

Zellassays

Methoden zur Transportercharakterisierung in primären Hepatozyten

MARKUS KEISER¹, JIA JIA², WERNER SIEGMUND¹, ANETT ULLRICH², DIETER RUNGE²

¹ CENTER OF DRUG ABSORPTION AND TRANSPORT, KLINISCHE PHARMAKOLOGIE, UNIVERSITÄTSMEDIZIN GREIFSWALD

² PRIMACYT CELL CULTURE TECHNOLOGY GMBH, SCHWERIN

Primary mammalian hepatocytes are used for several *in vitro* applications like drug metabolism and toxicity assays. The influence of substances on uptake and efflux transporters has to be evaluated during development as well. Therefore, we characterized the uptake and the efflux transport of different substrates in appropriate hepatocytes of different species.

DOI: 10.1007/s12268-015-0559-x
© Springer-Verlag 2015

■ Primäre Hepatozyten unterschiedlicher Spezies stellen ein wichtiges Werkzeug zur Vorhersage der Aufnahme, Metabolisierung und Freisetzung von endogenen und exogenen Substanzen, aber auch zur Vorhersage der Toxizität und Medikamenteninteraktion *in vivo* dar. Primäre Leberzellen werden mittels Collagenaseperfusion direkt aus einem Leber-

resektat isoliert und sind sowohl in Suspensionsversuchen als auch auf Collagenbeschichteten Zellkulturplatten einsetzbar. Die Kultivierungsdauer in den von der PRIMACYT GmbH entwickelten serumfreien Medien beträgt (je nach Spezies) etwa zwei bis drei Wochen. Die Hepatozyten behalten über diesen Zeitraum ihre leberzellspezifischen Funktionen (Harnstoff- und Albuminsynthese) weitgehend bei [1]. Da primäre Zellen stärker differenziert sind als immortalisierte Zelllinien wie HepG2 oder stabil transgenierte Zelllinien, sind sie deutlich besser geeignet, um bei der präklinischen Entwicklung neuer Wirkstoffe Medikamenten-induzierte Prozesse zu untersuchen und vorherzusagen. Auch die HepaRG-Zelllinie ist nur eine eingeschränkte Alternative zur Untersuchung des Metabolismus und des Einflusses von Wirkstoffen auf Cytochrom-P450-Enzyme [2], da sich zum Teil signifikante

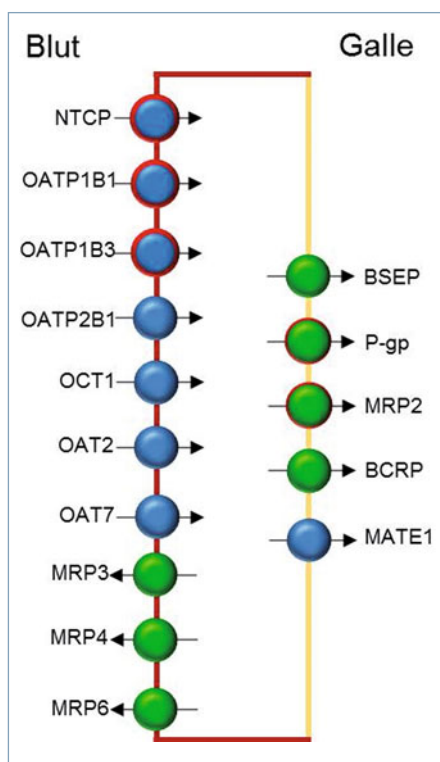
Unterschiede bei der Expression membranständiger Transporterproteine, die wesentlich an der Aufnahme einer Substanz in die Zelle bzw. der Freisetzung der Metabolite beteiligt sind, zeigen [3].

Innerhalb der Transporterproteine werden die Superfamilien der *solute carrier* (SLC) und die der ATP-abhängigen ABC(*ATP-binding cassette*)-Transporter unterschieden (Abb. 1), wobei es sich bei ersteren überwiegend um Aufnahmetransporter und bei letzteren ausschließlich um Effluxtransporter handelt [4].

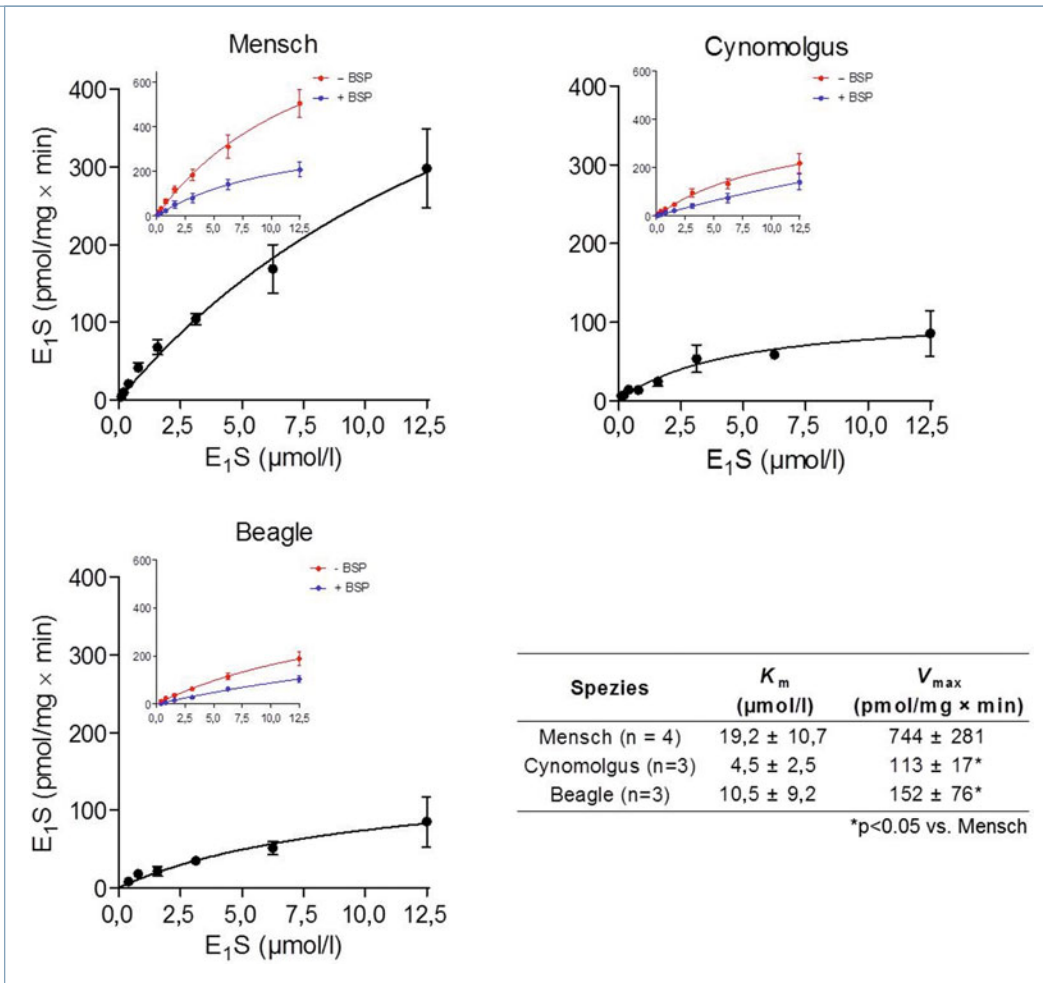
Informationen über die Beteiligung spezifischer Transporter an der Aufnahme bzw. dem Efflux von Xenobiotika sollten entsprechend der Richtlinien der amerikanischen (FDA) und europäischen (EMA) Zulassungsbehörden so früh wie möglich während der Medikamentenentwicklung gewonnen werden, da es ansonsten bei gleichzeitiger Gabe von mehreren Substanzen, die die gleichen Transportwege nutzen, zu massiven unerwünschten Arzneimittelwirkungen kommen kann. Außerdem sind einige hepatische Transportsysteme aufgrund ihrer Variabilität zwischen Individuen der gleichen Spezies (genetisch bedingt oder krankheitsassoziiert) verantwortlich für wichtige Variationen in der Verteilung, pharmakologischen Aktivität und der Toxizität mancher Wirkstoffe.

In vitro-Modelle

Die Beteiligung spezifischer Aufnahme- und Effluxtransporter am Transport eines Wirkstoffkandidaten kann gezielt an transgenierten Zelllinien oder Lipovesikeln untersucht werden, welche jeweils nur ein Transportprotein exprimieren [5, 6]. Diese Modelle stellen jedoch nur einen isolierten Transportprozess dar, wodurch eine Übertragbarkeit auf die tatsächliche *in vivo*-Situation nur bedingt möglich ist. Primäre Hepatozyten bilden dagegen auch hinsichtlich der Komplexität aller exprimierten Transportsysteme eine funktionelle Einheit, mit der eine Vorhersagbarkeit der *in vivo*-Situation deutlich besser gegeben ist. Zur Sicherstellung der Funktionalität der Hepatozyten bezüglich der Transporteraktivität ist



◀ **Abb. 1:** Transporter der SLC- (blau) und ABC-Superfamilien (grün) in humanen Leberzellen. Rot umrandet: leberspezifische Transporter. OATP: *organic anion-transporting polypeptides*; OCT: *organic cation transporter*; MRP: *multidrug resistance-associated protein*; BSEP: *bile salt export pump*; P-gp: P-Glykoprotein; BCRP: *breast cancer resistance protein*; NTCP: *Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide*; MATE1: *multidrug and toxin extrusion protein 1*.



◀ **Abb. 2:** Transporter-ermittelte Aufnahme von Estron-3-sulfat (E_1S) in primären Hepatozyten verschiedener Spezies (kleine Diagramme zeigen die Aufnahmen von E_1S in An- bzw. Abwesenheit des kompetitiven Inhibitors BSP). Die Michaelis-Menten-Kontante K_m sowie die maximale Aufnahmegeschwindigkeit V_{max} wurden unter Verwendung des Programms Prism 5.01 (GraphPad Software) berechnet. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes ($M \pm \text{SEM}$).

es unerlässlich, eine grundlegende Charakterisierung der Aufnahme eines Referenzsubstrats durchzuführen.

Assays zur Substanzaufnahme

Alle Assays zur Substanzaufnahme wurden an Hepatozyten vom Menschen (*Homo sapiens*), Javaneraffen (*Macaca fascicularis*, Cynomolgus) bzw. Hund (*Canis lupus familiaris*, Rasse Beagle) jeweils an Tag 2 nach der Isolierung der Hepatozyten durchgeführt. Als Referenzsubstrat wurde radioaktiv markiertes Estron-3-sulfat (E_1S) verwendet, welches ein Substrat der Transporter OATP1B1 und -2B1 (*organic anion-transporting polypeptide 1B1* bzw. *2B1*) ist. Die Aufnahme von E_1S wurde in An- oder Abwesenheit von Bromsulphothalein (BSP) durchgeführt, welches ebenfalls über die genannten Transporter transportiert wird und somit als kompetitiver Inhibitor fungierte. Die transporter-ermittelte Nettoaufnahme wurde durch die Subtraktion der Aufnahme von E_1S in Anwesenheit von BSP von der Aufnahme von E_1S in Abwesenheit von BSP ermittelt und gegen den Proteingehalt der Zellen normalisiert (**Abb. 2**).

E_1S wurde in Hepatozyten aller drei untersuchten Spezies aufgenommen, die Aufnahme ließ sich durch gleichzeitige Gabe von BSP

teils signifikant hemmen. Dabei zeigten die Hepatozyten vom Menschen eine signifikant höhere Transportkapazität und damit Aufnahme von E_1S als die Hepatozyten von Cynomolgus bzw. Beagle.

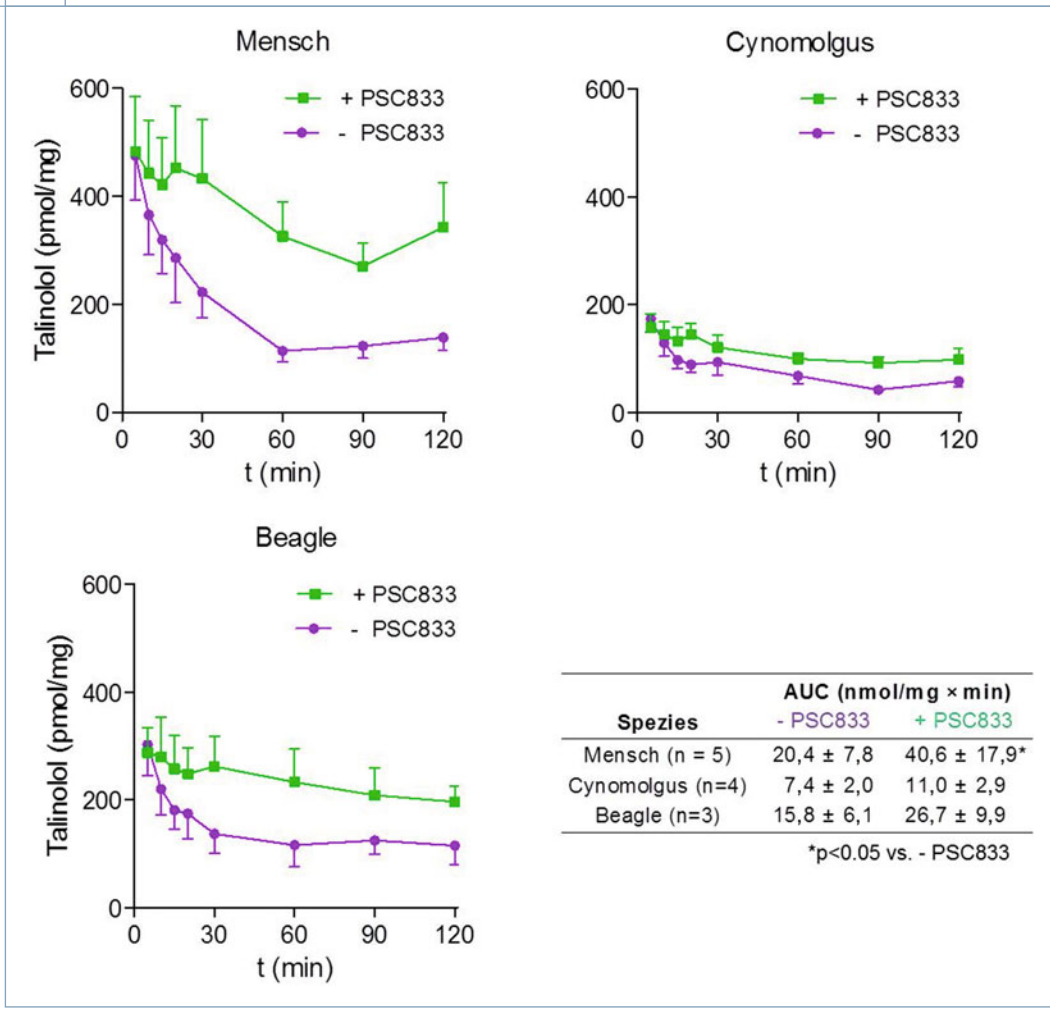
Untersuchung der Effluxtransporter

Der Effluxtransporter P-gp (P-Glykoprotein) wurde anhand des Substrats Talinolol und der MRP2-Transporter (*multidrug resistance protein*) mittels Estradiol-17 β -Glucuronid sowie deren spezifischer Hemmstoffe PSC833 bzw. MK571 charakterisiert. Nach einer kurzen Vorinkubation mit dem jeweiligen Substrat zur Aufnahme dessen wurden die Zellen in An- und Abwesenheit des spezifischen Inhibitors für maximal zwei Stunden inkubiert. Die Ausschleusung des Beta-Blockers Talinolol als P-gp-Substrat konnte in Hepatozyten von Mensch, Cynomolgus sowie Beagle durch den spezifischen Inhibitor PSC833 gehemmt werden (**Abb. 3**).

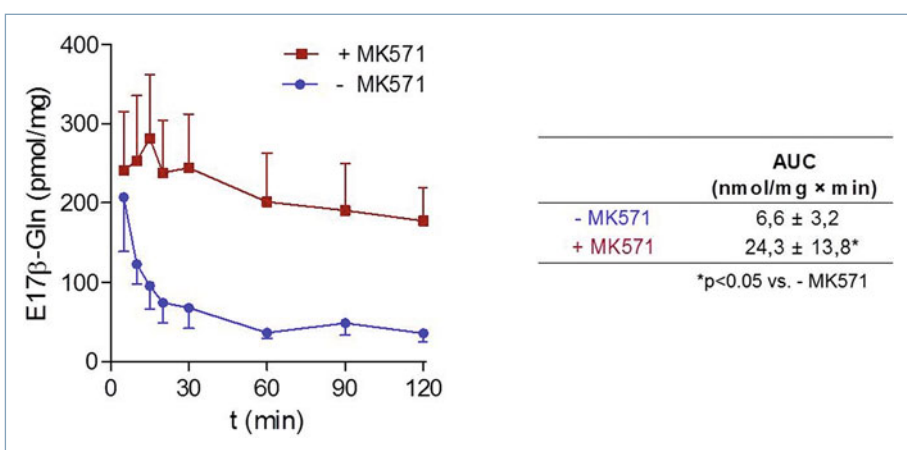
Die Inhibition des Effluxtransports von Estradiol-17 β -Glucuronid über MRP2 erfolgte nur in Beagle-Hepatozyten durch den spezifischen Hemmstoff MK571 (**Abb. 4**). In Hepatozyten von Mensch und Cynomolgus hatte dieser Inhibitor keinen Einfluss auf den Transport von E17 β -Glucuronid (Daten nicht gezeigt).

Fazit

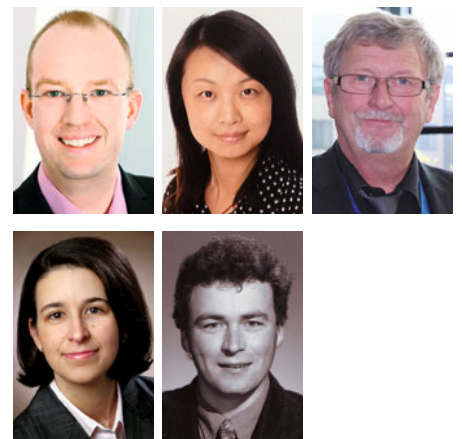
Unter Verwendung radioaktiv markierter Substrate kann in den vorgestellten Hepatozyten-Modellen die Fähigkeit eines Wirkstoffkandidaten zur Inhibition der Aktivität von Aufnahmetransportern untersucht werden, wobei auch teils signifikante Speziesdifferenzen detektiert wurden. Zudem kann mit den entwickelten Assays überprüft werden, ob eine Substanz die Ausschleusung eines Substrats blockiert. Ähnlich wie bei der Untersuchung der Aufnahme von E_1S zeigte sich auch hier, dass die Aufnahmekapazität von Talinolol, welches als Referenzsubstanz für den Effluxtransporter P-gp verwendet wurde, bei humanen Hepatozyten deutlich über dem Niveau der tierischen Hepatozyten lag. Zudem zeigte sich auch nur bei humanen Hepatozyten eine signifikante Hemmbarkeit des Effluxtransports von Talinolol durch den P-gp-Inhibitor PSC833. Sowohl die Ergebnisse aus den Aufnahmeversuchen als auch die Ergebnisse zur Überprüfung der Funktionalität des Effluxes machen deutlich, dass Testsysteme unterschiedlicher Spezies nur nach kritischer Prüfung aufeinander zu übertragen sind und dieses stets mit einer sorgfältigen Validierung einhergehen sollte.



◀ **Abb. 3:** Zeitabhängiger Effluxtransport von Talinolol über P-Glykoprotein (P-gp) und Hemmung durch PSC833 in primären Hepatozyten verschiedener Spezies. Die Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (*area under curve*, AUC) wurde durch die Trapezregel (AUC_{0-tz}) errechnet, wobei $AUC_{tz-\infty}$ durch Extrapolation bestimmt wurde. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwertes ($M \pm SEM$).



[5] Jia J, Puls D, Oswald S et al. (2014) Characterization of the intestinal and hepatic uptake/efflux transport of the magnetic resonance imaging contrast agent gadoliniummethoxyl-benzyl-diethylenetriamine-pentaacetic acid. *Invest Radiol* 49:78–86
 [6] Leonhardt M, Keiser M, Oswald S et al. (2010) Hepatic uptake of the magnetic resonance imaging contrast agent Gd-EOB-DTPA: role of human organic anion transporters. *Drug Metab Dispos* 38:1024–1028



Markus Keiser, Jia Jia, Werner Siegmund, Anett Ullrich und Dieter Runge (v. l. n. r.)

Korrespondenzadresse:
 Dr. Dieter Runge
 PRIMACYT GmbH
 Hagenower Straße 73
 D-19061 Schwerin
 Tel.: 0385-3993-600
 Fax: 0385-3993-602
 dieter.runge@primacyt.de

▲ **Abb. 4:** Zeitabhängiger Effluxtransport von Estradiol-17β-Glucuronid über MRP2 (*multidrug resistance protein 2*) und Hemmung durch MK571 in primären Beagle-Hepatozyten. (AUC = *area under curve*, n = 5). Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwertes ($M \pm SEM$).

Sollten Regulationsbehörden wie die EMA oder FDA entsprechende Transportstudien an Hepatozyten obligatorisch verlangen, könnten entsprechende Zellmodelle, die auf primären Hepatozyten basieren, dazu beitragen, die Anzahl von Tierversuchen deutlich zu reduzieren, da Toxizitäts- oder Transporterstudien an einem der *in vivo*-Situation ähnlichen Modell durchgeführt werden können. ■

Literatur

[1] Ullrich A, Stolz DB, Ellis E et al. (2009) Long term cultures of primary human hepatocytes as an alternative to drug testing in animals. *Altox* 26:295–302
 [2] Aninat C, Piton A, Glaise D et al. (2006) Expression of cytochromes P450, conjugating enzymes and nuclear receptors in human hepatoma HepaRG cells. *Drug Metab Dispos* 34:75–83
 [3] Le VM, Jigorel E, Glaise D et al. (2006) Functional expression of sinusoidal and canalicular hepatic drug transporters in the differentiated human hepatoma HepaRG cell line. *Eur J Pharm Sci* 28:109–117
 [4] Giacomini KM, Huang SM (2013) Transporters in drug development and clinical pharmacology. *Clin Pharmacol Ther* 94:3–9