 M1	4,2	155,2	0,8	1,3
HROC126	2,3	18,1	0,4	0,5
HROC159 T2 M4	1,4	44,4	0,7	0,7
HROC183 T0 M2	2,3	39,3	1,4	1,2
HROC217 T1 M2	2,1	71,1	1,1	0,9
HROC239 T0 M1	5,1	129,9	0,4	0,9
HROC383	1,3	9,1	6,3	1,6
Caco-2	1,7	n.d.	2,4	0,4

4.3 Untersuchung der Barriereintegrität

4.3.1 Einfluss der Kulturzeit auf die Integrität der epithelialen Barriere

Um den Einfluss der Kulturzeit auf die Integrität der epithelialen Barriere zu untersuchen, erfolgten zunächst TEER-Messungen im Zeitraum von 21 Tagen nach Aussaat der Zellen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 13 dargestellt.

Insgesamt zeigte sich in allen untersuchten Linien ein Anstieg der TEER-Werte im zeitlichen Verlauf. Innerhalb des Zellpanels konnten jedoch erhebliche Unterschiede in den TEER-Werten festgestellt werden. Der mit Abstand stärkste Anstieg des TEER wurde in HROC60 gemessen ($6\,066\ \Omega\cdot\text{cm}^2$ an d17), der geringste TEER wurde für HROC383 erfasst ($812\ \Omega\cdot\text{cm}^2$ an d15). In zusätzlichen Versuchen wurde für HROC60 nach fünfwöchiger Kultur ein weiterer Anstieg des TEER auf bis zu $> 11\,500\ \Omega\cdot\text{cm}^2$ beobachtet. Der TEER des Referenzmodells Caco-2 erreichte sein Maximum an d16 ($1\,259\ \Omega\cdot\text{cm}^2$) und lag an d7 erstmals im Bereich $> 300\ \Omega\cdot\text{cm}^2$. Ein ähnlicher Anstieg konnte zu diesem Zeitpunkt in den Linien HROC32 ($429\ \Omega\cdot\text{cm}^2$), HROC383 ($365\ \Omega\cdot\text{cm}^2$) und HROC183 T0 M2 ($301\ \Omega\cdot\text{cm}^2$) nachgewiesen werden. Ein im Vergleich deutlich schnellerer Anstieg des TEER wurde für HROC60 ($341\ \Omega\cdot\text{cm}^2$ an d4) und HROC80 T1 M1 ($578\ \Omega\cdot\text{cm}^2$ an d5) beobachtet. Hingegen zeigten die Linien HROC43 ($565\ \Omega\cdot\text{cm}^2$ an d12) und HROC159 T2 M4 ($331\ \Omega\cdot\text{cm}^2$ an d14) einen deutlich langsameren Anstieg des TEER. In der Summe erreichten sieben der zehn HROC-Zelllinien mit der Caco-2 vergleichbare oder höhere TEER-Werte.

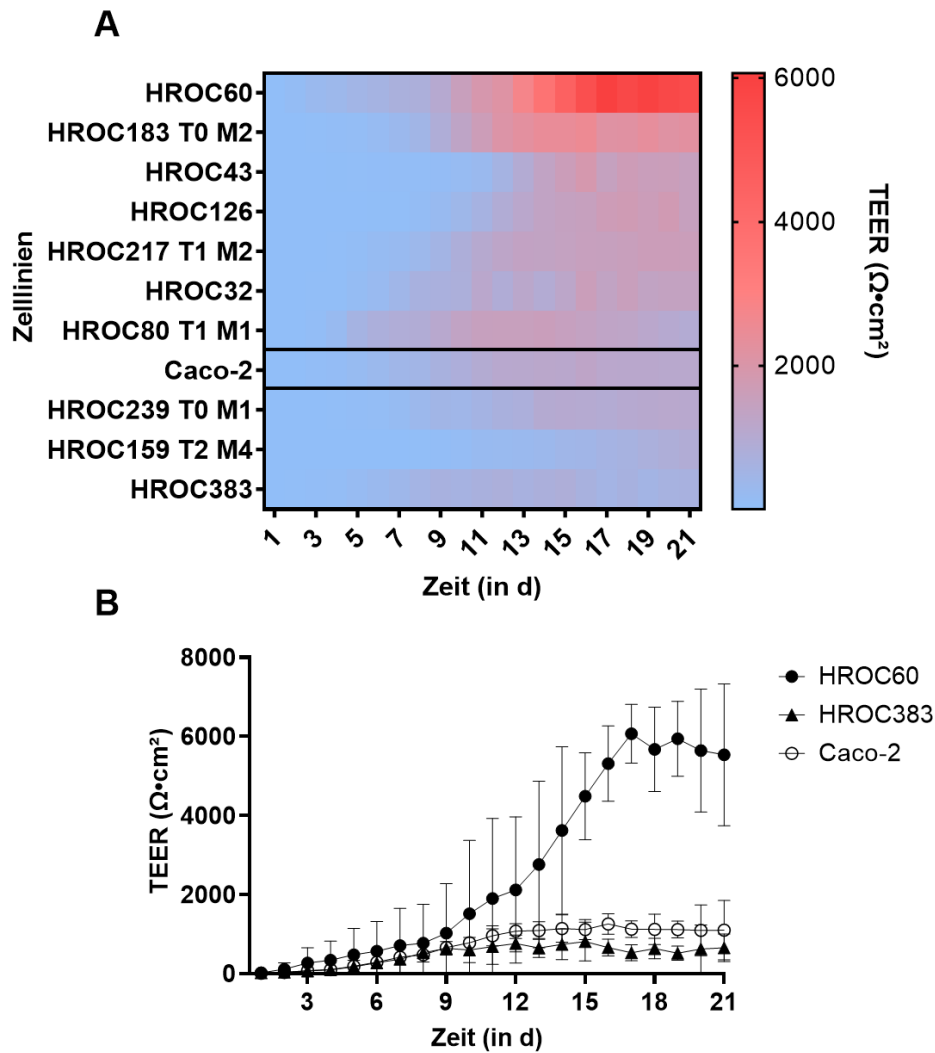


Abbildung 13: Ergebnisse der TEER-Messungen zur Untersuchung der Barriereintegrität in HROC-Zelllinien und Caco-2. Die Zellen wurden in 24-Well-Zellkultureinsätzen über einen Zeitraum von 21 Tagen (d) kultiviert und der TEER täglich erfasst. A) Heatmap zeigt die Gesamtübersicht der zeitabhängigen Änderung des TEER (Mittelwerte) in den HROC-Zelllinien und Caco-2, absteigend sortiert nach den jeweiligen Maxima. B) Zeitabhängige Änderung des TEER repräsentativ für HROC60 und HROC383 im direkten Vergleich zu Caco-2. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD, $n = 3$.

Zusätzlich zu den TEER-Messungen erfolgte die Untersuchung der parazellulären Permeabilität. Die Ergebnisse zur Untersuchung der FD4-Permeabilität der HROC- und Caco-2-Zelllayer sind in Abbildung 14 dargestellt.

Bei allen untersuchten Zelllinien konnte eine zeitabhängige Abnahme der parazellulären Permeabilität festgestellt werden. Korrelierend mit einem schnellen Anstieg des TEER in HROC60 und HROC80 T1 M1 wurde in diesen Linien an d5 nach Aussaat eine schnellere Reduktion der FD4-Permeabilität beobachtet (5 % und 8 %) als in Caco-2 (29 %). Für HROC239 T0 M1 und HROC126 wurde eine mit Caco-2 vergleichbare Abnahme des parazellulären Fluxes erfasst. Eine erhöhte Permeabilität konnte hingegen in HROC32 und HROC43 durch Reduktion der FD4-Permeabilität auf 11 % und 30 % an d14 beobachtet werden.

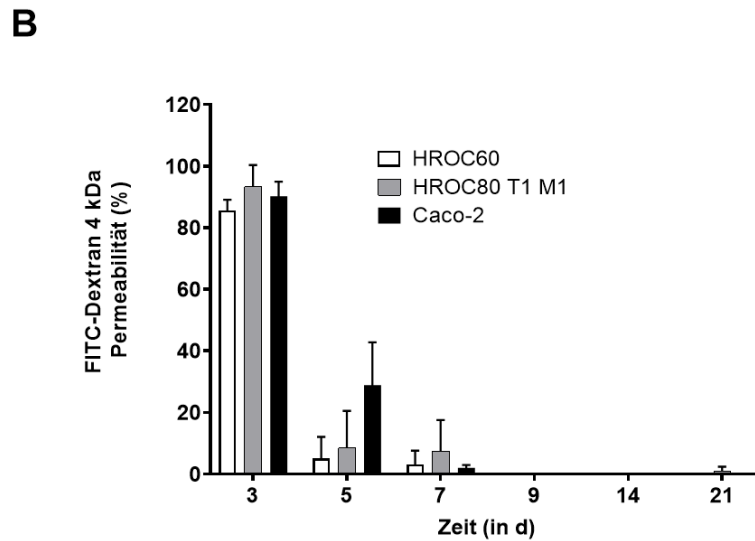
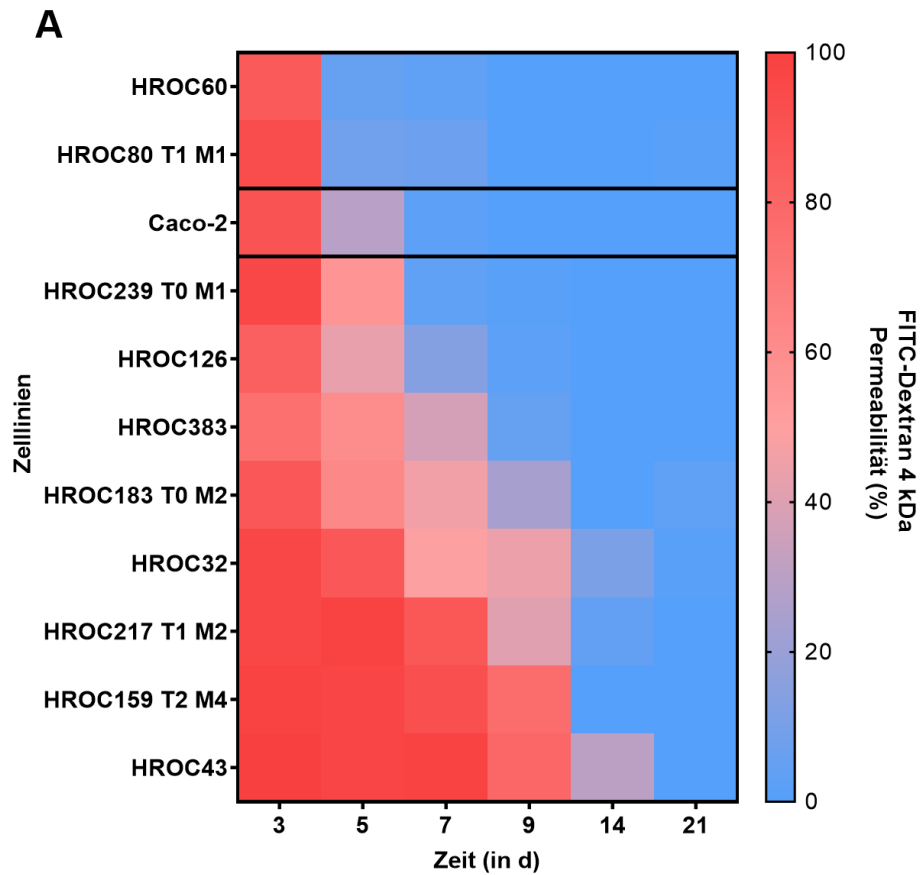


Abbildung 14: Ergebnisse des FD4-Permeabilitäts-Assay zur Untersuchung der parazellulären Permeabilität in HROC-Zelllinien und Caco-2. Die Zellen wurden in 24-Well-Zellkultureinsätzen über einen Zeitraum von 21 Tagen (d) kultiviert und die FD4-Permeabilität an d3, d5, d7, d9, d14 und d21 nach Aussaat gemessen. A) Heatmap zeigt die Gesamtübersicht der zeitabhängigen Änderung der FD4-Permeabilität in Prozent (Mittelwerte) in den HROC-Zelllinien und Caco-2. B) Zeitabhängige Änderung der FD4-Permeabilität repräsentativ für HROC60 und HROC80 T1 M1 im direkten Vergleich zu Caco-2. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD, $n = 3$.

4.3.2 Untersuchungen zur Bildung von Tight Junction-Komplexen

Für die weitere Untersuchung der Barriereintegrität erfolgten zusätzliche Versuche für den Nachweis von TJ-Komplexen in konfluenten Zellschichten der HROC-Zelllinien und der Caco-2.

4.3.2.1 Immunfluoreszenzmikroskopische Visualisierung von ZO-1

Zunächst erfolgte hierzu die Analyse der immunfluoreszenzmikroskopischen Visualisierung des TJ-Proteins ZO-1. Die Ergebnisse zeigten eine ZO-1-Expression in allen untersuchten Zelllinien, die unterschiedlich stark ausgeprägt war (Abbildung 15). Insgesamt wurde in den Linien HROC43, HROC80 T1 M1, HROC159 T2 M4, HROC183 T0 M2 und HROC217 T1 M2 durch die Anfärbung eine pflastersteinartige Morphologie deutlich, die mit Caco-2 vergleichbar war. Darunter zeigte HROC43 die stärksten Fluoreszenzsignale, in HROC159 T2 M4 konnte dagegen ein gleichmäßig dichtes Expressionsmuster nachgewiesen werden. In HROC60 war ZO-1 insgesamt schwächer, an bestimmten Zell-Zell-Kontakten jedoch stärker exprimiert. Das ZO-1-Expressionsmuster in HROC32 war hingegen von dünnfädiger, spinnennetzartiger Struktur. Für HROC126 wurde insgesamt die schwächste ZO-1-Expression festgestellt.

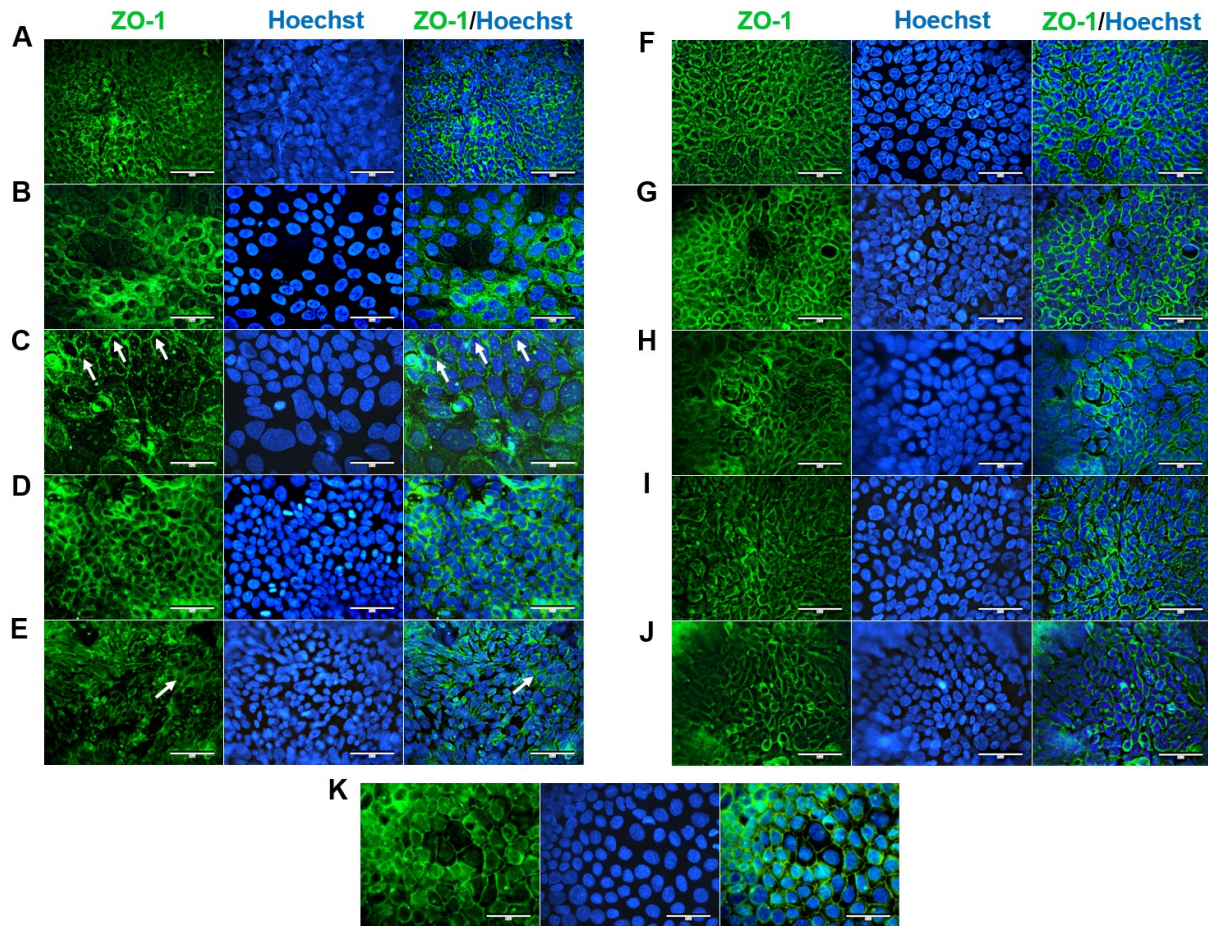


Abbildung 15: Immunfluoreszenzmikroskopische Visualisierung von ZO-1 in den HROC-Zelllinien und Caco-2 nach Erreichen einer 100%igen Konfluenz. Die konfluenten Zellschichten wurden mit Methanol/Azeton (1:1) fixiert und mit 0,5 % Triton-X permeabilisiert. Die ZO-1-Lokalisation auf der apikalen Zellmembran erfolgte durch direkte Immunfluoreszenz (grün), die Zellkerne wurden mit Hoechst blau angefärbt. Weiße Pfeile markieren ZO-1 in weniger stark ausgeprägten Expressionsmustern. (A) HROC32, (B) HROC43, (C) HROC60, (D) HROC80 T1 M1, (E) HROC126, (F) HROC159 T2 M4, (G) HROC183 T0 M2, (H) HROC217 T1 M2, (I) HROC239 T0 M1, (J) HROC383 und (K) Caco-2. Balken = 50 μm , Vergrößerung 60x. ZO-1: Zonula occludens-1.

4.3.2.2 Rasterelektronenmikroskopische Detektion von Tight Junctions

Die konfluenten Zellschichten wurden hinsichtlich der Ausprägung von Zell-Zell-Kontakten auch rasterelektronenmikroskopisch untersucht. Hierbei konnten besonders ausgeprägte TJ-Strukturen in HROC60, HROC159 T2 M4 und Caco-2 auf apikaler Seite der Zellmembran detektiert werden. HROC60 und Caco-2 waren durch eine stärkere Ausprägung mit wallartigen Strukturen charakterisiert, während HROC159 T2 M4 büstensaumartige Strukturen von Zell-Zell-Kontakten aufwies (Abbildung 16).

4.3.2.3 Einfluss der Kulturzeit auf die Expression von Occludin

Im Anschluss wurde die Genexpression des Transmembranproteins Occludin in den HROC-Zelllinien und der Caco-2 vor Erreichen der Konfluenz (CTRL) und nach zehntägiger Konfluenz (d10) untersucht und mit der Expression in humanem Dünndarm verglichen. Im Ver-

gleich zur Kontrollmessung zeigte sich ein deutlicher Anstieg der Occludin-Expression nach zehntägiger Konfluenz in den Linien HROC183 T0 M2 (0,6-fach auf 5,9-fach) und HROC60 (0,7-fach auf 3,7-fach) (Abbildung 16). Ein geringerer Anstieg konnte in den Linien HROC239 T0 M1 (1-fach auf 2,9-fach), HROC43 (2,4-fach auf 3,8-fach) und HROC126 (3,1-fach auf 3,2-fach) festgestellt werden. In HROC383 (22,9-fach auf 4-fach), HROC159 T2 M4 (6,6-fach auf 0,8-fach) und HROC32 (8,3-fach auf 3,8-fach) wurde hingegen eine Abnahme der Occludin-Expression mit zunehmender Kulturzeit beobachtet. Auffällig war eine Überexpression von Occludin in Caco-2 (25-fach) nach zehntägiger Konfluenz gegenüber normalem Dünndarmgewebe. Eine Überexpression konnte ebenso für die Linien HROC383 (22,9-fach), HROC32 (8,3-fach) und HROC159 T2 M4 (6,6-fach) vor Erreichen der Konfluenz festgestellt werden. Insgesamt war die Occludin-Expression am ehesten in HROC159 T2 M4 (0,8-fach), HROC217 T1 M2 (1,8-fach) und HROC239 T0 M1 (2,9-fach) mit der Expression in normalem Dünndarmgewebe vergleichbar.

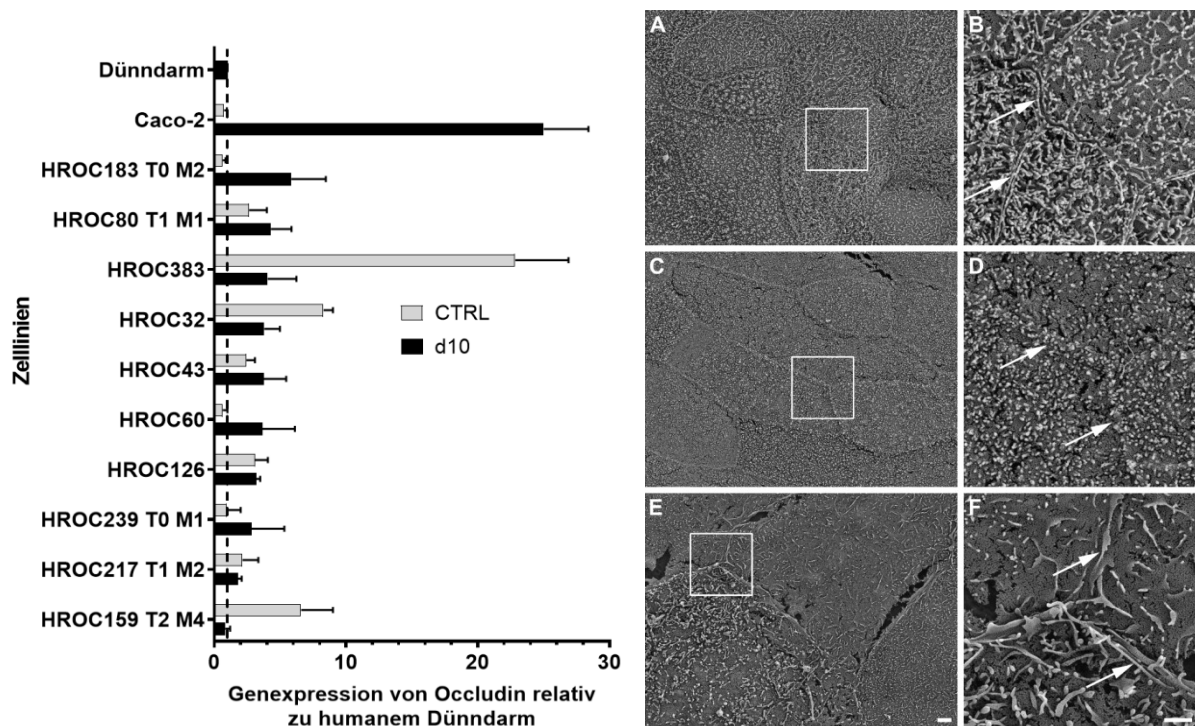


Abbildung 16: Nachweis von TJ-Strukturen in den HROC-Zelllinien und Caco-2: Links: Genexpressionsanalyse von Occludin relativ zu humanem Dünndarm. Dargestellt ist die mRNA-Expression des Transmembranproteins Occludin vor Erreichen der Konfluenz (CTRL) und nach zehntägiger Konfluenz (d10), absteigend sortiert nach Expressionsstärke an d10. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD, $n = 3$. Die mRNA-Quantifizierung erfolgte nach der Isolation der Gesamt-RNA durch Real-time PCR. Alle Ct-Werte wurden auf GAPDH normalisiert und die relative Veränderung der Genexpression im Vergleich zu humanem Dünndarm mithilfe der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode ermittelt. Die Expressionsstärke des Dünndarms entspricht eins (gestrichelte Linie). Rechts: Repräsentative rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von TJ in konfluenten HROC-Zelllayern und Caco-2 nach Erreichen einer 100%igen Konfluenz. Erkennbar sind TJ-Strukturen (weiße Pfeile) auf apikaler Zellmembran in den Zelllinien (A und B) HROC60, (C und D) HROC159 T2 M4 sowie (E und F) Caco-2. Balken = 2 μ m (A, C und E) und 1 μ m (B, D und F). TJ: Tight Junctions.

4.4 Untersuchung des Differenzierungsgrades

4.4.1 Differenzierung in spezialisierte intestinale Epithelzellen

Im weiteren Verlauf wurden die HROC-Zelllinien und die Caco-2 hinsichtlich ihrer Eigenschaft zur Differenzierung hin zu spezifischen IECs untersucht. Hierfür wurde die Expression von Markergenen, die spezifisch für intestinale epitheliale Zelltypen sind, mittels immunzytochemischer Färbung bestimmt.

Zunächst erfolgte der Nachweis des Proteins MUC2 als Marker für differenzierte gastrointestinale Becherzellen in konfluenten Zelllayern der HROC-Zelllinien und Caco-2 (Abbildung 17). Dabei wurden innerhalb des untersuchten Zellpanels Unterschiede deutlich. Die stärkste MUC2-Expression konnte in HROC43 nachgewiesen werden; eine auffällig homogene cytoplasmatische Fluoreszenz und rinnsal-artige über die Zelloberfläche verteilte Spuren. Eine starke homogene MUC2-Expression konnte ebenso in HROC60 und HROC159 T2 M4 nachgewiesen werden. Diese wurde in HROC60 als perinukleäre Grundfluoreszenz mit zum Teil zahlreichen runden Fluoreszenz-Tröpfchen sichtbar. Zusätzlich wurden Strukturen deutlich, die dem Zellkern einseitig anliegen. HROC159 T2 M4 zeigte hingegen ein leicht schwächeres perinukleäres, homogenes Fluoreszenzmuster mit auffällig angeordneten fein- bis grobtropfigen Strukturen im Cytoplasma. In Caco-2 wurde ein gemischtes Muster mit Fluoreszenz der nukleären Peripherie als auch nukleärer Areale nachgewiesen. HROC32, HROC80 T1 M1, HROC183 T0 M2 und HROC217 T1 M2 zeigten eine schwache Färbung des Cytoplasmas mit jedoch vereinzelt starker perinukleärer Fluoreszenz, die sich in HROC32 und HROC217 T1 M2 als schweifartige Sekretpur darstellte. HROC126, HROC239 T0 M1 und HROC383 waren hingegen durch eine schwache perinukleäre Fluoreszenz mit unspezifischen Mustern in HROC126 und HROC239 T0 M1 gekennzeichnet. Insgesamt konnten MUC2-sezernierende Becherzellen aufgrund charakteristischer Fluoreszenzmuster in den Linien HROC32, HROC43, HROC60, HROC80 T1 M1, HROC159 T2 M4, HROC183 T0 M2, HROC217 T1 M2 und HROC383 nachgewiesen werden.

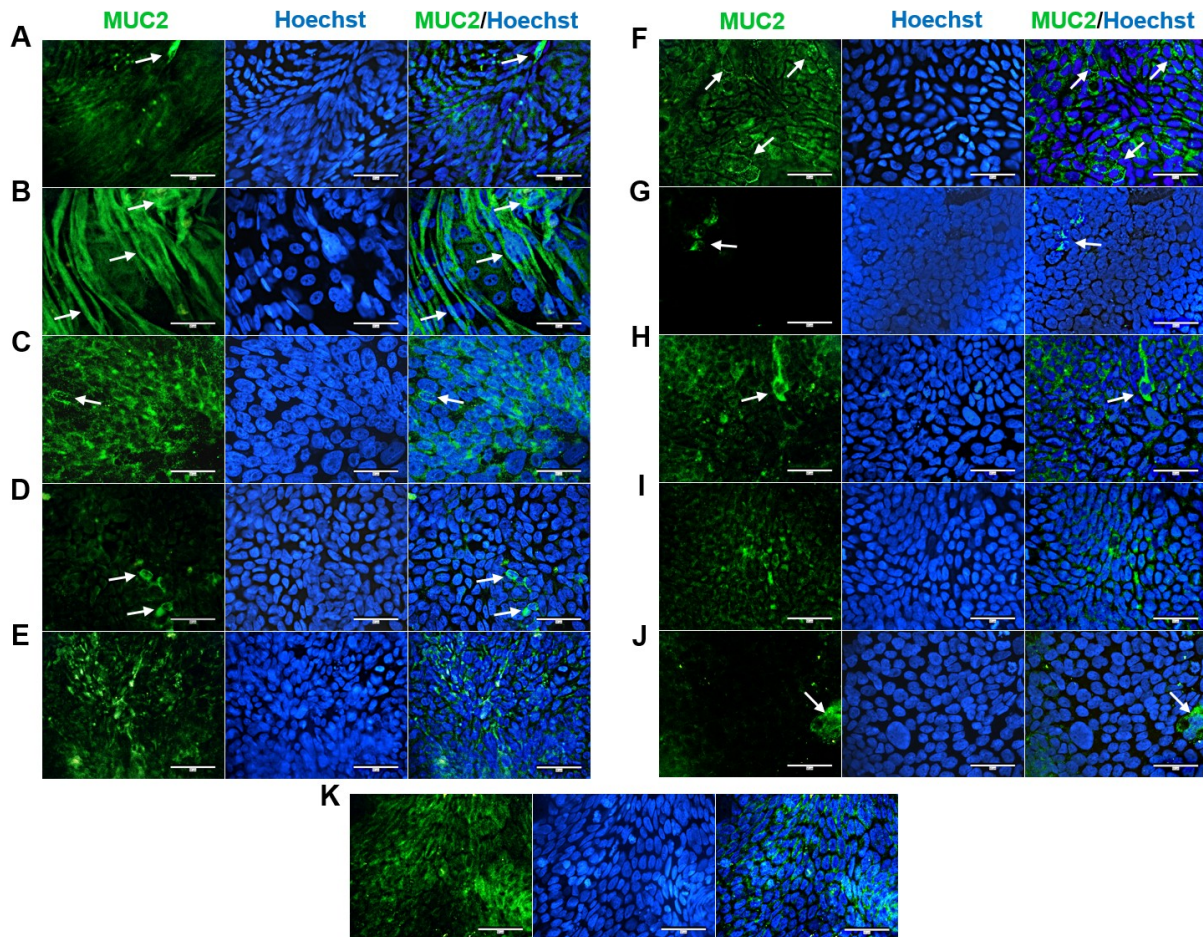


Abbildung 17: Immunfluoreszenzmikroskopische Visualisierung von Becherzellen in den HROC-Zelllinien und Caco-2 nach Erreichen einer 100%igen Konfluenz. Die konfluenten Zellschichten wurden mit 4 % PFA fixiert und mit 0,5 % Triton-X permeabilisiert. Die Lokalisation epithelialer Becherzellen (weiße Pfeile) an der apikalen Zellmembran erfolgte durch direkte Immunfluoreszenz von MUC2 (grün), die Zellkerne wurden mit Hoechst blau angefärbt. (A) HROC32, (B) HROC43, (C) HROC60, (D) HROC80 T1 M1, (E) HROC126, (F) HROC159 T2 M4, (G) HROC183 T0 M2, (H) HROC217 T1 M2, (I) HROC239 T0 M1, (J) HROC383 und (K) Caco-2. Balken = 50 µm, Vergrößerung 60x. MUC2: Mucin 2, PFA: Paraformaldehyd.

Für den Nachweis der in den Krypten des Dünndarms lokalisierten Paneth-Zellen wurde das Protein LYZ als Marker verwendet. Die Ergebnisse der immunfluoreszenzmikroskopischen Visualisierung sind in Abbildung 18 dargestellt.

Insgesamt zeigten sich erhebliche Unterschiede in der LYZ-Expression innerhalb des Zellpanels. Dabei wurde eine hohe cytoplasmatische Fluoreszenz in HROC43 detektiert, die zudem durch Fluoreszenz 15 groß- und etwa 55 feintropfiger Punkte in nukleären und perinukleären Arealen charakterisiert war. In HROC60, HROC126 und HROC159 T2 M4 konnten homogene mäßig starke, perinukleäre Fluoreszenzmuster nachgewiesen werden, das in HROC60 teilweise als feingranuläre cytoplasmatische Fluoreszenz deutlich wurde. In HROC80 T1 M1 und HROC217 T1 M2 zeigten sich perinukleäre Fluoreszenzmuster mit Strukturen, die dem Zellkern einseitig anliegen. Eine schwächere Grundfluoreszenz konnte in HROC32, HROC183 T0 M2 und Caco-2 beobachtet werden. In diesen Linien wurden jedoch zum Teil spezifische perinukleäre Fluoreszenzmuster deutlich. HROC239 T0 M1 wies

eine schwache Intensität mit grobtropfiger Fluoreszenz perinukleärer und nukleärer Areale auf. HROC383 zeigte ebenso eine geringe Fluoreszenz, die sich als schwach ausgeprägtes perinukleäres Muster darstellte.

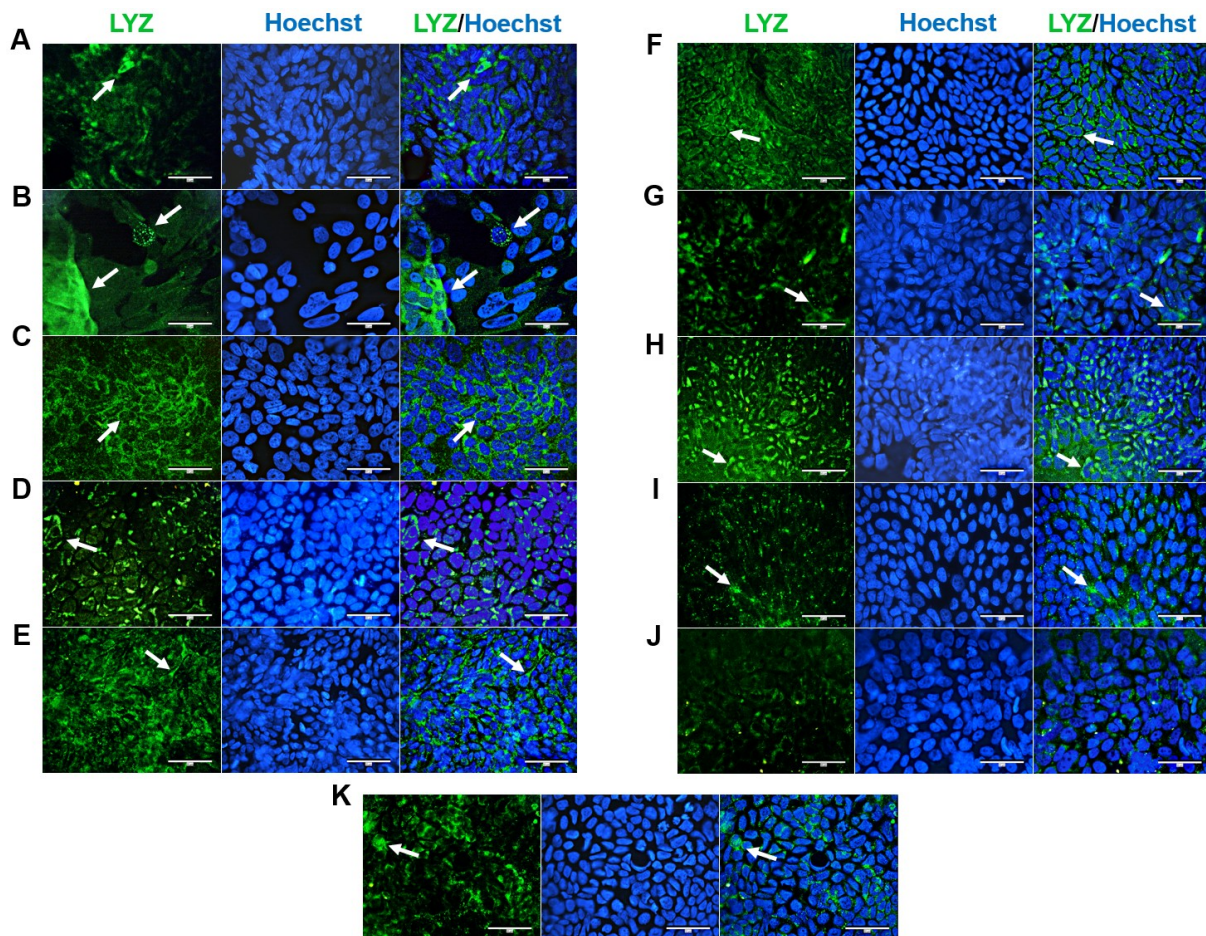


Abbildung 18: Immunfluoreszenzmikroskopische Visualisierung von Paneth-Zellen in den HROC-Zelllinien und Caco-2 nach Erreichen einer 100%igen Konfluenz. Die konfluenten Zelllayer wurden mit 4 % PFA fixiert und mit 0,5 % Triton-X permeabilisiert. Die Lokalisation von LYZ (grün) auf der apikalen Zellmembran erfolgte durch direkte Immunfluoreszenz, die Zellkerne wurden mit Hoechst blau angefärbt. Weiße Pfeile verdeutlichen spezifische Fluoreszenzmuster. (A) HROC32, (B) HROC43, (C) HROC60, (D) HROC80 T1 M1, (E) HROC126, (F) HROC159 T2 M4, (G) HROC183 T0 M2, (H) HROC217 T1 M2, (I) HROC239 T0 M1, (J) HROC383 und (K) Caco-2. Balken = 50 µm, Vergrößerung 60x. LYZ: Lysozym, PFA: Paraformaldehyd.

Im Anschluss erfolgte der Nachweis des Proteins CHGA als Marker für enteroendokrine Zellen. Die immunzytochemische Färbung ergab ein spezifisches Fluoreszenzmuster in allen Zelllinien, das durch eine unterschiedliche Anzahl mittelgroßer gleichmäßig über den Zellkern verteilter Granula charakterisiert war (Abbildung 19). In den Linien HROC43 und HROC60 wurden insgesamt die stärksten Fluoreszenzsignale gemessen. Dies zeichnete sich in HROC43 durch stärker fluoreszierende Granula in Arealen mit ausgeprägter perinukleärer und nukleärer Fluoreszenz aus. Auffällig war zudem eine cytoplasmatische Fluoreszenz im Zellverband, die sich als sekretspurartiges Muster darstellte. HROC60 zeigte

hingegen ein homogeneres und stärker perinukleäres Fluoreszenzmuster, jedoch mit schwächer fluoreszierenden Granula. In HROC183 T0 M2 wurden perinukleäre, in HROC217 T1 M2 mitunter auch nukleäre Fluoreszenzmuster in Arealen mit verstärkt fluoreszierenden Granula nachgewiesen. HROC32, HROC126 und HROC159 T2 M4 wiesen eine homogene cytoplasmatische Grundfluoreszenz auf. Diese stellte sich in HROC32 und HROC126 zum Teil auch als perinukleäre Fluoreszenz dar. Die Fluoreszenz in Caco-2 war von schwacher Intensität, es zeigten sich jedoch perinukleäre Fluoreszenzmuster in Arealen mit verstärkt fluoreszierenden Granula. HROC80 T1 M1 war ebenso durch eine schwache Fluoreszenzintensität geprägt, jedoch zeigten sich fluoreszierende Granula an einer hohen Anzahl von Zellkernen. In HROC239 T0 M1 war die CHGA-Expression als homogene cytoplasmatische Grundfluoreszenz charakterisiert, die sich teilweise als pfeilspitzartige Strukturen seitlich der Zellkerne darstellte. Innerhalb des Zellpanels zeigte HROC383 mit spärlich fluoreszierenden Granula sowie schwach perinukleärem Muster die geringste Fluoreszenzintensität.

Insgesamt konnten enteroendokrine Zellen in HROC32, HROC43, HROC60, HROC126, HROC183 T0 M2, HROC217 T1 M2, HROC239 T0 M2 und Caco-2 nachgewiesen werden.

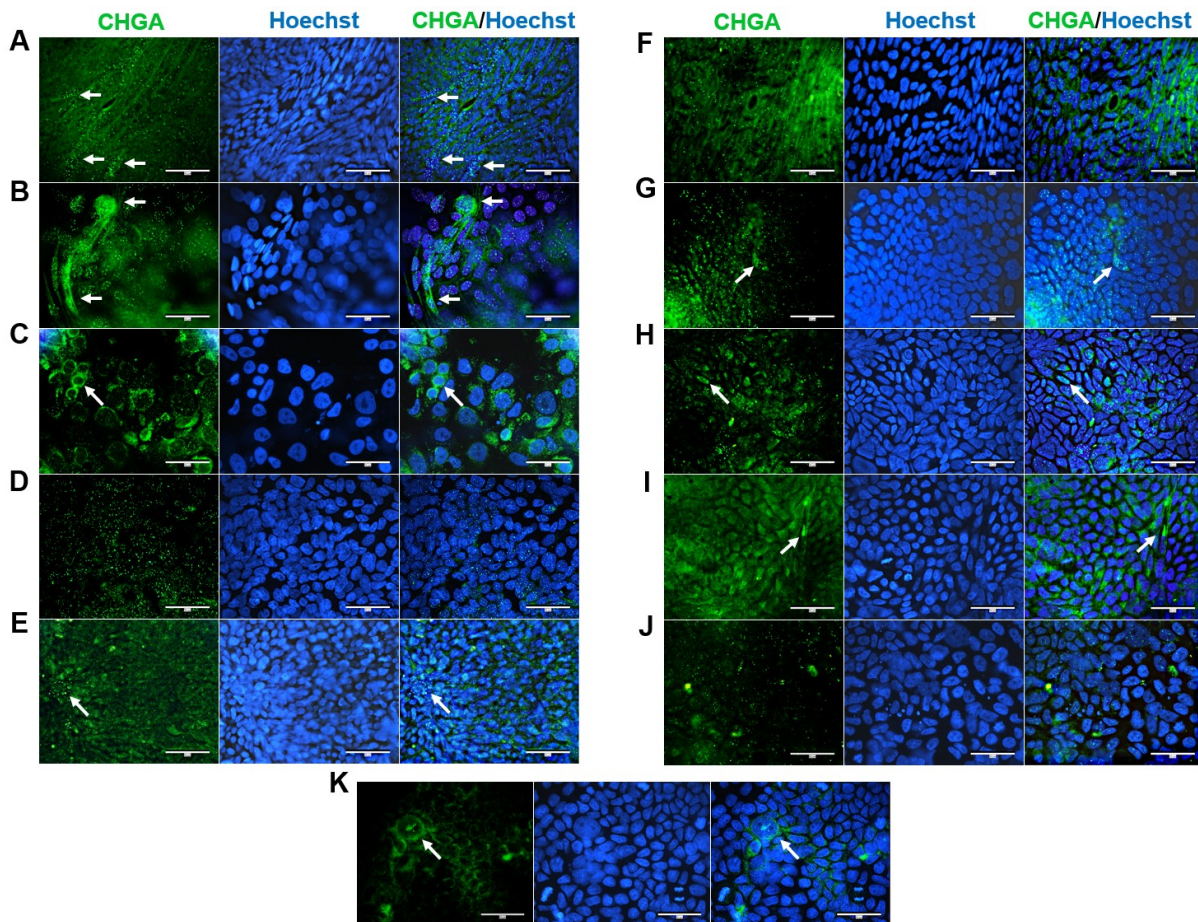


Abbildung 19: Immunfluoreszenzmikroskopische Visualisierung von enteroendokrinen Zellen in den HROC-Zelllinien und Caco-2 nach Erreichen einer 100%igen Konfluenz. Die konfluenten Zelllayer wurden mit 4 % PFA fixiert und mit 0,5 % Triton-X permeabilisiert. Die Lokalisation enteroendokriner Zellen (weiße Pfeile) auf der apikalen Zellmembran erfolgte durch direkte Immunfluoreszenz von CHGA (grün), die Zellkerne wurden mit Hoechst blau angefärbt. (A) HROC32, (B) HROC43, (C) HROC60, (D) HROC80 T1 M1, (E) HROC126, (F) HROC159 T2 M4, (G) HROC183 T0 M2, (H) HROC217 T1 M2, (I) HROC239 T0 M1, (J) HROC383 und (K) Caco-2. Balken = 50 µm, Vergrößerung 60x. CHGA: Chromogranin A, PFA: Paraformaldehyd.

Abschließend wurden die konfluenten Zelllayer der HROC-Zelllinien und Caco-2 für den Nachweis hochprismatischer Epithelzellen und Oberflächendifferenzierungen rasterelektronenmikroskopisch untersucht. Die Aufnahmen zeigen die Ausbildung polarisierter Zelllayer in Form zahlreicher, unterschiedlich stark besetzter Mikrovilli auf apikaler Seite in allen untersuchten Linien (Abbildung 20). Hierbei wurden innerhalb des Zellpanels Unterschiede in der Morphologie der Mikrovilli deutlich. Besonders dichte und büschelartige Strukturen wurden in den Zelllinien HROC183 T0 M2 und HROC217 T1 M2 detektiert, die in manchen Arealen besonders ausgeprägt waren. Dabei war HROC217 T1 M2 durch eine auffällig längliche, charakteristische Mikrovilli-Struktur geprägt. HROC159 T2 M4 zeichnete sich durch ein homogenes dichtes Verteilungsmuster mit kurzen kleinen Mikrovilli-Strukturen aus, die sich zum Teil auch als drahtige Struktur darstellten. Ähnlich kurze und dichte Strukturen konnten auch in HROC32 und HROC43 festgestellt werden, wobei das Epithel in HROC32 spärlicher

mit Villi-Strukturen besetzt war. Markant waren korallenriffartige Strukturen in HROC126, HROC217 T1 M2 und HROC239 T0 M1, die unmittelbar an Areale mit charakteristischen langfädigen Mikrovilli-Strukturen angrenzten. In HROC126 und HROC183 T0 M2 waren manche Areale zum Teil auch mit Wattwurmhaufen-ähnlichen Strukturen besetzt. Insgesamt waren die Mikrovilli-Strukturen in HROC60 und HROC80 T1 M1 am ehesten mit Caco-2 vergleichbar. HROC60 war durch ein auffällig gleichmäßiges Verteilungsmuster geprägt, das jedoch kurze mit Caco-2 vergleichbare Strukturen aufwies. Ein ähnliches Verteilungsmuster zeigte sich in HROC80 T1 M1, zusätzlich wurden jedoch einzelne langfädige Strukturen in dieser Linie nachgewiesen. HROC383 war insgesamt eher spärlich mit Mikrovilli-Strukturen besetzt, zum Teil stellten sich diese jedoch von umliegenden Zellen abgrenzbar als dichte drahtige Strukturen dar.

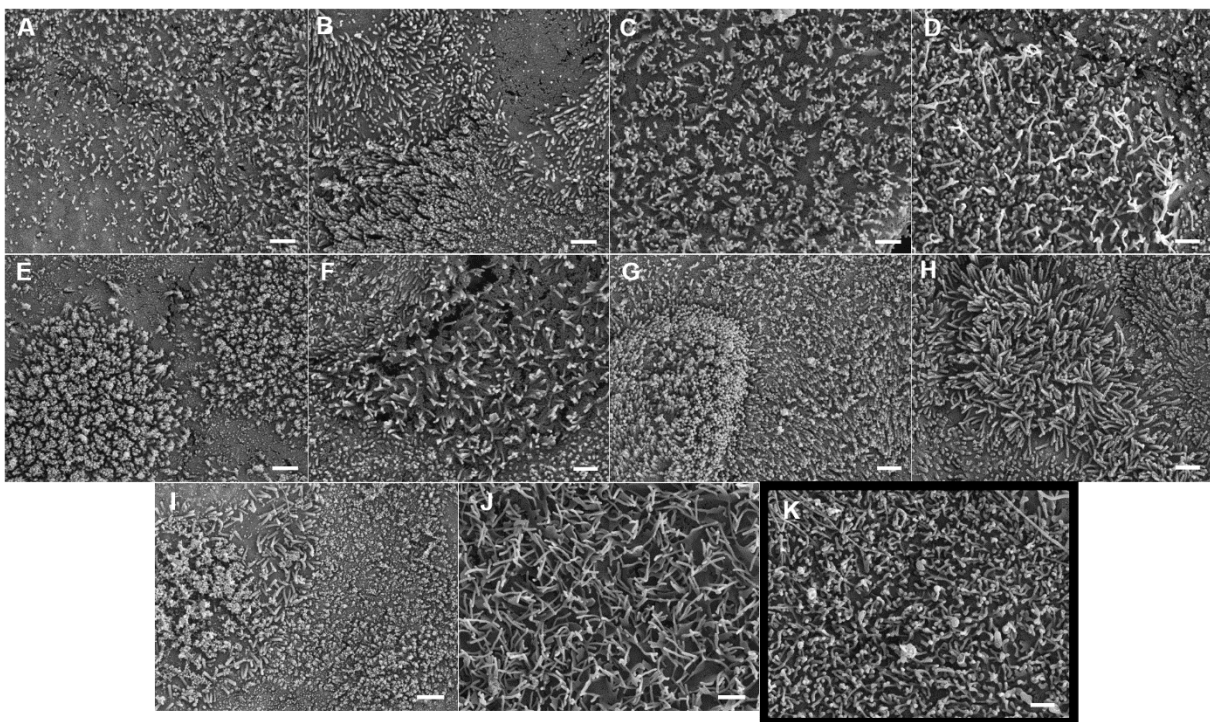


Abbildung 20: Repräsentative rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Mikrovilli in den HROC-Zelllinien und Caco-2 nach Erreichen einer 100%igen Konfluenz. Erkennbar sind Oberflächendifferenzierungen in Form von zahlreichen, morphologisch diversen Mikrovilli auf apikaler Seite der Zellmembran in den Zelllinien (A) HROC32, (B) HROC43, (C) HROC60, (D) HROC80 T1 M1, (E) HROC126, (F) HROC159 T2 M4, (G) HROC183 T0 M2, (H) HROC217 T1 M2, (I) HROC239 T0 M1, (J) HROC383 und (K) Caco-2 (schwarzer Rahmen). Balken = 1 µm.

Neben morphologischen Unterschieden der Mikrovilli-Strukturen gingen aus den REM-Aufnahmen auch besonders auffällige heterogene Verteilungsmuster hervor. Repräsentative Aufnahmen sind in Abbildung 21 dargestellt.

Eine besonders hohe morphologische Variation konnte in HROC43 festgestellt werden. Hierbei wurden verschiedenartige Verteilungsmuster klar voneinander abgrenzbarer Areale deutlich. Zum einen zeigte das Epithel drei nebeneinander liegende kreisrunde Areale mit

einem Durchmesser von 3,5 μm und stark buschigem Mikrovilli-Besatz. Erkennbar waren auch 4 μm große kreisrunde Areale ohne erkennbare Oberflächendifferenzierung sowie 5 μm große kreisrunde Flächen mit spärlichem stoppelartigem Mikrovilli-Besatz. Auffällig waren zudem 8 μm große kreisrunde Areale mit gleichmäßig punktförmigem Mikrovilli-Besatz. Des Weiteren wurden 50 μm große Areale ohne erkennbare Oberflächendifferenzierung nachgewiesen, die in ähnlicher Ausprägung auch in Caco-2 detektiert wurden. HROC32 und HROC217 T1 M2 waren teilweise von kreisrunden und ovalen Arealen mit einem Durchmesser von 21 bis 23 μm ohne Mikrovilli-Besatz geprägt. Darunter zeigte sich eine auffällig zeltartige Struktur am Flächenrand in HROC217 T1 M2.

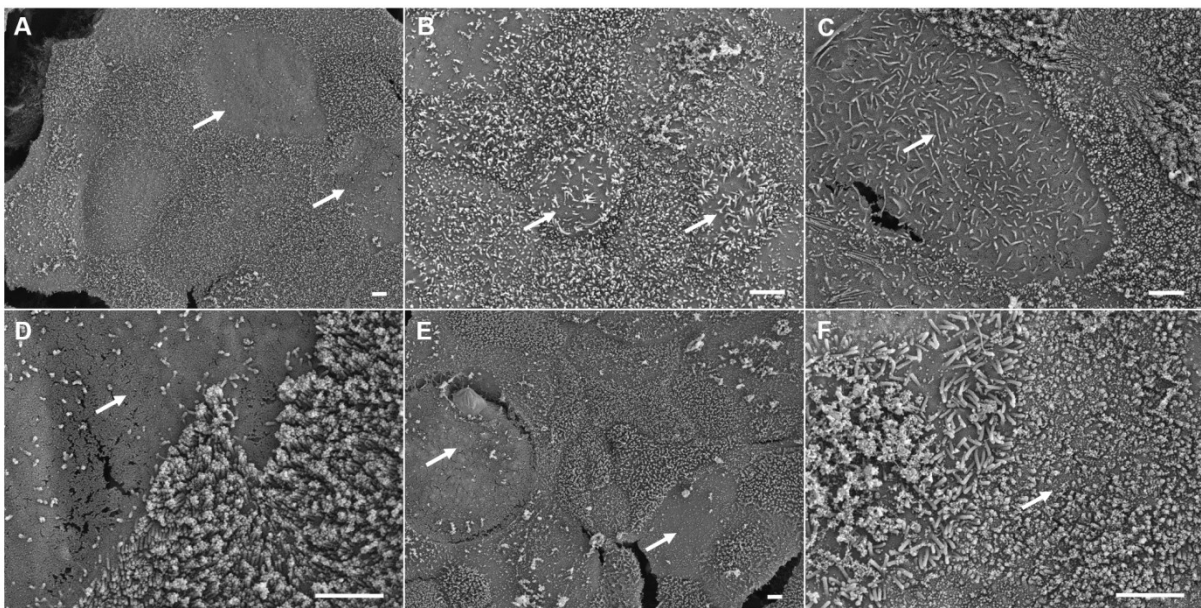


Abbildung 21: Repräsentative rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Arealen mit weniger stark besetzten Mikrovilli und besonderer Morphologie in den HROC-Zelllinien nach Erreichen einer 100%igen Konfluenz. Erkennbar sind selektiv spärliche Ausprägungen des Mikrovilli-Besatzes in den Zelllinien (A) HROC32, (B) HROC43, (C) HROC126, (D) HROC183 T0 M2 und (E) HROC217 T1 M2 sowie korallenriffartige Strukturen in (F) HROC239 T0 M1. Auffällige Areale mit spärlichem Mikrovilli-Besatz sind durch weiße Pfeile hervorgehoben. Balken = 2 μm .

4.5 Untersuchungen zum intestinalen First-Pass-Metabolismus

4.5.1 Bestimmung der basalen CYP3A4-Aktivität

Um die Zellmodelle hinsichtlich ihrer Eigenschaft des First-Pass-Metabolismus zu untersuchen, erfolgte zunächst die Messung der basalen Aktivität des Phase I-Enzyms CYP3A4. Die CYP3A4-Aktivitätslevel in den HROC-Zelllinien und Caco-2 sind in Abbildung 22 dargestellt.

Die höchste basale CYP3A4-Aktivität wurde in HROC32 gemessen (6,5-fach höher als Caco-2). Höhere Aktivitäten als in Caco-2 wurden zudem für die Linien HROC43 (2,8-fach) und HROC159 T2 M4 (1,8-fach) bestimmt. Mit der Caco-2 vergleichbare Level wurden in den Linien HROC217 T1 M2 (0,8-fach), HROC383 (0,7-fach) und HROC239 T0 M1 (0,7-fach)

beobachtet. Niedrigere CYP3A4-Aktivitätslevel wurden für HROC126 (0,6-fach), HROC80 T1 M1 (0,5-fach), HROC183 T0 M2 (0,2-fach) und HROC60 (0,2-fach) festgestellt.

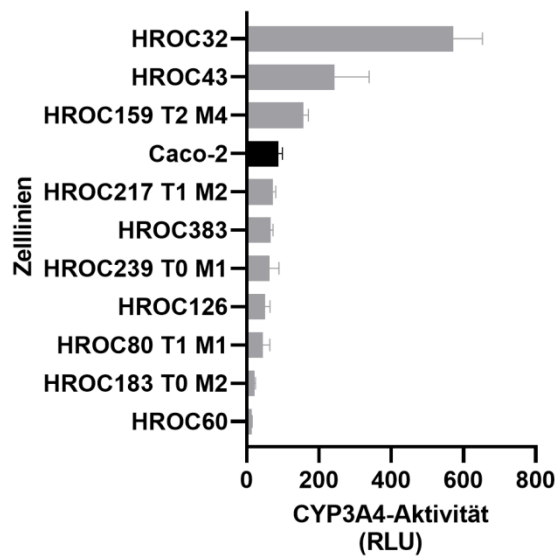


Abbildung 22: Basale Level der CYP3A4-Aktivität in den HROC-Zelllinien und Caco-2. Die Zellen wurden in 96-Well-Zellkulturplatten ausgesät, bis zum Erreichen einer 100%igen Konfluenz kultiviert und für 24 h mit 0,1 % DMSO in DMEM/F12 (10 % FKS) inkubiert. Die CYP3A4-Aktivität wurde mithilfe des CYP3A4/Luciferin-IPA P450-Glo™ Assay aus der emittierenden Biolumineszenz als relative Lichteinheit (RLU) ausgegeben. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD, n = 3. CYP3A4: Cytochrom P450 3A4.

4.5.2 Rezeptorabhängige Induktion und Inhibition der CYP3A4-Aktivität

Im weiteren Verlauf wurde der Einfluss von CYP3A4-Substraten auf die CYP3A4-Aktivität durch funktionelle Analysen untersucht. Zur Bestimmung der rezeptorabhängigen Induktion und Inhibition des CYP3A4-vermittelten Metabolismus wurden die Zellen mit den PXR-, VDR- und Glucocorticoid-Rezeptor (GR)-Agonisten Rifampicin, VD3 und Dexamethason behandelt. Die Ergebnisse der Analysen sind in Abbildung 23 dargestellt.

Die Behandlung mit VD3 resultierte insgesamt in der höchsten Induktion der CYP3A4-Aktivität. So konnte in acht HROC-Zelllinien ein höheres Induktionspotential im Vergleich zur Caco-2 festgestellt werden, von denen fünf Linien statistisch signifikante Effekte aufwiesen. Das höchste VDR-vermittelte Induktionspotential wurde für HROC183 T0 M2 erfasst (16,8-fache Veränderung nach 72 h). Ein starkes Induktionspotential durch VD3 konnte ebenso in den Linien HROC80 T1 M1 (12,1-fach nach 72 h), HROC217 T1 M2 (10,2-fach nach 48 h), HROC126 (7,2-fach nach 72 h) und HROC159 T2 M4 (5,1-fach nach 72 h) beobachtet werden. Schwächere Induktionseffekte ohne statistische Signifikanz wurden in HROC239 T0 M1 (2,3-fach nach 48 h), HROC383 (2-fach an 24 h und 72 h), HROC32 (1,9-fach) und Caco-2 (1,4-fach nach 48 h) beobachtet. In HROC43 (0,4-fach nach 24 h) und HROC60 (0,5-fach nach 24 h und 48 h) wurden hingegen inhibitorische Effekte festgestellt.

Die Behandlung der Zellen mit Rifampicin zur Untersuchung der PXR-vermittelten Veränderung der CYP3A4-Aktivität führte zu einer Induktion als auch zu einer Inhibition der metabolischen CYP3A4-Aktivität. Signifikante Induktionseffekte konnten dabei in HROC217 T1 M2, HROC183 T0 M2 und Caco-2 beobachtet werden. Das Induktionspotential lag dabei in HROC217 T1 M2 (5,1-fach nach 48 h) und HROC183 T0 M2 (2,2-fach nach 24 h) höher als in Caco-2 (2-fach nach 72 h). Schwache Induktionseffekte ohne statistische Signifikanzen wurden in den Linien HROC383 (2,5-fach nach 72 h), HROC80 T1 M1 (1,8-fach nach 72 h) und HROC126 (1,5-fach nach 48 h) beobachtet. Auffällig war eine Herunterregulation der CYP3A4-Aktivitätslevel in fünf HROC-Zelllinien nach Behandlung mit Rifampicin. Dabei zeigten sich in den Linien HROC159 T2 M4 und HROC32 statistische Signifikanzen. Zudem konnte eine Reduktion der CYP3A4-Aktivität bis zu 70 % in HROC239 T0 M1 (nach 24 h), HROC32 (nach 72 h) und HROC43 (nach 24 h und 72 h) beobachtet werden.

Die Behandlung mit Dexamethason führte im Vergleich zu Rifampicin und VD3 zu einer schwächeren Induktion der CYP3A4-Aktivität. Jedoch wurde in den Linien HROC183 T0 M2 (2,2-fach nach 72 h) und HROC217 T1 M2 (1,9-fach nach 48 h) ein höheres statistisch signifikantes Induktionspotential festgestellt als in Caco-2 (1,8-fach nach 48 h). HROC80 T1 M1 zeigte ein mit Caco-2 vergleichbares Induktionspotential, jedoch ohne statistische Signifikanz.

Insgesamt führte die Behandlung mit den CYP3A4-Substraten in den Linien HROC80 T1 M1, HROC183 T0 M2, HROC217 T1 M2 und Caco-2 einzig zu einer Induktion der CYP3A4-Aktivität. Ausschließlich inhibitorische Effekte konnten hingegen in den Linien HROC43 und HROC60 beobachtet werden.

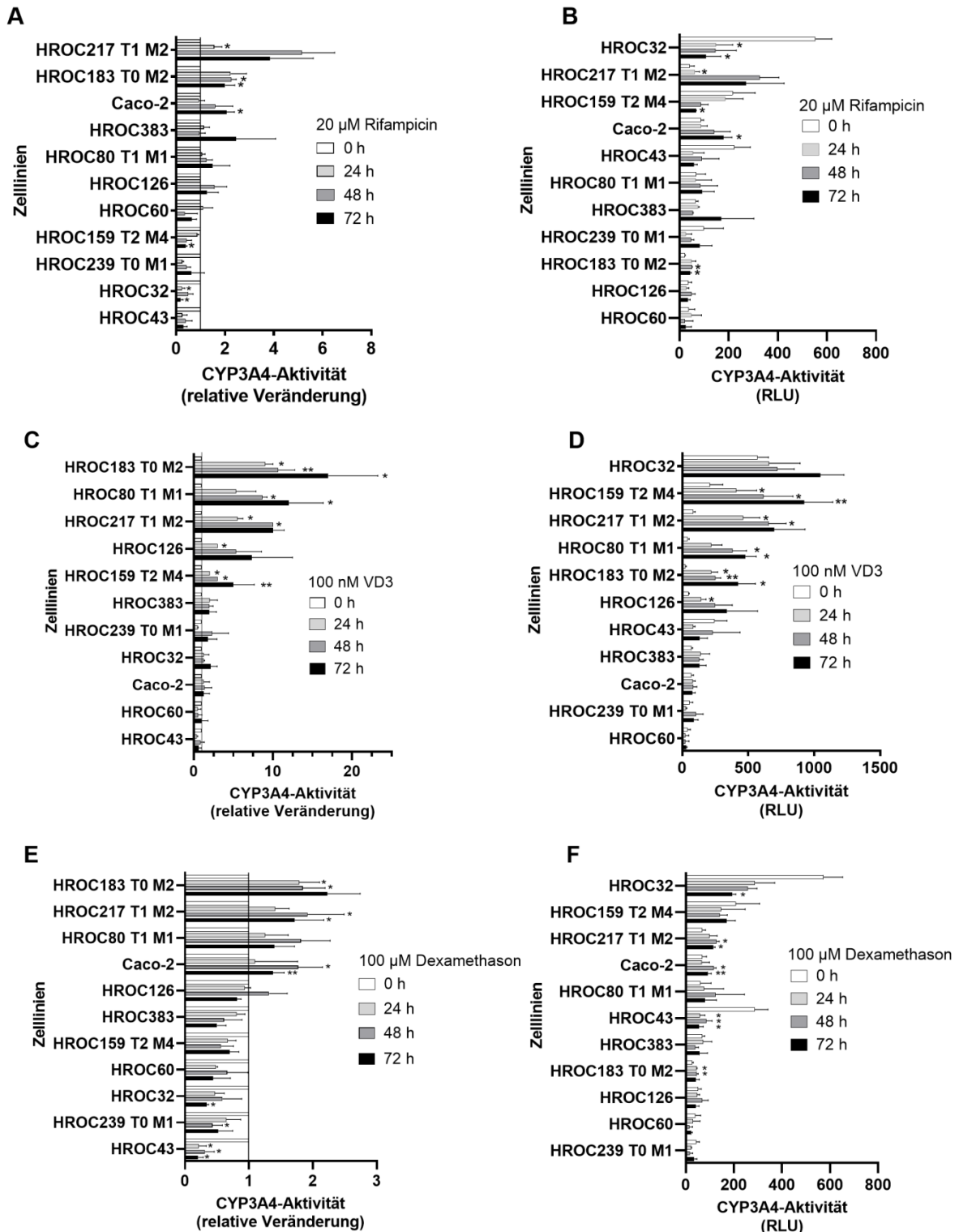


Abbildung 23: Veränderung der CYP3A4-Aktivität in den HROC-Zelllinien und Caco-2 nach Behandlung mit CYP3A4-Substraten. Zur Untersuchung der rezeptorvermittelten CYP3A4-Induktion und -inhibition wurden die Zellen für 72 h mit 20 μM Rifampicin (A, B), 100 nM VD3 (C, D) und 100 μM Dexamethason (E, F), die unbehandelten Kontrollen mit 0,1 % DMSO (Rifampicin und Dexamethason) und 0,1 % Ethanol (VD3) in DMEM/F12 (10 % FKS) behandelt. Die CYP3A4-Aktivität wurde nach 24 h, 48 h und 72 h Inkubation mithilfe des CYP3A4/Luciferin-IPA P450-Glo™ Assay ermittelt. A, C, E) Relative Veränderung der CYP3A4-Aktivität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (auf eins gesetzt), absteigend sortiert nach Induktionspotential. B, D, F) Veränderung der CYP3A4-Aktivität, angegeben in RLU. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD, $n = 2-3$. Die statistische Auswertung erfolgte durch den gepaarten zweiseitigen t -Test (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$). CYP3A4: Cytochrom P450 3A4, RLU: Relative Lichteinheit, VD3: 1,25-dihydroxyvitamin D3.

Um Zusammenhänge zwischen der PXR-, VDR- und GR-vermittelten Veränderung der CYP3A4-Aktivität in den HROC-Zelllinien und der Caco-2 zu untersuchen, wurde der Korrelationskoeffizient nach Spearman berechnet. Dabei wurde festgestellt, dass die relative Veränderung der CYP3A4-Aktivität nach Behandlung mit Rifampicin, VD3 und Dexamethason zueinander korrelierte (Abbildung 24). Die stärkste Korrelation wurde zwischen der PXR- und GR-vermittelten Veränderung der CYP3A4-Aktivität festgestellt ($r = 0,93$, $p = 0,001$). Eine starke Korrelation konnte ebenso für die VDR- und GR-vermittelte Veränderung der CYP3A4-Aktivität beobachtet werden ($r = 0,78$, $p = 0,006$). Die Korrelation zwischen PXR- und VD3-vermittelter Veränderung der CYP3A4-Aktivität war hingegen mäßig positiv ($r = 0,62$, $p = 0,048$).

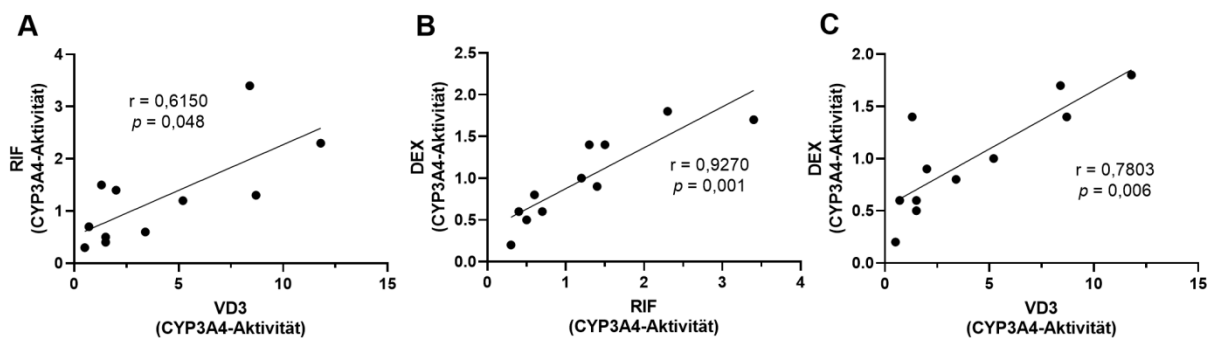


Abbildung 24: Spearman-Korrelation zwischen Veränderungen der CYP3A4-Aktivität in den HROC-Zelllinien und Caco-2 nach Behandlung mit spezifischen Substraten. Die Graphen zeigen relative Veränderungen der CYP3A4-Aktivität und signifikante Korrelationen zwischen der Behandlung mit A) RIF und VD3, B) RIF und DEX und C) VD3 und DEX. $n = 11$, r = Korrelationskoeffizient. CYP: Cytochrom P450, DEX: Dexamethason, RIF: Rifampicin, VD3: 1,25-dihydroxyvitamin D3.

4.6 Einfluss der Kulturzeit auf die Gen- und Proteinexpression intestinaler Transporter und nukleärer Rezeptoren

4.6.1 Genexpression von Transportern, Enzymen und nukleärer Rezeptoren im Vergleich zu humanem Dünndarm

Im Folgenden wurde untersucht, wie sich die mRNA-Expressionslevel der intestinalen Transporter *SLCO2B1*, *SLC2A2*, *UGT1A6*, *ABCB1* und *ABCG2* sowie der nukleären Rezeptoren *NR1I2* und *NR1I1* im Verlauf der Kulturzeit verändern. Die relative Veränderung der Expressionslevel nach zehn Tagen postkonfluenten HROC-Zellen im Vergleich zu Caco-2 und humanem Dünndarm ist in Abbildung 25 dargestellt. Insgesamt zeigte sich ein konfluenzabhängiger Anstieg der *NR1I2*-, *NR1I1*-, *SLCO2B1*-, *SLC2A2*-, *UGT1A6*- und *ABCB1* mRNA-Expression in HROC60, HROC80 T1 M1 und HROC183 T0 M2, wobei für HROC60 nur leichte Effekte beobachtet wurden. Mit Ausnahme der *SLC2A2*-Expression konnte in HROC217 T1 M2 ebenso ein konfluenzabhängiger Anstieg verzeichnet werden. Die relativen Genexpressionslevel von *NR1I1* (1,1-fach), *SLCO2B1* (0,8-fach) und *ABCG2* (0,7-fach) waren in HROC217 T1 M2 nach zehntägiger Konfluenz am ehesten mit der Dün-

darmexpression zu vergleichen, wobei *NR1I2* (5,2-fach), *ABCB1* (3,6-fach) und *UGT1A6* (1,6-fach) überexprimiert vorlagen. In HROC43 waren geringere konfluenzabhängige Expressionsunterschiede zu verzeichnen, die Expressionslevel waren insgesamt jedoch mit normalem Dünndarm vergleichbar. Nach zehntägiger Konfluenz zeigte sich in HROC43 zwar eine dem Dünndarm ähnliche Expression von *NR1I1* (0,5-fach), dennoch lagen *NR1I1*, *SLCO2B1*, *UGT1A6* und *ABCG2* in der Kontrollgruppe höher exprimiert vor, als im postkonfluenten Stadium. *ABCB1* (1,2-fach) war unter beiden Bedingungen unverändert exprimiert.

Die Expressionsprofile von HROC183 T0 M2 und HROC80 T1 M1 zeigten auffällig vergleichbare Muster. Diese waren beiderseits gekennzeichnet durch eine Überexpression der *NR1I2* mRNA (73-fach und 52-fach) nach zehntägiger Postkonfluenz und wiesen mit Ausnahme von *NR1I2* und *ABCG2* Gemeinsamkeiten mit Caco-2 auf.

Deutliche Abweichungen von der Expression normalen Dünndarms zeigte die *SLCO2B1*-Expression in Caco-2 (36-fach) sowie die *NR1I1*-Expression in HROC126 (30-fach) und HROC183 T0 M2 (10-fach) nach zehntägiger Konfluenz. Auffällig war zudem eine mangelhafte *UGT1A6*-Expression in HROC383, eine schwache *UGT1A6*-Expression konnte dagegen für HROC60, HROC126 und HROC159 T2 M4 nachgewiesen werden. *ABCG2* lag in HROC183 T0 M2 und HROC159 T2 M4 nach zehntägiger Postkonfluenz schwach exprimiert vor, während HROC32, HROC126 und Caco-2 einen Mangel an *ABCG2* mRNA in beiden Konfluenzbedingungen aufwiesen. Die insgesamt schwächsten konfluenzabhängigen Effekte wurden in HROC60 und HROC383 beobachtet. In diesen Linien lagen die Genexpressionslevel deutlich unter denen des humanen Dünndarms.

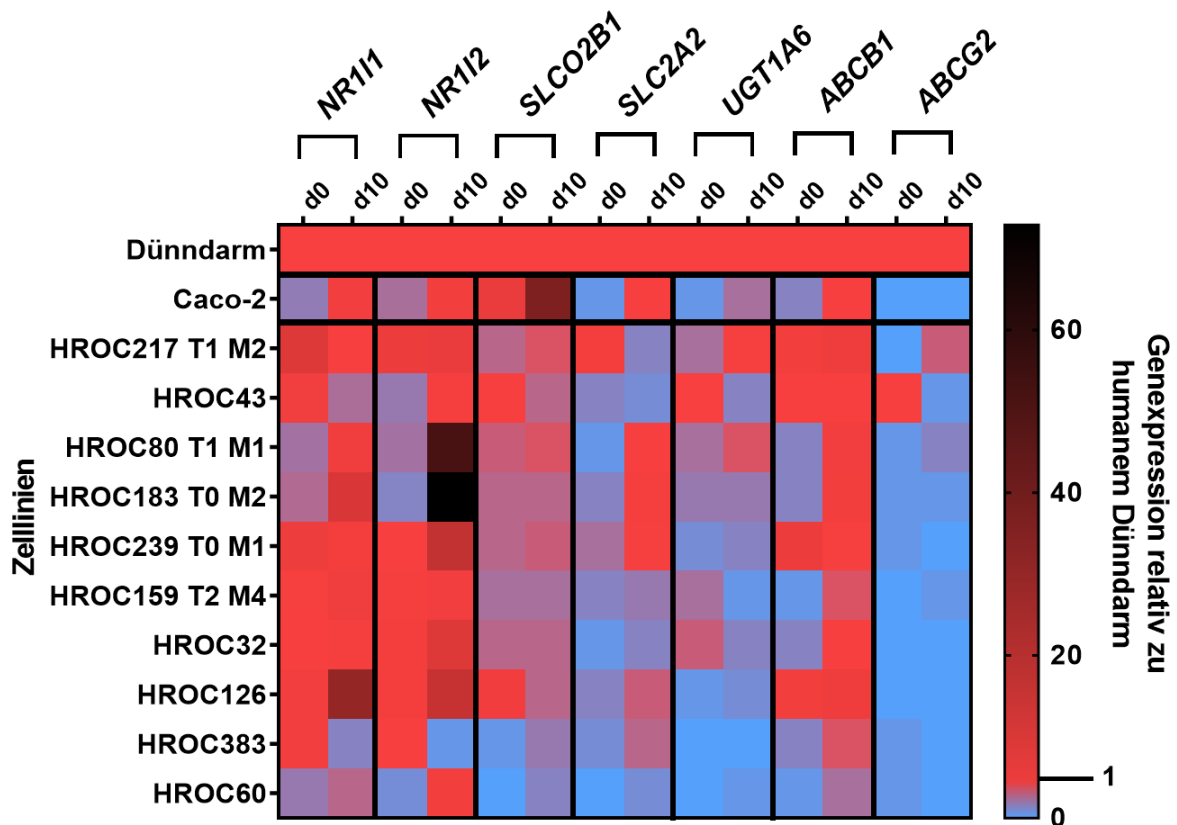


Abbildung 25: Genexpression klinisch relevanter Transporter und nukleärer Rezeptoren in Abhängigkeit von der Kulturzeit in den HROC-Zelllinien und Caco-2 im Vergleich zu humanem Dünndarm. Die Zellen wurden bis zum Erreichen einer 100%igen Konfluenz (d0) und zehn Tage nach Erreichen einer 100%igen Konfluenz (d10) in 6-Well-Zellkulturplatten kultiviert. Nach der Isolation der Gesamt-RNA erfolgte die mRNA-Quantifizierung durch Real-time PCR. Alle Ct-Werte wurden auf GAPDH normalisiert und die relative Veränderung der Genexpression im Vergleich zu Caco-2 (schwarzer Rahmen) und humanem Dünndarm mithilfe der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode ermittelt. Das Genexpressionslevel des humanen Dünndarms entspricht eins (rot). Dargestellt ist der Mittelwert, $n = 2-3$. ABC: ATP-abhängige Efflux-Transporter, NR: nukleäre Rezeptoren, SLC: *Solute Carrier*-Transporter, UGT: UDP-Glucuronosyltransferase.

Die Bestimmung der Genexpression relevanter Transporter und nukleärer Rezeptoren war Hauptbestandteil der Charakterisierung des Zellpanels. Um die simultane Expression relevanter Gene in Hinblick auf funktionelle Gen-Gen-Interaktionen in den einzelnen Linien zu prüfen, wurde im Anschluss der Korrelationskoeffizient nach Spearman berechnet. Die Ergebnisse der Analyse sind in Abbildung 26 dargestellt. Hierbei zeigte sich, dass die relative Veränderung der Genexpression einzelner, intestinaler Transporter und nukleärer Rezeptoren zueinander korrelierte. Die insgesamt stärkste Korrelation wurde hierbei zwischen der Expression von *NR111* und *SLC2A2* vor Erreichen der zehntägigen Konfluenz festgestellt ($r = 0,86$, $p = 0,001$). Eine starke Korrelation konnte in der Kontrollgruppe ebenso zwischen der *ABCB1*- und *NR111*-Expression ($r = 0,75$, $p = 0,009$) sowie zwischen der *ABCB1*- und *SLC2A2*-Expression ($r = 0,69$, $p = 0,021$) verzeichnet werden. Eine höhere Zahl signifikanter Korrelationen wurde hingegen nach zehntägiger Postkonfluenz beobachtet. Dabei zeigte sich eine Korrelation von *NR112* mit *NR111* ($r = 0,71$, $p = 0,018$), *SLC2A2* ($r = 0,61$, $p =$

0,049) sowie *ABCB1* ($r = 0,66$, $p = 0,03$). Die Expression von *ABCB1* korrelierte mit *NR112* ($r = 0,66$, $p = 0,03$), *SLCO2B1* ($r = 0,65$, $p = 0,035$) und *UGT1A6* ($r = 0,65$, $p = 0,032$). Zudem konnte eine Korrelation zwischen der *NR111*- und *SLC2A2*-Expression ($r = 0,63$, $p = 0,043$) festgestellt werden.

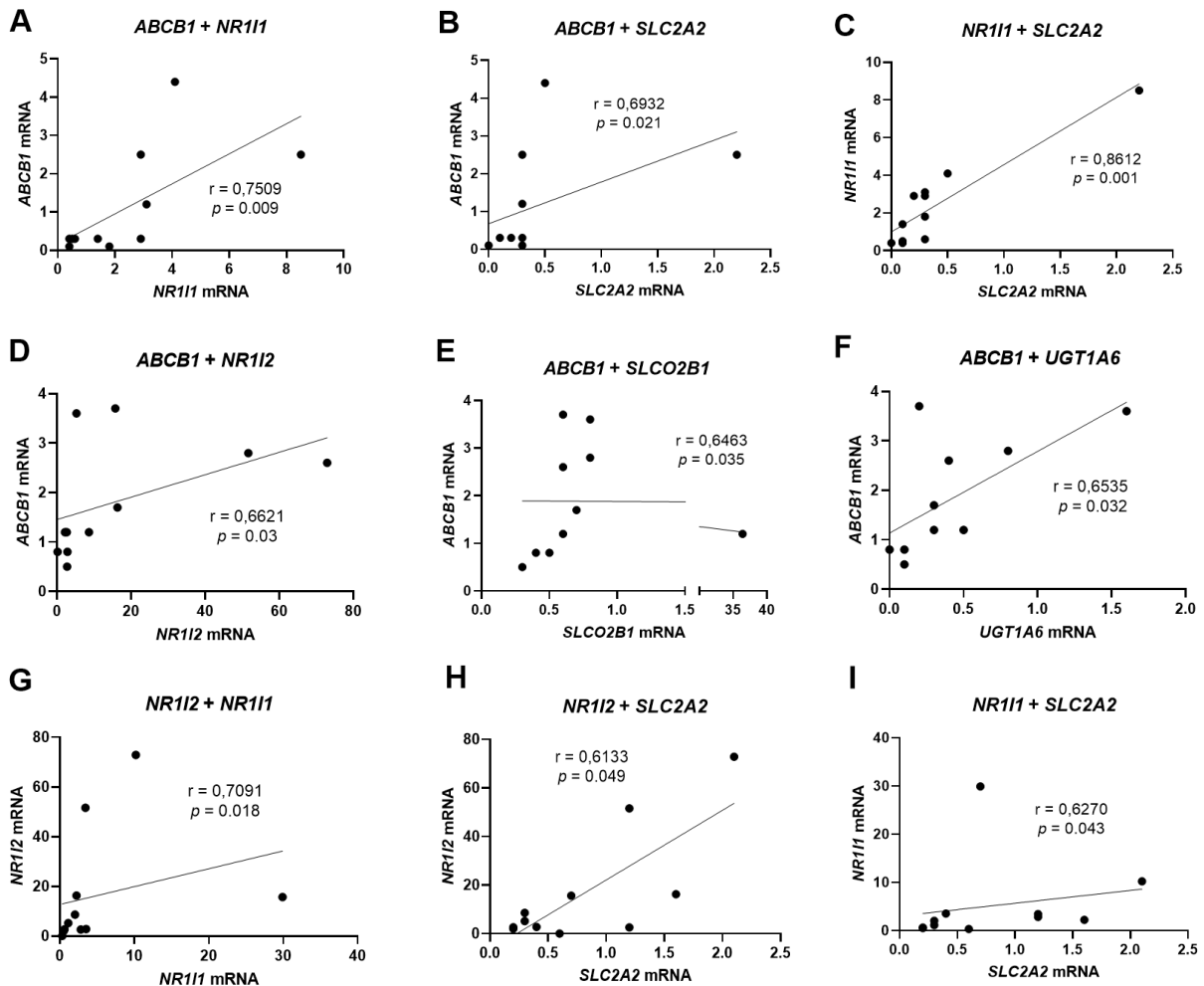


Abbildung 26: Spearman-Korrelation zwischen der Veränderung der Genexpression in den HROC-Zelllinien und Caco-2 in Abhängigkeit von der Kulturzeit im Vergleich zu humanem Dünndarm. Die Graphen zeigen signifikante Korrelationen zwischen der relativen Veränderung der Genexpression intestinaler Transporter und nukleärer Rezeptoren bei Erreichen der Konfluenz (A-C) und nach zehntägiger Postkonfluenz (D-I) im Vergleich zu humanem Dünndarm. $n = 11$, r = Korrelationskoeffizient.

4.6.2 Proteinexpression von Transportern im Vergleich zu humanem Jejunum

Im weiteren Verlauf wurde die Proteinexpression der Transporter PEPT1, OATP2B1, P-gp und BCRP quantifiziert und mit den Proteinlevel in humanem Jejunum verglichen. Die Ergebnisse der Analysen sind in Abbildung 27 dargestellt. Insgesamt konnte in allen Linien ein stark signifikanter Anstieg der PEPT1-Proteinexpression nach zehntägiger Postkonfluenz verzeichnet werden ($p = 0,0004$). Dabei wurden im Vergleich zu humanem Jejunum in HROC217 T1 M2 (3,1-fach), HROC60 (2,9-fach), HROC80 T1 M1 (2,9-fach) und HROC32 (2,8-fach) höhere PEPT1-Proteinlevel gemessen. In den Linien HROC159 T2 M4 (1-fach),

HROC383 (1-fach), HROC126 (0,8-fach) und HROC43 (0,6-fach) waren die Messwerte am ehesten mit humanem Jejunum vergleichbar. Die geringste PEPT1-Proteinexpression wurde für Caco-2 erfasst (0,1-fach).

Für OATP2B1, P-gp und BCRP konnte kein signifikanter Anstieg der Proteinexpression in Abhängigkeit von der Kulturzeit festgestellt werden. So wurden in HROC60 und HROC383 im Vergleich zur Kontrollgruppe höhere Proteinlevel für OATP2B1 und P-gp, in HROC383 zusätzlich für BCRP erfasst. Deutlich höhere Proteinlevel von OATP2B1 im Vergleich zum Jejunum wurden in Caco-2 (9-fach) nach zehntägiger Postkonfluenz detektiert. Höhere Messwerte konnten ebenso für HROC80 T1 M1 (3-fach), HROC32 (1,9-fach) und HROC159 T2 M4 (1,8-fach) erfasst werden. In HROC43 (1,2-fach), HROC183 T0 M2 (1,4-fach) und HROC239 T0 M1 (0,5-fach) war die OATP2B1-Proteinexpression hingegen am ehesten mit dem Jejunum vergleichbar.

Die Proteinlevel von P-gp lagen nach Erreichen der Postkonfluenz in HROC159 T2 M4 (4,2-fach), HROC126 (3,2-fach), HROC183 T0 M2 (1,9-fach) und HROC80 T1 M1 (1,8-fach) höher vor, als in basalem Zustand. In den Linien HROC239 T0 M1 (0,7-fach), HROC217 T1 M2 (0,4-fach), HROC43 (1,8-fach) und HROC80 T1 M1 (1,8-fach) konnten mit dem Jejunum vergleichbare Messwerte festgestellt werden. In Caco-2 (0,3-fach) und HROC32 (0,2-fach) lag eine schwache Expression vor, in HROC60 und HROC383 war hingegen keine P-gp-Proteinexpression nach zehntägiger Postkonfluenz zu verzeichnen.

Die höchste Proteinexpression für BCRP wurde für HROC43 (2,1-fach), HROC183 T0 M2 (0,2-fach) und Caco-2 (0,2-fach) nach zehntägiger Postkonfluenz erfasst. In den übrigen Linien konnte BCRP nicht detektiert werden. Jedoch zeigten HROC217 T1 M2 (0,5-fach), HROC383 (0,5-fach) und HROC239 T0 M1 (0,2-fach) in der Kontrollgruppe eine höhere Jejunum-ähnliche BCRP-Proteinexpression.

Zusammenfassend wurden in HROC43, HROC183 T0 M2, HROC217 T1 M2 und HROC239 T0 M1 höhere Proteinlevel für PEPT1, OATP2B1, P-gp und BCRP detektiert als in Caco-2. HROC43 zeigte hierbei die größte Vergleichbarkeit der Transporter mit humanem Jejunum.

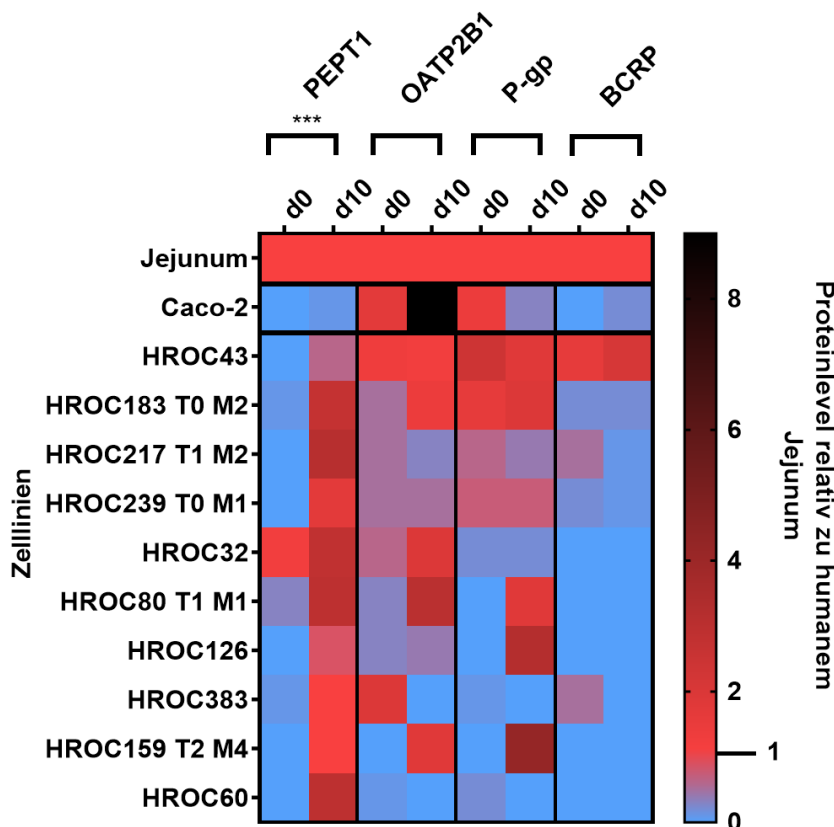


Abbildung 27: Zeitabhängige Proteinexpression von Transportern in den HROC-Zelllinien und Caco-2 im Vergleich zu humanem Jejunum. Die Zellen wurden bis zum Erreichen einer 100%igen Konfluenz (d0) und zehn Tage nach Erreichen einer 100%igen Konfluenz (d10) in 6-Well-Zellkulturplatten kultiviert. Die Quantifizierung der Proteinexpression erfolgte durch LC-MS/MS. Dargestellt ist die Veränderung der Proteinexpression relativ zu humanem Jejunum, das Expressionslevel des Jejunum entspricht eins (rot). Dargestellt ist der Mittelwert, $n = 2-3$. Die statistische Auswertung erfolgte durch den gepaarten zweiseitigen t -Test ($*** p < 0,001$). BCRP: *Breast Cancer Resistance Protein*, LC-MS/MS: Flüssigkeitschromatografie-Massenspektrometrie/Massenspektrometrie, OATP2B1: Organo-Anion-Transporter 1, PEPT1: Peptidtransporter 1, P-gp: Permeabilitätsglykoprotein.

4.7 Einfluss auf die Expression von Transportern, Enzymen und nukleären Rezeptoren nach Behandlung mit Rifampicin und Vitamin D3

Im letzten Teil wurde die Veränderung der Genexpression von Phase II-III-Enzymen (*SLCO2B1*, *UGT1A6*, *ABCB1* und *ABCG2*) und den Rezeptorgenen *NR1I2* und *NR1I1* in den HROC-Zelllinien und der Caco-2 unter Behandlung mit den Induktoren Rifampicin und VD3 untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 28 dargestellt. Insgesamt wurde eine hohe Variabilität bei der Regulierung der mRNA als Folge der Arzneimittelreaktion festgestellt. So führte die Behandlung mit Rifampicin und VD3 sowohl zu induktiven als auch zu inhibitorischen Effekten auf die mRNA-Expression der untersuchten Phase II-III-Enzyme.

Im Vergleich zu Caco-2 wurden in sechs HROC-Zelllinien stärkere Effekte auf die mRNA der Efflux-Transporter *ABCB1* und *ABCG2* beobachtet. Dies zeigte sich zum einen durch eine stärkere Induktion der *ABCB1* mRNA in sieben HROC-Zelllinien als in Caco-2 (1,4-fach nach 72 h) nach Behandlung mit VD3. Die stärksten Effekte wurden hierbei für HROC43 (6,5-fach

nach 72 h) und HROC60 (3,8-fach nach 72 h) nachgewiesen. Zum anderen führte die Behandlung mit Rifampicin in fünf HROC-Zelllinien zu einer höheren Induktion von *ABCG2* im Vergleich zu Caco-2 (1,4-fach nach 48 h). Darunter zeigten HROC32 (4,2-fach nach 72 h), HROC43 (3,3-fach nach 72 h) und HROC60 (3,2-fach nach 72 h) die stärksten Effekte. Unter VD3-Behandlung konnten zudem in HROC239 T0 M1 (3,5-fach nach 24 h), HROC32 (2,3-fach nach 48 h) und HROC60 (2,2-fach nach 72 h) stärkere Induktionseffekte als in Caco-2 (1,7-fach nach 48 h) festgestellt werden. Rifampicin und VD3 führten insgesamt in HROC183 T0 M2 und HROC217 T1 M2 zu stärkeren induktiven Effekten sowohl auf die CYP3A4-Aktivität als auch auf die *ABCB1*-Expression im Vergleich zu Caco-2. HROC60 zeigte unter VD3 mit Caco-2 vergleichbare Induktionseffekte auf die Expression von *NR1I2* und *UGT1A6*, jedoch stärkere Effekte auf *ABCB1* (3,8-fach nach 72 h) und *SLCO2B1* (3,9-fach nach 72 h). Die insgesamt höchste Rifampicin-vermittelte Regulation sowohl auf die CYP3A4-Aktivität als auch auf die Transporter-Expression wurde in HROC43 festgestellt. So konnte eine Herunterregulation für *SLCO2B1* und eine Hochregulation für *UGT1A6*, *ABCB1*, *ABCG2* und *NR1I2* beobachtet werden. Auffällig war eine Herunterregulation multipler Enzyme und Transporter in den Linien HROC126 und HROC159 T2 M4. In HROC159 T2 M4 führte die Behandlung mit Rifampicin sowohl zu einer Herunterregulation der CYP3A4-Aktivität als auch der Expression von *UGT1A6* (0,2-fach nach 24 h), *ABCB1* (0,8-fach nach 24, 48 und 72 h) und *NR1I2* (0,5-fach nach 24 h). Hingegen war unter VD3 eine Hochregulation der CYP3A4-Aktivität, jedoch eine Herunterregulation der *SLCO2B1*-, *UGT1A6*-, *ABCB1*-, *ABCG2*-, *NR1I2*- und *NR1I1*-Expression zu verzeichnen. VD3 führte zu induktiven Effekten auf die *NR1I1*-Expression in den Linien HROC32 (2,4-fach nach 48 h), HROC43 (2,1-fach nach 72 h), HROC60 (2,6-fach nach 72 h) und HROC239 T0 M1 (2,1-fach nach 24 h), die mit Caco-2 (3,2-fach nach 72 h) vergleichbar waren. Eine Induktion des Rezeptorgens *NR1I2* durch VD3 konnte in HROC43 (3,9-fach nach 72 h), HROC239 T0 M1 (3,5-fach nach 72 h), Caco-2 (3-fach nach 72 h), HROC217 T1 M2 (2,3-fach nach 48 h) und HROC383 (1,7-fach nach 72 h) beobachtet werden. In HROC383 war als einziger signifikanter Effekt eine Herunterregulation von *NR1I1* durch VD3 (0,6-fach nach 72 h) zu verzeichnen. Diese Linie wies schwache regulative Effekte durch Rifampicin und VD3 auf und war damit insgesamt mit Caco-2 vergleichbar. Im Gegensatz zu HROC383 führte Rifampicin in Caco-2 jedoch zu einer starken Hochregulation der *NR1I2*-Expression (16,6-fach nach 48 h).

Zusammenfassend zeigten die Linien HROC43, HROC60, HROC80 T1 M1, HROC183 T0 M2 und HROC217 T1 M2 eine höhere Anzahl signifikanter regulativer Effekte durch Rifampicin und VD3 als Caco-2.

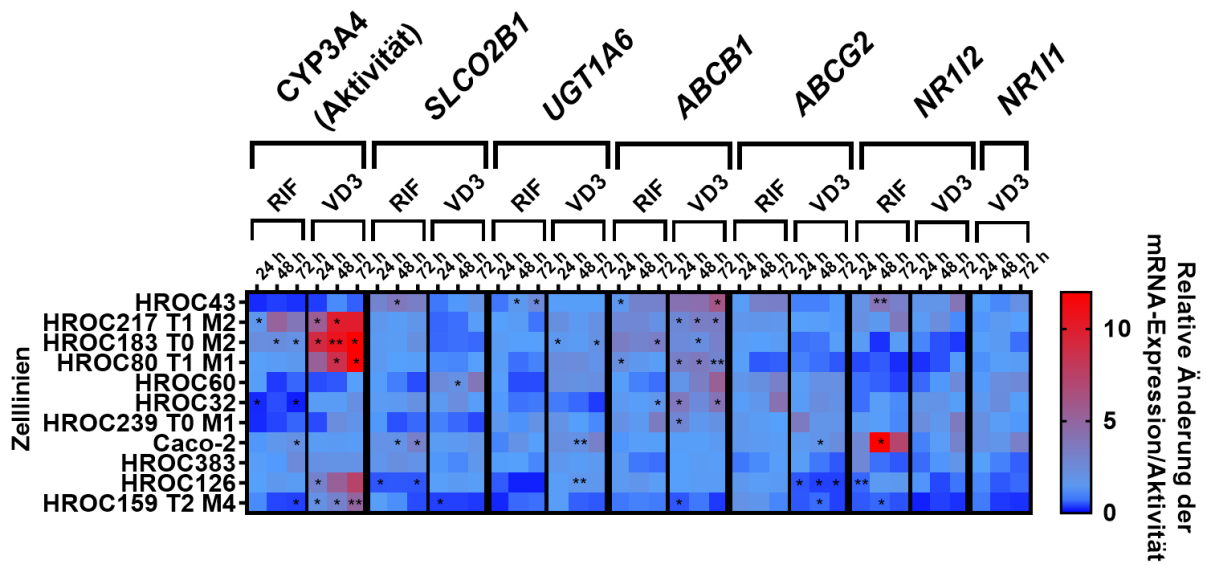


Abbildung 28: Veränderung der CYP3A4-Aktivität sowie Genexpression von Phase II-III-Enzymen nach Behandlung mit Rifampicin und Vitamin D3 in den HROC-Zelllinien und Caco-2. Die Zellen wurden in 6- und 96-Well-Zellkulturplatten kultiviert und bei Erreichen einer 100%igen Konfluenz für 72 h mit 20 μM RIF und 100 nM VD3, die unbehandelten Kontrollen mit 0,1 % DMSO (RIF) und 0,1 % Ethanol (VD3) behandelt. Nach der Isolation der Gesamt-RNA erfolgte die mRNA-Quantifizierung durch Real-time PCR. Alle Ct-Werte wurden auf GAPDH normalisiert und die relative Veränderung der Genexpression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (entspricht eins) mithilfe der $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ -Methode ermittelt. Für einen verbesserten Vergleich wurden die Ergebnisse zur Veränderung der CYP3A4-Aktivität zusätzlich mit aufgeführt. Dargestellt ist der Mittelwert, $n = 2-3$. Die statistische Auswertung erfolgte durch den gepaarten zweiseitigen t -Test (* $p < 0.01$, ** $p < 0.005$). ABC: ATP-abhängige Efflux-Transporter, CYP: Cytochrom P450, NR: nukleäre Rezeptoren, RIF: Rifampicin, SLC: *Solute Carrier*-Transporter, UGT: UDP-Glucuronosyltransferase, VD3: 1,25-dihydroxyvitamin D₃.

5 Diskussion

5.1 Hintergrund

Der Dünndarm stellt eine der wichtigsten Kontaktflächen zur Umwelt dar und ist an wichtigen physiologischen Funktionen wie der Absorption von Nährstoffen, Wasser und Vitaminen beteiligt. Gleichzeitig besitzt die Darmbarriere eine Schutzfunktion vor toxischen Xenobiotika und Pathogenen (Chelakkot et al. 2018; Gordon et al. 2015).

Die meisten Arzneimittel werden aufgrund der vereinfachten, sicheren, schmerzfreien und kostengünstigen Gabe, insbesondere bei Langzeitpatienten, oral verabreicht (Sastry et al. 2000; Jiang et al. 2022). Daher hat die Darmbarriere bei der oralen Verabreichung von Medikamenten zunehmend an Bedeutung gewonnen. So galt die Leber lange Zeit als Hauptorgan des First-Pass-Metabolismus (Lin et al. 1999). Mittlerweile werden 50 % der FDA-geprüften Medikamente zu oralen Arzneimitteln gezählt (FDA 2018). Nachdem die Substanzen nach oraler Einnahme den Magen passieren, werden sie aufgrund der hohen Resorptionsfläche und der erhöhten Permeabilität primär im Dünndarm resorbiert (Walton et al. 2016). Die orale Bioverfügbarkeit vieler wasserlöslicher und makromolekularer Arzneimittel wird jedoch durch ungenügende physikochemische Eigenschaften wie schlechter Löslichkeit oder geringer Permeabilität limitiert. Weitere Faktoren wie pH-Wert und schützende aktive Enzymbarrieren aus z.B. Mucinen können zusätzlich für eine geringere Wirksamkeit sorgen und beeinflussen somit den therapeutischen Effekt (Tekade 2018). Vor allem Protein- und Peptidwirkstoffe besitzen aufgrund ihres hohen Molekulargewichtes, instabilem Verhalten im Verdauungssaft oder geringer Membranpenetration eine orale Bioverfügbarkeit von weniger als 1 % (Zhu et al. 2021). Noch immer scheitern daher 90 % neuartiger Medikamente in der Entwicklung (Sun et al. 2022). Diese Hürden machen es erforderlich, die Parameter ADME an geeigneten *in vitro* Modellen zu untersuchen. Zunehmend wurden daher *in vitro* Modelle zumeist in Verbindung mit dem Goldstandard Caco-2 zur Untersuchung von Wirkstoff- und Nährstofftransportvorgängen durch das Dünndarmepithel entwickelt (Wikman-Larhed und Artursson 1995; Walter et al. 1996; Artursson et al. 2001). Die Caco-2-Zelllinie zählt zu den am meisten verwendeten Modellen zur Untersuchung von Absorptions- und Transportprozessen (Meunier et al. 1995; Ingels und Augustijns 2003). Dieses Modell ist jedoch in seiner Anwendung und Vorhersagekraft der ADME-Parameter in verschiedenen Eigenschaften limitiert. Grundsätzlich sind die *in vitro* Eigenschaften der Caco-2 nicht mit der *in vivo* Situation der Darmbarriere vergleichbar. So ist der Caco-2-Monolayer durch eine geringe parazelluläre Permeabilität charakterisiert, wodurch aufgrund einer fehlenden Mucinschicht hoch diffusionsfähige kleine Moleküle zu den Mikrovilli vereinfacht zugeführt werden (Artursson et al. 2001). Zudem wurde vielfach gezeigt, dass sich die Genexpression bestimmter Transporter erheblich von der

in humanem Dünndarm unterscheidet (Hilgendorf et al. 2007; Brück et al. 2017; Nakamura et al. 2002; Taipalensuu et al. 2001). Um die Limitationen des Caco-2-Modells zu überwinden, wurde ausgehend von einer hohen Anzahl neu etablierter KRK-Zelllinien der BioBank Rostock untersucht, ob eine Untergruppe dieser HROC-Linien eine im Vergleich zur Caco-2 verbesserte Ähnlichkeit zur *in vivo* Darmbarriere aufzeigt.

5.2 Charakterisierung der Zelllinien

Ein entscheidendes Kriterium bei der Auswahl geeigneter *in vitro* Modelle ist die Anwendbarkeit von Standard *in vitro* Assays wie dem *wound healing assay*. Diese Methode ist einfach und kostengünstig durchzuführen und findet vielfach Anwendung bei der Untersuchung zweidimensionaler Zellmigration und epithelialer Wundheilung. In der pharmazeutischen Industrie hat die Untersuchung des therapeutischen Einflusses auf die Zellmigration durch Anwendung von *in vitro* Assays in den letzten Jahren an Aufmerksamkeit gewonnen (Rodriguez et al. 2005; Nikolić et al. 2006; Gandalovičová et al. 2017). Die Wundheilung des Dünndarms beträgt fünf bis zehn $\mu\text{m}/\text{h}$ und ist abhängig von der Proliferation, der Differenzierung an die Wunde angrenzender IECs sowie regulatoriver Peptide wie Wachstumsfaktoren und Zytokine (Heath 1996; Iizuka und Konno 2011). In dieser Arbeit konnten durch Anwendung des *wound healing assay* Migrationsraten im Bereich von 0,7 $\mu\text{m}/\text{h}$ bis 7,7 $\mu\text{m}/\text{h}$ ermittelt werden. Dies zeigte innerhalb des untersuchten HROC-Zellpanels zunächst die Fähigkeit zur Zellmigration. Mit Zellmigrationsraten von 6,2 $\mu\text{m}/\text{h}$ in HROC60 waren diese am ehesten mit Caco-2 (7,7 $\mu\text{m}/\text{h}$) und der intestinalen Wundschließungszeit vergleichbar (Parker et al. 2017; Heath 1996). Die Migrationsraten der übrigen Linien liegen somit unter denen des Dünndarms *in vivo*. Ein Vergleich zwischen den *in vitro* Daten und der *in vivo* Situation ist jedoch aufgrund der gesteigerten Tumorigenität der Tumorzellen erschwert (Pastor et al. 2010). Ebenso könnten höhere Migrationsraten auf den Mutationsstatus oder Mikrosatelliteninstabilität zurückzuführen sein, wodurch ein direkter Vergleich mit gesundem intestinale Gewebe erschwert wird.

Zusätzlich zur Simulation epithelialer Wundheilung sollte die Nutzung der HROC-Zellmodelle für HTS gegeben sein. Aus diesem Grund wurden zusätzlich die Proliferationszeiten der Zelllinien erfasst, um das Handling der Kulturen und die Anwendbarkeit für HTS, begünstigt durch eine schnelle Proliferationszeit, zu gewährleisten. Die untersuchten HROC-Zelllinien wiesen insgesamt Verdopplungszeiten von 43,9 h bis 68,4 h auf. Das beschleunigte Migrationsverhalten in Caco-2 und in HROC60 spiegelte sich nicht in der Wachstumsgeschwindigkeit wider. Für Caco-2 wurde in dieser Untersuchung eine Verdopplungszeit von 52,1 h bestimmt. Dies ist mit der für Caco-2 bekannten Verdopplungszeit von 51,4 h vergleichbar. Im Gegensatz dazu liegen die Verdopplungszeiten weiterer etablierter, häufig für *in vitro* Versuche genutzter KRK-Zelllinien wie T-84 bei 33,9 h und für HT-29 bei 36,9 h (Bazzocco et al.

2015). Eine damit vergleichbare Verdopplungszeit wurde nur durch HROC183 T0 M2 mit einer Verdopplungszeit von 43,9 h erreicht. Ausgehend von den erhobenen Daten zu den Proliferationszeiten konnte festgestellt werden, dass die Migrationsgeschwindigkeit nicht zwangsläufig mit den ermittelten Verdopplungszeiten korreliert.

Die Phänotypisierung der Oberflächenstruktur in den HROC-Zelllinien ergab insgesamt eine erhöhte Expression sowohl von B- und T-Zell-, als auch Adhäsionsmarkern in den Linien HROC60 und HROC383. Auffällig war auch eine im Vergleich höhere Expression von CD54 in diesen Linien. CD54 ist in einer Vielzahl von Zelltypen exprimiert und hat eine wichtige kostimulierende Funktion bei der T-Zell-Aktivierung. Eine Hochregulierung von CD54 könnte daher als verstärkte Antwort auf Entzündungsmediatoren wie proinflammatorische Zytokine, Hormone oder Zellstress zu deuten sein (Roebuck und Finnegan 1999). Auffällig war zudem eine schwache, im Vergleich zu den übrigen Linien leicht erhöhte Expression von CD102 in HROC43 und HROC60. CD102 ist für die Vermittlung adhäsiver Interaktionen für Antigen-spezifische Immunabwehr, natürlicher Killerzell-vermittelter Abwehr oder Lymphozyten-Rezirkulation relevant. Die Expression und Funktion in Tumorzellen ist bislang jedoch nicht geklärt (Sasaki et al. 2016b). Dennoch könnten diese Linien geeignete Modelle, insbesondere zur Untersuchung der Regulierung des Lymphozyten-Wanderungsstroms durch die Darmwand von Bedeutung sein (Pabst und Rothkötter 1991). Hierzu müssten allerdings weitere Untersuchungen vorgenommen werden. Die Ergebnisse verdeutlichten ebenso eine starke Expression des etablierten epithelialen Zellmarkers CD326 (Baeuerle und Gires 2007). Die Expression des Markers lag bei den untersuchten Linien > 73 % und belegte damit den epithelialen Ursprung der Zelllinien. Dies konnte zusätzlich durch eine zu CD326 korrelierende Expression des Adhäsions- und Epithelmarkers CD29 belegt werden. Hingegen wurde für den Epithel- und Tumormarker CD66adecb ein insgesamt schwächeres und heterogen verteiltes Expressionsmuster festgestellt. Besonders auffällig war eine schwache Expression in HROC60 (1 %) und HROC383 (12 %). Alle Linien des untersuchten Zellpanels sind tumoralen Ursprungs und besitzen die Eigenschaft zum Erreichen einer 100%igen Konfluenz mit Fähigkeit zur Zellmigration. Die genaue Ursache für die starken Expressionsunterschiede von CD66adecb kann daher in dieser Untersuchung nicht geklärt werden. Zusätzlich relevant für die Charakterisierung intestinaler *in vitro* Modelle sind die Marker CD15, CD24, CD44 und CD58. Es gibt Hinweise, dass der Granulozyten-Marker CD15 in Paneth-Zellen exprimiert ist (Ariza et al. 1996). Eine erhöhte CD15-Expression in HROC32 (55 %), HROC239 T0 M1 (47 %), HROC217 T1 M2 (36 %), HROC43 (33 %) und HROC183 T0 M2 (27 %) könnte ein Hinweis auf Krypten-Stammzell-Eigenschaften dieser Linien sein. Darüber hinaus könnte CD15 auch durch fortgeschrittene Stadien der KRK in Zusammenhang stehen (Jang et al. 2013). CD24 und CD44 werden als Stammzellmarker beschrieben (Todaro et al. 2010), können jedoch auch als Indikator für Metastasierung dienen. Eine Expression von

CD44 könnte zudem auf gesteigertes Tumorstadium und antiapoptotische Effekte hindeuten (Keysar und Jimeno 2010; Lim 2005). Die gesteigerte Expression von CD24 und CD44 in den Linien HROC126 und HROC383 kann daher nicht eindeutig als Stammzell-Indikator dienen. Der Oberflächenmarker CD58 wird als Kostimulator und Leukozyten-Funktionsantigen beschrieben (Zhang et al. 2021). IECs besitzen innerhalb des Dünndarmepithels eine wichtige Funktion bei der Erkennung fremder Antigene. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass der Marker CD58 von polarisierten IECs im Bereich von T-Zell-Kontakten exprimiert wird (Framson et al. 1999). Eine hohe CD58-Expression in den HROC-Zelllinien könnte auch dadurch zu erklären sein, dass KRK-Zelllinien häufig CD58-positiv sind und eine erhöhte Tumorigenität aufweisen. Zudem wurde gezeigt, dass eine erhöhte CD58-Expression über Aktivierung des Wnt/ β -catenin-Signalweges zur gesteigerten Selbsterneuerung von KRK-Zellen beiträgt (Xu et al. 2015). Dies könnte im Hinblick auf die Bedeutung des Wnt-Signalweges für die Differenzierung in IECs in diesen Linien eine Rolle spielen (Sansom et al. 2004). Dieser Aspekt liefert daher zunächst Anhaltspunkte, die weitere Untersuchungen dieser Linien auf funktioneller Ebene beispielsweise durch Verwendung von Stammzellmarkern rechtfertigen.

Die umfangreiche Untersuchung zur Chemosensitivität gegenüber den klinisch relevanten Therapeutika 5-FU, Irinotecan und Oxaliplatin erbrachte deutliche Unterschiede innerhalb der 23 untersuchten HROC-Zelllinien. So zeigte HROC32 eine auffällig hohe, HROC60 hingegen eine geringere Sensitivität gegenüber den Therapeutika. Dies könnte zum einen durch die unterschiedlichen Wirkungsmechanismen der Therapeutika begründet werden. Zum anderen könnten derartige Unterschiede u.a. durch Mutationen, veränderten Influx- oder Effluxmechanismen, Verdopplungszeiten oder auch verzögertes Ansprechen beeinflusst werden (Blondy et al. 2020; Wang et al. 2022).

5.3 Epitheliale Barriereintegrität

Die Integrität einer Epithelschicht kann *in vitro* durch verschiedene Techniken qualitativ und quantitativ bewertet werden. Dazu zählt die Visualisierung komplexer Proteinnetzwerke der TJ mithilfe von Immunfluoreszenzfärbungen, die Messung der makromolekularen Permeabilität durch Verwendung von FITC-Dextranen und die Bestimmung des TEER nach Kultivierung der Zellen in semipermeablen Transwell-Membraneinsätzen (Srinivasan et al. 2015; Rezaee und Georas 2014).

In dieser Untersuchung erfüllten 32 von 49 HROC-Zelllinien durch Nachweis epithelialer Morphologie die Grundvoraussetzungen an intestinale Modelle. Die epitheliale Barriereintegrität wurde zunächst durch TEER-Messungen quantitativ bestimmt. Diese Methode gibt Auskunft über die Ausbildung eines dichten Netzwerkes aus TJ und konnte in zahlreichen Studien in konfluenten Caco-2-Monolayern belegt werden (Lopez-Escalera und

Wellejus 2022; Narai et al. 1997; Putt et al. 2017). Auf Grundlage der vielfach in unterschiedlichen Untersuchungen erhobenen TEER-Werte für intestinale Gewebe und Zellmodelle kann eine grundlegende Klassifizierung der TEER-Werte in drei Bereiche erfolgen. TEER-Werte von 50 bis 100 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ deuten hierbei auf ein poröses Epithel hin, wohingegen Bereiche von 300 bis 400 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ als mittelmäßig und Werte von etwa 2 000 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ als dicht gelten (Amidon et al. 1999). Caco-2-Zellen benötigen typischerweise 21 Tage Kulturzeit, um in einen dichten Monolayer zu differenzieren, der als Voraussetzung zur Durchführung bidirektionaler Transportversuche gilt (Hubatsch et al. 2007). In Anlehnung an etablierte Standardprotokolle zur Durchführung von TEER-Messungen bei Caco-2, erfolgten die TEER-Messungen in den HROC-Zelllinien ebenso über einen Zeitraum von 21 Tagen (Zhou et al. 2005; Zhao et al. 2023). Dabei konnte eine Zunahme der TEER-Werte in den HROC-Zelllinien und Caco-2 im zeitlichen Verlauf festgestellt werden. Die TEER-Maxima überschritten hierbei die Grenze von 300 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ und können somit als Nachweis für die Bildung einer funktionellen Barriere mit gut ausgebildeten TJ gedeutet werden (Srinivasan et al. 2015; Ghaffarian und Muro 2013).

In dieser Untersuchung wurden für Caco-2 in Transwell-Zellkultureinsätzen TEER-Werte von 419 bis 1 259 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ermittelt. In weiteren Studien werden TEER-Werte für Caco-2 im Bereich von 150 bis 400 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ sowie 1 400 bis 2 400 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ angegeben (Srinivasan et al. 2015; Hilgendorf et al. 2000). Die für Caco-2 erhobenen Daten liegen somit innerhalb des Bereiches der für Caco-2 bekannten TEER. Eine direkte Zuordnung entsprechend der Klassifizierung der TEER-Werte wird aufgrund fehlender Übereinstimmung zu anderen Studien jedoch erschwert. In dieser Arbeit wird daher ein TEER von 1 200 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ in Anlehnung an den für Caco-2 erhobenen Maximalwert als Indiz für die Ausbildung eines dichten Monolayers angesehen. Die Abweichungen der TEER-Werte könnten auf die Nutzung unterschiedlicher Messgeräte, Zellkultureinsätze, der Passage der Zellen oder die hohe Temperatursensitivität dieser Methode zurückzuführen sein (Srinivasan et al. 2015). Zusätzlich könnte diese Varianz auch durch unterschiedliche Caco-2-Klone oder Zellkulturprotokolle zu erklären sein (Yee 1997). Für Caco-2-Zellen wurde gezeigt, dass Veränderungen hinsichtlich des Differenzierungsgrades und der TEER-Werte Passagen-abhängig auftreten können. So konnten in Caco-2-Subklonen eine plattenepithelartigere Morphologie mit weniger stark ausgeprägten Zell-Zell-Kontakten sowie einem Abfall des TEER bei Zunahme der Passagen nachgewiesen werden (Jahn et al. 2011). Zudem ist aus verschiedenen Untersuchungen bekannt, dass Zusätze wie Hormone, Wachstumsfaktoren und weitere Metaboliten *in vivo* regulative Effekte auf die Differenzierung in IECs ausüben und somit Einfluss auf den TEER nehmen können (Souleimani und Asselin 1993; Basson et al. 1996; Gomez et al. 1995; Hardin et al. 1993). Dieser Aspekt konnte *in vitro* durch den Nachweis einer erhöhten Permeabilität in Caco-2 verifiziert werden (Gupta et al. 2013). Die zelllinienspezifischen TEER-

Maxima lagen insgesamt in einem Bereich von $812 \Omega \cdot \text{cm}^2$ (HROC383 an d15) bis $6\,066 \Omega \cdot \text{cm}^2$ (HROC60 an d17). Hiervon lagen drei der Linien unterhalb der für Caco-2 erfassten Maxima. Überraschend war der exorbitant hohe TEER in HROC60, der während fünfwöchiger Kultur auf einen Wert $> 11\,500 \Omega \cdot \text{cm}^2$ anstieg. Ein derart hoher TEER weicht deutlich von denen anderer KRK-Zelllinien ab und ist bisher von keiner weiteren Zelllinie kolonischen Ursprunges bekannt (Srinivasan et al. 2015). Für den menschlichen Dünndarm wird ein TEER von 12 bis $120 \Omega \cdot \text{cm}^2$ angegeben (Amidon et al. 1999; Ayehunie et al. 2018; Collett et al. 1996). Dies könnte durch eine höhere Anzahl und Größe von wassergefüllten Poren im Dünndarmepithel zu erklären sein (Artursson et al. 1993; Linnankoski et al. 2010). Insbesondere die Präsenz Mucin-sezernierender Becherzellen könnte potentiell zu niedrigeren TEER-Werten und somit zu einer verbesserten Simulation der physiologischen Parameter beitragen (Amidon et al. 1999). Der extrem hohe TEER in HROC60 könnte daher durch eine geringe Anzahl Mucin-sezernierender Becherzellen oder enteroendokriner Zellen zu erklären sein. So konnte in Untersuchungen durch Triple-Ko-Kultur mit Mucin-sezernierenden HT-29-Zellen und der B-Lymphozyten-Zelllinie Raji B eine gesteigerte Permeabilität der Caco-2-Monolayer durch Erhöhung der Zelldiversität erreicht werden (Antunes et al. 2013). Deutlich höhere TEER-Werte in den HROC-Zelllayern im Vergleich zu humanem Dünndarm deuten somit auf eine schwächere Porosität im Vergleich zu intestinalem Gewebe hin. Ein direkter Vergleich zwischen den in menschlichem Dünndarmgewebe und konfluenten 2D-Zellkultur Layern erhobenen TEER-Werten ist jedoch schwierig. Zum einen fehlen weitere zuverlässige Angaben von TEER aus humanem Dünndarmgewebe *in vivo*. Zum anderen sind die TEER-Werte teilweise durch Nutzung unterschiedlicher Methoden wie der Ussing-Kammer erhoben worden. Dabei liegen die absoluten TEER-Werte, die per Ussing-Kammer erhoben werden, generell unterhalb der mit Voltohmmetern erfassten Messdaten (Hoffmann et al. 2021). Weiterhin fehlen ausführlichere Angaben zur Methodik bei der Erhebung der TEER-Werte aus humanem Dünndarmgewebe. Aufgrund der erschwerten Vergleichbarkeit von TEER-Werten aus unterschiedlichen Laboren wird die Bestimmung der parazellulären Permeabilität bestimmter Substanzen als genauere Grundlage für laborübergreifende Vergleiche angesehen (Yee 1997). Zusätzlich zur Erfassung des TEER erfolgte daher die Untersuchung der parazellulären Permeabilität. Bei zunehmender Kulturzeit konnte hierbei eine mit Caco-2 vergleichbare Abnahme der FITC-Dextran-Permeabilität beobachtet werden. Dies belegte zusätzlich zu den TEER die Ausbildung von dichten TJ-Netzwerken. Die Ergebnisse zeigen jedoch eine geringere Porosität in den untersuchten HROC-Linien, die ausgehend von der Referenz Caco-2 im Vergleich zum humanen Dünndarmepithel erhöht ist.

TJ sind in der Lage, durch Ausbildung einer epithelialen Barriere die parazelluläre Diffusion im Darmepithel zu beschränken (Anderson 2001). Nach der Aufnahme besonders hydrophiler Arzneimittel können diese aufgrund dieser Barriere nur erschwert vom dahinterliegenden

Gewebe absorbiert werden. TJ-Proteine bilden durch Membranproteine jedoch nicht nur eine Barriere, welche die parazelluläre Permeabilität beeinflusst, sondern sind in weitere funktionelle Gruppen eingeteilt. Somit sind sie über Signaltransduktion in weitere komplexe Vorgänge wie der Zellproliferation, aber auch der Teilung polarer Zellen in eine apikale und basolaterale Einheit involviert (Paris et al. 2008). Zwei Proteine, die am Aufbau des TJ-Netzwerkes eine Rolle spielen, sind ZO-1 und Occludin. Bei ZO-1 handelt es sich um ein Transmembranprotein, welches als Verbindungsprotein zwischen Aktinfilamenten, dem Cadherin-Catenin-Komplex und Occludin an der Abdichtung des parazellulären Raums beteiligt ist (Fanning et al. 1998; Itoh et al. 1997). Die Detektion von komplexen Netzwerken des TJ-Proteins ZO-1 deutet daher auf die Ausbildung weiterer TJ hin. Dies konnte durch eine mindestens mit humanem Dünndarm vergleichbare Genexpression von Occludin im postkonfluenten Stadium aller untersuchten Zelllinien bekräftigt werden. Diese Ergebnisse können daher zusammenfassend als Nachweis für die Ausbildung von TJ-Komplexen und somit funktioneller Barriereigenschaften gedeutet werden.

Die Organisation und Expressionsstärke der TJ-Proteine in den HROC-Zelllinien bildet somit grundsätzlich eine solide Basis zur Untersuchung von Regulationsmechanismen parazellulärer Bewegung von Ionen, Makromolekülen und Immunzellen durch die intestinale Barriere hindurch (Rodgers et al. 2013). In der Arzneimittelforschung spielt die Existenz von TJ in intestinalen *in vitro* Modellen eine bedeutende Rolle. So existieren Studien zur pharmakologischen Beeinflussung der TJ-Permeabilität (Walter 2009). Darüber hinaus ist die Entwicklung und Anwendung effektiver TJ-Modulatoren zur Erhöhung des parazellulären Wirkstofftransportes und Selektivität Gegenstand der Forschung (Deli 2009).

Insgesamt konnte ein konfluenzabhängiger Anstieg der Occludin-Expression in den Linien HROC43, HROC60, HROC80 T1 M1, HROC183 T0 M2, HROC239 T0 M1 und Caco-2 beobachtet werden. Dies könnte auf eine Ausreifung der TJ-Strukturen mit Zunahme der Kulturzeit hindeuten (Lopez-Escalera und Wellejus 2022). Unklar ist die erhöhte Occludin-Expression in den übrigen Linien vor Erreichen der Konfluenz. Auffällig war die im Vergleich zu humanem Dünndarm vielfach höhere Occludin-Expression in Caco-2 nach zehntägiger Postkonfluenz, die sich deutlich von den Expressionslevel der HROC-Zelllinien abhob. Mögliche Ursache für die hohe Varianz der Occludin-Expression in den Zelllinien ist die Interaktion von Occludin mit einem Signaltransduktionsweg zur Regulierung von Überlebensmechanismen in Krebszellen. So wird Occludin als mögliches Tumorsuppressorgen in verschiedenen Krebsarten vermutet (Osanai et al. 2006). In mehreren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass eine Hochregulierung weiterer TJ-Moleküle in Krebszellen zu induzierter Apoptose und Suppression von metastatischem Potential führt (Michl et al. 2003; Mima et al. 2005; Hoevel et al. 2004). Die in dieser Arbeit nachgewiesene Hochregulierung von Occludin in Caco-2 könnte auf eine übermäßige Ausbildung von TJ hindeuten, die wiederum zur be-

kannt geringen Permeabilität dieses Modells im Vergleich zu humanem Dünndarm führt (Amidon et al. 1999). Untersuchungen zur Occludin-Expression zeigten zwar, dass eine Hochregulierung die Funktion von TJ-Barrieren beeinflussen könnte (Balda et al. 2000), dies konnte in weiteren Studien durch den Nachweis physiologisch und strukturell normaler TJ in Occludin-Knockout-Mäusen jedoch nicht bestätigt werden (Saitou et al. 2000; Schulzke et al. 2005). Somit kann davon ausgegangen werden, dass Occludin allein nicht entscheidend bei der Bildung von TJ beteiligt ist. Ebenso konnte gezeigt werden, dass eine Hochregulierung von Occludin keinen Effekt auf die ZO-1-Expression hat (van Itallie et al. 2010). Dies würde die innerhalb des untersuchten Panels auftretenden zelllinienspezifischen Unterschiede bei der REM-Detektion von TJ-Strukturen, Visualisierung von ZO-1 als auch Expression von Occludin erklären. Die zur Bewertung der epithelialen Integrität herangezogenen Parameter korrelierten somit nicht zwangsläufig untereinander. Zwischen der ZO-1-Expression konnte kein Zusammenhang mit den korrespondierenden Daten zu TEER, FD4-Permeabilität und der Occludin-Expression in postkonfluenten Zellen festgestellt werden. Bisher ist bekannt, dass eine Hochregulierung von Occludin keinen Effekt auf die ZO-1-Expression hat (van Itallie et al. 2010). Weiterhin konnte der hohe TEER in HROC60 nicht durch ein signifikant stärkeres ZO-1-Expressionsmuster, auf Ebene der Genexpression jedoch durch einen Anstieg von Occludin im postkonfluenten Stadium unterlegt werden. Innerhalb der ZO-1-Expressionsmuster zeigte HROC159 T2 M4 ein engmaschiges, gut verteiltes TJ-Netzwerk, das sich aufgrund der homogenen Fluoreszenz deutlich von denen der anderen Linien abhob. Die REM-Analyse erbrachte insbesondere für HROC60 und HROC159 T2 M4 den Nachweis stark ausgebildeter wallartiger TJ-Strukturen. Für beide Linien könnten diese Beobachtungen als Ergänzung zu hohen TEER in HROC60 sowie einem gut verteilten ZO-1-Expressionsmuster mit Dünndarm-ähnlicher Occludin-Expression in HROC159 T2 M4 dienen. Ebenso wurde in HROC159 T2 M4 ähnlich wie für HROC383 ein geringerer TEER erfasst. Somit wären HROC159 T2 M4 und HROC383 im Vergleich physiologisch mit dem Dünndarm vergleichbarer als die übrigen Linien. Für alle Zelllinien gilt jedoch, dass sich bedingt durch zelllinienspezifische Proliferationsraten eine längere Kulturzeit möglicherweise auf einen weiteren Anstieg des TEER ausgewirkt hätte (Liu et al. 2023a). Es bleibt also anzuzweifeln, ob es sich bei den erfassten TEER-Daten tatsächlich um die potentiell erreichbaren zelllinienspezifischen Maxima handelt.

Auffällig war der Nachweis erhöhter FD4-Permeabilität in HROC32 und HROC43 an d14 (11 % und 30 %) trotz erhöhter TEER-Werte von 946 und 1 321 $\Omega \cdot \text{cm}^2$. Insbesondere HROC43 zeigte eine erhöhte Diskrepanz zwischen TEER und FD4-Permeabilität. Bei einem vergleichbaren TEER in Caco-2 konnte hingegen kein parazellulärer Flux gemessen werden. Dies könnte daher auf eine erhöhte Porosität des HROC43-Monolayers trotz Ausbildung einer dichten TJ-Barriere hinweisen. Damit hätte speziell HROC43 ein im Vergleich zu den

übrigen Linien höheres Potential zur verbesserten Simulation der gastrointestinalen Physiologie. Die Bestimmung der parazellulären Permeabilität in dieser Untersuchung war jedoch in einigen Punkten limitiert. Zum einen wurde der parazelluläre Flux ausschließlich durch Verwendung von FITC-Dextran mit einem Molekulargewicht von 4 kDa durchgeführt. Um verbesserte Aussagen speziell zur Funktionalität der TJ zu treffen, wären zusätzlich Untersuchungen mit parazellulären Tracer unterschiedlicher Molekülgröße notwendig. So fand beispielsweise Lucifer Yellow bei der Untersuchung der parazellulären Permeabilität vielfach Verwendung (Hidalgo et al. 1989; Valdez et al. 2020).

5.4 Differenzierungsgrad

Der Dünndarm ist ein komplexes System, bestehend aus verschiedenen IECs wie Enterozyten, Becher-, Paneth- und enteroendokrinen Zellen (Tillmann 2016). Innerhalb des intestinalen Epithels zählen die Enterozyten dabei zu dem vorherrschenden Zelltyp (Gehart und Clevers 2019). Im lebenden Körper interagieren unterschiedliche Zelltypen durch Signale benachbarter Zellen miteinander und sorgen so für die biologische Funktion des Gewebes. Die zellulären Phänotypen des Dünndarmepithels werden durch Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen beeinflusst und sind definiert durch die Expression spezifischer Gene (Armingol et al. 2021; Hickey et al. 2023). Um Interaktionen zwischen verschiedenen Zelltypen zu untersuchen, sind bislang jedoch Ko-Kulturen erforderlich (Lea 2015). Die Etablierung von Zellmodellen mit höherem Differenzierungsgrad als Caco-2 ist für eine vereinfachte Kultivierung, einer verbesserten Darstellung der *in vivo* Situation und Beurteilung von ADME-Parametern von großem Interesse. Jedoch sind Differenzierungsprozesse in etablierten KRK-Zelllinien bisher nur von einer limitierten Anzahl an Modellen bekannt (Liévin-Le Moal und Servin 2013). Demnach liegen bisher kaum Studien zu Differenzierungsprozessen in IECs bei KRK-Zelllinien vor. Hauptsächlich wurde bisher die Oberflächendifferenzierung konfluenter Monolayer der Zelllinien Caco-2, HT-29 und T84 rasterelektronenmikroskopisch untersucht. Caco-2 sind auf apikaler Seite der Zellmembran durch zahlreiche Enterozyten charakterisiert, die sich in Form eines dichten und regulär verteilten Mikrovilli-Besatzes zeigen (Cabellos et al. 2017; Chen et al. 2015). Die einzelnen Enterozyten sind dabei durch REM nachweisbare TJ-Strukturen miteinander verbunden. Anhand der REM-Aufnahmen dieser Untersuchung zeigte sich jedoch eine geringere Ausprägung der TJ in Caco-2 als in anderen Studien (Chen et al. 2015). Dies könnte durch die im Vergleich zu den üblichen Caco-2-Protokollen verkürzte Postkonfluenz von zehn Tagen zu erklären sein, die somit auch auf die Oberflächendifferenzierung in den HROC-Linien Einfluss nehmen könnte.

Zunächst wurden die Zelllinien hinsichtlich ihrer Differenzierbarkeit zu Enterozyten untersucht. Enterozyten spielen eine entscheidende Rolle beim Verdauungsprozess durch Aufnahme von Wasser, Nährstoffen, Vitaminen und unkonjugierten Gallensalzen. Weiterhin sind

Enterozyten bei der Entwicklung einer immunologischen Toleranz gegenüber resorbierten Proteinen beteiligt (Miron und Cristea 2012). Die Beurteilung der Enterozyten-Differenzierung erfolgte anhand der Expression von OATP2B1 und *NR1/2* sowie dem REM-Nachweis eines intestinalen Bürstensaumes. OATP2B1 ist in der apikalen Membran humaner Enterozyten lokalisiert (Chen et al. 2020). Daneben konnte eine erhöhte *NR1/2*-Expression bei höherer Anzahl differenzierter IECs nachgewiesen werden (Ranhotra et al. 2016). Die quantitativen Daten dieser Marker dienten somit der methodischen Validierung sowie als Indiz für den Nachweis von Enterozyten. Caco-2-Zellen differenzieren in Kultur hauptsächlich in Enterozyten (Lea 2015). Dies könnte die auch aus weiteren Studien bestätigte Überexpression von OATP2B1 in Caco-2 im Vergleich zu jejunalem Gewebe erklären (Brück et al. 2017; Seithel et al. 2006; Englund et al. 2006). Die in dieser Arbeit für Caco-2 rasterelektronenmikroskopisch nachgewiesenen, charakteristischen Mikrovilli-Strukturen, zeigten zunächst morphologische Ähnlichkeit mit denen aus anderen Studien (Lea 2015; Chen et al. 2015). Grundsätzlich waren die in den HROC-Zelllinien nachgewiesenen Mikrovilli-Strukturen demnach mindestens mit Caco-2 vergleichbar. Dies konnte dadurch belegt werden, dass die Höhe der Villi von etwa 1 µm mit der Höhe der Mikrovilli auf apikaler Seite der Enterozyten im Dünndarm mit 1 bis 3 µm sehr ähnlich waren (Crawley et al. 2014). Die Strukturen der Mikrovilli im menschlichen Dünndarm sind im Normalfall charakterisiert durch eine fingerförmige Morphologie. Innerhalb des Panels traten jedoch unterschiedlichste Ausprägungen von Mikrovilli-Formationen hervor. Im Vergleich unterschieden sich die eher kurzen, drahtigen Mikrovilli-Strukturen in Caco-2 signifikant von denen in HROC183 T0 M2 sowie HROC217 T1 M2. Diese Linien zeigten bei REM-Visualisierung verbesserte morphologische Eigenschaften hinsichtlich Dichte und Struktur der Villi, die subjektiv betrachtet eine höhere Ähnlichkeit mit der Morphologie im Dünndarm aufwiesen (Crawley et al. 2014). Wenigstens für HROC183 T0 M2 wurde dies auch in einer mit dem Jejunum vergleichbaren OATP2B1-Proteinexpression sowie Überexpression von *NR1/2* nach zehntägiger Postkonfluenz widerspiegelt. Die höchste Ähnlichkeit mit Dünndarm-spezifischen Leveln von OATP2B1 und *NR1/2* wurde jedoch für HROC43 erfasst. Mit Abweichungen zur jejunalen Expression konnte OATP2B1 zudem in den Linien HROC32, HROC80 T1 M1, HROC159 T2 M4 und HROC239 T0 M1 detektiert werden. Obwohl sich auf REM-Ebene keine auffällig morphologischen Unterschiede zeigten, könnte die OATP2B1-Proteinexpression in diesen Linien dennoch auf die Ausbildung einer Enterozytenbarriere hindeuten. Schwächere Level in den Linien HROC126 und HROC239 T0 M1 könnten durch den rektalen Ursprung dieser Linien mit abnehmender Mikrovilli-Dichte zu erklären sein (Ouwehand und Vaughan 2006). Hingegen deuten die in ihrer Dichte geringeren und im Vergleich drahtigeren Mikrovilli-Strukturen in HROC60 und HROC383 auf eine schwächere Differenzierung in Enterozyten hin. Insbesondere HROC60 war durch einen äußerst homogenen Mikrovilli-Besatz ohne größere Unter-

schiede in Bezug auf Dichte und Morphologie geprägt. Nicht detektierbare Proteinlevel von OATP2B1 in HROC60 sowie eine schwache Genexpression von *NR1I2* in HROC383 könnten diese Annahme möglicherweise bestätigen. Die Linie T84 zeigt in Kultur strukturelle und funktionelle Charakteristika kolonischer Zellen mit Ähnlichkeit zu HROC60, die durch kurze Mikrovilli und ausgeprägte TJ charakterisiert sind (Liévin-Le Moal und Servin 2013). Dies konnte in einer weiteren Studie durch einen hohen TEER von bis zu $4\ 000\ \Omega\cdot\text{cm}^2$ in T84 belegt werden (Yamaura et al. 2016). Die hohe Ähnlichkeit von HROC60 mit T84 führt wenigstens für diese Linie zu der Annahme, dass HROC60 in deutlichem Ausmaß in kolonische Zellen differenziert.

Der Nachweis Mikrovilli-besetzter Zellen kann jedoch nicht zwangsläufig als Nachweis für ausdifferenzierte Enterozyten dienen. So sind viele Zellarten durch kurze einzelnstehende Mikrovilli charakterisiert (Ulfig 2019). Für Caco-2 konnte zudem eine passagenabhängige Abnahme des Bürstensaumes nachgewiesen werden (Jahn et al. 2011). Insbesondere die hohe Variation des Mikrovilli-Besatzes kann hierbei als Indiz für schwach bzw. verschieden differenzierte IECs gedeutet werden. Daher wurde die Morphologie des Mikrovilli-Besatzes in Caco-2 als Referenz für ausdifferenzierte Enterozyten genutzt. Mindestens kann die Detektion eines Bürstensaumes als Indiz für polarisierte, resorbierende Epithelien dienen. Die Interpretation der Mikrovilli-Strukturen in den HROC-Zelllinien wird zusätzlich dadurch erschwert, dass unterschiedliche Kulturbedingungen oder Fluid-Zirkulation Einfluss auf die Ausprägung des Bürstensaumes intestinaler Epithelzellen nehmen können (Miura et al. 2015). Somit wird ein direkter Vergleich zwischen den HROC-Linien und Caco-2 erschwert. Zudem liefern die REM-Aufnahmen keine zuverlässigen quantitativen Daten, um die Differenzierung in Enterozyten adäquat zu beurteilen.

Für den Nachweis der Differenzierung in Becher-, Paneth- und enteroendokrine Zellen wurden die HROC-Zelllinien nach Erreichen 100%iger Konfluenz hinsichtlich ihrer Proteinexpression der etablierten Marker MUC2, LYZ und CHGA fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

Becherzellen sezernieren Schleim, deren Hauptbestandteil aus Mucinen besteht (Moe 1953; Meaney und O'Driscoll 1999). Diese Mucinschicht bedeckt die apikale Membran der IECs und limitiert somit die molekulare Absorption von Substanzen (Meaney und O'Driscoll 1999). Zellmodelle, die in Kultur in Enterozyten und Mucin-sezernierende Becherzellen differenzieren, sind daher für die Arzneimittelforschung zur verbesserten Vorhersage der ADME-Parameter von hohem Interesse (Pontier et al. 2001; Mahler et al. 2009). Die Detektion von MUC2 ergab deutliche zelllinienspezifische Unterschiede in den Fluoreszenzmustern. So hob sich das rinnsal-artige Fluoreszenzmuster in HROC43 deutlich von denen der anderen Linien ab. Dies könnte auf eine erhöhte Mucin-Sezernierung mit Bildung einer ausgereiften Mucinschicht oberhalb der Epithelschicht hinweisen. Im Gegensatz dazu wurde in den Linien

HROC60 und HROC159 T2 M4 ein auffällig intrazelluläres Fluoreszenzmuster beobachtet. In einer anderen humanen KRK-Zelllinie wurde MUC2 bei Erreichen einer nahezu 100%igen Konfluenz innerhalb des Zelllayers detektiert, wobei eine Sekretion in das Zellmedium festgestellt wurde (Sheehan et al. 1996). Dies könnte mitunter die Ausprägung intrazellulärer Fluoreszenzmuster in den HROC-Zelllinien erklären. Variationen in der MUC2-Expression könnte zudem durch Expressionsschwankungen innerhalb KRK unterschiedlicher histologischer Typen zu erklären sein (Blank et al. 1994). Des Weiteren könnte die ungleiche Verteilung von Becherzellen innerhalb des Gastrointestinaltraktes Einfluss auf die MUC2-Expression in den HROC-Linien nehmen. So nimmt die Anzahl an Becherzellen nach distal zu und ist im distalen Ileum sowie im Rektum am höchsten (Specian und Oliver 1991). Eine geringe MUC2-Expression könnte dagegen durch insgesamt schwach differenzierte KRK bzw. rektale Adenokarzinome sowie durch fortgeschrittenes Tumorstadium in KRK zu erklären sein (Wang et al. 2017b). Aus den Ergebnissen zur phänotypischen Charakterisierung der Oberflächenstruktur ging auch hervor, dass der Lymphozytenmarker CD69 in allen HROC-Zelllinien exprimiert war. CD69 liegt in Schleimhautarealen als physikalische Barriere zum Schutz vor Pathogenen hoch exprimiert vor (Radulovic und Niess 2015). Eine erhöhte Expression des Markers könnte demnach Hinweise auf die Ausprägung einer Mucinschicht liefern. Dies würde insbesondere die im Vergleich höchste CD69-Expression in HROC43 erklären, die mit den rinnsal-artigen MUC2-Fluoreszenzmustern im Einklang steht.

Paneth-Zellen sind im Dünndarm in den Krypten neben den Stammzellen lokalisiert und sezernieren antimikrobielle Substanzen wie LYZ (Porter et al. 2002). Ausgeprägte Fluoreszenzmuster konnten in den Linien HROC43, HROC60, HROC159 T2 M4 und HROC217 T1 M2 festgestellt werden. Diese Beobachtung könnte auf die Existenz von Paneth-Zellen bei chronischen Darmentzündungen, Adenomen und Karzinomen zurückzuführen sein (Luo et al. 2019). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Paneth-Zellen in der Lage sind, sich stammzellartige Eigenschaften anzueignen, die zur Entwicklung von Darmkrebs beitragen (Fodde et al. 2023). Im Kolon sind Paneth-Zellen nicht präsent, jedoch wurde ein zu Paneth-Zellen analoger kolonischer Zelltyp mit ebenso sezernierenden und nischenartigen funktionellen Eigenschaften beschrieben (Sasaki et al. 2016a). Die Unterscheidung beider Zelltypen gestaltet sich daher als problematisch. Innerhalb des Panels wurde in HROC43 ein auffälliges, aus vielen einzelnen grob- und feintropfigen Punkten bestehendes Muster mit umliegender cytoplasmatischer Fluoreszenz beobachtet, das sich deutlich von denen der anderen Linien unterscheidet. Dies könnte auf eine spezifische Färbung der LYZ-enthaltenen Vesikel einer Paneth-Zelle hinweisen (Liévin-Le Moal und Servin 2013). Trotz erhöhter Expression des Paneth-Zellmarkers CD15 in HROC43 kann diese Annahme anhand quantitativer Daten nicht belegt werden.

Enteroendokrine Zellen umfassen ca. 1 % der IECs im menschlichen Dünndarm und sezernieren Hormone und Peptide für die Aktivierung von Immunzellen (Moran et al. 2008; Bohórquez et al. 2011). Ausgeprägte CHGA-Fluoreszenzmuster wurden in den Linien HROC43, HROC60, HROC159 T2 M4 und HROC239 T0 M1 festgestellt. Neben der Existenz enteroendokriner Zellen könnte die hohe Expression in den HROC-Linien auch durch die Anwesenheit CHGA-positiver Subtypen dieses Zelltyps erklärt werden (Kim et al. 2001). Die starke intrazelluläre CHGA-Expression in HROC159 T2 M4 und HROC239 T0 M1 könnte dagegen auf die Rolle von CHGA in intrazellulärer Kalziumhomöostase zurückzuführen sein. Jedoch unterliegt die Proteinbestimmung von CHGA durch Antikörper noch immer Schwierigkeiten aufgrund geringer Spezifität und Kreuzreaktivität für CHGA und abgeleiteter Peptide (Eissa et al. 2018).

Da weitere Angaben wie vergleichende REM-Aufnahmen zu Mikrovilli-besetzten Becher- und Paneth-Zellen aus anderen 2D-Zellkulturmodellen oder humanem Dünndarmgewebe sowie Größenangaben ausgereifter IECs fehlen, können keine eindeutigen Aussagen zur Zuordnung auffälliger Areale zu bestimmten Zelltypen getroffen werden (Liévin-Le Moal und Servin 2013). Für eine zuverlässige Beurteilung zur Differenzierung in weitere intestinale Zelltypen wären zusätzliche adäquatere, quantitative Methoden notwendig. Jedoch ergab die REM-Untersuchung Anzeichen für Differenzierungen in weitere Zelltypen. So könnten 50 µm große auffällige Areale ohne Mikrovilli-Besatz als Indiz für die Existenz von M-Zellen in den Linien HROC32, HROC43 und HROC217 T1 M2 zu deuten sein. M-Zellen besitzen im Vergleich zu Enterozyten keine Glykokalyx und sind durch ihre hohe Zugänglichkeit für den Transport von Antigenen durch die Epithelbarriere verantwortlich, was schließlich zur Stimulierung des Immunsystems führt (Murphy et al. 2018). Morphologisch unterscheiden sich M-Zellen durch die Abwesenheit von Mikrovilli-Strukturen (Beloqui et al. 2017). Insbesondere in HROC217 T1 M2 detektierte Areale zeigten starke Ähnlichkeit mit spärlichen Mikrovilli-besetzten M-Zellen in Caco-2 nach Ko-Kultur mit Raji-B-Zellen (Schimpel et al. 2015).

Aus den Ergebnissen zur Untersuchung des Differenzierungsgrades ging insgesamt hervor, dass HROC32 und HROC43 ein hohes Potential zur Differenzierung in Enterozyten, Becher-, Paneth- und enteroendokrinen Zellen und möglicherweise auch M-Zellen aufweisen. Insbesondere für HROC43 konnte dies rasterelektronenmikroskopisch durch eine hohe Variation in der Morphologie des Bürstensaumes sowie durch spezifische Fluoreszenzmuster bekräftigt werden. HROC183 T0 M2 und HROC217 T1 M2 zeigten in Kultur ebenso ein erhöhtes Potential zur Differenzierung in IECs, jedoch ohne eindeutige Hinweise auf Paneth-Zellen. Im Gegensatz dazu konnte in HROC126 und HROC383 ein schwacher Differenzierungsgrad mit limitierter Anzahl an spezialisierten IECs festgestellt werden. Schwache ZO-1-Expressionsmuster in diesen Linien könnten in direktem Zusammenhang mit dem Differenzierungsgrad stehen und diese Annahme bestätigen (Sommers et al. 1994). Der Nachweis

relevanter Marker-Proteine in einigen der HROC-Linien verdeutlichen jedoch, dass die natürliche Zell-Diversität des nativen Dünndarmepithels auch in immortalisierten Zelllinien widergespiegelt werden kann.

5.5 Vergleich der Expressionslevel mit humanem Dünndarm

Eine mit dem Dünndarm vergleichbare Expression von Enzymen, Transportern und nukleären Rezeptoren ist eine wichtige Voraussetzung für die Verwendung von KRK-Zelllinien für ADME-Untersuchungen. Dies setzt bei Caco-2-Zellen eine 21-tägige Kultur zur Ausbildung eines dichten Monolayers voraus (Hubatsch et al. 2007; Sun et al. 2008). Es wurden jedoch zunehmend Protokolle beschrieben, um die Kultivierungszeit von Caco-2-Zellen zu verkürzen (Sevin et al. 2013; Peng et al. 2014; Kishimoto et al. 2014). Als unklar gilt jedoch, ob die kürzeren Kultivierungszeiten Einfluss auf die Expression und Funktion von Enzymen, Transportern oder nukleären Rezeptoren haben. Der Vergleich prä- und postkonflunter Expressionslevel führte zunächst zu der Erkenntnis, dass die Kultivierungsdauer signifikanten Einfluss auf die Expression relevanter Gene und Proteine in den HROC-Zelllinien nimmt. Zusätzlich erbrachten Korrelationen zwischen der Genexpression ausgewählter Transporter und nukleärer Rezeptoren den Nachweis aktiver funktioneller Gen-Gen-Netzwerke in den HROC-Linien. In diesem Zusammenhang verdeutlichte die Zunahme signifikanter Korrelationen im zeitlichen Verlauf die Relevanz zehntägiger Postkonfluenz für die Ausbildung einer genetischen Funktionsvielfalt. Im Vergleich zu Caco-2-Protokollen wären die für ADME-Experimente notwendige Kultivierungszeit somit deutlich kürzer.

Bislang erfolgten zahlreiche Untersuchungen zur Expression relevanter Enzyme und Transporter in Caco-2 im Vergleich zum humanen Dünndarm. Hierbei konnte zwar gezeigt werden, dass die Expression von Transportern in Caco-2 im Wesentlichen mit der in humanem Dünndarmgewebe übereinstimmt, jedoch traten zum Teil deutliche Unterschiede hervor (Hilgendorf et al. 2007; Taipalensuu et al. 2001; Englund et al. 2006; Seithel et al. 2006). Als größte Diskrepanz gilt hierbei eine deutlich höhere Expression von OATP2B1, die sowohl in dieser Untersuchung, als auch in zwei weiteren Studien belegt werden konnte (Ölander et al. 2016). Die in dieser Arbeit erhobenen Genexpressionsdaten für *SLCO2B1* und *UGT1A6* in Caco-2 sind mit denen aus einer weiteren Studie vergleichbar. In dieser Untersuchung wurden in Caco-2 jedoch deutlich geringere *ABCB1*- und *ABCG2*-Expressionslevel festgestellt (Takenaka et al. 2014). Auch die im Vergleich zum Jejunum geringeren Proteinlevel für PEPT1 in Caco-2 wichen von den Beobachtungen einer weiteren Untersuchung ab (Brück et al. 2017).

PXR hat eine wichtige Funktion bei dem Schutz des Körpers vor schädlichen Substanzen. Aus diesem Grund liegt PXR im Dünndarm für die Detoxifikation endo- und exogener Substanzen hoch exprimiert vor (Urquhart et al. 2007; Tirona 2011; Drozdik et al. 2014). Unter-

suchungen zeigten, dass die *NR1/2*-Expression in Caco-2 deutlich unter der des Dünndarms liegt (Negoro et al. 2016; Takahashi et al. 2022). Dies konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Bis auf HROC383 wurde in allen HROC-Linien eine mindestens mit dem Dünndarm vergleichbare *NR1/2*-Expression nach zehntägiger Postkonfluenz nachgewiesen. Unklar ist die im Vergleich deutlich geringere *NR1/2*-Expression in HROC383. Des Weiteren hoben sich die Expressionslevel in HROC80 T1 M1 und HROC183 T0 M2 deutlich von der des Dünndarms ab. Diese Unterschiede könnten durch die hohe Variabilität in der *NR1/2*-Expression in KRK zurückzuführen sein (Raynal et al. 2010). Daneben hat PXR eine wichtige Funktion als Regulator und Aktivator von Wachstum, Apoptose, Invasion und Metastasierungsprozessen in KRK (Wang et al. 2011). Dies könnte sich zusätzlich auf die *NR1/2*-Expressionslevel in den HROC-Zelllinien auswirken. Die mit *NR1/2* im postkonfluenten Stadium der Zellen korrelierende *NR1/1*-Expression könnte ebenso ein Hinweis auf die Aktivierung apoptotischer Prozesse sein (Yu et al. 2023). Geringe *NR1/1*-Expressionslevel wie in postkonfluenten HROC383 deuten dagegen womöglich auf eine erhöhte Tumorprogression hin (Shi et al. 2020).

Aus den Analysen geht deutlich hervor, dass die Linien HROC43, HROC183 T0 M2 und HROC217 T1 M2 hinsichtlich ihrer Gen- als auch Proteinexpressionslevel innerhalb der zehntägigen Postkonfluenz eine höhere Ähnlichkeit mit humanem Dünndarm aufweisen als Caco-2. Insbesondere HROC43 wies hinsichtlich der BCRP-Proteinexpression eine hohe Vergleichbarkeit mit humanem Jejunum auf. Daher kann davon ausgegangen werden, dass sich HROC183 T0 M2 und HROC217 T1 M2, vorrangig jedoch HROC43 als verbesserte Zellmodelle zur Darstellung der *in vivo* Situation eignen.

Eine mögliche tumoral bedingte Überexpression von P-gp und BCRP konnte für die HROC-Linien und Caco-2 nicht bestätigt werden. Dies würde sich begünstigend auf Versuche zur Untersuchung von Efflux-Mechanismen in diesen Modellen auswirken.

Grundsätzlich geht aus den Ergebnissen hervor, dass sich die mRNA-Expression als auch die Proteinlevel der ausgewählten Transporter zwischen den untersuchten Zelllinien und humanem Jejunum unterschieden. Obwohl Gemeinsamkeiten bestehen, lassen sich eindeutige Rückschlüsse auf die tatsächliche Gen- und Proteinexpression in diesen Linien nicht ziehen. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass ein Vergleich zwischen der Genexpression und den Proteinlevel klinisch relevanter Transporter in intestinalem Gewebe nicht immer korreliert (Drozdik et al. 2014). Diese Beobachtung wurde in ähnlicher Weise in Leberzellen bestätigt (Ohtsuki et al. 2012). Auch in dieser Arbeit konnte eine Diskrepanz zwischen der Genexpression und dem Proteingehalt von *SLCO2B1*, *ABCB1* und *ABCG2* festgestellt werden.

5.6 Regulierung von Enzymen, Transportern und nukleären Rezeptoren

CYP3A4 liegt neben dem Dünndarm auch in KRK exprimiert vor (Kolars et al. 1994; Gervasini et al. 2007). Die Enzyme der arzneistoffmetabolisierenden CYP-Familie sind dabei starken interindividuellen Schwankungen unterlegen. Als Folge polymorpher Allele bestehen durch veränderte Enzymfunktionen Unterschiede in der Fähigkeit, Arzneistoffe zu metabolisieren (Rodriguez-Antona und Ingelman-Sundberg 2006). Die mitunter hohen Level sowie die starken Unterschiede der basalen CYP3A4-Aktivität innerhalb des HROC-Zellpanels könnte durch zellspezifische Charakteristika in Bezug auf physiologische und pathophysiologische Faktoren wie Hormonstatus, Geschlecht und Alter zu erklären sein (Klein und Zanger 2013). Bei der Untersuchung des First-Pass-Metabolismus oral verabreichter Medikamente führt der Mangel an CYP3A4 in Zellkulturmodellen wie Caco-2 zu erheblichen Nachteilen (Macedo et al. 2018; Ungell 2004). Um diese Problematik zu umgehen, wurde in Untersuchungen versucht, die CYP3A4-Expression in Caco-2 durch Behandlung mit VD3 oder durch Eingliederung von NADPH in die basolaterale Seite der Membran zu erhöhen (van Breemen und Li 2005). Dadurch konnte die Bedeutung des Caco-2-Modells für die Untersuchung des intestinalen First-Pass-Metabolismus erheblich verbessert werden (Hu et al. 2004). In den HROC-Zelllinien HROC32, HROC43 und HROC159 T2 M4 liegt im Vergleich zu Caco-2 eine deutlich höhere basale CYP3A4-Aktivität vor. Diese Linien wären daher als Modelle zur Untersuchung des intestinalen First-Pass-Metabolismus im Vergleich zu Caco-2 besser geeignet. Die etablierte KRK-Zelllinie LS-180 zeigt im Vergleich zu Caco-2 stärkere Induktionseffekte auf die CYP3A4 mRNA nach Behandlung mit Rifampicin (3-fach) und VD3 (5-fach). Nachteil dieser Linie sind jedoch ein geringer TEER sowie eine erhöhte Permeabilität (Yamaura et al. 2016). Im funktionellen Vergleich zeigten HROC183 T0 M2 und HROC217 T1 M2 mindestens mit LS-180 vergleichbare CYP3A4-Induktionseffekte sowie deutlich höhere TEER-Werte mit geringerer parazellulärer Permeabilität. Aufgrund dieser Eigenschaften wären diese Linien zur Vorhersage der Bioverfügbarkeit von PXR- und VDR-Liganden bei stabilerem Erhalt der Barriereintegrität überlegen.

Die meisten Enzyme der CYPs sind bei Xenobiotikabelastung des Organismus zur Enzyminduktion fähig. Ausgelöst durch die verstärkte *de novo* Expressierung von Enzymen wird die Geschwindigkeit der Biotransformation erhöht, wodurch in der Folge die Konzentration des Ausgangssubstrates abnimmt. Viele CYP-Induktoren sorgen zudem für eine Ko-Induktion von Phase II-Enzymen wie den UGTs oder den Glutathion-S-Transferasen (Rushmore und Kong 2002). Ferner wurden simultane Induktionseffekte zahlreicher Phase III-Transporter beobachtet. Eine derart koordinierte Aktivierung einer Biotransformations- und Transportkaskade führt zu einer erhöhten Effizienz der Detoxifikation schädlicher Xenobiotika (Xu et al. 2005). Am deutlichsten waren Rifampicin-vermittelte regulative Effekte auf die CYP3A4-

Aktivität, *SLCO2B1*-, *UGT1A6*-, *ABCB1*-, *ABCG2*- und *NR1I2*-Genexpression in HROC43 zu beobachten. Ähnliche, jedoch schwächere Effekte konnten in HROC32 und HROC60 beobachtet werden. Die Modelle HROC183 T0 M2 und HROC217 T1 M2 waren durch starke Induktionseffekte auf die CYP3A4-Aktivität als auch auf die *ABCB1* mRNA-Expression gekennzeichnet. Diese Ergebnisse weisen auf eine im Vergleich zu Caco-2 verstärkte Aktivierung einer Transportkaskade hin. Ganzheitlich betrachtet stellen diese Linien zusammen mit HROC43 somit geeignetere Modelle zur simultanen Untersuchung von PXR- und VDR-vermitteltem intestinalen First-Pass-Metabolismus sowie Efflux-Mechanismen dar.

VDR gilt als relevantes therapeutisches Ziel zahlreicher Vitamin D-Analoga (Choi et al. 2020). Dies lässt sich durch das hohe therapeutische Potential von VDR-Liganden zur Behandlung von Entzündungen, Osteoporose, Autoimmunerkrankungen und Krebs erklären (Takada und Makishima 2015). Neben Caco-2 zeigten HROC43 und HROC60 schwache induktive Effekte auf *NR1I1*. Ferner deuten VDR-vermittelte Induktionseffekte auf *SLCO2B1*, *ABCB1* und *NR1I2* in HROC43 und HROC60 darauf hin, dass dieser Rezeptor aktiv in diesen Linien vorliegt. Somit wären diese Modelle als Ergänzung zu Caco-2 für die Bewertung neuartiger VDR-Liganden innerhalb der Wirkstoffforschung von hohem Interesse.

In einigen HROC-Zelllinien, speziell in HROC43 und HROC60 konnten simultane Inhibitionseffekte der CYP3A4-Aktivität sowohl nach der Behandlung mit Rifampicin, VD3 als auch mit Dexamethason beobachtet werden. Die genauen Ursachen für derartige Effekte können jedoch nicht eindeutig geklärt werden. Vergleichende inhibitorische Effekte für *NR1I2* wurden in den KRK-Zelllinien LS180 und Caco-2 durch Rifampicin beobachtet (Pfrunder et al. 2003, Kögl 2018). Diese Beobachtungen widersprechen der logischen Konsequenz einer Induktion durch Rifampicin. Mögliche Ursachen dieser Expressionsänderungen bleiben jedoch ungeklärt, weil die exakten molekularbiologischen Signalwege der Induktions-Mechanismen noch nicht bekannt sind. Es wird jedoch von einer hohen Komplexität molekularbiologischer Signalwege ausgegangen. So konnte gezeigt werden, dass eine post-transkriptionelle Regulation als auch eine Methylierung der Promotorregion von *NR1I2* Einfluss auf die Expression nehmen können (Habano et al. 2011; Takagi et al. 2008). Im Gegensatz zur Induktion führt eine Hemmung der Enzymaktivität zu einem verlangsamten Abbau der verabreichten Pharmaka. Dies kann eine verlängerte pharmakologische Wirkung oder eine erhöhte Inzidenz arzneimittelinduzierter Toxizität zur Folge haben. Eine Hemmung des Metabolismus kann nach Verabreichung zweier Medikamente in Form ungewollter Arzneistoffinteraktionen auftreten, wenn diese um die Bindungsstellen an den Rezeptoren bzw. Plasmaproteinen und somit um das katalytische Zentrum des metabolisierenden Enzyms konkurrieren (Lin und Lu 1998). In dieser Untersuchung wurden die CYP3A4-Substrate einzeln verabreicht, sodass diese Möglichkeit ausgeschlossen werden kann. Eine große Anzahl klinisch bedeutender Interaktionen, die auf der Inhibition von CYPs beruhen, kann zudem durch die geringe Sub-

stratspezifität dieser Enzyme erklärt werden (Lin und Lu 1998). Unerwartet waren signifikante Inhibitionseffekte auf die CYP3A4-Aktivität nach Behandlung mit Rifampicin, VD3 und Dexamethason. Möglicherweise könnten die Inhibitionseffekte in einigen HROC-Linien auch aufgrund tumoraler Eigenschaften hervorgerufen werden. So ist bekannt, dass Entzündungsprozesse, Infektionen oder Krebserkrankungen zu veränderten pharmakokinetischen Eigenschaften von Arzneimitteln führen, die in einer Herunterregulation metabolisierender Enzyme resultieren (Slaviero et al. 2003).

Bisherige Untersuchungen zeigten verstärkte CYP3A4-Induktionseffekte in Caco-2 durch VD3, jedoch nicht durch Rifampicin und Dexamethason (Schmiedlin-Ren et al. 2001; Negoro et al. 2016). Diese Ergebnisse sind damit konträr zu den Beobachtungen dieser Arbeit. Zudem wurden keine Veränderungen von *NR1I2* durch Rifampicin und VD3 in Caco-2 beschrieben (Pfrunder et al. 2003). In dieser Arbeit konnte hingegen eine starke Rifampicin-vermittelte *NR1I2*-Induktion in Caco-2 festgestellt werden. Durch ausbleibende Effekte auf die *ABCB1*- und *ABCG2*-Expression durch Rifampicin kann eine direkte transkriptionelle Aktivierung der Efflux-Transporter durch *NR1I2* jedoch nicht bestätigt werden und bekräftigt die Annahme, dass *NR1I2* in Caco-2 inaktiv vorliegt (Pfrunder et al. 2003). Es wird daher vermutet, dass eine CYP3A4-Induktion in Caco-2 nicht über den PXR, sondern über den VDR erfolgt (Thummel et al. 2001; Schmiedlin-Ren et al. 2001). Dafür spricht auch der Nachweis einer *ABCG2*-Induktion durch VD3, jedoch nicht durch Rifampicin (Yamaura et al. 2016). Im Zusammenhang mit funktionellen Testungen wären die Linien HROC43, HROC60, HROC80 T1 M1, HROC183 T0 M2 und HROC217 T1 M2 dem Caco-2-Modell womöglich überlegen, indem diese sowohl durch Rifampicin als auch VD3 zu einer direkten transkriptionellen Aktivierung ausgewählter Gene führen.

Mögliche Ursachen für diese zu anderen Studien konträren Ergebnisse könnten zum einen durch die für Caco-2 bekannt hohe Variabilität von Expressionsdaten zu erklären sein (Brück et al. 2017). Zum anderen könnte dies auf die in dieser Untersuchung durchgeführte Messung der CYP3A4-Aktivität zurückzuführen sein, die einen direkten Vergleich mit mRNA-Daten erschwert. Auch die Verwendung unterschiedlicher Klone und somit der Einfluss passagenabhängiger Veränderungen der Genaktivität könnten zu unterschiedlichen Ergebnissen führen. Zudem könnte die verkürzte Kultivierungsdauer oder ebenso die Verwendung unterschiedlicher Zellkulturmaterialien zu abweichenden Expressionsleveln führen.

Daten zur arzneimittelinduzierten Expressionsänderung *in vivo* liegen bislang für *CYP3A4*, *ABCB1*, *ABCG2* und *NR1I2* vor. Bei der Untersuchung der Genexpression in Darmpräzisionsschnitten von vier unterschiedlichen Spendern zeigte sich nach Behandlung mit Rifampicin eine Induktion von *ABCB1* (bis zu 7,4-fach) und *CYP3A4* (bis 78-fach) mit dazu korrelierenden PXR-Leveln (Martinec et al. 2021). Eine derart hohe CYP3A4-Hochregulierung konnte in keiner der untersuchten Linien festgestellt werden. In einer weite-

ren Untersuchung führten Rifampicin und VD3 in einem Biopsie-abgeleiteten Duodenum-Chip hingegen zu einer 5,3- und 4,1-fachen Induktion der *CYP3A4*-Expression (Kasendra et al. 2020). Diese Ergebnisse sind eher mit den Beobachtungen einiger HROC-Modelle zu vergleichen. Demnach sind die Induktionseffekte in HROC183 T0 M2 und HROC217 T1 M2 am ehesten mit denen im humanen Duodenum-Chip vergleichbar. Davon zeigte HROC217 T1 M2 durch simultane Rifampicin-vermittelte Hochregulierung der *CYP3A4*-Aktivität sowie *ABCB1* und *NR1I2* mRNA *in vivo*-ähnliche Mechanismen. In einer weiteren Studie zur Untersuchung der Expressionsänderung durch Rifampicin in Duodenum-Biopsien konnte für *ABCB1* eine 3,5-fache Hochregulierung nachgewiesen werden, für *NR1I2* wurde hingegen eine leichte Hochregulierung und für *ABCG2* keine signifikante Änderung beobachtet (Brueck et al. 2019). Diese Effekte wären am ehesten mit der in HROC43 und HROC217 T1 M2 beobachteten Hochregulierung von *ABCB1* und *NR1I2* zu vergleichen.

5.7 Vor- und Nachteile sowie Anwendungsbereiche

Umstritten bleibt nach wie vor der kolonische Ursprung der HROC-Zellmodelle, der auch für Caco-2 nach wie vor kontrovers diskutiert wird. So ähneln KRK-Zelllinien in ihren strukturellen und funktionellen Eigenschaften eher Dickdarm-, als Dünndarmzellen. Hierauf deuten stärker ausgebildete TJ, höhere TEER-Werte sowie eine veränderte Enzym- und Transporterexpression hin (Macedo et al. 2018; Darling et al. 2020). Trotz der verbesserten Eigenschaften zur Nachstellung der *in vivo* Darmbarriere im Vergleich zu Caco-2 sind die Linien des vorgestellten Zellpanels in einigen Punkten limitiert. So kann die *in vivo* Funktionsvielfalt des menschlichen Dünndarms durch die HROC-Zelllinien aufgrund ihres kanzerogenen Ursprunges und die damit verbundene Alteration relevanter Charakteristika wie Expression und Regulation von Enzymen und Transportern nicht vollständig abgebildet werden. Überraschend waren in diesem Zusammenhang die Ergebnisse zur Charakterisierung der rektal-abstammenden Linien HROC126 und HROC239 T0 M1. Beide Linien zeigten konfluenzabhängige Effekte auf das Expressionsniveau. Insbesondere HROC239 T0 M1 zeigte hierbei eine hohe Ähnlichkeit zu nativem Dünndarm- bzw. jejunalem Gewebe mit schwachen regulativen Effekten auf die *CYP3A4*-Aktivität sowie *ABCB1*- und *ABCG2*-Expression. Darüber hinaus war der Nachweis der *SLCO2B1*-Expression unerwartet, da eine Expression in rektalem Gewebe bislang nicht beschrieben ist (Kinzi et al. 2021). Aufgrund des rektalen Ursprunges in Kombination mit jejunalen Eigenschaften stellt HROC239 T0 M1 möglicherweise ein geeignetes Modell zur Untersuchung rektaler Medikamentengabe dar.

Trotz ihres kolonischen Ursprunges spiegelten die HROC-Zelllinien zum Teil jedoch dünndarmspezifische Eigenschaften wider (Tabelle A2). Verbleibende jejunale Eigenschaften in einer Untergruppe der untersuchten HROC-Linien könnte auf unterschiedliche Lokalisationen

der korrespondierenden Primärtumoren innerhalb des gastrointestinalen Traktes zurückzuführen sein.

Die Mucin-Schicht ist permanent luminalen Inhaltsstoffen ausgesetzt und spielt daher eine große Rolle bei der Regulierung para- und transzellulär diffundierender Nährstoffe, Ionen oder auch Arzneimitteln (van Eyken et al. 2014). Im Caco-2-Modell bleibt die Vorhersage möglicher Wechselwirkungen mit der Mucin-Schicht sowie der Einfluss auf die Absorption und Verteilung von Arzneistoffen aufgrund fehlender Becherzellen bislang unberücksichtigt. Neben der Enterozytenmembran sollte die Mucin-Schicht zur Vorhersage der ADME-Parameter jedoch als zusätzliche biologische Barriere betrachtet werden (Lock et al. 2018). Vor diesem Hintergrund werden Ko-Kulturen von Caco-2 mit Mucin-sezernierenden KRK-Zelllinien HT29-MTX und HT29-FU verwendet, um die Becherzellen des Dünndarms weitestgehend darzustellen (Pontier et al. 2001). Hierbei wurde in Untersuchungen gezeigt, dass nur etwa 5 % der HT29-Zellen in Mucin-sezernierende Becherzellen differenzieren (Huet et al. 1995). In Anbetracht dieser geringen Zahl sich differenzierender Zellen und der im Gegensatz dazu starken MUC2-Expression in HROC43 könnte diese Linie eine bessere Alternative zu etablierten Ko-Kulturen darstellen. Durch den Wegfall dieser bislang notwendigen Ko-Kultivierung zur Simulation der Mucin-Schicht ist die Verwendung der HROC-Zellmodelle durch vereinfachte Kultivierungsbedingungen zeitsparender und kostengünstiger.

Gegenwärtig werden Substanzen bei der Entwicklung neuartiger Wirkstoffe zunächst mithilfe 2D-Zellkultur-basierter Methoden geprüft. Etablierte Zelllinien zeichnen sich zwar durch einfache Handhabung und leicht durchführbare Expressionsanalysen aus, diese unterliegen hingegen einigen Limitationen (Liu und Chen 2018). Als wichtigster Nachteil gilt das Wachstum der Zellen auf einer flachen Oberfläche, wodurch Nährstoffe und Wachstumsfaktoren uneingeschränkt zur Verfügung stehen (Pampaloni et al. 2007). 2D-Zellkulturmodelle sind somit auch in der Reflektion zellulärer Heterogenität, Zell-Zell-Kommunikation und Gewebespezifischer Struktur stark eingeschränkt (Baker und Chen 2012). Bislang haben sich humane induzierte pluripotente Stammzell-abgeleitete Enterozyten-ähnliche Zellen als geeignete Alternative zu gewöhnlichen 2D-Zellkulturmodellen wie Caco-2 bewährt (Negoro et al. 2016). Der Differenzierungsprozess ist jedoch vergleichsweise zeitaufwendig und somit kostenintensiver. Ein weiterer Nachteil zellbasierter Modelle wie Caco-2 ist die limitierte Reproduzierbarkeit, die durch veränderte Kulturbedingungen wie unterschiedliche Zellkulturmedien oder Anzahl der Passagen stark beeinflusst wird (Meunier et al. 1995; Ohura et al. 2016). Ein wichtiger Vorteil des charakterisierten HROC-Zellpanels insbesondere im Vergleich zu Caco-2 sind die bekannt niedrigen Passagen. Hierdurch lassen sich passagenabhängige Alterationen funktioneller Eigenschaften minimieren. Gleichzeitig bleiben die Charakteristika des Original-Tumors weitestgehend erhalten. Weiterer Vorteil der HROC-Modelle sind außerdem

Unterschiede im somatischen Mutationsprofil (Abbildung A2). Zusammen mit abweichenden Charakteristika hinsichtlich Chemosensitivität, Zelldifferenzierung, Expressionslevel und Regulierungspotential soll die Charakterisierung des Panels auch darauf abzielen, Modelle zur Prüfung von Wirkstoffen für zielgerichtete Therapien bereitzustellen. Die immortalisierten HROC-Linien sind zudem durch eine schnelle Proliferationszeit und einfache Kultivierung charakterisiert und benötigen keine Medium-Zusätze, um zelllinienspezifisch in IECs zu differenzieren.

In den letzten Jahrzehnten hat die Entwicklung konventioneller intestinaler *in vitro* und *ex vivo* Modelle, darunter klassische 2D-Zellkulturmodelle, Transwell-Zellkultureinsätze und Ussing-Kammern einen nennenswerten Beitrag für die Darmforschung geleistet. Diese Modelle haben in erheblichem Maße dazu beigetragen, die Physiologie und Pathologie des Gastrointestinaltraktes zu untersuchen und zu verstehen. Noch immer ist jedoch die Simulation im Darm ablaufender Prozesse anhand von *in vivo* Tierversuchen und *ex vivo* Darmschnitten schwer nachzustellen. *In vitro* Modelle zeichnen sich hierbei insbesondere durch die Anwendung für HTS und gut kontrollierbaren und reproduzierbaren Bedingungen aus, die eine relativ gute Vorhersagekraft der humanen intestinalen *in vivo* Situation mit sich bringt (Costa und Ahluwalia 2019). Des Weiteren bieten *in vitro* Zellkulturmodelle die Möglichkeit, zelluläre biologische Prozesse zu untersuchen, während ethische Aspekte und hohe Kosten in Verbindung mit intestinalen *in vivo* Proben oder Versuchstieren reduziert werden (Cencic und Langerholc 2010). Im Gegensatz zu 2D-Zellkulturmodellen bewahren aus intestinalen Biopsien isolierte Primärzellen die Mehrheit der *in vivo* Eigenschaften, insbesondere in Bezug auf Genexpressionsmuster. Das ganzheitlich vorliegende Genom eignet sich zwar in besonderem Maße für personalisierte Therapien, die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse variiert jedoch innerhalb der isolierten Zellen stark (Mitra et al. 2013). Bisher gelang die Primärkultur lebensfähiger differenzierter Enterozyten, die aus humanen fetalen Dünndarmzellen generiert wurden. Die Kulturen sind allerdings durch eine verkürzte Überlebenszeit von nur wenigen Tagen in konventionellen Kultursystemen gegenüber herkömmlichen Modellen benachteiligt (Perreault und Beaulieu 1998).

Die neuesten Entwicklungen mikrophysiologischer Systeme zeigten großes Potential in ihrer Anwendung und gelten mitunter als unverzichtbar bei der Darstellung physiologischer Schlüsselparameter im menschlichen Körper. Die Entwicklung eines geschlossenen Systems mit integrierten ADME-Prozessen wäre dabei für die pharmazeutische Industrie von zentraler Bedeutung (Ramadan et al. 2021). Von Modellen wie mikrofluidischen Systemen ist jedoch bekannt, dass diese höhere TEER-Werte von 3 000 bis 4 000 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ aufzeigen, als die unter statischen Bedingungen kultivierten Kontroll-Kulturen mit einem TEER von 700 bis 800 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ (Kim et al. 2012). Bislang ist jedoch nicht bekannt, inwiefern TEER-Werte statischer und mikrofluidischer Systeme miteinander vergleichbar sind (Srinivasan et al. 2015).

Unabhängig davon sind diese Modelle geeignet, den Einfluss von Scherstress auf die Barrierefunktion gastrointestinaler Gewebe zu untersuchen. In diesem Zusammenhang würde HROC60 aufgrund hoher TEER-Werte und Langzeitkultur-Charakteristika ein geeignetes Modell für die Verwendung in mikrofluidischen Systemen darstellen, wenngleich die Nachstellung der humanen physiologischen Parameter reduziert ist (Amidon et al. 1999).

5.8 Limitationen dieser Arbeit

In dieser Arbeit wurden unterschiedliche Methoden zur Untersuchung dünndarmspezifischer Eigenschaften in den HROC-Zelllinien angewendet. Ein direkter Vergleich mit nativem Dünndarmgewebe war dabei nicht durchgehend möglich. Aufgrund methodischer Limitationen erfolgte die Untersuchung der CYP3A4-Aktivität sowie deren Regulierung durch Rifampicin, VD3 und Dexamethason ausschließlich im Vergleich zu Caco-2. Die exakten Level der CYP3A4-Aktivität in humanem Dünndarm sind unbekannt und waren in dieser Arbeit methodisch nicht ermittelbar. Zudem wurde in weiteren Untersuchungen zur Genexpressionsänderung der Fokus ausschließlich auf regulative Effekte durch Rifampicin und VD3 gelegt. Diese Induktoren wurden auch in weiteren Untersuchungen für pharmazeutische Forschung mit Caco-2 verwendet (Yamashita et al. 2021; Pfrunder et al. 2003). Limitierend war auch, dass die für die HROC-Zelllinien erhobenen Gen- sowie Proteinexpressionsdaten mit unterschiedlichem Referenzgewebe in Relation gesetzt wurden. Ein direkter Vergleich beider Datensätze war somit nicht möglich. Ebenso konnte für die durchflusszytometrischen, fluoreszenzmikroskopischen und REM-Analysen kein Dünndarmgewebe als Referenz verwendet werden.

Der Fokus der visuellen Interpretation der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen lag in dieser Untersuchung auf der Detektion einzelner IECs. Zu viele Faktoren nahmen Einfluss auf die Fluoreszenzintensität und erschwerten somit eine valide Quantifizierung der Proteinexpression. Ähnliche Probleme bei der Fluoreszenzbildauswertung sind auch aus anderen Arbeiten bekannt (Draheim 2009). Größte Schwierigkeit waren vor allem heterogene Fluoreszenzmuster, welche die Messung der Fluoreszenzintensität zuvor definierter Flächenanteile für den direkten Vergleich der Proben verhinderte. Die visuelle Interpretation der Fluoreszenzlokalisierung unterlag somit einer subjektiven Betrachtungsweise und war daher auf die Angabe von Tendenzen limitiert. Durch einen zeitlichen Verzug zwischen den Bildaufnahmen und eine hohe Belichtungszeit bestand weiterhin die Gefahr einer Abnahme der Fluoreszenzintensität und somit einer verzerrten Darstellung. Zudem führten stark fluoreszierende Artefakte durch automatische Anpassung an die Fluoreszenzintensität oftmals zu Schwierigkeiten bei der Erstellung von Aufnahmen. Dies führte zu einer erschwerten Interpretation der Fluoreszenzlokalisierung und Identifikation einzelner IECs. Für die zukünftige Anwendung fluoreszenzmikroskopischer Untersuchungen wäre eine Software zur Bildaus-

wertung von Interesse, die beispielsweise neben der Quantifizierung der Fluoreszenzintensität ebenso die Anzahl der IECs pro Flächenanteil quantitativ bestimmt.

An dieser Stelle sollte erwähnt werden, dass die Durchführung der REM-Analysen vorrangig dem Nachweis von Mikrovilli auf apikaler Seite der Zellmembran diene. Möglicherweise spiegeln die Ergebnisse daher nicht das vollständige Bild der linienspezifischen Zelllandschaft ab. Weitere Untersuchungen zur gezielten REM-Detektion intestinaler epithelialer Zellen, insbesondere für die Kandidaten-Zelllinien HROC43, HROC183 T0 M2 und HROC217 T1 M2 wären von Interesse und würden die Lücken zu einer allumfassenden Charakterisierung der Modelle schließen.

Zusätzlich sollte hervorgehoben werden, dass der Fokus dieser Arbeit auf der Untersuchung der Zelllinien für die Anwendung von pharmakologischen Fragestellungen lag. Daher wurden weitere mögliche Anwendungsgebiete wie Nährstoffabsorption sowie anschließende funktionelle Testungen von GLUT-2 nicht berücksichtigt. Des Weiteren entspricht die Anzahl der für die Proteinbestimmung herangezogenen Transporter nicht der Anzahl der für Expressionsanalysen verwendeten Gene. Auch wurde der Einfluss von Rifampicin und VD3 auf die jeweiligen Proteine nicht analysiert. Grund dafür waren hohe Variationen bei der Proteinbestimmung durch LC-MC/MS, die jedoch für PEPT1, OATP2B1, P-gp und BCRP minimiert waren. Möglicherweise könnten unterschiedlich große Zellpellets und die damit verbundene Normalisierung durch den BCA-Assay zu den erheblichen Schwankungen beigetragen haben.

Aufgrund der umfangreichen Datenlage aus entsprechenden Untersuchungen zur Charakterisierung des Caco-2-Modells sind für die beschriebenen HROC-Zelllinien ergänzende Untersuchungen notwendig, um noch aussagekräftigere Ergebnisse zu erzielen. Hierzu wären weitere experimentelle Untersuchungen zu Hydrolasen, Zell-Zell-Interaktionen, Darstellung des Mikrobioms oder Validierungsuntersuchungen für die Nutzung der Zelllinien als *in vitro* Krankheitsmodelle denkbar (Liu et al. 2023b).

5.9 Ausblick

In den letzten Jahrzehnten stieg mit zunehmendem Wissen um intestinale Aufnahme- und Transportvorgänge und der Notwendigkeit, ADME-Parameter im menschlichen Dünndarm für die präklinische Wirkstoffforschung präzise vorherzusagen, die Nachfrage nach geeigneten *in vitro* Modellen. Die für den Goldstandard Caco-2 ermittelten Limitationen verdeutlichen, dass die Übertragbarkeit der Ergebnisse durch eingeschränkte Darstellung der *in vivo* Situation jedoch nur schwer möglich ist. Um zukünftig valide Vorhersagen für ADME-Parameter bei der Entwicklung neuartiger Arzneistoffe zu gewährleisten, besteht die Notwendigkeit zur Etablierung neuartiger humaner *in vitro* Modelle mit verbesserten Eigenschaften. Noch immer ist das Fehlen einer immortalisierten Dünndarmzelllinie und die Verfügbar-

keit frischer humaner Dünndarmzellen ein limitierender Faktor. Weitere *in vitro* Modelle wie intestinale Stammzellen oder Organoidkulturen gelten als arbeitsaufwändig und teuer und sind zur Optimierung und breiteren Anwendung Bestandteil intensiver Forschung. Kryokonservierte humane KRK-Zelllinien stellen daher noch immer eine geeignete Alternative zu den bisher genutzten intestinalen *in vitro* Modellen dar. Der Vorteil der in dieser Untersuchung beschriebenen immortalisierten HROC-Zelllinien sind deren einfache Handhabung, bekannt tiefe Passagen und deren kommerzielle Nutzung. Erste Studien belegten *in vitro* eine zum Dünndarmepithel *in vivo*-ähnliche Morphologie. Darüber hinaus konnte die funktionelle Anwendung der Zelllinien zur Vorhersage des intestinalen First-Pass-Metabolismus sowie Influx- und Effluxtransport entlang der Darmbarriere gezeigt werden (Przybylla et al. 2022; Przybylla et al. 2023). Zusätzlich zur weiteren Charakterisierung und funktionellen Testung könnten die Kultivierungsbedingungen der Zelllinien in Zukunft dahingehend angepasst werden, um *in vitro* eine noch *in vivo*-ähnlichere Situation darzustellen. So ist die Etablierung der HROC-Zelllinien als 3D-Kulturmodelle zum Erreichen klinisch relevanterer Ergebnisse sowie zur verbesserten Untersuchung von Differenzierungsprozessen und Zell-Zell-Interaktionen denkbar. In diesem Kontext steht durch die Entwicklung alternativer *in vitro* Methoden für die Anwendung in der präklinischen Wirkstoffforschung auch die Befolgung des 3R-Prinzips bei der Durchführung von Tierversuchen im Vordergrund.

Durch Kultivierung der Zellen in mikrofluidischen Systemen wie *gut-on-a-chip*-Modellen könnte zusätzlich eine Grundlage geschaffen werden, um die physiologisch komplexen Prozesse entlang des Dünndarmepithels *in vitro* weitestgehend zu simulieren. Neben der Nutzung der Zelllinien für die präklinische Wirkstoffanalytik könnten die Modelle auch in weiteren Anwendungsgebieten wie der Stammzellforschung oder zur Untersuchung der Nahrungsmittelaufnahme, des gastrointestinalen Mikrobioms sowie Auswirkungen auf Umweltbelastungen, beispielsweise durch Mikroplastik, genutzt werden.

6 Literaturverzeichnis

Allendörfer, Jens; Estler, Claus-Jürgen; Schmidt, Harald (2006): Pharmakologie und Toxikologie. Für Studium und Praxis; mit 281 Tabellen. 6., vollst. überarb. und erw. Aufl. Stuttgart [u.a.]: Schattauer. ISBN: 3794522958.

Allikmets, R.; Gerrard, B.; Hutchinson, A.; Dean, M. (1996): Characterization of the human ABC superfamily: isolation and mapping of 21 new genes using the expressed sequence tags database. In: *Human molecular genetics* 5 (10), S. 1649–1655. DOI: 10.1093/hmg/5.10.1649.

Alqahtani, Mohammed S.; Kazi, Mohsin; Alsenaidy, Mohammad A.; Ahmad, Muhammad Z. (2021): Advances in Oral Drug Delivery. In: *Frontiers in pharmacology* 12, S. 618411. DOI: 10.3389/fphar.2021.618411.

Amasheh, S.; Fromm, M.; Günzel, D. (2011): Claudins of intestine and nephron - a correlation of molecular tight junction structure and barrier function. In: *Acta physiologica (Oxford, England)* 201 (1), S. 133–140. DOI: 10.1111/j.1748-1716.2010.02148.x.

Amidon, Gordon L.; Lee, Ping I.; Topp, Elizabeth M. (1999): Transport Processes in Pharmaceutical Systems: CRC Press. DOI: 10.1201/9780203909478.

Anderson, J. M. (2001): Molecular structure of tight junctions and their role in epithelial transport. In: *News in physiological sciences : an international journal of physiology produced jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society* 16, S. 126–130. DOI: 10.1152/physiologyonline.2001.16.3.126.

Antunes, Filipa; Andrade, Fernanda; Araújo, Francisca; Ferreira, Domingos; Sarmiento, Bruno (2013): Establishment of a triple co-culture in vitro cell models to study intestinal absorption of peptide drugs. In: *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V* 83 (3), S. 427–435. DOI: 10.1016/j.ejpb.2012.10.003.

Ariza, A.; López, D.; Castellà, E. M.; Muñoz, C.; Zújar, M. J.; Mate, J. L. (1996): Expression of CD15 in normal and metaplastic Paneth cells of the digestive tract. In: *Journal of clinical pathology* 49 (6), S. 474–477. DOI: 10.1136/jcp.49.6.474.

Armingol, Erick; Officer, Adam; Harismendy, Olivier; Lewis, Nathan E. (2021): Deciphering cell-cell interactions and communication from gene expression. In: *Nature reviews. Genetics* 22 (2), S. 71–88. DOI: 10.1038/s41576-020-00292-x.

Arndt, Torsten (2019): Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik. Band 1-3, 3. Aufl., Springer, Heidelberg. DOI: 10.1007/978-3-662-48986-4.

Artursson, P.; Palm, K.; Luthman, K. (2001): Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. In: *Advanced drug delivery reviews* 46 (1-3), S. 27–43. DOI: 10.1016/s0169-409x(00)00128-9.

- Artursson, P.; Ungell, A. L.; Löfroth, J. E. (1993): Selective paracellular permeability in two models of intestinal absorption: cultured monolayers of human intestinal epithelial cells and rat intestinal segments. In: *Pharmaceutical research* 10 (8), S. 1123–1129. DOI: 10.1023/A:1018903931777.
- Ayehunie, Seyoum; Landry, Tim; Stevens, Zachary; Armento, Alex; Hayden, Patrick; Klausner, Mitchell (2018): Human Primary Cell-Based Organotypic Microtissues for Modeling Small Intestinal Drug Absorption. In: *Pharmaceutical research* 35 (4), S. 72. DOI: 10.1007/s11095-018-2362-0.
- Azman, Maisarah; Sabri, Akmal H.; Anjani, Qonita Kurnia; Mustaffa, Mohd Faiz; Hamid, Khuriah Abdul (2022): Intestinal Absorption Study: Challenges and Absorption Enhancement Strategies in Improving Oral Drug Delivery. In: *Pharmaceuticals* 15 (8). DOI: 10.3390/ph15080975.
- Baeuerle, P. A.; Gires, O. (2007): EpCAM (CD326) finding its role in cancer. In: *British journal of cancer* 96 (3), S. 417–423. DOI: 10.1038/sj.bjc.6603494.
- Baker, Brendon M.; Chen, Christopher S. (2012): Deconstructing the third dimension: how 3D culture microenvironments alter cellular cues. In: *Journal of cell science* 125 (Pt 13), S. 3015–3024. DOI: 10.1242/jcs.079509.
- Balda, M. S.; Flores-Maldonado, C.; Cereijido, M.; Matter, K. (2000): Multiple domains of occludin are involved in the regulation of paracellular permeability. In: *Journal of cellular biochemistry* 78 (1), S. 85–96. DOI:10.1002/(SICI)1097-4644(20000701)78:13.3.CO;2-6.
- Basson, M. D.; Turowski, G.; Emenaker, N. J. (1996): Regulation of human (Caco-2) intestinal epithelial cell differentiation by extracellular matrix proteins. In: *Experimental cell research* 225 (2), S. 301–305. DOI: 10.1006/excr.1996.0180.
- Bazzocco, Sarah; Dopeso, Higinio; Carton-Garcia, Fernando; Macaya, Irati; Andretta, Elena; Chionh, Fiona et al. (2015): Highly Expressed Genes in Rapidly Proliferating Tumor Cells as New Targets for Colorectal Cancer Treatment. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 21 (16), S. 3695–3704. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-2457.
- Bednarek, Radoslaw (2022): In Vitro Methods for Measuring the Permeability of Cell Monolayers. In: *Methods and protocols* 5 (1). DOI: 10.3390/mps5010017.
- Beloqui, Ana; Brayden, David J.; Artursson, Per; Pr eat, V eronique; Des Rieux, Anne (2017): A human intestinal M-cell-like model for investigating particle, antigen and microorganism translocation. In: *Nature protocols* 12 (7), S. 1387–1399. DOI: 10.1038/nprot.2017.041.
- Benson, Kathrin; Cramer, Sandra; Galla, Hans-Joachim (2013): Impedance-based cell monitoring: barrier properties and beyond. In: *Fluids and barriers of the CNS* 10 (1), S. 5. DOI: 10.1186/2045-8118-10-5.
- BfR (2021): Verwendung von Versuchstieren im Jahr 2021. Online: https://www.bf3r.de/de/verwendung_von_versuchstieren_im_jahr_2021-309160.html [abgerufen am 18.10.2023].

- Birchenough, G. M. H.; Johansson, M. E. V.; Gustafsson, J. K.; Bergström, J. H.; Hansson, G. C. (2015): New developments in goblet cell mucus secretion and function. In: *Mucosal immunology* 8 (4), S. 712–719. DOI: 10.1038/mi.2015.32.
- Bjarnason, I.; MacPherson, A.; Hollander, D. (1995): Intestinal permeability: an overview. In: *Gastroenterology* 108 (5), S. 1566–1581. DOI: 10.1016/0016-5085(95)90708-4.
- Blank, M.; Klussmann, E.; Krüger-Krasagakes, S.; Schmitt-Gräff, A.; Stolte, M.; Bornhoeft, G. et al. (1994): Expression of MUC2-mucin in colorectal adenomas and carcinomas of different histological types. In: *International journal of cancer* 59 (3), S. 301–306. DOI: 10.1002/ijc.2910590302.
- Blondy, Sabrina; David, Valentin; Verdier, Mireille; Mathonnet, Muriel; Perraud, Aurélie; Christou, Niki (2020): 5-Fluorouracil resistance mechanisms in colorectal cancer: From classical pathways to promising processes. In: *Cancer science* 111 (9), S. 3142–3154. DOI: 10.1111/cas.14532.
- Bock, Karl Walter; Köhle, Christoph (2005): UDP-glucuronosyltransferase 1A6: structural, functional, and regulatory aspects. In: *Methods in enzymology* 400, S. 57–75. DOI: 10.1016/S0076-6879(05)00004-2.
- Bohórquez, Diego V.; Chandra, Rashmi; Samsa, Leigh Ann; Vigna, Steven R.; Liddle, Rodger A. (2011): Characterization of basal pseudopod-like processes in ileal and colonic PYY cells. In: *Journal of molecular histology* 42 (1), S. 3–13. DOI: 10.1007/s10735-010-9302-6.
- Brandes, Ralf; Lang, Florian; Schmidt, Robert F. (2019): Physiologie des Menschen. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. DOI: 10.1007/978-3-662-56468-4.
- Breslin, Susan; O'Driscoll, Lorraine (2013): Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. In: *Drug discovery today* 18 (5-6), S. 240–249. DOI: 10.1016/j.drudis.2012.10.003.
- Brück, S.; Strohmeier, J.; Busch, D.; Drozdzik, M.; Oswald, S. (2017): Caco-2 cells - expression, regulation and function of drug transporters compared with human jejunal tissue. In: *Biopharmaceutics & drug disposition* 38 (2), S. 115–126. DOI: 10.1002/bdd.2025.
- Brueck, Susanne; Bruckmueller, Henrike; Wegner, Danilo; Busch, Diana; Martin, Paul; Oswald, Stefan et al. (2019): Transcriptional and Post-Transcriptional Regulation of Duodenal P-Glycoprotein and MRP2 in Healthy Human Subjects after Chronic Treatment with Rifampin and Carbamazepine. In: *Molecular pharmaceutics* 16 (9), S. 3823–3830. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.9b00458.
- Cabellos, Joan; Delpivo, Camilla; Fernández-Rosas, Elisabet; Vázquez-Campos, Socorro; Janer, Gemma (2017): Contribution of M-cells and other experimental variables in the translocation of TiO₂ nanoparticles across in vitro intestinal models. In: *NanoImpact* 5, S. 51–60. DOI: 10.1016/j.impact.2016.12.005.
- Cai, Yike; Xu, Chenshu; Chen, Peiyi; Hu, Jinqing; Hu, Rong; Huang, Min; Bi, Huichang (2014): Development, validation, and application of a novel 7-day Caco-2 cell culture system. In: *Journal of pharmaceutical and toxicological methods* 70 (2), S. 175–181. DOI: 10.1016/j.vascn.2014.07.001.

- Cano-Cebrián, María José; Zornoza, Teodoro; Granero, Luis; Polache, Ana (2005): Intestinal absorption enhancement via the paracellular route by fatty acids, chitosans and others: a target for drug delivery. In: *Current drug delivery* 2 (1), S. 9–22. DOI: 10.2174/1567201052772834.
- Carlberg, Carsten; Molnar, Ferdinand (2012): Current status of vitamin D signaling and its therapeutic applications. In: *Current topics in medicinal chemistry* 12 (6), S. 528–547. DOI: 10.2174/156802612799436623.
- Carulli, Alexis J.; Samuelson, Linda C.; Schnell, Santiago (2014): Unraveling intestinal stem cell behavior with models of crypt dynamics. In: *Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro* 6 (3), S. 243–257. DOI: 10.1039/C3IB40163D.
- Cascorbi, Ingolf (2012): Drug interactions--principles, examples and clinical consequences. In: *Deutsches Arzteblatt international* 109 (33-34), 546-55; quiz 556. DOI: 10.3238/arztebl.2012.0546.
- Cencic, Avreljia; Langerholc, Tomaz (2010): Functional cell models of the gut and their applications in food microbiology--a review. In: *International journal of food microbiology* 141 Suppl 1, S4-14. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.03.026.
- Chan, Laretta M. S.; Lowes, Simon; Hirst, Barry H. (2004): The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability. In: *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* 21 (1), S. 25–51. DOI: 10.1016/j.ejps.2003.07.003.
- Chawla, A.; Repa, J. J.; Evans, R. M.; Mangelsdorf, D. J. (2001): Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. In: *Science (New York, N.Y.)* 294 (5548), S. 1866–1870. DOI: 10.1126/science.294.5548.1866.
- Chediack, J. G.; Caviedes-Vidal, E.; Fasulo, V.; Yamin, L. J.; Karasov, W. H. (2003): Intestinal passive absorption of water-soluble compounds by sparrows: effect of molecular size and luminal nutrients. In: *Journal of comparative physiology. B, Biochemical, systemic, and environmental physiology* 173 (3), S. 187–197. DOI: 10.1007/s00360-002-0314-8.
- Chelakkot, Chaithanya; Ghim, Jaewang; Ryu, Sung Ho (2018): Mechanisms regulating intestinal barrier integrity and its pathological implications. In: *Experimental & molecular medicine* 50 (8), S. 1–9. DOI: 10.1038/s12276-018-0126-x.
- Chen, Hanqing; Wang, Bing; Zhao, Ruifang; Di Gao; Guan, Ming; Zheng, Lingna et al. (2015): Coculture with Low-Dose SWCNT Attenuates Bacterial Invasion and Inflammation in Human Enterocyte-like Caco-2 Cells. In: *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* 11 (34), S. 4366–4378. DOI: 10.1002/smll.201500136.
- Chen, Isaac; Lui, Forshing (2023): StatPearls. Physiology, Active Transport. Treasure Island (FL). PMID: 31613498.
- Chen, Mingqing; Hu, Shuiying; Li, Yang; Gibson, Alice A.; Fu, Qiang; Baker, Sharyn D.; Sparreboom, Alex (2020): Role of Oatp2b1 in Drug Absorption and Drug-Drug Interactions. In: *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 48 (5), S. 419–425. DOI: 10.1124/dmd.119.090316.

- Choi, Min Sik; Kim, Yu Chul; Maeng, Han-Joo (2020): Therapeutic targets of vitamin D receptor ligands and their pharmacokinetic effects by modulation of transporters and metabolic enzymes. In: *J. Pharm. Investig.* 50 (1), S. 1–16. DOI: 10.1007/s40005-019-00429-z.
- Christians, Uwe; Schmitz, Volker; Haschke, Manuel (2005): Functional interactions between P-glycoprotein and CYP3A in drug metabolism. In: *Expert opinion on drug metabolism & toxicology* 1 (4), S. 641–654. DOI: 10.1517/17425255.1.4.641.
- Chunduri, Venkatesh; Maddi, Srinivas (2022): Role of in vitro two-dimensional (2D) and three-dimensional (3D) cell culture systems for ADME-Tox screening in drug discovery and development: a comprehensive review. In: *ADMET & DMPK* 11 (1), S. 1–32. DOI: 10.5599/admet.1513.
- Clevers, Hans (2016): Modeling Development and Disease with Organoids. In: *Cell* 165 (7), S. 1586–1597. DOI: 10.1016/j.cell.2016.05.082.
- Collett, A.; Sims, E.; Walker, D.; He, Y. L.; Ayrton, J.; Rowland, M.; Warhurst, G. (1996): Comparison of HT29-18-C1 and Caco-2 cell lines as models for studying intestinal paracellular drug absorption. In: *Pharmaceutical research* 13 (2), S. 216–221. DOI: 10.1023/a:1016082829111.
- Costa, Joana; Ahluwalia, Arti (2019): Advances and Current Challenges in Intestinal in vitro Model Engineering: A Digest. In: *Frontiers in bioengineering and biotechnology* 7, S. 144. DOI: 10.3389/fbioe.2019.00144.
- Crawley, Scott W.; Mooseker, Mark S.; Tyska, Matthew J. (2014): Shaping the intestinal brush border. In: *The Journal of cell biology* 207 (4), S. 441–451. DOI: 10.1083/jcb.201407015.
- Crosnier, Cécile; Stamatakis, Despina; Lewis, Julian (2006): Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. In: *Nature reviews. Genetics* 7 (5), S. 349–359. DOI: 10.1038/nrg1840.
- Dahlgren, David; Lennernäs, Hans (2019): Intestinal Permeability and Drug Absorption: Predictive Experimental, Computational and In Vivo Approaches. In: *Pharmaceutics* 11 (8). DOI: 10.3390/pharmaceutics11080411.
- Darling, Nicole J.; Mobbs, Claire L.; González-Hau, Ariana L.; Freer, Matthew; Przyborski, Stefan (2020): Bioengineering Novel in vitro Co-culture Models That Represent the Human Intestinal Mucosa With Improved Caco-2 Structure and Barrier Function. In: *Frontiers in bioengineering and biotechnology* 8, S. 992. DOI: 10.3389/fbioe.2020.00992.
- Deli, Mária A. (2009): Potential use of tight junction modulators to reversibly open membranous barriers and improve drug delivery. In: *Biochimica et biophysica acta* 1788 (4), S. 892–910. DOI: 10.1016/j.bbamem.2008.09.016.
- Doke, Sonali K.; Dhawale, Shashikant C. (2015): Alternatives to animal testing: A review. In: *Saudi pharmaceutical journal : SPJ : the official publication of the Saudi Pharmaceutical Society* 23 (3), S. 223–229. DOI: 10.1016/j.jsps.2013.11.002.

- Dothel, Giovanni; Vasina, Valentina; Barbara, Giovanni; Ponti, Fabrizio de (2013): Animal models of chemically induced intestinal inflammation: predictivity and ethical issues. In: *Pharmacology & therapeutics* 139 (1), S. 71–86. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2013.04.005.
- Draheim, V. (2009): In vitro-Modell zur Charakterisierung transportvermittelter biliärer Ausscheidung. Dissertation (Naturwissenschaften). Universität Greifswald, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät. Online: https://epub.ub.uni-greifswald.de/frontdoor/deliver/index/docId/599/file/Diss_Draheim_Viola.pdf [abgerufen am 18.10.2023].
- Drozdik, Marek; Czekawy, Izabela; Oswald, Stefan; Drozdik, Agnieszka (2020): Intestinal drug transporters in pathological states: an overview. In: *Pharmacological reports : PR* 72 (5), S. 1173–1194. DOI: 10.1007/s43440-020-00139-6.
- Drozdik, Marek; Gröer, Christian; Penski, Jette; Lapczuk, Joanna; Ostrowski, Marek; Lai, Yurong et al. (2014): Protein abundance of clinically relevant multidrug transporters along the entire length of the human intestine. In: *Molecular pharmaceuticals* 11 (10), S. 3547–3555. DOI: 10.1021/mp500330y.
- Eissa, Nour; Hussein, Hayam; Hendy, Geoffrey N.; Bernstein, Charles N.; Ghia, Jean-Eric (2018): Chromogranin-A and its derived peptides and their pharmacological effects during intestinal inflammation. In: *Biochemical pharmacology* 152, S. 315–326. DOI: 10.1016/j.bcp.2018.04.009.
- Eloranta, Jyrki J.; Meier, Peter J.; Kullak-Ublick, Gerd A. (2005): Coordinate transcriptional regulation of transport and metabolism. In: *Methods in enzymology* 400, S. 511–530. DOI: 10.1016/S0076-6879(05)00028-5.
- EMA (2012): Guideline on the investigation of drug interactions. Online: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-investigation-drug-interactions-revision-1_en.pdf [abgerufen am 18.10.2023].
- Englund, Gunilla; Rorsman, Fredrik; Rönnblom, Anders; Karlbom, Urban; Lazorova, Lucia; Gråsjö, Johan et al. (2006): Regional levels of drug transporters along the human intestinal tract: co-expression of ABC and SLC transporters and comparison with Caco-2 cells. In: *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* 29 (3-4), S. 269–277. DOI: 10.1016/j.ejps.2006.04.010.
- Estudante, Margarida; Morais, José G.; Soveral, Graça; Benet, Leslie Z. (2013): Intestinal drug transporters: an overview. In: *Advanced drug delivery reviews* 65 (10), S. 1340–1356. DOI: 10.1016/j.addr.2012.09.042.
- Ewe, K.; Karch, U. (1987): Funktionen des Magen-Darm-Kanals. In: Robert F. Schmidt und Gerhard Thews (Hg.): *Physiologie des Menschen*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, S. 733–777. DOI: 10.1007/978-3-662-09340-5_29.
- Fanning, A. S.; Jameson, B. J.; Jesaitis, L. A.; Anderson, J. M. (1998): The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. In: *The Journal of biological chemistry* 273 (45), S. 29745–29753. DOI: 10.1074/jbc.273.45.29745.

- FDA (2018): Biopharmaceutics classification. System-based biowaivers. Online: https://www.fda.gov/files/guidance%20documents/published/M9-Biopharmaceutics_Classification-System-Based-Biowaivers.pdf [abgerufen am 18.10.2023].
- Ferruzza, Simonetta; Rossi, Carlotta; Scarino, Maria Laura; Sambuy, Yula (2012): A protocol for in situ enzyme assays to assess the differentiation of human intestinal Caco-2 cells. In: *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 26 (8), S. 1247–1251. DOI: 10.1016/j.tiv.2011.11.007.
- Fish, Elizabeth M.; Burns, Bracken (2023): StatPearls. Physiology, Small Bowel. Treasure Island (FL). PMID: 30335296.
- Fodde, Riccardo; Verhagen, Mathijs; Joosten, Rosalie; Schmitt, Mark; Sacchetti, Andrea; Choi, Jiahn et al. (2023): Paneth cells as the origin of intestinal cancer in the context of inflammation. In: *Research square*. DOI: 10.21203/rs.3.rs-2458794/v1.
- Fogh, J.; Fogh, J. M.; Orfeo, T. (1977): One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. In: *Journal of the National Cancer Institute* 59 (1), S. 221–226. DOI: 10.1093/jnci/59.1.221.
- Framson, P. E.; Cho, D. H.; Lee, L. Y.; Hershberg, R. M. (1999): Polarized expression and function of the costimulatory molecule CD58 on human intestinal epithelial cells. In: *Gastroenterology* 116 (5), S. 1054–1062. DOI: 10.1016/s0016-5085(99)70008-9.
- Friend, D. S.; Gilula, N. B. (1972): Variations in tight and gap junctions in mammalian tissues. In: *The Journal of cell biology* 53 (3), S. 758–776. DOI: 10.1083/jcb.53.3.758.
- Fuchs, H.-F.; Donner, M. W.; Beyer, D.; Hellstern, A.; Hofmann-Preiss, K.; Jessen, K. et al. (Hg.) (1990): Gastrointestinaltrakt. Diagnostik mit bildgebenden Verfahren. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; Imprint; Springer (Klinische Radiologie, Diagnostik mit bildgebenden Verfahren). ISBN: 978-3540174066.
- Fujii, Masayuki; Matano, Mami; Toshimitsu, Kohta; Takano, Ai; Mikami, Yohei; Nishikori, Shingo et al. (2018): Human Intestinal Organoids Maintain Self-Renewal Capacity and Cellular Diversity in Niche-Inspired Culture Condition. In: *Cell stem cell* 23 (6), 787-793.e6. DOI: 10.1016/j.stem.2018.11.016.
- Fujiwara, Ryoichi; Takenaka, Saya; Hashimoto, Mitsuhiro; Narawa, Tomoya; Itoh, Tomoo (2014): Expression of human solute carrier family transporters in skin: possible contributor to drug-induced skin disorders. In: *Scientific Reports* 4. DOI: 10.1038/srep05251.
- Furuse, M.; Fujita, K.; Hiiragi, T.; Fujimoto, K.; Tsukita, S. (1998): Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. In: *The Journal of cell biology* 141 (7), S. 1539–1550. DOI: 10.1083/jcb.141.7.1539.
- Furuse, M.; Hirase, T.; Itoh, M.; Nagafuchi, A.; Yonemura, S.; Tsukita, S. (1993): Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. In: *The Journal of cell biology* 123 (6 Pt 2), S. 1777–1788. DOI: 10.1083/jcb.123.6.1777.

- Gandalovičová, Aneta; Rosel, Daniel; Fernandes, Michael; Veselý, Pavel; Heneberg, Petr; Čermák, Vladimír et al. (2017): Migrastatics-Anti-metastatic and Anti-invasion Drugs: Promises and Challenges. In: *Trends in cancer* 3 (6), S. 391–406. DOI: 10.1016/j.trecan.2017.04.008.
- Gehart, Helmuth; Clevers, Hans (2019): Tales from the crypt: new insights into intestinal stem cells. In: *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology* 16 (1), S. 19–34. DOI: 10.1038/s41575-018-0081-y.
- Geick, A.; Eichelbaum, M.; Burk, O. (2001): Nuclear receptor response elements mediate induction of intestinal MDR1 by rifampin. In: *The Journal of biological chemistry* 276 (18), S. 14581–14587. DOI: 10.1074/jbc.M010173200.
- Gervasini, Guillermo; García-Martín, Elena; Ladero, José M.; Pizarro, Rosa; Sastre, Javier; Martínez, Carmen et al. (2007): Genetic variability in CYP3A4 and CYP3A5 in primary liver, gastric and colorectal cancer patients. In: *BMC cancer* 7, S. 118. DOI: 10.1186/1471-2407-7-118.
- Ghaffarian, Rasa; Muro, Silvia (2013): Models and methods to evaluate transport of drug delivery systems across cellular barriers. In: *Journal of visualized experiments : JoVE* (80), e50638. DOI: 10.3791/50638.
- Gomez, G.; Zhang, T.; Rajaraman, S.; Thakore, K. N.; Yanaihara, N.; Townsend, C. M. et al. (1995): Intestinal peptide YY: ontogeny of gene expression in rat bowel and trophic actions on rat and mouse bowel. In: *The American journal of physiology* 268 (1 Pt 1), G71-81. DOI: 10.1152/ajpgi.1995.268.1.G71.
- Gordon, Sarah; Daneshian, Mardas; Bouwstra, Joke; Caloni, Francesca; Constant, Samuel; Davies, Donna E. et al. (2015): Non-animal models of epithelial barriers (skin, intestine and lung) in research, industrial applications and regulatory toxicology. In: *ALTEX* 32 (4), S. 327–378. DOI: 10.14573/altex.1510051.
- Gröer, C.; Brück, S.; Lai, Y.; Paulick, A.; Busemann, A.; Heidecke, C. D. et al. (2013): LC-MS/MS-based quantification of clinically relevant intestinal uptake and efflux transporter proteins. In: *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 85, S. 253–261. DOI: 10.1016/j.jpba.2013.07.031.
- Guengerich, F. P. (1999): Cytochrome P-450 3A4: regulation and role in drug metabolism. In: *Annual review of pharmacology and toxicology* 39, S. 1–17. DOI: 10.1146/annurev.pharmtox.39.1.1.
- Guengerich, F. P. (2001): Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. In: *Chemical research in toxicology* 14 (6), S. 611–650. DOI: 10.1021/tx0002583.
- Gupta, Vivek; Doshi, Nishit; Mitragotri, Samir (2013): Permeation of insulin, calcitonin and exenatide across Caco-2 monolayers: measurement using a rapid, 3-day system. In: *PloS one* 8 (2), e57136. DOI: 10.1371/journal.pone.0057136.
- Habano, Wataru; Gamo, Toshie; Terashima, Jun; Sugai, Tamotsu; Otsuka, Koki; Wakabayashi, Go; Ozawa, Shogo (2011): Involvement of promoter methylation in the regulation of Pregnane X receptor in colon cancer cells. In: *BMC cancer* 11, S. 81. DOI: 10.1186/1471-2407-11-81.

- Haorah, James; Schall, Kathy; Ramirez, Servio H.; Persidsky, Yuri (2008): Activation of protein tyrosine kinases and matrix metalloproteinases causes blood-brain barrier injury: Novel mechanism for neurodegeneration associated with alcohol abuse. In: *Glia* 56 (1), S. 78–88. DOI: 10.1002/glia.20596.
- Hardin, J. A.; Buret, A.; Meddings, J. B.; Gall, D. G. (1993): Effect of epidermal growth factor on enterocyte brush-border surface area. In: *The American journal of physiology* 264 (2 Pt 1), G312-8. DOI: 10.1152/ajpgi.1993.264.2.G312.
- Haroun, Elio; Kumar, Prashanth Ashok; Saba, Ludovic; Kassab, Joseph; Ghimire, Krishna; Dutta, Dibyendu; Lim, Seah H. (2023): Intestinal barrier functions in hematologic and oncologic diseases. In: *Journal of translational medicine* 21 (1), S. 233. DOI: 10.1186/s12967-023-04091-w.
- Hayashi, Masahiro; Tomita, Mikio; Awazu, Shoji (1997): Transcellular and paracellular contribution to transport processes in the colorectal route. In: *Advanced drug delivery reviews* 28 (2), S. 191–204. DOI: 10.1016/S0169-409X(97)00072-0.
- He, Lei; Vasiliou, Konstandinos; Nebert, Daniel W. (2009): Analysis and update of the human solute carrier (SLC) gene superfamily. In: *Human genomics* 3 (2), S. 195–206. DOI: 10.1186/1479-7364-3-2-195.
- Heath, J. P. (1996): Epithelial cell migration in the intestine. In: *Cell biology international* 20 (2), S. 139–146. DOI: 10.1006/cbir.1996.0018.
- Heiskala, M.; Peterson, P. A.; Yang, Y. (2001): The roles of claudin superfamily proteins in paracellular transport. In: *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 2 (2), S. 93–98. DOI: 10.1034/j.1600-0854.2001.020203.x.
- Hickey, John W.; Becker, Winston R.; Nevins, Stephanie A.; Horning, Aaron; Perez, Almudena Espin; Zhu, Chenchen et al. (2023): Organization of the human intestine at single-cell resolution. In: *Nature* 619 (7970), S. 572–584. DOI: 10.1038/s41586-023-05915-x.
- Hidalgo, Ismael J.; Raub, Thomas J.; Borchardt, Ronald T. (1989): Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. In: *Gastroenterology* 96 (3), S. 736–749. DOI: 10.1016/0016-5085(89)90897-4.
- Hilgendorf, C.; Spahn-Langguth, H.; Regårdh, C. G.; Lipka, E.; Amidon, G. L.; Langguth, P. (2000): Caco-2 versus Caco-2/HT29-MTX co-cultured cell lines: permeabilities via diffusion, inside- and outside-directed carrier-mediated transport. In: *Journal of pharmaceutical sciences* 89 (1), S. 63–75. DOI: 10.1002/(SICI)1520-6017(200001)89:1<63::AID-JPS7>3.0.CO;2-6.
- Hilgendorf, Constanze; Ahlin, Gustav; Seithel, Annick; Artursson, Per; Ungell, Anna-Lena; Karlsson, Johan (2007): Expression of thirty-six drug transporter genes in human intestine, liver, kidney, and organotypic cell lines. In: *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 35 (8), S. 1333–1340. DOI: 10.1124/dmd.107.014902.
- Hilgers, A. R.; Conradi, R. A.; Burton, P. S. (1990): Caco-2 cell monolayers as a model for drug transport across the intestinal mucosa. In: *Pharmaceutical research* 7 (9), S. 902–910. DOI: 10.1023/A:1015937605100.

- Ho, Ming-Chih David; Ring, Nicholas; Amaral, Kirsten; Doshi, Utkarsh; Li, Albert P. (2017): Human Enterocytes as an In Vitro Model for the Evaluation of Intestinal Drug Metabolism: Characterization of Drug-Metabolizing Enzyme Activities of Cryopreserved Human Enterocytes from Twenty-Four Donors. In: *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 45 (6), S. 686–691. DOI: 10.1124/dmd.116.074377.
- Hoevel, Thorsten; Macek, Robert; Swisshelm, Karen; Kubbies, Manfred (2004): Reexpression of the TJ protein CLDN1 induces apoptosis in breast tumor spheroids. In: *International journal of cancer* 108 (3), S. 374–383. DOI: 10.1002/ijc.11571.
- Hoffmann, Pascal; Burmester, Marion; Langeheine, Marion; Brehm, Ralph; Empl, Michael T.; Seeger, Bettina; Breves, Gerhard (2021): Caco-2/HT29-MTX co-cultured cells as a model for studying physiological properties and toxin-induced effects on intestinal cells. In: *PloS one* 16 (10). DOI: 10.1371/journal.pone.0257824.
- Hu, Ming; Ling, Jie; Lin, Huimin; Chen, Jun (2004): Use of Caco-2 Cell Monolayers to Study Drug Absorption and Metabolism. In: Zhengyin Yan und Gary W. Caldwell (Hg.): *Optimization in Drug Discovery*. Totowa, NJ: Humana Press, S. 19–35. DOI:10.1385/1-59259-800-5:019.
- Hubatsch, Ina; Ragnarsson, Eva G. E.; Artursson, Per (2007): Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers. In: *Nature protocols* 2 (9), S. 2111–2119. DOI: 10.1038/nprot.2007.303.
- Huet, G.; Kim, I.; Bolos, C. de; Lo-Guidice, J. M.; Moreau, O.; Hemon, B. et al. (1995): Characterization of mucins and proteoglycans synthesized by a mucin-secreting HT-29 cell subpopulation. In: *Journal of cell science* 108 (Pt 3), S. 1275–1285. DOI: 10.1242/jcs.108.3.1275.
- Hughes, A. L. (1994): Evolution of the ATP-binding-cassette transmembrane transporters of vertebrates. In: *Molecular biology and evolution* 11 (6), S. 899–910. DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040163.
- Hunter, J.; Jepson, M. A.; Tsuruo, T.; Simmons, N. L.; Hirst, B. H. (1993): Functional expression of P-glycoprotein in apical membranes of human intestinal Caco-2 cells. Kinetics of vinblastine secretion and interaction with modulators. In: *The Journal of biological chemistry* 268 (20), S. 14991–14997. DOI: 10.1016/S0021-9258(18)82429-2.
- Hunter, Janice; Hirst, Barry H. (1997): Intestinal secretion of drugs. The role of P-glycoprotein and related drug efflux systems in limiting oral drug absorption. In: *Advanced drug delivery reviews* 25 (2-3), S. 129–157. DOI: 10.1016/S0169-409X(97)00497-3.
- Iizuka, Masahiro; Konno, Shiho (2011): Wound healing of intestinal epithelial cells. In: *World journal of gastroenterology* 17 (17), S. 2161–2171. DOI: 10.3748/wjg.v17.i17.2161.
- Ingels, Françoise M.; Augustijns, Patrick F. (2003): Biological, pharmaceutical, and analytical considerations with respect to the transport media used in the absorption screening system, Caco-2. In: *Journal of pharmaceutical sciences* 92 (8), S. 1545–1558. DOI: 10.1002/jps.10408.

- Itoh, M.; Nagafuchi, A.; Moroi, S.; Tsukita, S. (1997): Involvement of ZO-1 in cadherin-based cell adhesion through its direct binding to alpha catenin and actin filaments. In: *The Journal of cell biology* 138 (1), S. 181–192. DOI: 10.1083/jcb.138.1.181.
- Jahn, Kristina A.; Biazik, Joanna M.; Braet, Filip (2011): GM1 expression in caco-2 cells: characterisation of a fundamental passage-dependent transformation of a cell line. In: *Journal of pharmaceutical sciences* 100 (9), S. 3751–3762. DOI: 10.1002/jps.22418.
- Jakoby, W. B.; Ziegler, D. M. (1990): The enzymes of detoxication. In: *The Journal of biological chemistry* 265 (34), S. 20715–20718. DOI: 10.1016/S0021-9258(17)45272-0.
- Jang, Tae Jung; Park, Jeong Bae; Im Lee, Jong (2013): The Expression of CD10 and CD15 Is Progressively Increased during Colorectal Cancer Development. In: *Korean Journal of Pathology* 47 (4), S. 340–347. DOI: 10.4132/KoreanJPathol.2013.47.4.340.
- Jepson, M. A.; Clark, M. A.; Foster, N.; Mason, C. M.; Bennett, M. K.; Simmons, N. L.; Hirst, B. H. (1996): Targeting to intestinal M cells. In: *Journal of anatomy* 189 (Pt 3) (Pt 3), S. 507–516. PMID: 8982824.
- Jiang, Linxia; Sun, Yi; an Lu; Wang, Xiangyu; Shi, Yujie (2022): Ionic Liquids: Promising Approach for Oral Drug Delivery. In: *Pharmaceutical research* 39 (10), S. 2353–2365. DOI: 10.1007/s11095-022-03260-8.
- Kasendra, Magdalena; Luc, Raymond; Yin, Jianyi; Manatakis, Dimitris V.; Kulkarni, Gauri; Lucchesi, Carolina et al. (2020): Duodenum Intestine-Chip for preclinical drug assessment in a human relevant model. In: *eLife* 9. DOI: 10.7554/eLife.50135.
- Kellett, G. L. (2001): The facilitated component of intestinal glucose absorption. In: *The Journal of physiology* 531 (Pt 3), S. 585–595. DOI: 10.1111/j.1469-7793.2001.0585h.x.
- Keysar, Stephen B.; Jimeno, Antonio (2010): More than markers: biological significance of cancer stem cell-defining molecules. In: *Molecular cancer therapeutics* 9 (9), S. 2450–2457. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-10-0530.
- Kim, D. C.; Harrison, A. W.; Ruwart, M. J.; Wilkinson, K. F.; Fisher, J. F.; Hidalgo, I. J.; Borchardt, R. T. (1993): Evaluation of the bile acid transporter in enhancing intestinal permeability to renin-inhibitory peptides. In: *Journal of drug targeting* 1 (4), S. 347–359. DOI: 10.3109/10611869308996094.
- Kim, Hyun Jung; Huh, Dongeun; Hamilton, Geraldine; Ingber, Donald E. (2012): Human gut-on-a-chip inhabited by microbial flora that experiences intestinal peristalsis-like motions and flow. In: *Lab on a chip* 12 (12), S. 2165–2174. DOI: 10.1039/c2lc40074j.
- Kim, T.; Tao-Cheng, J. H.; Eiden, L. E.; Loh, Y. P. (2001): Chromogranin A, an "on/off" switch controlling dense-core secretory granule biogenesis. In: *Cell* 106 (4), S. 499–509. DOI: 10.1016/S0092-8674(01)00459-7.
- Kim, Young S.; Ho, Samuel B. (2010): Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. In: *Current gastroenterology reports* 12 (5), S. 319–330. DOI: 10.1007/s11894-010-0131-2.

- Kinzi, Jonny; Grube, Markus; Meyer Zu Schwabedissen, Henriette E. (2021): OATP2B1 - The underrated member of the organic anion transporting polypeptide family of drug transporters? In: *Biochemical pharmacology* 188, S. 114534. DOI: 10.1016/j.bcp.2021.114534.
- Kishimoto, Wataru; Ishiguro, Naoki; Ludwig-Schwellinger, Eva; Ebner, Thomas; Schaefer, Olaf (2014): In vitro predictability of drug-drug interaction likelihood of P-glycoprotein-mediated efflux of dabigatran etexilate based on I₂/IC₅₀ threshold. In: *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 42 (2), S. 257–263. DOI: 10.1124/dmd.113.053769.
- Klein, Kathrin; Zanger, Ulrich M. (2013): Pharmacogenomics of Cytochrome P450 3A4: Recent Progress Toward the "Missing Heritability" Problem. In: *Frontiers in genetics* 4, S. 12. DOI: 10.3389/fgene.2013.00012.
- Kliwer, Steven A.; Willson, Timothy M. (2002): Regulation of xenobiotic and bile acid metabolism by the nuclear pregnane X receptor. In: *Journal of Lipid Research* 43 (3), S. 359–364. DOI: 10.1016/S0022-2275(20)30141-3.
- Kögl, J. (2018): Expression, Regulation und Funktion von Arzneistofftransportern in Caco-2-Zellen: ein biorelevantes in vitro-Modell für den intestinalen Arzneimitteltransport? Dissertation (Medizin). Universität Greifswald, Institut für Pharmakologie. Online: <https://epub.ub.uni-greifswald.de/frontdoor/deliver/index/docId/2539/file/Dissertation-Koegl.pdf> [abgerufen am 18.10.2023].
- Kolars, J. C.; Lown, K. S.; Schmiedlin-Ren, P.; Ghosh, M.; Fang, C.; Wrighton, S. A. et al. (1994): CYP3A gene expression in human gut epithelium. In: *Pharmacogenetics* 4 (5), S. 247–259. DOI: 10.1097/00008571-199410000-00003.
- Kolars, J. C.; Schmiedlin-Ren, P.; Schuetz, J. D.; Fang, C.; Watkins, P. B. (1992): Identification of rifampin-inducible P450III_{A4} (CYP3A₄) in human small bowel enterocytes. In: *The Journal of Clinical Investigation* 90 (5), S. 1871–1878. DOI: 10.1172/JCI116064.
- Koop, Irmtraut (Hg.) (2010): Gastroenterologie compact. Alles für Klinik und Praxis. 2., komplett überarb., aktualisierte und erw. Aufl. Stuttgart, New York, NY: Thieme. DOI: 10.1055/b-002-11373.
- Kullak-Ublick, Gerd A. (2021): Nukleäre Rezeptoren beim hepatischen und intestinalen Medikamententransport. In: *Drug research* 71 (S 01), S13-S14. DOI: 10.1055/a-1606-5609.
- Kumar, Kalyan K. V.; Karnati, Swathi; Reddy, Mamatha B.; Chandramouli, R. (2010): Caco-2 cell lines in drug discovery- an updated perspective. In: *Journal of basic and clinical pharmacy* 1 (2), S. 63–69. PMID: 24825967.
- Lea, Tor (2015): The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models. Caco-2 Cell Line. Hg. v. Kitty Verhoeckx, Paul Cotter, Iván López-Expósito, Charlotte Kleiveland, Tor Lea, Alan Mackie, et al. Cham (CH). DOI: 10.1007/978-3-319-16104-4.
- Lentz, K. A.; Hayashi, J.; Lucisano, L. J.; Polli, J. E. (2000): Development of a more rapid, reduced serum culture system for Caco-2 monolayers and application to the biopharmaceutics classification

- system. In: *International journal of pharmaceutics* 200 (1), S. 41–51. DOI: 10.1016/S0378-5173(00)00334-3.
- Leturque, A.; Brot-Laroche, E.; Le Gall, M.; Stolarczyk, E.; Tobin, V. (2005): The role of GLUT2 in dietary sugar handling. In: *Journal of physiology and biochemistry* 61 (4), S. 529–537. DOI: 10.1007/BF03168378.
- Lewis, David F. V. (2003): Human cytochromes P450 associated with the phase 1 metabolism of drugs and other xenobiotics: a compilation of substrates and inhibitors of the CYP1, CYP2 and CYP3 families. In: *Current medicinal chemistry* 10 (19), S. 1955–1972. DOI: 10.2174/0929867033456855.
- Li, Ming; Graaf, Inge A. M. de; van de Steeg, Evita; Jager, Marina H. de; Groothuis, Geny M. M. (2017): The consequence of regional gradients of P-gp and CYP3A4 for drug-drug interactions by P-gp inhibitors and the P-gp/CYP3A4 interplay in the human intestine ex vivo. In: *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 40, S. 26–33. DOI: 10.1016/j.tiv.2016.12.002.
- Li, Na; Wang, Dandan; Sui, Zhigang; Qi, Xiaoyi; Ji, Liyun; Wang, Xiuli; Yang, Ling (2013): Development of an improved three-dimensional in vitro intestinal mucosa model for drug absorption evaluation. In: *Tissue engineering. Part C, Methods* 19 (9), S. 708–719. DOI: 10.1089/ten.tec.2012.0463.
- Liddle, Christopher; Goodwin, Bryan (2002): Regulation of hepatic drug metabolism: role of the nuclear receptors PXR and CAR. In: *Seminars in liver disease* 22 (2), S. 115–122. DOI: 10.1055/s-2002-30098.
- Liévin-Le Moal, Vanessa; Servin, Alain L. (2013): Pathogenesis of human enterovirulent bacteria: lessons from cultured, fully differentiated human colon cancer cell lines. In: *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 77 (3), S. 380–439. DOI: 10.1128/mubr.00064-12.
- Lim, S. C. (2005): CD24 and human carcinoma: tumor biological aspects. In: *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 59 Suppl 2, S351-4. DOI: 10.1016/s0753-3322(05)80076-9.
- Lin, J. H.; Chiba, M.; Baillie, T. A. (1999): Is the role of the small intestine in first-pass metabolism overemphasized? In: *Pharmacological reviews* 51 (2), S. 135–158. PMID: 10353984.
- Lin, J. H.; Lu, A. Y. (1998): Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications. In: *Clinical pharmacokinetics* 35 (5), S. 361–390. DOI: 10.2165/00003088-199835050-00003.
- Lin, J. H.; Lu, A. Y. (2001): Interindividual variability in inhibition and induction of cytochrome P450 enzymes. In: *Annual review of pharmacology and toxicology* 41, S. 535–567. DOI: 10.1146/annurev.pharmtox.41.1.535.
- Linnankoski, Johanna; Mäkelä, Johanna; Palmgren, Joni; Mauriala, Timo; Vedin, Charlotta; Ungell, Anna-Lena et al. (2010): Paracellular porosity and pore size of the human intestinal epithelium in tissue and cell culture models. In: *Journal of pharmaceutical sciences* 99 (4), S. 2166–2175. DOI: 10.1002/jps.21961.

- Liu, Jinlong; Zhao, Wenjie; Qin, Meiyang; Luan, Xiaofeng; Li, Yuang; Zhao, Yang et al. (2023a): Real-time measurement of the trans-epithelial electrical resistance in an organ-on-a-chip during cell proliferation. In: *The Analyst* 148 (3), S. 516–524. DOI: 10.1039/d2an01931k.
- Liu, Xiaodong (2019): Transporter-Mediated Drug-Drug Interactions and Their Significance. In: *Advances in experimental medicine and biology* 1141, S. 241–291. DOI: 10.1007/978-981-13-7647-4_5.
- Liu, Yang; Peng, Jiang; Zhu, Shiya; Yu, Leilei; Tian, Fengwei; Zhao, Jianxin et al. (2023b): A Screening Model for Probiotics Against Specific Metabolic Diseases Based on Caco-2 Monolayer Membrane. In: *Engineering* 25, S. 222–233. DOI: 10.1016/j.eng.2022.02.014.
- Liu, Yuan; Chen, Ye-Guang (2018): 2D- and 3D-Based Intestinal Stem Cell Cultures for Personalized Medicine. In: *Cells* 7 (12). DOI: 10.3390/cells7120225.
- Livak, K. J.; Schmittgen, T. D. (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. In: *Methods (San Diego, Calif.)* 25 (4), S. 402–408. DOI: 10.1006/meth.2001.1262.
- Lock, Jaclyn Y.; Carlson, Taylor L.; Carrier, Rebecca L. (2018): Mucus models to evaluate the diffusion of drugs and particles. In: *Advanced drug delivery reviews* 124, S. 34–49. DOI: 10.1016/j.addr.2017.11.001.
- Lopez-Escalera, Silvia; Wellejus, Anja (2022): Evaluation of Caco-2 and human intestinal epithelial cells as in vitro models of colonic and small intestinal integrity. In: *Biochemistry and biophysics reports* 31, S. 101314. DOI: 10.1016/j.bbrep.2022.101314.
- Luo, Wenyi; Hofstetter, Wayne L.; Tan, Dongfeng (2019): Gastroesophageal junction Paneth cell carcinoma with extensive cystic and secretory features - case report and literature review. In: *Diagnostic pathology* 14 (1), S. 1. DOI: 10.1186/s13000-018-0775-z.
- Macedo, Maria Helena; Araújo, Francisca; Martínez, Elena; Barrias, Cristina; Sarmiento, Bruno (2018): iPSC-Derived Enterocyte-like Cells for Drug Absorption and Metabolism Studies. In: *Trends in molecular medicine* 24 (8), S. 696–708. DOI: 10.1016/j.molmed.2018.06.001.
- Mahler, Gretchen J.; Shuler, Michael L.; Glahn, Raymond P. (2009): Characterization of Caco-2 and HT29-MTX cocultures in an in vitro digestion/cell culture model used to predict iron bioavailability. In: *The Journal of nutritional biochemistry* 20 (7), S. 494–502. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2008.05.006.
- Marrero, Denise; Pujol-Vila, Ferran; Vera, Daniel; Gabriel, Gemma; Illa, Xavi; Elizalde-Torrent, Aleix et al. (2021): Gut-on-a-chip: Mimicking and monitoring the human intestine. In: *Biosensors & bioelectronics* 181, S. 113156. DOI: 10.1016/j.bios.2021.113156.
- Martinec, Ondrej; Biel, Carin; Graaf, Inge A. M. de; Hulciak, Martin; Jong, Koert P. de; Staud, Frantisek et al. (2021): Rifampicin Induces Gene, Protein, and Activity of P-Glycoprotein (ABCB1) in Human Precision-Cut Intestinal Slices. In: *Frontiers in pharmacology* 12, S. 684156. DOI: 10.3389/fphar.2021.684156.
- Martins-Gomes, Carlos; Steck, Jan; Keller, Judith; Bunzel, Mirko; Nunes, Fernando M.; Silva, Amélia M. (2022): Molecular Characterization of Thymus capitellatus Extracts and Their Antioxidant,

- Neuroprotective and Anti-Proliferative Activities. In: *International journal of molecular sciences* 23 (23). DOI: 10.3390/ijms232315187.
- Matsumoto, H.; Erickson, R. H.; Gum, J. R.; Yoshioka, M.; Gum, E.; Kim, Y. S. (1990): Biosynthesis of alkaline phosphatase during differentiation of the human colon cancer cell line Caco-2. In: *Gastroenterology* 98 (5 Pt 1), S. 1199–1207. DOI: 10.1016/0016-5085(90)90334-w.
- Meaney, C.; O'Driscoll, C. (1999): Mucus as a barrier to the permeability of hydrophilic and lipophilic compounds in the absence and presence of sodium taurocholate micellar systems using cell culture models. In: *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* 8 (3), S. 167–175. DOI: 10.1016/S0928-0987(99)00007-X.
- Meigs, Lucy; Smirnova, Lena; Rovidia, Costanza; Leist, Marcel; Hartung, Thomas (2018): Animal testing and its alternatives - the most important omics is economics. In: *ALTEX* 35 (3), S. 275–305. DOI: 10.14573/altex.1807041.
- Mendiratta, Shweta; Jain, Shruti; Maini, Jayant; Brahmachari, Vani (2014): Pharmacoepigenomics: an interplay of epigenetic modulation of drug response and modulation of the epigenome by drugs. In: *Current pharmaceutical design* 20 (11), S. 1819–1830. DOI: 10.2174/13816128113199990542.
- Meunier, V.; Bourrié, M.; Berger, Y.; Fabre, G. (1995): The human intestinal epithelial cell line Caco-2; pharmacological and pharmacokinetic applications. In: *Cell biology and toxicology* 11 (3-4), S. 187–194. DOI: 10.1007/BF00756522.
- Michl, Patrick; Barth, Claudia; Buchholz, Malte; Lerch, Markus M.; Rolke, Monika; Holzmann, Karl-Heinz et al. (2003): Claudin-4 expression decreases invasiveness and metastatic potential of pancreatic cancer. In: *Cancer research* 63 (19), S. 6265–6271. PMID: 14559813.
- Mima, Shinji; Tsutsumi, Shinji; Ushijima, Hironori; Takeda, Miho; Fukuda, Ikue; Yokomizo, Kazumi et al. (2005): Induction of claudin-4 by nonsteroidal anti-inflammatory drugs and its contribution to their chemopreventive effect. In: *Cancer research* 65 (5), S. 1868–1876. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-2770.
- Miron, N.; Cristea, V. (2012): Enterocytes: active cells in tolerance to food and microbial antigens in the gut. In: *Clinical and experimental immunology* 167 (3), S. 405–412. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2011.04523.x.
- Misaka, Shingen; Müller, Fabian; Fromm, Martin F. (2013): Clinical relevance of drug efflux pumps in the gut. In: *Current opinion in pharmacology* 13 (6), S. 847–852. DOI: 10.1016/J.COPH.2013.08.010.
- Mitra, Abhisek; Mishra, Lopa; Li, Shulin (2013): Technologies for deriving primary tumor cells for use in personalized cancer therapy. In: *Trends in biotechnology* 31 (6), S. 347–354. DOI: 10.1016/j.tibtech.2013.03.006.
- Miura, Shigenori; Sato, Koji; Kato-Negishi, Midori; Teshima, Tetsuhiko; Takeuchi, Shoji (2015): Fluid shear triggers microvilli formation via mechanosensitive activation of TRPV6. In: *Nature communications* 6, S. 8871. DOI: 10.1038/ncomms9871.

- Miyazaki, Kyohei; Hashimoto, Koichi; Sato, Masatoki; Watanabe, Masahiro; Tomikawa, Naoki; Kanno, Shuto et al. (2017): Establishment of a method for evaluating endothelial cell injury by TNF- α in vitro for clarifying the pathophysiology of virus-associated acute encephalopathy. In: *Pediatric research* 81 (6), S. 942–947. DOI: 10.1038/pr.2017.28.
- Moe, H. (1953): Mucus-producing goblet cells of the small intestine. In: *Nature* 172 (4372), S. 309. DOI: 10.1038/172309a0.
- Moran, Gordon W.; Leslie, Fiona C.; Levison, Scott E.; Worthington, J.; McLaughlin, John T. (2008): Enteroendocrine cells: neglected players in gastrointestinal disorders? In: *Therapeutic advances in gastroenterology* 1 (1), S. 51–60. DOI: 10.1177/1756283X08093943.
- Müller, Janett; Keiser, Markus; Drozdziak, Marek; Oswald, Stefan (2017): Expression, regulation and function of intestinal drug transporters: an update. In: *Biological chemistry* 398 (2), S. 175–192. DOI: 10.1515/hsz-2016-0259.
- Mullins, Christina S.; Micheel, Bianca; Matschos, Stephanie; Leuchter, Matthias; Bürtin, Florian; Krohn, Mathias et al. (2019): Integrated Biobanking and Tumor Model Establishment of Human Colorectal Carcinoma Provides Excellent Tools for Preclinical Research. In: *Cancers* 11 (10). DOI: 10.3390/cancers11101520.
- Murphy, Kenneth; Weaver, Casey; Seidler, Lothar (2018): Das mukosale Immunsystem. In: *Janeway Immunologie*, S. 641–691. DOI: 10.1007/978-3-662-56004-4_12.
- Nagy, Ildikó; Tóth, Beáta; Gáborik, Zsuzsanna; Erdo, Franciska; Krajcsi, Péter (2016): Membrane Transporters in Physiological Barriers of Pharmacological Importance. In: *Current pharmaceutical design* 22 (35), S. 5347–5372. DOI: 10.2174/1381612822666160726101748.
- Nakamura, Tsutomu; Sakaeda, Toshiyuki; Ohmoto, Nobuko; Tamura, Takao; Aoyama, Nobuo; Shirakawa, Toshiro et al. (2002): Real-time quantitative polymerase chain reaction for MDR1, MRP1, MRP2, and CYP3A-mRNA levels in Caco-2 cell lines, human duodenal enterocytes, normal colorectal tissues, and colorectal adenocarcinomas. In: *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 30 (1), S. 4–6. DOI: 10.1124/dmd.30.1.4.
- Nakanishi, Takeo; Ross, Douglas D. (2012): Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2): its role in multidrug resistance and regulation of its gene expression. In: *Chinese journal of cancer* 31 (2), S. 73–99. DOI: 10.5732/cjc.011.10320.
- Nakata, Kotoko; Tanaka, Yoshitomo; Nakano, Tatsuya; Adachi, Tatsuhiko; Tanaka, Hiroshi; Kaminuma, Tsuguchika; Ishikawa, Toshihisa (2006): Nuclear receptor-mediated transcriptional regulation in Phase I, II, and III xenobiotic metabolizing systems. In: *Drug metabolism and pharmacokinetics* 21 (6), S. 437–457. DOI: 10.2133/dmpk.21.437.
- Narai, A.; Arai, S.; Shimizu, M. (1997): Rapid decrease in transepithelial electrical resistance of human intestinal Caco-2 cell monolayers by cytotoxic membrane perturbants. In: *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 11 (4), S. 347–354. DOI: 10.1016/S0887-2333(97)00026-X.

- Neely, W. B. (1960): Dextran: structure and synthesis. In: *Advances in carbohydrate chemistry* 15, S. 341–369. DOI: 10.1016/S0096-5332(08)60191-5.
- Negoro, Ryosuke; Takayama, Kazuo; Nagamoto, Yasuhito; Sakurai, Fuminori; Tachibana, Masashi; Mizuguchi, Hiroyuki (2016): Modeling of drug-mediated CYP3A4 induction by using human iPS cell-derived enterocyte-like cells. In: *Biochemical and biophysical research communications* 472 (4), S. 631–636. DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.03.012.
- Nikolić, Djordje L.; Boettiger, Alistair N.; Bar-Sagi, Dafna; Carbeck, Jeffrey D.; Shvartsman, Stanislav Y. (2006): Role of boundary conditions in an experimental model of epithelial wound healing. In: *American journal of physiology. Cell physiology* 291 (1), C68-75. DOI: 10.1152/ajpcell.00411.2005.
- Noah, Taeko K.; Donahue, Bridgitte; Shroyer, Noah F. (2011): Intestinal development and differentiation. In: *Experimental cell research* 317 (19), S. 2702–2710. DOI: 10.1016/j.yexcr.2011.09.006.
- Ohtsuki, Sumio; Schaefer, Olaf; Kawakami, Hirotaka; Inoue, Tae; Liehner, Stephanie; Saito, Asami et al. (2012): Simultaneous absolute protein quantification of transporters, cytochromes P450, and UDP-glucuronosyltransferases as a novel approach for the characterization of individual human liver: comparison with mRNA levels and activities. In: *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 40 (1), S. 83–92. DOI: 10.1124/dmd.111.042259.
- Ohura, Kayoko; Nishiyama, Hikaru; Saco, Saori; Kurokawa, Keisuke; Imai, Teruko (2016): Establishment and Characterization of a Novel Caco-2 Subclone with a Similar Low Expression Level of Human Carboxylesterase 1 to Human Small Intestine. In: *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 44 (12), S. 1890–1898. DOI: 10.1124/dmd.116.072736.
- Ölander, Magnus; Wiśniewski, Jacek R.; Matsson, Pär; Lundquist, Patrik; Artursson, Per (2016): The Proteome of Filter-Grown Caco-2 Cells With a Focus on Proteins Involved in Drug Disposition. In: *Journal of pharmaceutical sciences* 105 (2), S. 817–827. DOI: 10.1016/j.xphs.2015.10.030.
- Osanai, Makoto; Murata, Masaki; Nishikiori, Nami; Chiba, Hideki; Kojima, Takashi; Sawada, Norimasa (2006): Epigenetic silencing of occludin promotes tumorigenic and metastatic properties of cancer cells via modulations of unique sets of apoptosis-associated genes. In: *Cancer research* 66 (18), S. 9125–9133. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-1864.
- Oswald, Stefan; Gröer, Christian; Drozdziak, Marek; Siegmund, Werner (2013): Mass spectrometry-based targeted proteomics as a tool to elucidate the expression and function of intestinal drug transporters. In: *The AAPS journal* 15 (4), S. 1128–1140. DOI: 10.1208/s12248-013-9521-3.
- Ouwehand, Arthur; Vaughan, Elaine E. (2006): *Gastrointestinal microbiology*. New York: Taylor & Francis. DOI: 10.3109/9781420014952.
- Pabst, R.; Rothkötter, H. J. (1991): Migration von Lymphozyten in den Darm — eine kritische Bestandsaufnahme. In: J. Seifert, R. Ottenjann, M. Zeitz und J. Bockemühl (Hg.): *Ökosystem Darm III*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, S. 98–103. DOI: 10.1007/978-3-642-77098-2_11.

- Paine, M. F.; Shen, D. D.; Kunze, K. L.; Perkins, J. D.; Marsh, C. L.; McVicar, J. P. et al. (1996): First-pass metabolism of midazolam by the human intestine. In: *Clinical pharmacology and therapeutics* 60 (1), S. 14–24. DOI: 10.1016/S0009-9236(96)90162-9.
- Paine, Mary F.; Hart, Heather L.; Ludington, Shana S.; Haining, Robert L.; Rettie, Allan E.; Zeldin, Darryl C. (2006): The human intestinal cytochrome P450 "pie". In: *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 34 (5), S. 880–886. DOI: 10.1124/dmd.105.008672.
- Pampaloni, Francesco; Reynaud, Emmanuel G.; Stelzer, Ernst H. K. (2007): The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 8 (10), S. 839–845. DOI: 10.1038/nrm2236.
- Pan, Xian; Yamazaki, Shinji; Neuhoff, Sibylle; Zhang, Mian; Pilla Reddy, Venkatesh (2021): Unraveling pleiotropic effects of rifampicin by using physiologically based pharmacokinetic modeling: Assessing the induction magnitude of P-glycoprotein-cytochrome P450 3A4 dual substrates. In: *CPT: pharmacometrics & systems pharmacology* 10 (12), S. 1485–1496. DOI: 10.1002/psp4.12717.
- Paris, Luca; Tonutti, Laura; Vannini, Cristina; Bazzoni, Gianfranco (2008): Structural organization of the tight junctions. In: *Biochimica et biophysica acta* 1778 (3), S. 646–659. DOI: 10.1016/j.bbamem.2007.08.004.
- Parker, Aimee; Maclaren, Oliver J.; Fletcher, Alexander G.; Muraro, Daniele; Kreuzaler, Peter A.; Byrne, Helen M. et al. (2017): Cell proliferation within small intestinal crypts is the principal driving force for cell migration on villi. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 31 (2), S. 636–649. DOI: 10.1096/fj.201601002.
- Pastor, Danielle M.; Poritz, Lisa S.; Olson, Thomas L.; Kline, Christina L.; Harris, Leonard R.; Koltun, Walter A. et al. (2010): Primary cell lines: false representation or model system? a comparison of four human colorectal tumors and their coordinately established cell lines. In: *International journal of clinical and experimental medicine* 3 (1), S. 69–83. PMID: 20369042.
- Pearce, Sarah C.; Coia, Heidi G.; Karl, J. P.; Pantoja-Feliciano, Ida G.; Zachos, Nicholas C.; Racicot, Kenneth (2018): Intestinal in vitro and ex vivo Models to Study Host-Microbiome Interactions and Acute Stressors. In: *Frontiers in physiology* 9, S. 1584. DOI: 10.3389/fphys.2018.01584.
- Peng, Ying; Yadava, Preeti; Heikkinen, Aki T.; Parrott, Neil; Railkar, Aruna (2014): Applications of a 7-day Caco-2 cell model in drug discovery and development. In: *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* 56, S. 120–130. DOI: 10.1016/j.ejps.2014.02.008.
- Perreault, N.; Beaulieu, J. F. (1998): Primary cultures of fully differentiated and pure human intestinal epithelial cells. In: *Experimental cell research* 245 (1), S. 34–42. DOI: 10.1006/excr.1998.4221.
- Pfrunder, Arabelle; Gutmann, Heike; Beglinger, Christoph; Drewe, Jürgen (2003): Gene expression of CYP3A4, ABC-transporters (MDR1 and MRP1-MRP5) and hPXR in three different human colon carcinoma cell lines. In: *The Journal of pharmacy and pharmacology* 55 (1), S. 59–66. DOI: 10.1111/j.2042-7158.2003.tb02434.x.

- Pontier, C.; Pachot, J.; Botham, R.; Lenfant, B.; Arnaud, P. (2001): HT29-MTX and Caco-2/TC7 monolayers as predictive models for human intestinal absorption: role of the mucus layer. In: *Journal of pharmaceutical sciences* 90 (10), S. 1608–1619. DOI: 10.1002/jps.1111.
- Porter, E. M.; Bevins, C. L.; Ghosh, D.; Ganz, T. (2002): The multifaceted Paneth cell. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 59 (1), S. 156–170. DOI: 10.1007/s00018-002-8412-z.
- Przybylla, Randy; Krohn, Mathias; Sellin, Marie-Luise; Frank, Marcus; Oswald, Stefan; Linnebacher, Michael (2023): Novel In Vitro Models for Cell Differentiation and Drug Transport Studies of the Human Intestine. In: *Cells* 12 (19), S. 2371. DOI: 10.3390/cells12192371.
- Przybylla, Randy; Mullins, Christina Susanne; Krohn, Mathias; Oswald, Stefan; Linnebacher, Michael (2022): Establishment and Characterization of Novel Human Intestinal In Vitro Models for Absorption and First-Pass Metabolism Studies. In: *International journal of molecular sciences* 23 (17). DOI: 10.3390/ijms23179861.
- Putt, Kelley K.; Pei, Ruisong; White, Heather M.; Bolling, Bradley W. (2017): Yogurt inhibits intestinal barrier dysfunction in Caco-2 cells by increasing tight junctions. In: *Food & function* 8 (1), S. 406–414. DOI: 10.1039/C6FO01592A.
- Radulovic, Katarina; Niess, Jan Hendrik (2015): CD69 is the crucial regulator of intestinal inflammation: a new target molecule for IBD treatment? In: *Journal of immunology research* 2015, S. 497056. DOI: 10.1155/2015/497056.
- Ramadan, Qasem; Fardous, Roa Saleem; Hazaymeh, Rana; Alshmmari, Sultan; Zourob, Mohammed (2021): Pharmacokinetics-On-a-Chip: In Vitro Microphysiological Models for Emulating of Drugs ADME. In: *Advanced biology* 5 (9), e2100775. DOI: 10.1002/adbi.202100775.
- Ranhotra, Harmit S.; Flannigan, Kyle L.; Brave, Martina; Mukherjee, Subhajit; Lukin, Dana J.; Hirota, Simon A.; Mani, Sridhar (2016): Xenobiotic Receptor-Mediated Regulation of Intestinal Barrier Function and Innate Immunity. In: *Nuclear receptor research* 3. DOI: 10.11131/2016/101199.
- Raynal, Caroline; Pascussi, Jean-Marc; Leguelinel, Géraldine; Breuker, Cyril; Kantar, Jovana; Lallemand, Benjamin et al. (2010): Pregnane X Receptor (PXR) expression in colorectal cancer cells restricts irinotecan chemosensitivity through enhanced SN-38 glucuronidation. In: *Molecular cancer* 9, S. 46. DOI: 10.1186/1476-4598-9-46.
- Rezaee, Fariba; Georas, Steve N. (2014): Breaking barriers. New insights into airway epithelial barrier function in health and disease. In: *American journal of respiratory cell and molecular biology* 50 (5), S. 857–869. DOI: 10.1165/rcmb.2013-0541RT.
- Robinson, Kianna; Tiriveedhi, Venkataswarup (2020): Perplexing Role of P-Glycoprotein in Tumor Microenvironment. In: *Frontiers in oncology* 10, S. 265. DOI: 10.3389/fonc.2020.00265.
- Rodgers, Laurel S.; Beam, M. Tanner; Anderson, James M.; Fanning, Alan S. (2013): Epithelial barrier assembly requires coordinated activity of multiple domains of the tight junction protein ZO-1. In: *Journal of cell science* 126 (Pt 7), S. 1565–1575. DOI: 10.1242/jcs.113399.

- Rödl, W.; Hofmann-Preiss, K.; Worlicek, H. (1990): Dünndarm Duodenum — Jejunum — Ileum. In: H.-F. Fuchs, M. W. Donner, D. Beyer, A. Hellstern, K. Hofmann-Preiss, K. Jessen et al. (Hg.): *Gastrointestinaltrakt*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, S. 151–243. DOI: 10.1007/978-3-642-86797-2_4.
- Rodriguez, Luis G.; Wu, Xiaoyang; Guan, Jun-Lin (2005): Wound-healing assay. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 294, S. 23–29. DOI: 10.1385/1-59259-860-9:023.
- Rodriguez-Antona, C.; Ingelman-Sundberg, M. (2006): Cytochrome P450 pharmacogenetics and cancer. In: *Oncogene* 25 (11), S. 1679–1691. DOI: 10.1038/sj.onc.1209377.
- Roebuck, K. A.; Finnegan, A. (1999): Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (CD54) gene expression. In: *Journal of leukocyte biology* 66 (6), S. 876–888. DOI: 10.1002/jlb.66.6.876.
- Rollins, D. E.; Klaassen, C. D. (1979): Biliary excretion of drugs in man. In: *Clinical pharmacokinetics* 4 (5), S. 368–379. DOI: 10.2165/00003088-197904050-00003.
- Romero, Luz; Vela, José Miguel (2014): Alternative Models in Drug Discovery and Development Part I: In Silico and In Vitro Models. In: José M. Vela, Rafael Maldonado und Michel Hamon (Hg.): *In Vivo Models for Drug Discovery: Wiley (Methods and Principles in Medicinal Chemistry)*, S. 27–58. ISBN: 978-3-527-67936-2.
- Roth, Megan; Obaidat, Amanda; Hagenbuch, Bruno (2012): OATPs, OATs and OCTs: the organic anion and cation transporters of the SLCO and SLC22A gene superfamilies. In: *British Journal of Pharmacology* 165 (5), S. 1260–1287. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2011.01724.x.
- Rushmore, Thomas H.; Kong, A-N Tony (2002): Pharmacogenomics, regulation and signaling pathways of phase I and II drug metabolizing enzymes. In: *Current drug metabolism* 3 (5), S. 481–490. DOI: 10.2174/1389200023337171.
- Saitou, M.; Furuse, M.; Sasaki, H.; Schulzke, J. D.; Fromm, M.; Takano, H. et al. (2000): Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. In: *Molecular biology of the cell* 11 (12), S. 4131–4142. DOI: 10.1091/mbc.11.12.4131.
- Sambuy, Y.; Angelis, I. de; Ranaldi, G.; Scarino, M. L.; Stamatii, A.; Zucco, F. (2005): The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. In: *Cell biology and toxicology* 21 (1), S. 1–26. DOI: 10.1007/s10565-005-0085-6.
- Sansom, Owen J.; Reed, Karen R.; Hayes, Anthony J.; Ireland, Heather; Brinkmann, Hannah; Newton, Ian P. et al. (2004): Loss of Apc in vivo immediately perturbs Wnt signaling, differentiation, and migration. In: *Genes & development* 18 (12), S. 1385–1390. DOI: 10.1101/gad.287404.
- Sántha, Miklós (2020): Biologia futura: animal testing in drug development-the past, the present and the future. In: *Biologia futura* 71 (4), S. 443–452. DOI: 10.1007/s42977-020-00050-4.
- Sasaki, Nobuo; Sachs, Norman; Wiebrands, Kay; Ellenbroek, Saskia I. J.; Fumagalli, Arianna; Lyubimova, Anna et al. (2016a): Reg4⁺ deep crypt secretory cells function as epithelial niche for Lgr5⁺

- stem cells in colon. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (37), E5399-407. DOI: 10.1073/pnas.1607327113.
- Sasaki, Yasushi; Tamura, Miyuki; Takeda, Kousuke; Ogi, Kazuhiro; Nakagaki, Takafumi; Koyama, Ryota et al. (2016b): Identification and characterization of the intercellular adhesion molecule-2 gene as a novel p53 target. In: *Oncotarget* 7 (38), S. 61426–61437. DOI: 10.18632/oncotarget.11366.
- Sastry, S. V.; Nyshadham, JR; Fix, J. A. (2000): Recent technological advances in oral drug delivery - a review. In: *Pharmaceutical science & technology today* 3 (4), S. 138–145. DOI: 10.1016/S1461-5347(00)00247-9.
- Schimpel, Christa; Werzer, Oliver; Fröhlich, Eleonore; Leitinger, Gerd; Absenger-Novak, Markus; Teubl, Birgit et al. (2015): Atomic force microscopy as analytical tool to study physico-mechanical properties of intestinal cells. In: *Beilstein journal of nanotechnology* 6, S. 1457–1466. DOI: 10.3762/bjnano.6.151.
- Schmiedlin-Ren, P.; Thummel, K. E.; Fisher, J. M.; Paine, M. F.; Watkins, P. B. (2001): Induction of CYP3A4 by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 is human cell line-specific and is unlikely to involve pregnane X receptor. In: *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 29 (11), S. 1446–1453. PMID: 11602520.
- Schulzke, J. D.; Gitter, A. H.; Mankertz, J.; Spiegel, S.; Seidler, U.; Amasheh, S. et al. (2005): Epithelial transport and barrier function in occludin-deficient mice. In: *Biochimica et biophysica acta* 1669 (1), S. 34–42. DOI: 10.1016/j.bbamem.2005.01.008.
- Seithel, Annick; Karlsson, Johan; Hilgendorf, Constanze; Björquist, Anna; Ungell, Anna-Lena (2006): Variability in mRNA expression of ABC- and SLC-transporters in human intestinal cells: comparison between human segments and Caco-2 cells. In: *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* 28 (4), S. 291–299. DOI: 10.1016/j.ejps.2006.03.003.
- Sevin, E.; Dehouck, L.; Fabulas-da Costa, A.; Cecchelli, R.; Dehouck, M. P.; Lundquist, S.; Culot, M. (2013): Accelerated Caco-2 cell permeability model for drug discovery. In: *Journal of pharmacological and toxicological methods* 68 (3), S. 334–339. DOI: 10.1016/j.vascn.2013.07.004.
- Sheehan, J. K.; Thornton, D. J.; Howard, M.; Carlstedt, I.; Corfield, A. P.; Paraskeva, C. (1996): Biosynthesis of the MUC2 mucin: evidence for a slow assembly of fully glycosylated units. In: *The Biochemical journal* 315 (Pt 3) (Pt 3), S. 1055–1060. DOI: 10.1042/bj3151055.
- Shen, D. D.; Kunze, K. L.; Thummel, K. E. (1997): Enzyme-catalyzed processes of first-pass hepatic and intestinal drug extraction. In: *Advanced drug delivery reviews* 27 (2-3), S. 99–127. DOI: 10.1016/s0169-409x(97)00039-2.
- Shi, Qi; Han, Xue-Ping; Yu, Jie; Peng, Hao; Chen, Yun-Zhao; Li, Feng; Cui, Xiao-Bin (2020): Decreased vitamin D receptor protein expression is associated with progression and poor prognosis of colorectal cancer patients. In: *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 13 (4), S. 746–755. PMID: 32355523.

- Sim, Sarah C.; Ingelman-Sundberg, Magnus (2010): The Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature website: a peer-reviewed database of CYP variants and their associated effects. In: *Human genomics* 4 (4), S. 278–281. DOI: 10.1186/1479-7364-4-4-278.
- Simon-Assmann, P.; Turck, N.; Sidhoum-Jenny, M.; Gradwohl, G.; Kedinger, M. (2007): In vitro models of intestinal epithelial cell differentiation. In: *Cell biology and toxicology* 23 (4), S. 241–256. DOI: 10.1007/s10565-006-0175-0.
- Singh, Sonu Sundd (2006): Preclinical pharmacokinetics: an approach towards safer and efficacious drugs. In: *Current drug metabolism* 7 (2), S. 165–182. DOI: 10.2174/138920006775541552.
- Slaviero, Kellie A.; Clarke, Stephen J.; Rivory, Laurent P. (2003): Inflammatory response: an unrecognised source of variability in the pharmacokinetics and pharmacodynamics of cancer chemotherapy. In: *The Lancet. Oncology* 4 (4), S. 224–232. DOI: 10.1016/s1470-2045(03)01034-9.
- Sommers, C. L.; Byers, S. W.; Thompson, E. W.; Torri, J. A.; Gelmann, E. P. (1994): Differentiation state and invasiveness of human breast cancer cell lines. In: *Breast cancer research and treatment* 31 (2-3), S. 325–335. DOI: 10.1007/BF00666165.
- Souleimani, A.; Asselin, C. (1993): Regulation of c-myc expression by sodium butyrate in the colon carcinoma cell line Caco-2. In: *FEBS letters* 326 (1-3), S. 45–50. DOI: 10.1016/0014-5793(93)81758-r.
- Specian, R. D.; Oliver, M. G. (1991): Functional biology of intestinal goblet cells. In: *The American journal of physiology* 260 (2 Pt 1), C183-93. DOI: 10.1152/ajpcell.1991.260.2.C183.
- Srinivasan, Balaji; Kolli, Aditya Reddy; Esch, Mandy Brigitte; Abaci, Hasan Erbil; Shuler, Michael L.; Hickman, James J. (2015): TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems. In: *Journal of laboratory automation* 20 (2), S. 107–126. DOI: 10.1177/2211068214561025.
- Stevenson, B. R.; Siliciano, J. D.; Mooseker, M. S.; Goodenough, D. A. (1986): Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. In: *The Journal of cell biology* 103 (3), S. 755–766. DOI: 10.1083/jcb.103.3.755.
- Stojanović, Ozren; Miguel-Aliaga, Irene; Trajkovski, Mirko (2022): Intestinal plasticity and metabolism as regulators of organismal energy homeostasis. In: *Nature metabolism* 4 (11), S. 1444–1458. DOI: 10.1038/s42255-022-00679-6.
- Sun, Duxin; Gao, Wei; Hu, Hongxiang; Zhou, Simon (2022): Why 90% of clinical drug development fails and how to improve it? In: *Acta pharmaceutica Sinica. B* 12 (7), S. 3049–3062. DOI: 10.1016/j.apsb.2022.02.002.
- Sun, Huadong; Chow, Edwin Cy; Liu, Shanjun; Du, Yimin; Pang, K. Sandy (2008): The Caco-2 cell monolayer: usefulness and limitations. In: *Expert opinion on drug metabolism & toxicology* 4 (4), S. 395–411. DOI: 10.1517/17425255.4.4.395.
- Taipalensuu, J.; Törnblom, H.; Lindberg, G.; Einarsson, C.; Sjöqvist, F.; Melhus, H. et al. (2001): Correlation of gene expression of ten drug efflux proteins of the ATP-binding cassette transporter family in normal human jejunum and in human intestinal epithelial Caco-2 cell monolayers. In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 299 (1), S. 164–170. PMID: 11561076.

- Takada, Ichiro; Makishima, Makoto (2015): Therapeutic application of vitamin D receptor ligands: an updated patent review. In: *Expert opinion on therapeutic patents* 25 (12), S. 1373–1383. DOI: 10.1517/13543776.2015.1093113.
- Takagi, Shingo; Nakajima, Miki; Mohri, Takuya; Yokoi, Tsuyoshi (2008): Post-transcriptional regulation of human pregnane X receptor by micro-RNA affects the expression of cytochrome P450 3A4. In: *The Journal of biological chemistry* 283 (15), S. 9674–9680. DOI: 10.1074/jbc.M709382200.
- Takahashi, Yu; Noguchi, Makoto; Inoue, Yu; Sato, Shintaro; Shimizu, Makoto; Kojima, Hirotsu et al. (2022): Organoid-derived intestinal epithelial cells are a suitable model for preclinical toxicology and pharmacokinetic studies. In: *iScience* 25 (7), S. 104542. DOI: 10.1016/j.isci.2022.104542.
- Takenaka, Toru; Harada, Naomoto; Kuze, Jiro; Chiba, Masato; Iwao, Takahiro; Matsunaga, Tamihide (2014): Human small intestinal epithelial cells differentiated from adult intestinal stem cells as a novel system for predicting oral drug absorption in humans. In: *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 42 (11), S. 1947–1954. DOI: 10.1124/dmd.114.059493.
- Tekade, Rakesh K. (2018): Dosage Form Design Considerations: Volume I. Hg. v. Rakesh K. Tekade: Academic Press. ISBN: 978-0128144237.
- Thorsen, Kristian; Drengstig, Tormod; Ruoff, Peter (2014): Transepithelial glucose transport and Na⁺/K⁺ homeostasis in enterocytes: an integrative model. In: *American journal of physiology. Cell physiology* 307 (4), C320-37. DOI: 10.1152/ajpcell.00068.2013.
- Thummel, K. E.; Brimer, C.; Yasuda, K.; Thottassery, J.; Senn, T.; Lin, Y. et al. (2001): Transcriptional control of intestinal cytochrome P-4503A by 1 α ,25-dihydroxy vitamin D₃. In: *Molecular pharmacology* 60 (6), S. 1399–1406. DOI: 10.1124/mol.60.6.1399.
- Thummel, Kenneth E. (2007): Gut instincts: CYP3A4 and intestinal drug metabolism. In: *The Journal of Clinical Investigation* 117 (11), S. 3173–3176. DOI: 10.1172/JCI34007.
- Tillmann (2016): Atlas der Anatomie des Menschen: Springer Berlin Heidelberg. ISBN : 978-3-662-49287-1.
- Tirona, Rommel G. (2011): Molecular mechanisms of drug transporter regulation. In: *Handbook of experimental pharmacology* (201), S. 373–402. DOI: 10.1007/978-3-642-14541-4_10.
- Todaro, Matilde; Francipane, Maria Giovanna; Medema, Jan Paul; Stassi, Giorgio (2010): Colon cancer stem cells: promise of targeted therapy. In: *Gastroenterology* 138 (6), S. 2151–2162. DOI: 10.1053/j.gastro.2009.12.063.
- Tukey, R. H.; Strassburg, C. P. (2000): Human UDP-glucuronosyltransferases: metabolism, expression, and disease. In: *Annual review of pharmacology and toxicology* 40, S. 581–616. DOI: 10.1146/annurev.pharmtox.40.1.581.
- Ulfig, Norbert (2019): Kurzlehrbuch Histologie. Stuttgart: Georg Thieme Verlag. ISBN: 9783132433182.

- Ungell, Anna-Lena B. (2004): Caco-2 replace or refine? In: *Drug discovery today. Technologies* 1 (4), S. 423–430. DOI: 10.1016/j.ddtec.2004.11.003.
- Urquhart, Bradley L.; Tirona, Rommel G.; Kim, Richard B. (2007): Nuclear receptors and the regulation of drug-metabolizing enzymes and drug transporters: implications for interindividual variability in response to drugs. In: *Journal of clinical pharmacology* 47 (5), S. 566–578. DOI: 10.1177/0091270007299930.
- Valdez, Jonathan C.; Cho, Junhyo; Bolling, Bradley W. (2020): Aronia berry inhibits disruption of Caco-2 intestinal barrier function. In: *Archives of biochemistry and biophysics* 688, S. 108409. DOI: 10.1016/j.abb.2020.108409.
- van Breemen, Richard B.; Li, Yongmei (2005): Caco-2 cell permeability assays to measure drug absorption. In: *Expert opinion on drug metabolism & toxicology* 1 (2), S. 175–185. DOI: 10.1517/17425255.1.2.175.
- van der Flier, Laurens G.; Clevers, Hans (2009): Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. In: *Annual review of physiology* 71, S. 241–260. DOI: 10.1146/annurev.physiol.010908.163145.
- van Eyken, Peter; Fanni, Daniela; Gerosa, Clara; Ambu, Rossano (2014): The Normal Biopsy: Mucosa and Submucosa. In: Karel Geboes, Sonia Nemolato, Maria Leo und Gavino Faa (Hg.): *Colitis*. Cham: Springer International Publishing, S. 1–16. DOI: 10.1007/978-3-319-08028-4_1.
- van Itallie, Christina M.; Fanning, Alan S.; Holmes, Jennifer; Anderson, James M. (2010): Occludin is required for cytokine-induced regulation of tight junction barriers. In: *Journal of cell science* 123 (Pt 16), S. 2844–2852. DOI: 10.1242/jcs.065581.
- Velamakanni, Saroj; Wei, Shen L.; Janvilisri, Tavan; van Veen, Hendrik W. (2007): ABCG transporters: structure, substrate specificities and physiological roles : a brief overview. In: *Journal of bioenergetics and biomembranes* 39 (5-6), S. 465–471. DOI: 10.1007/s10863-007-9122-x.
- Volk, Neil; Lacy, Brian (2017): Anatomy and Physiology of the Small Bowel. In: *Gastrointestinal endoscopy clinics of North America* 27 (1), S. 1–13. DOI: 10.1016/j.giec.2016.08.001.
- Walter, E.; Janich, S.; Roessler, B. J.; Hilfinger, J. M.; Amidon, G. L. (1996): HT29-MTX/Caco-2 cocultures as an in vitro model for the intestinal epithelium: in vitro-in vivo correlation with permeability data from rats and humans. In: *Journal of pharmaceutical sciences* 85 (10), S. 1070–1076. DOI: 10.1021/js960110x.
- Walter, Juliane Katharina (2009): Charakterisierung der Struktur, Funktion und Wechselwirkungen der Tight Junction Proteine Occludin und Zonula Occludens 1. Humboldt-Universität zu Berlin. Online: <https://edoc.hu-berlin.de/handle/18452/16664> [abgerufen am 18.10.2023].
- Walton, Katherine D.; Freddo, Andrew M.; Wang, Sha; Gumucio, Deborah L. (2016): Generation of intestinal surface: an absorbing tale. In: *Development (Cambridge, England)* 143 (13), S. 2261–2272. DOI: 10.1242/dev.135400.

- Wang, Chun-Yang; Liu, Shu; Xie, Xiao-Nv; Tan, Zhi-Rong (2017a): Regulation profile of the intestinal peptide transporter 1 (PepT1). In: *Drug Design, Development and Therapy* 11, S. 3511–3517. DOI: 10.2147/DDDT.S151725.
- Wang, Haipeng; Jin, Shengjian; Lu, Huiling; Mi, Sisi; Shao, Wenhua; Zuo, Xiaoxv et al. (2017b): Expression of survivin, MUC2 and MUC5 in colorectal cancer and their association with clinicopathological characteristics. In: *Oncology letters* 14 (1), S. 1011–1016. DOI: 10.3892/ol.2017.6218.
- Wang, Hongwei; Venkatesh, Madhukumar; Li, Hao; Goetz, Regina; Mukherjee, Subhajit; Biswas, Arunima et al. (2011): Pregnane X receptor activation induces FGF19-dependent tumor aggressiveness in humans and mice. In: *The Journal of Clinical Investigation* 121 (8), S. 3220–3232. DOI: 10.1172/JCI41514.
- Wang, Qianyu; Shen, Xiaofei; Chen, Gang; Du, Junfeng (2022): Drug Resistance in Colorectal Cancer: From Mechanism to Clinic. In: *Cancers* 14 (12). DOI: 10.3390/cancers14122928.
- Wang, Shanshan; Okun, Michael S.; Suslov, Oleg; Zheng, Tong; McFarland, Nikolaus R.; Vedam-Mai, Vinata et al. (2012): Neurogenic potential of progenitor cells isolated from postmortem human Parkinsonian brains. In: *Brain research* 1464, S. 61–72. DOI: 10.1016/j.brainres.2012.04.039.
- Watkins, P. B. (1997): The barrier function of CYP3A4 and P-glycoprotein in the small bowel. In: *Advanced drug delivery reviews* 27 (2-3), S. 161–170. DOI: 10.1016/s0169-409x(97)00041-0.
- Watson, P. Marc D.; Paterson, Judy C.; Thom, George; Ginman, Ulrika; Lundquist, Stefan; Webster, Carl I. (2013): Modelling the endothelial blood-CNS barriers: a method for the production of robust in vitro models of the rat blood-brain barrier and blood-spinal cord barrier. In: *BMC neuroscience* 14, S. 59. DOI: 10.1186/1471-2202-14-59.
- Wenzel, Christoph; Drozdik, Marek; Oswald, Stefan (2021): Mass spectrometry-based targeted proteomics method for the quantification of clinically relevant drug metabolizing enzymes in human specimens. In: *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 1180, S. 122891. DOI: 10.1016/j.jchromb.2021.122891.
- Wenzel, Christoph; Gödtke, Lisa; Reichstein, Anne; Keiser, Markus; Busch, Diana; Drozdik, Marek; Oswald, Stefan (2022): Gene Expression and Protein Abundance of Nuclear Receptors in Human Intestine and Liver: A New Application for Mass Spectrometry-Based Targeted Proteomics. In: *Molecules (Basel, Switzerland)* 27 (14). DOI: 10.3390/molecules27144629.
- Wikman-Larhed, A.; Artursson, P. (1995): Co-cultures of human intestinal goblet (HT29-H) and absorptive (Caco-2) cells for studies of drug and peptide absorption. In: *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* 3 (3), S. 171–183. DOI: 10.1016/0928-0987(95)00007-Z.
- Wu, Guoyao (2016): Dietary protein intake and human health. In: *Food & function* 7 (3), S. 1251–1265. DOI: 10.1039/C5FO01530H.

- Xu, Changjiang; Li, Christina Yong-Tao; Kong, Ah-Ng Tony (2005): Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. In: *Archives of pharmacal research* 28 (3), S. 249–268. DOI: 10.1007/BF02977789.
- Xu, S.; Wen, Z.; Jiang, Q.; Zhu, L.; Feng, S.; Zhao, Y. et al. (2015): CD58, a novel surface marker, promotes self-renewal of tumor-initiating cells in colorectal cancer. In: *Oncogene* 34 (12), S. 1520–1531. DOI: 10.1038/onc.2014.95.
- Yamashita, Tomoki; Inui, Tatsuya; Yokota, Jumpei; Kawakami, Kentaro; Morinaga, Gaku; Takatani, Masahito et al. (2021): Monolayer platform using human biopsy-derived duodenal organoids for pharmaceutical research. In: *Molecular therapy. Methods & clinical development* 22, S. 263–278. DOI: 10.1016/j.omtm.2021.05.005.
- Yamaura, Yoshiyuki; Chapron, Brian D.; Wang, Zhican; Himmelfarb, Jonathan; Thummel, Kenneth E. (2016): Functional Comparison of Human Colonic Carcinoma Cell Lines and Primary Small Intestinal Epithelial Cells for Investigations of Intestinal Drug Permeability and First-Pass Metabolism. In: *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 44 (3), S. 329–335. DOI: 10.1124/dmd.115.068429.
- Yee, S. (1997): In vitro permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict in vivo (small intestinal) absorption in man—fact or myth. In: *Pharmaceutical research* 14 (6), S. 763–766. DOI: 10.1023/a:1012102522787.
- Yu, Jie; Sun, Qi; Hui, Yi; Xu, Jinping; Shi, Pancheng; Chen, Yu; Chen, Yunzhao (2023): Vitamin D receptor prevents tumour development by regulating the Wnt/ β -catenin signalling pathway in human colorectal cancer. In: *BMC cancer* 23 (1), S. 336. DOI: 10.1186/s12885-023-10690-z.
- Zamek-Gliszczynski, Maciej J.; Taub, Mitchell E.; Chothe, Paresh P.; Chu, Xiaoyan; Giacomini, Kathleen M.; Kim, Richard B. et al. (2018): Transporters in Drug Development: 2018 ITC Recommendations for Transporters of Emerging Clinical Importance. In: *Clinical pharmacology and therapeutics* 104 (5), S. 890–899. DOI: 10.1002/cpt.1112.
- Zhang, Yalu; Liu, Qiaofei; Yang, Sen; Liao, Quan (2021): CD58 Immunobiology at a Glance. In: *Frontiers in immunology* 12, S. 705260. DOI: 10.3389/fimmu.2021.705260.
- Zhao, Anpeng; Mu, Hongfang; Yao, Wanteng; Chang, Xiwen; Li, Wenbin; Wang, Rong (2023): Effects of hypoxia on the expression and function of P-gp in Caco-2 cells. In: *Journal of Central South University. Medical sciences* 48 (4), S. 491–498. DOI: 10.11817/j.issn.1672-7347.2023.220448.
- Zhou, J.; Zhang, W.; Liu, W.; Sheng, J.; Li, M.; Chen, X.; Dong, R. (2020): Histological study of intestinal goblet cells, IgA, and CD3+ lymphocyte distribution in Huang-huai white goat. In: *Folia morphologica* 79 (2), S. 303–310. DOI: 10.5603/FM.a2019.0082.
- Zhou, Shufeng; Li, Yan; Kestell, Phillip; Schafer, Peter; Chan, Eli; Paxton, James W. (2005): Transport of thalidomide by the human intestinal Caco-2 monolayers. In: *European journal of drug metabolism and pharmacokinetics* 30 (1-2), S. 49–61. DOI: 10.1007/BF03226408.

Zhu, L.; Lu, L.; Wang, S.; Wu, J.; Shi, J.; Yan, T. et al. (2017): Oral Absorption Basics. In: Developing Solid Oral Dosage Forms: Elsevier, S. 297–329.

Zhu, Quangang; Chen, Zhongjian; Paul, Pijush Kumar; Lu, Yi; Wu, Wei; Qi, Jianping (2021): Oral delivery of proteins and peptides: Challenges, status quo and future perspectives. In: *Acta pharmaceutica Sinica. B* 11 (8), S. 2416–2448. DOI: 10.1016/j.apsb.2021.04.001.

7 Anhang

Tabelle A1: Verwendete humane KRK-Zelllinien mit Patienten- und Tumordaten. CIMP: CpG island methylator phenotype, H: high, L: low, LS: Lynch-Syndrom, m: männlich, n.d.: nicht detektiert, NET: Neuroendokriner Tumor, spMSI: sporadische MSI, spSTD: sporadischer Standard, UICC: *Union international contre le cancer*, w: weiblich.

Zelllinie	Alter, Geschlecht	Lokalisation	Grading	UICC	Molekularer Typ
HROC18	65, w	Caecum	G2	I	spSTD
HROC24	98, m	Ascendens	G2	I	spMSI
HROC24 T1 M1					
HROC32	82, w	Ascendens	G2	IV	spSTD
HROC39	69, m	Ascendens	G3	II B	spSTD
HROC40	69, m	Descendens	G3	III A	CIMP-L
HROC43	72, m	Ascendens	G3	III B	CIMP-L
HROC46 T0 M1	66, m	Ascendens	G3	IV	spSTD
HROC50 T1 M5	67, w	Ascendens	G2	II B	spMSI
HROC57	43, m	Ascendens	G3	IV	NET
HROC60	71, m	Ascendens	G2	I	CIMP-L
HROC69	62, m	Ascendens	G3	II	spSTD
HROC80 T1 M1	72, m	Caecum	G2	III A	spSTD
HROC87 T0 M2	76, w	Ascendens	G3	II A	spMSI
HROC107	74, m	Sigmoid	G2	IV	spSTD
HROC113	41, w	Ascendens	G3	IV	LS
HROC126	58, w	Rektum	G2	III B	spSTD
HROC131 T0 M3	75, w	Ascendens	G3	III A	spMSI
HROC147 T0 M1	54, m	Rektosigmoid	G3	IV	CIMP-L
HROC147Met1		Lebermetastase			CIMP-L
HROC159 T2 M4	78, w	Caecum	G2	II A	spMSI
HROC173	45, m	Ascendens	G3	IV	spSTD
HROC183 T0 M2	59, w	Ascendens	G3	III C	CIMP-H
HROC212	74, w	Caecum	G3	IV	spMSI
HROC217 T1 M2	73, m	Ascendens	G2	III B	spSTD
HROC222 T1 M2	79, m	Transversum	G2	II	spSTD
HROC239 T0 M1	72, w	Rektum	G2	III C	spSTD
HROC252Tu2 T2 M2	45, m	Sigmoid	G3	II	LS
HROC257	84, w	Ascendens	G3	III	spMSI
HROC277 T0 M1	77, m	Caecum	G2	IV	spSTD
HROC277Met1 T0 M2		Lebermetastase 1			spSTD
HROC277Met2	78, m	Lebermetastase 2			spSTD
HROC278 T0 M1	76, w	Ascendens	G4	IV	CIMP-H
HROC278Met T2 M2		Peritonealmetastase			CIMP-H
HROC285 T0 M2	30, w	Descendens	G2	IV	LS
HROC296	92, w	Ascendens	G2	II A	spSTD
HROC300 T2 M1	73, m	Rektum	G2	IV	CIMP-H
HROC300Met1 T3 M4		Lebermetastase			CIMP-H
HROC309	86, m	Descendens	G2	II A	spSTD
HROC315 T1 M2	42, w	Descendens	G3	III B	LS
HROC324	55, w	Caecum	G3	III B	LS
HROC357	41, w	Transversum	G2	II	spSTD
HROC370	77, w	Caecum	G2	I	spMSI
HROC374	65, m	Sigmoid	G3	III	n.d.
HROC383	83, w	Transversum	G3	II A	spMSI
HROC383 T0 M2					
HROC415Met1 T0 M4	33, m	Peritonealmetastase	G3	-	LS
HROC439	74, m	Transversum	G2	-	spSTD
HHC6548 T1 M1	26, m	Ascendens	G3	III C	LS
Caco-2	72, m	Kolon	-	-	CIMP-L

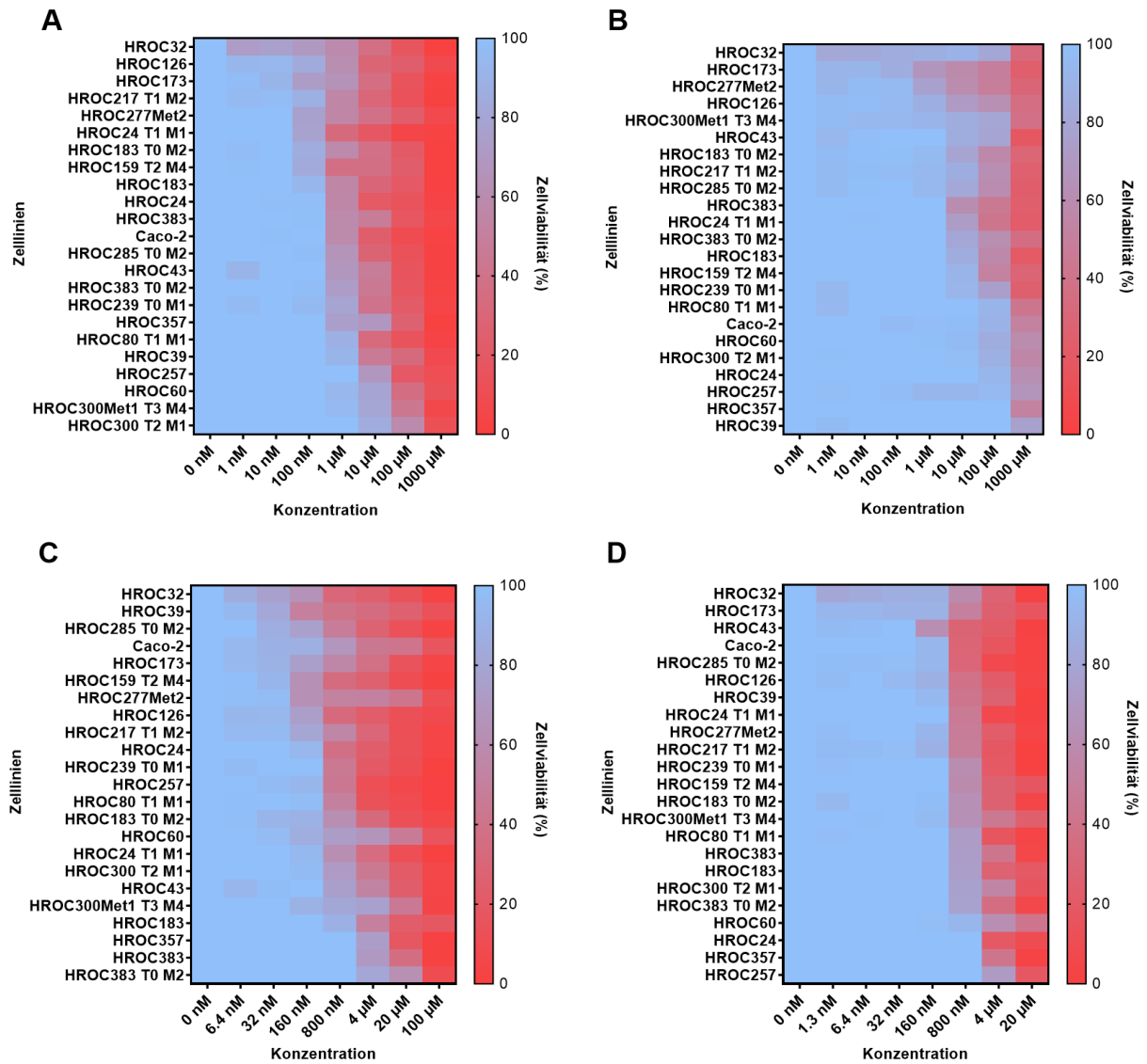


Abbildung A1: Zellviabilität in HROC-Zelllinien und Caco-2 nach Behandlung mit Zytostatika. 23 KRK-Zelllinien wurden nach 144 h Inkubation hinsichtlich ihrer Sensitivität auf klinisch relevante Chemotherapeutika zur Behandlung des KRK untersucht. Heatmap zeigt die Zellviabilität in Prozent nach Behandlung mit A) 5-FU, B) Capecitabin, C) Irinotecan und D) Oxaliplatin. Dargestellt ist der Mittelwert, $n = 2-3$.

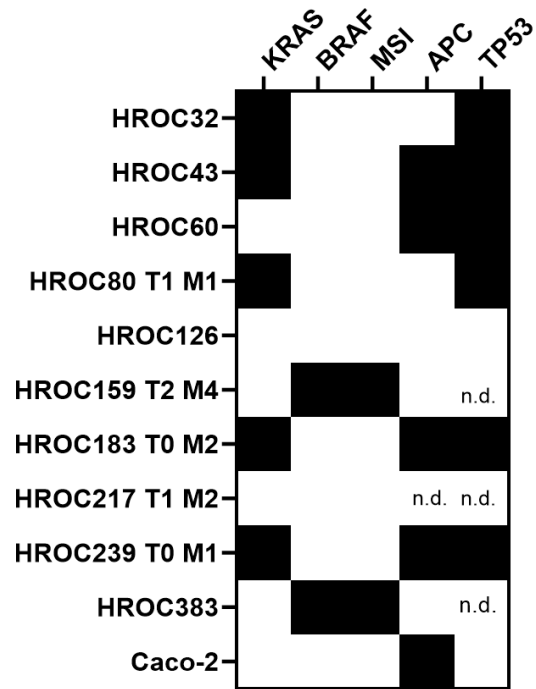


Abbildung A2: Mutationsprofil des untersuchten HROC-Panels und der Caco-2 Zelllinie.

Tabelle A2: Zusammenfassung der Ergebnisse für das HROC-Zellpanel. Zelllinienspezifische Vorteile, Limitationen und Anwendungsbereiche zur Untersuchung von ADME.

Zelllinie	Differenzierungsgrad	Vorteile	Limitationen	Anwendungsbereiche
HROC32	Becher-, Paneth- und enteroendokrine Zellen, Mikrovilli-Strukturen	PEPT1-, OATP2B1- und P-gp-Proteinexpression, hohe basale CYP3A4-Aktivität, starke Efflux-Mechanismen	Fehlen von BCRP auf Protein- und mRNA-Ebene, geringere GLUT-2-Expression im Vergleich zum Dünndarm, kolonischer Ursprung	VDR-vermittelter First-Pass-Metabolismus, Zelldifferenzierung, Zell-Zell-Interaktionen, HTS
HROC43	hohe Ähnlichkeit mit <i>in vivo</i> jejunalen Eigenschaften, Becher-, Paneth- und enteroendokrine Zellen, Mikrovilli-Strukturen	gut ausgebildete TJ, hohe basale CYP3A4-Aktivität, PEPT1-, OATP2B1-, P-gp-, und BCRP-Proteinexpression, PXR-/VDR-vermittelte Regulation der CYP3A4-Aktivität und Transporter mRNA	geringere GLUT-2-Expression im Vergleich zum Dünndarm, kolonischer Ursprung	First-Pass-Metabolismus, jejunale Permeabilität, Wirt-Mikrobeninteraktionen, Geweberegeneration, Zelldifferenzierung, Zell-Zell-Interaktionen, HTS
HROC60	Becher- und enteroendokrine Zellen, Mikrovilli-Strukturen, LYZ-Expression	gut ausgebildete TJ, extrem hoher TEER, stabile Langzeitkultur, PEPT1-Proteinexpression, hohe VDR-vermittelte Regulation von Transportern und nukleären Rezeptoren	schwacher Differenzierungsgrad, geringe basale CYP3A4-Aktivität, geringe mRNA-Expression von Transportern und nukleären Rezeptoren, limitierte Darstellung der <i>in vivo</i> Situation, kolonischer Ursprung	<i>gut-on-a-chip</i> , Geweberegeneration, HTS
HROC80 T1 M1	Becherzellen, Mikrovilli-Strukturen	gut ausgebildete TJ, PXR-/VDR-vermittelte Regulation von CYP3A4 und Transportern	keine BCRP-Proteinexpression, schwacher Differenzierungsgrad (Fehlen von enteroendokrinen- und Panethzellen), schwaches PXR-vermitteltes Ansprechen, kolonischer Ursprung	First-Pass-Metabolismus, HTS
HROC126	Enteroendokrine Zellen, Mikrovilli-Strukturen	VDR-vermittelte Induktion der CYP3A4-Aktivität	schwacher Differenzierungsgrad (Fehlen von Becher- und Panethzellen), schwache PXR-vermittelte Regulation von Transportern, VDR-Hochregulation, kolonischer Ursprung	VDR-vermittelter First-Pass-Metabolismus, rektale Medikamentengabe, HTS

Zelllinie	Differenzierungsgrad	Vorteile	Limitationen	Anwendungsbereiche
HROC159 T2 M4	Becherzellen, LYZ-Expression, Mikrovilli-Strukturen	gute ausgebildete TJ, hohe basale CYP3A4-Aktivität, VDR-vermittelte Regulation der CYP3A4-Aktivität	geringe Gen- und Proteinexpression multipler Transporter, kolonischer Ursprung	First-Pass-Metabolismus, Geweberegeneration, HTS
HROC183 T0 M2	hohe Ähnlichkeit mit <i>in vivo</i> jejunalen Eigenschaften, Becherzellen und enteroendokrine Zellen, LYZ-Expression, Mikrovilli-Strukturen	gut ausgebildete TJ, VDR-vermittelte Induktion der CYP3A4-Aktivität, PXR-/VDR-vermittelte Regulation der CYP3A4-Aktivität und <i>ABCB1</i> mRNA	geringe basale CYP3A4-Aktivität, kolonischer Ursprung	PXR-vermittelter First-Pass-Metabolismus, HTS
HROC217 T1 M2	hohe Ähnlichkeit mit <i>in vivo</i> jejunalen Eigenschaften, Becher- und enteroendokrine Zellen, LYZ-Expression, Mikrovilli-Strukturen	gut ausgebildete TJ, PEPT1-, OATP2B1-, P-gp- und BCRP-, Proteinexpression, PXR-/VDR-vermittelte Regulation der CYP3A4-Aktivität und <i>ABCB1</i> mRNA	geringere Proteinexpression von OATP2B1, P-gp und BCRP im Vergleich zum Jejunum, kolonischer Ursprung	PXR-/VDR-vermittelter First-Pass-Metabolismus, HTS
HROC239 T0 M1	hohe Ähnlichkeit mit <i>in vivo</i> jejunalen Eigenschaften, enteroendokrine Zellen, Mikrovilli-Strukturen	Proteinexpression von PEPT1, OATP2B1, P-gp und BCRP	<i>NR1I2</i> Hochregulation, geringe <i>UGT1A6</i> mRNA-Expression, Fehlen von Becher- und Panethzellen, geringe Proteinexpression von OATP2B1, P-gp und BCRP im Vergleich zum Jejunum, kolonischer Ursprung	rektale Medikamentengabe, HTS
HROC383	Becherzellen und Mikrovilli-Strukturen	Proteinexpression von PEPT1 und OATP2B1	schwacher Differenzierungsgrad, schwaches PXR- und VDR-vermitteltes Ansprechen, schwache Expression von OATP2B1, keine Expression von <i>UGT1A6</i> , kolonischer Ursprung	HTS

Lebenslauf

Berufserfahrungen

- 07/2019 – 07/2021 **Biobank Rostock, Universitätsmedizin Rostock**
- Aufarbeitung und Einlagerung von primärem Patientenmaterial
 - Anlegen und Pflege von Langzeit-Kulturen
 - Expansion von Tumormaterial durch Patienten-abgeleitete Xenograft-Modelle
 - Einarbeitung von studentischen Hilfskräften

Bildungsweg

- 07/2019 – 08/2023 **Promotion**
- Universität Rostock
 - Dissertation zum Thema „Entwicklung und Charakterisierung neuartiger humaner intestinaler *in vitro* Modelle für die präklinische Wirkstoffforschung“
- 09/2014 - 09/2016 **Master of Science**
- Forensic Sciences and Engineering
 - BTU Cottbus
 - Schwerpunkte: Forensische DNA–Analytik, Molekularbiologie, Forensische Praxis, Statistik
- 09/2009 - 08/2014 **Bachelor of Science**
- Landnutzung und Wasserbewirtschaftung
 - BTU Cottbus
 - Schwerpunkte: Mikrobiologie, Organische-/Anorganische Chemie, Statistik
- 09/2002 – 06/2009 **Abitur**
- Humboldt-Gymnasium Eichwalde