

Untersuchungen zur Expression, Funktion und Regulation der ABC-Transporter P-Glykoprotein und Multidrug Resistance Protein 3 beim Menschen

Von der Fakultät für Chemie an der Universität Stuttgart zur Erlangung der Würde
eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
genehmigte Abhandlung

Vorgelegt von

Monika Hitzl

aus Salzburg

Hauptberichter: Prof. Dr. D. Wolf

Mitberichter: Prof. Dr. M. Eichelbaum

Prüfer: Prof. Dr. R. Schmid

Tag der mündlichen Prüfung: 24.03.2003

Institut für Biochemie
Dr. Margarete Fischer-Bosch Institut für Klinische Pharmakologie
Stuttgart, 2003

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und unter ausschließlicher Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und der Ratschläge von jeweils namentlich aufgeführten Personen angefertigt habe.

Monika Hitzl

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	3
Abkürzungsverzeichnis	8
1 Zusammenfassung.....	10
2 Abstract.....	12
3 Einleitung	18
3.1 Vorbemerkungen.....	18
3.2 Das ABC-Transporterprotein P-Glykoprotein	19
3.2.1 Die Lokalisation von P-Glykoprotein	20
3.2.2 Die Struktur von P-Glykoprotein.....	21
3.2.3 Die Funktion von P-Glykoprotein und seine Substrate.....	22
3.2.4 Der Einfluss von exogenen Faktoren auf die P-Glykoprotein-expression	23
3.2.5 Der Einfluss von Polymorphismen im <i>MDR1</i> -Gen auf die P-Glykoproteinexpression und -funktion.....	24
3.3 Das ABC-Transporterprotein Multidrug Resistance Protein 3	26
3.3.1 Multidrug Resistance Proteine	26
3.3.2 Topologie, Lokalisation und Expression von MRP3	27
3.3.3 Substratspezifität von MRP3	28
3.3.4 Die Rolle von MRP3 bei der Arzneimittelresistenz.....	28
3.3.5 Physiologische Funktion von MRP3.....	29
3.4 Ziele der Arbeit:	31
4 Methoden	32
4.1 P-Glykoprotein.....	32
4.1.1 Molekularbiologische Methoden.....	32
4.1.1.1 Isolierung von humaner genomischer DNA aus Vollblut.....	32
4.1.1.2 Genotypisierung mittels „Denaturing High-performance liquid chromatography“ (DHPLC).....	32
4.1.1.2.1 Nachweis der C3435T Mutation in Exon 26 des <i>MDR1</i> -Gens	33
4.1.1.2.2 Nachweis der G2677T Mutation in Exon 21 des <i>MDR1</i> -Gens	35
4.1.1.3 RNA Isolierung aus Vollblut	35
4.1.1.4 RNA Isolierung aus humanem Gewebe (Plazenta, Kolon)	36
4.1.1.5 RNA Quantifizierung	37
4.1.1.6 Qualitative Analyse der RNA.....	37
4.1.1.7 Quantifizierung der <i>MDR1</i> mRNA durch RT-PCR mit real time TaqMan Technologie	38
4.1.1.7.1 Durchführung der cDNA Synthese:	39

4.1.1.7.2	Durchführung der real time TaqMan PCR:	40
4.1.2	Bestimmung der P-Glykoproteinfunktion in CD56 ⁺ NK-Zellen mit der Methode des Rhodaminefflux	42
4.1.2.1	Übersicht	42
4.1.2.2	Isolierung der mononukleären Zellen aus Vollblut	43
4.1.2.3	Rhodaminefflux	44
4.1.2.4	Messung der intrazellulären Rhodamin123 Fluoreszenz von CD56 ⁺ NK-Zellen mittels Durchflußzytometer.....	45
4.1.3	Proteinchemische Methoden.....	46
4.1.3.1	Aufarbeitung von Plazentagewebe	46
4.1.3.2	Aufarbeitung von Kolongewebe	47
4.1.3.3	Bestimmung der Proteinmenge nach der Methode von Smith.....	48
4.1.4	Biochemische Methoden	49
4.1.4.1	Western Blot Analyse von P-Glykoprotein	49
4.1.5	Immunhistochemische Methoden.....	52
4.1.5.1	Nachweis von P-Glykoprotein in humaner Plazenta	52
4.1.5.2	Nachweis von P-Glykoprotein in humanem Kolongewebe	53
4.2	Multidrug Resistance Protein 3.....	54
4.2.1	Zellbiologische Methoden.....	54
4.2.1.1	In vitro Inkubationsexperimente mit CaCo-2 Zellen	54
4.2.1.1.1	Inkubation von CaCo-2 Zellen mit Rifampicin	55
4.2.1.1.2	Inkubation von CaCo-2 Zellen mit Gallensäuren.....	55
4.2.1.2	In vitro Inkubationsexperimente mit HepG2 Zellen	56
4.2.1.2.1	Inkubation von HepG2 Zellen mit Rifampicin	58
4.2.1.2.2	Inkubation von HepG2 Zellen mit Cortisol	58
4.2.1.2.3	Inkubation von HepG2 Zellen mit Omeprazol.....	58
4.2.1.2.4	Inkubation von HepG2 Zellen mit β -Naphtoflavon.....	59
4.2.2	Molekularbiologische Methoden.....	59
4.2.2.1	RNA Isolierung aus humanem Gewebe (Leber, Kolon, Duodenalbiopsien) ...	59
4.2.2.2	RNA Isolierung aus Zellen (HepG2, CaCo-2)	60
4.2.2.3	RNA Isolierung aus CaCo-2 Zellen mit Trizol	60
4.2.2.4	Quantifizierung der MRP3 mRNA durch RT-PCR über real time TaqMan Technologie	61
4.2.2.4.1	Durchführung der cDNA Synthese	61
4.2.2.4.2	Durchführung der real time TaqMan PCR:	61
4.2.3	Proteinchemische Methoden.....	63
4.2.3.1	Aufarbeitung von Kolongewebe	63

4.2.3.2	Aufarbeitung von Lebergewebe	63
4.2.3.3	Aufarbeitung von Zellen (HepG2, CaCo-2)	64
4.2.3.4	Bestimmung der Proteinkonzentration nach der Methode von Smith	64
4.2.4	Biochemische Methoden	64
4.2.4.1	Western Blot Analyse von MRP3	64
4.2.5	Immunhistochemische Methoden	65
4.2.5.1	Nachweis von MRP3 in Kolongewebe	65
4.2.6	Cytochrom P450 1A Aktivitätsmessung	66
4.3	Statistische Auswertung	67
5	Ergebnisse	68
5.1	P-Glykoprotein	68
5.1.1	P-Glykoproteinexpression und -funktion in peripheren mononukleären Zellen in Abhängigkeit vom <i>MDR1</i> -Genotyp	68
5.1.1.1	Probandendokumentation	68
5.1.1.2	Genotypisierung	69
5.1.1.2.1	Analyse des <i>MDR1</i> -Genotyps in Exon 26 an Position 3435:	69
5.1.1.2.2	Analyse des <i>MDR1</i> -Genotyps in Exon 21 an Position 2677:	70
5.1.1.3	Quantifizierung der <i>MDR1</i> mRNA aus Leukozyten	72
5.1.1.4	P-Glykoproteinfunktion in CD56 ⁺ NK-Zellen	73
5.1.1.4.1	Methodenvalidierung:	73
5.1.1.4.2	Messung der Probanden	74
5.1.2	P-Glykoproteinexpression in humaner Plazenta in Abhängigkeit vom <i>MDR1</i> -Genotyp	78
5.1.2.1	Genotypisierung	78
5.1.2.2	Quantifizierung der <i>MDR1</i> mRNA in humanem Plazentagewebe	78
5.1.2.3	Quantifizierung von P-Glykoprotein in humanem Plazentagewebe	81
5.1.2.3.1	Methodenvalidierung	81
5.1.2.3.2	Messergebnisse	81
5.1.2.4	Immunhistochemischer Nachweis von P-Glykoprotein in Plazenta	81
5.1.3	P-Glykoproteinexpression in Kolongewebe in Abhängigkeit vom <i>MDR1</i> -Genotyp	81
5.1.3.1	Patientendokumentation und Genotypisierung	81
5.1.3.2	Quantifizierung der <i>MDR1</i> mRNA	81
5.1.3.3	Quantifizierung von P-Glykoprotein in Kolongewebe	81
5.1.3.3.1	Methodenoptimierung	81
5.1.3.3.2	Messung der Proben	81
5.1.3.4	Immunhistochemischer Nachweis von P-Glykoprotein in Kolongewebe	81

5.2	Multidrug Resistance Protein 3 (MRP3)	81
5.2.1	Regulation der MRP3-Expression	81
5.2.1.1	Der Einfluss von Rifampicin auf die <i>MRP3</i> mRNA Expression	81
5.2.1.1.1	<i>MRP3</i> mRNA Expression in humanem Duodenum	81
5.2.1.1.2	<i>MRP3</i> mRNA Expression in CaCo-2 Zellen	81
5.2.1.1.3	<i>MRP3</i> mRNA Expression in HepG2 Zellen	81
5.2.1.2	Der Einfluss von Cortisol auf die MRP3-Expression in HepG2 Zellen	81
5.2.1.2.1	<i>MRP3</i> mRNA Expression in HepG2 Zellen	81
5.2.1.2.2	MRP3 Proteinexpression in HepG2 Zellen	81
5.2.1.3	Der Einfluss von Omeprazol auf die MRP3-Expression in Hepatozyten	81
5.2.1.3.1	MRP3-Expression in humaner Leber	81
5.2.1.3.2	MRP3-Expression in HepG2 Zellen	81
5.2.1.3.3	Untersuchungen zum Mechanismus der MRP3 Induktion durch Omeprazol	81
5.2.1.4	Einfluss von Gallensäuren auf die MRP3-Expression in CaCo-2 Zellen	81
5.2.1.4.1	<i>MRP3</i> mRNA Mengen	81
5.2.1.4.2	MRP3 Protein	81
5.2.2	MRP3-Expression in gesundem Kolongewebe und Kolon-Tumorgewebe	81
5.2.2.1	Patientendokumentation	81
5.2.2.2	<i>MRP3</i> mRNA Mengen in Kolongewebe	81
5.2.2.3	MRP3 Proteinexpression in Kolongewebe	81
5.2.2.4	Immunhistochemischer Nachweis von MRP3 in Kolongewebe	81
6	Diskussion	81
6.1	P-Glykoprotein	81
6.1.1	P-Glykoproteinexpression und -funktion in peripheren, mononukleären Zellen in Abhängigkeit vom <i>MDR1</i> -Genotyp	81
6.1.2	P-Glykoproteinexpression in humaner Plazenta in Abhängigkeit vom <i>MDR1</i> -Genotyp	81
6.1.3	Die Auswirkungen einer genetisch bedingten Veränderung der P-Glykoproteinexpression und -funktion auf die Arzneimittel-therapie	81
6.1.4	Mögliche Mechanismen, die den Einfluss der Mutationen im <i>MDR1</i> -Gen auf die P-Glykoproteinexpression und -funktion erklären	81
6.2	Multidrug Resistance Protein 3	81
6.2.1	Regulation der MRP3-Expression	81
6.2.1.1	Der Einfluss von Rifampicin auf die MRP3-Expression	81
6.2.1.2	Der Einfluss von Omeprazol auf die MRP3-Expression	81
6.2.1.3	Der Einfluss von Gallensäuren auf die MRP3-Expression	81

6.2.2	MRP3-Expression in gesundem Kolon-Gewebe und Kolon-Tumorgewebe.....	81
7	Literaturverzeichnis	81
8	Lebenslauf.....	81
9	Danksagung	81

Abkürzungsverzeichnis

ABC	ATP-binding cassette
AML	akute myeloische Leukämie
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäuren
AUC	area under the curve
CA	Cholsäure
CD	cluster of differentiation
CDA	Chenodeoxycholsäure
cMOAT	multispecific organic anion transporter
DA	Deoxycholsäure
DHPLC	denaturing high performance liquid chromatography
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase I	Deoxyribonuclease I
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
EBSS	Earle's balanced salt solution [J Nat. Cancer Inst. (1943) 4, 167]
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FAM	6-Carboxyfluorescein
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FSC	Vorwärts-Streulicht
GA	Glycolitocholsäure
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase
GCA	Glychocholsäure
GCDCA	Glycochenodeoxycholsäure
GDCA	Glycodeoxycholsäure
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathiondisulfid
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonsäure
inkl.	inklusive
LA	Lithocholsäure
MDR	multidrug resistance
min	Minuten
MOPS	3-(N-morpholino)propansulfonsäure
mRNA	messenger Ribonukleinsäure

MRP3	multidrug resistance protein 3
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
OD	optische Dichte
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDAR	Pre-Developed Assay Reagents
POD	Meerrettichperoxidase
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptions-PCR
s	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat
SNP	single nucleotide polymorphism
SSC	Seitwärts-Streulicht
TAMRA	6-Carboxytetramethylrhodamin
TCA	Taurocholsäure
TCDCA	Taurochenodeoxycholsäure
TDA	Taurodeoxycholsäure
TEAA	Triethylammonium Acetat
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydromethyl)aminomethan
TUA	Tauroursodeoxycholsäure
UA	Ursodeoxycholsäure

1 Zusammenfassung

Das Ausmaß der Wirkung eines Arzneimittels hängt von seiner Konzentration am Wirkort ab. Zu niedrige Konzentrationen des Wirkstoffes haben keinen erwünschten therapeutischen Effekt beim Patienten. Im Gegensatz dazu bewirken zu hohe Arzneimittelkonzentrationen häufig toxische Nebenwirkungen. Arzneimitteltransporterproteine sind neben Arzneimittel-metabolisierenden Enzymen für die Pharmakakonzentration am Wirkort verantwortlich. Das Verständnis der Ursachen interindividueller Unterschiede in der Expression solcher Transporterproteine kann somit dazu beitragen, interindividuelle Unterschiede in der Arzneimittelwirkung zu verstehen.

In dieser Arbeit wurden zwei ATP-binding cassette Transporterproteine, P-Glykoprotein und Multidrug Resistance Protein 3 untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass ein Polymorphismus in Exon 26 des humanen *MDR1*-Gens (C3435T) mit einer reduzierten P-Glykoproteinexpression und -funktion assoziiert ist. Träger dieses Polymorphismus (3435 TT) zeigten eine niedrigere P-Glykoproteinexpression in Leukozyten als Probanden mit dem CC-Genotyp. Zur Ermittlung der P-Glykoproteinfunktion wurde der Efflux des P-Glykoproteinsubstrates Rhodamin123 aus Leukozyten mit der höchsten P-Glykoproteinexpression (CD56⁺ NK-Zellen) gemessen. Die P-Glykoproteinfunktion in CD56⁺ NK-Zellen von Individuen mit dem Genotyp 3435 TT in Exon 26 des *MDR1*-Gens war signifikant niedriger als bei Individuen mit dem CC-Genotyp. Die Abhängigkeit der P-Glykoproteinexpression vom *MDR1*-Genotyp wurde auch in Plazenta- und Kolongewebe untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die P-Glykoproteinexpression in humanem Plazentagewebe durch den Polymorphismus C3435T in ähnlicher Weise wie in den CD56⁺ NK-Zellen beeinflusst wurde. In Fällen, in denen Mutter und Kind den gleichen Genotyp hatten, führte die Mutation in Exon 26 des *MDR1*-Gens (3435 TT) zu einer 40 %igen Reduktion der P-Glykoproteinexpression in Plazentagewebe. Diese Befunde bedeuten, dass Arzneimittel, welche P-Glykoproteinsubstrate sind (z. B. HIV-Proteaseinhibitoren), niedrigere Konzentrationen in den Leukozyten von Individuen mit dem Genotyp 3435 CC erreichen und somit möglicherweise eine geringere Wirksamkeit haben (z. B. bei HIV). Eine genetisch-bedingte, niedrigere P-Glykoproteinexpression in der Plazenta dürfte die Anreicherung von Xenobiotika im Feten verstärken und könnte somit ein erhöhtes Teratogenitätsrisiko darstellen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die Expression und Regulation von Multidrug Resistance Protein 3 untersucht. Eine Analyse von 62 humanen Lebern zeigte eine erhebliche

Variabilität der Multidrug Resistance Proteins 3 Expression. Der Protonenpumpenhemmer Omeprazol wurde als Faktor identifiziert, der zu einer signifikanten Erhöhung der Multidrug Resistance Proteins 3 Expression im Lebergewebe von Patienten führt. Durch in vitro Experimente konnte die Induktion des Multidrug Resistance Proteins 3 durch Omeprazol bestätigt werden. Weitere Experimente zeigten, dass der Aryl Hydrokarbon Rezeptor am Mechanismus der Induktion von Multidrug Resistance Protein 3 durch Omeprazol beteiligt ist. Es konnte außerdem nachgewiesen werden, dass Gallensäuren die Expression von Multidrug Resistance Protein 3 in CaCo-2 Zellen induzieren. Da die Expression von ABC-Transporterproteinen häufig in Tumorgewebe induziert ist und somit zur Multidrug Resistance bei der Chemotherapie beiträgt, wurde die MRP3-Expression in Kolon-Tumorgewebe untersucht. Es konnte jedoch bei diesem Tumor eine niedrigere MRP3-Expression im Vergleich zu gesundem Kolongewebe nachgewiesen werden.

Mit dieser Arbeit wurden Faktoren identifiziert, die zu einer variablen Transporterprotein-expression beitragen. Das bessere Verstehen dieser Einflussfaktoren könnte somit einen Beitrag zu einer individualisierten, sichereren Arzneimitteltherapie leisten.

2 Abstract

Drug disposition is an important factor influencing success of drug treatment. The intensity and duration of drug action and possible toxic side effects depend on the drug concentration at the site of action. If the same dose of a drug is administered to patients substantial interindividual differences in drug concentrations have been observed. Whereas the role of drug metabolism has been characterised, it was only recently appreciated that some proteins can transport drugs in and out of the cell. As this transporter proteins are expressed in intestine, liver and kidney, they will affect the absorption and elimination of drugs. Moreover, the transfer of drugs from blood into brain or lymphocytes is controlled by these so called transporters. Since there is substantial variability in the expression, even at identical plasma concentrations drug efficacy can differ, as cellular drug concentration at the site of action is different. Knowledge about mechanisms for interindividual variability in expression and function of such active transport systems contributes to improved efficacy and safety of drug therapy. This thesis reports analysis of expression, function and regulation of the two active transport systems for drugs, P-glycoprotein and multidrug resistance protein 3 (MRP3).

The *MDR1* (multidrug resistance) gene product P-glycoprotein is a membrane protein, which functions as an ATP-dependent exporter of drugs from cells (Bellamy, 1996; Borst and Schinkel, 1996; Gottesman et al., 1996; Fromm, 2000). In addition to its role for the development of multidrug resistance during chemotherapy of tumours (e.g. with vinca alkaloids, etoposide), it is expressed in normal tissues with excretory function (intestine, liver and kidney), testis, the blood-brain barrier and placenta (Thiebaut et al., 1987; Cordon-Cardo et al., 1989). *MDR1* mRNA and P-glycoprotein-mediated dye transport have also been found in normal leukocyte lineages (Drach et al., 1996). Klimecki et al. (Klimecki et al., 1995) determined the highest *MDR1* mRNA levels in CD56⁺ natural killer cells, followed by lower expression levels in CD4⁺, CD15⁺, CD19⁺ and CD14⁺ cells. P-glycoprotein has been shown to determine absorption and CNS concentrations of its substrates (e. g. digoxin, cyclosporine, paclitaxel, HIV-1 protease inhibitors; (Schinkel et al., 1995; Lown et al., 1997; Sparreboom et al., 1997; Kim et al., 1998). Inhibition and induction of P-glycoprotein were identified as underlying mechanisms of drug interactions (Schinkel et al., 1995; Kim et al., 1998; Fromm et al., 1999). Inhibition of P-glycoprotein-mediated digoxin transport by quinidine has been shown to be the underlying mechanism of increased digoxin plasma concentrations in patients during concomitant therapy with the antiarrhythmic quinidine (Fromm et al., 1999). Moreover, rifampin increased expression of P-glycoprotein in human duodenum thereby determining absorption of the cardiac glycoside (Greiner et al., 1999).

However, P-glycoprotein expression and function is not only determined by exogenous factors. Recently, a polymorphism in exon 26 (C3435T) of the *MDR1* gene has been identified, which correlates with P-glycoprotein expression and function in humans (Hoffmeyer et al., 2000). Carriers homozygous for this polymorphism (TT) showed more than 50 % lower intestinal P-glycoprotein expression and higher plasma concentrations after oral administration of the P-glycoprotein substrate digoxin compared to the CC group. Until now it has not been reported whether this polymorphism also determines P-glycoprotein expression and function in other tissues.

MRP3 is a member of the multidrug resistance protein (MRP) family (for review see (Borst et al., 2000; Keppler and König, 2000)). These membrane proteins mediate ATP-dependent efflux of lipophilic substances conjugated to glucuronate, glutathione and sulfate. Substrates of the basolateral export pump MRP3 are sulfated and nonsulfated bile salts, 17 β -glucuronosyl estradiol, leukotriene C4 and several anticancer drugs (König et al., 1999; Zeng et al., 1999; Hirohashi et al., 2000; Zelcer et al., 2001). MRP3 appears to be involved in bile salt homeostasis by several ways. First, expression of MRP3 in the basolateral membrane of enterocytes indicates that it could be involved in intestinal transport of organic anions from the cells into portal blood (Rost et al., 2002). Second, MRP3 expression was found in the basolateral membrane of human hepatocytes with exceptionally high expression in livers from patients with Dubin-Johnson syndrome and a patient with primary biliary cirrhosis, in the lateral membrane of intrahepatic bile duct epithelial cells (cholangiocytes and in the basolateral membrane of human gallbladder epithelia) (König et al., 1999; Kool et al., 1999; Gotoh et al., 2000; Rost et al., 2001). Since in animal models of cholestasis, Mrp2 is downregulated while MRP3 expression is induced (Hirohashi et al., 1998; Ogawa et al., 2000; Donner and Keppler, 2001), it appears that MRP3 compensates for impaired MRP2 function and responds to bile salts at transcriptional level (Schuetz et al., 2001). Accordingly, recent data indicate that intestinal MRP3 is also induced by bile acids (Inokuchi et al., 2001). In addition to increased MRP3 expression in humans during cholestasis, there is little information on the variability of MRP3 expression in normal human tissues like duodenum, liver, and colon and on factors contributing to MRP3 expression such as comedication.

The aims of the first part of this thesis were to investigate if there is any association of P-glycoprotein expression or function in different tissues and the *MDR1*-genotype. The following points were investigated

- *MDR1* mRNA expression in leukocytes and efflux of the P-glycoprotein substrate rhodamine 123 from CD56⁺ natural killer (NK) cells of healthy individuals with different *MDR1*-genotypes
- P-glycoprotein expression in human placenta and colon from individuals with different *MDR1*-genotypes

In the second part of this work, factors were identified contributing to different MRP3 expression in human tissues. Therefore, investigations to the points mentioned below were done.

- Influence of rifampicin on the MRP3 expression in human duodenal biopsies
- MRP3 expression and regulation in a large collection of human livers and HepG2 cells
- Influence of cortisol and omeprazole on the MRP3 expression in human liver and HepG2 cells
- Mechanism of MRP3 induction
- Influence of bile acids on the MRP3 expression
- MRP3 expression in colon tumour tissues in comparison to the MRP3 expression in non-tumours tissues

P-glycoprotein

The genotype 3435 TT in exon 26 of the *MDR1* gene is associated with reduced P-glycoprotein expression and function in human small intestine (Hoffmeyer et al., 2000). However it has not been investigated, whether this polymorphism is also associated with lower P-glycoprotein expression in other tissues. Therefore, this polymorphism and the linked polymorphism in exon 21 (G2677T) were analysed for correlation with P-glycoprotein expression and function in leukocytes, placenta and colon.

MDR1 mRNA was quantified in leukocytes by real-time PCR. *MDR1* mRNA normalised for cyclophilin was lowest in the 3435 TT population (1.29 ± 1.01), intermediate in heterozygous

subjects (3435 CT, 1.60 ± 0.76) and highest in the 3435 CC group (1.91 ± 0.94 ; n.s.). The same results were obtained for the G2677T mutation (TT, 0.99 ± 0.57 vs. GT, 1.56 ± 0.99 vs GG 1.97 ± 0.96). For subjects carrying both polymorphisms (3435 TT and 2677 TT), *MDR1* mRNA levels were significantly lower than for wildtype individuals (3435 CC and 2677 GG; 2.07 ± 0.99 vs. 0.99 ± 0.57 ; $p < 0.05$). Moreover, efflux of the P-glycoprotein-substrate rhodamine 123 from CD56⁺ natural killer cells was assessed. Leukocytes were isolated from whole blood of 31 healthy Caucasian individuals. Using flow cytometry rhodamine fluorescence was determined in CD56⁺ cells. Subjects with 3435 CC genotype revealed a significantly lower rhodamine fluorescence (i.e. higher P-glycoprotein function) in comparison to individuals with 3435 TT genotype (51.1 ± 11.4 %, $n = 10$ vs 67.5 ± 9.5 %, $n = 10$; $p < 0.01$). Heterozygous individuals (3435 CT) had an intermediate rhodamine fluorescence (61.4 ± 6.3 %, $n = 11$). Similar results were obtained for the G2677T polymorphism. Significantly lower rhodamine fluorescence was observed for subjects with 2677 GG genotype compared to individuals with 2677 GT or 2677 TT genotype (GG, 52.4 ± 12.2 %, $n = 10$ vs GT, 65.0 ± 9.2 %, $n = 14$ or TT, 63.2 ± 9.2 %, $n = 6$; $p < 0.05$). Subjects homozygous for both mutant alleles (3435 TT and 2677 TT) showed also significantly higher rhodamine fluorescence corresponding lower P-glycoprotein function. In summary, subjects being homozygous for C in position 3435 and/or G in position 2677 of the *MDR1* gene have a higher *MDR1* mRNA expression in leukocytes and a more pronounced efflux of rhodamine from CD56⁺ natural killer cells than subjects with the TT genotype. Measurement of rhodamine efflux using flow-cytometry from peripheral blood cells allows assessment of genetically determined differences in P-glycoprotein function.

In addition, *MDR1* mRNA and P-glycoprotein was analysed in 73 full-term human placentas of Caucasians by TaqMan RT-PCR and Western blotting, respectively. *MDR1* genotypes at positions 3435 (C3435T) and 2677 (G2677T/A) of mothers and children were determined by denaturing high-performance liquid chromatography. P-glycoprotein levels were lower, when both mother and child were homozygous for the mutant allele (3435 TT) compared to homozygotes for the wild-type allele (TT/tt, $n = 13$, 0.40 ± 0.18 a. u.; CC/cc, $n = 10$, 0.66 ± 0.29 a. u., $P < 0.05$). Moreover, placentas from mothers carrying both polymorphism (3435T and 2677T; TT/TT) showed also a significantly lower P-glycoprotein expression ($n = 5$, 0.31 ± 0.12 a. u.) compared to placentas of wild type individuals (CC/GG, $n = 11$, 0.71 ± 0.31 a. u., $p < 0.05$). Taken together, polymorphisms C3435T and G2677T of the *MDR1* gene are also associated with lower placental P-glycoprotein expression and could therefore be important factors for variable fetal exposure to xenobiotics.

Finally, *MDR1* mRNA in colon tissues of patients with different *MDR1*-genotypes was analysed by TaqMan RT-PCR and Western blotting, respectively. Individuals with 3435 CC genotype ($n = 3$, 8.83 ± 4.75 a. u.) showed a trend for higher *MDR1* mRNA levels compared to individuals with the 3435 TT genotype ($n = 3$, 6.16 ± 1.74 a. u.).

Multidrug resistance protein 3 (MRP3)

MRP3 expression was measured in 8 duodenal biopsies obtained before and after treatment of healthy volunteers with rifampicin. There was no increase of *MRP3* mRNA in human enterocytes during rifampicin treatment.

Moreover, MRP3 expression in a large collection of human livers and factors contributing to variable MRP3 expression in liver and HepG2 cells were investigated. MRP3 was measured in 62 human livers from patients and showed a variable MRP3 mRNA expression (factor 86) and MRP3 protein expression. No MRP3 protein was detectable in 2 livers. In the remainder of the population MRP3 protein expression varied 193-fold. Omeprazole has been identified as a factor being responsible for this variability in MRP3 expression in human liver and HepG2 cells. Livers of patients treated with omeprazole showed 4.8-fold ($p < 0.0001$) higher MRP3 protein expression compared to the remainder of the population. Accordingly, MRP3 mRNA and protein were induced 2.4- and 1.8-fold, respectively ($P < 0.01$ and $P < 0.05$), in HepG2 cells treated with omeprazole. Patients without omeprazole treatment showed a variability in MRP3 expression in human liver of factor 88; therefore it could be possible, that apart from omeprazole also other factors like polymorphism in the *MRP3* gene may lead to variable MRP3 expression in human liver. In summary, treatment with the protonpump inhibitor omeprazole is one determinant of variable human hepatic MRP3 expression.

To investigate the potential involvement of the Ah receptor pathway in the MRP3 induction by omeprazole, HepG2 cells were incubated with the Ah receptor ligand β -naphthoflavone. As a positive control, in these cells the induction of CYP1A activity by β -naphthoflavone was determined by analysing the metabolism of the CYP1A substrate ethoxyresorufine. *MRP3* mRNA levels were 1.78 ± 0.86 , 5.47 ± 0.94 and 5.81 ± 0.29 a. u. in control, 5 μ M and 10 μ M β -naphthoflavone treated cells, respectively. Cells, which were treated with 5 μ M and 10 μ M β -naphthoflavone, showed on average a 10.5- and 8.5-fold higher resorufine formation in comparison to control cells, respectively. These results indicate that the Ah receptor pathway

is involved in MRP3 induction. In vitro incubation experiments of CaCo-2 cells with bile acids showed also an induction of MRP3 expression by lithocholic acid and chenodeoxycholic acid. Finally, *MRP3* mRNA in non-tumours-colon tissues and colon tumour tissues of 9 patients was analysed by TaqMan RT-PCR. MRP3 mRNA levels were significant lower in colon tumour tissues compared to non-tumours colon tissues (8.70 ± 6.35 vs. 21.24 ± 13.25 ; $p < 0.05$) whereas MRP3 protein expression was not different in these tissues.

In summary, measurement of rhodamine efflux using flow-cytometry from peripheral blood cells allows assessment of genetically determined differences in P-glycoprotein function. Investigating an individual's phenotype using easily accessible peripheral blood cells might aid the search for further P-glycoprotein mutations and identification of subjects of increased risk of drug toxicity or reduced therapeutic response. This could be of clinical relevance for the treatment of the HIV infection, since CD4⁺ T-lymphocytes are the major cellular target of HIV-1 protease inhibitors (Lucia et al., 1995). Indinavir, nelfinavir and saquinavir have been identified as P-glycoprotein substrates (Kim et al., 1998). A more pronounced P-glycoprotein function in these cells of subjects with the CC genotype in comparison to the remainder of the population could limit intracellular concentrations of these compounds thereby limiting their therapeutic efficacy.

Knowledge about the association of the P-glycoprotein expression in placenta with the *MDR1*-genotype gives information about protection of the fetus against teratogenic effects of amphipathic toxins.

The link between transporter function and drug disposition and effects is not understood for MRP3 so far. Using in vitro studies in combination with clinical samples induction of this ABC transporter involved in homeostasis of endogenous compounds as well as in drug disposition was found. Moreover, evidence is provided for the putative mechanism of MRP3 induction.

Taken together, the findings of this work improved the understanding on expression, function and regulation of two active drug transport systems and might therefore contribute to a safer drug therapy.

3 Einleitung

3.1 Vorbemerkungen

Ein zentrales Problem der Arzneimitteltherapie ist die unterschiedliche Wirkung derselben Dosis eines Arzneimittels bei verschiedenen Patienten. So kann bei einem Patienten nach Gabe der Standarddosis kein erwünschter therapeutischer Effekt auftreten, hingegen ein anderer Patient bei dieser Dosis bereits unerwünschte Arzneimittelwirkungen zeigen. Ziel der rationalen Arzneimitteltherapie ist es, die Dosierung den individuellen Bedürfnissen anzupassen. Um dieses Ziel zu erreichen ist es erforderlich, die Faktoren zu identifizieren, die für diese inter- und intraindividuelle Variabilität der Arzneimittelkonzentration verantwortlich sind.

Die Wirkung eines Arzneimittels ist das Ergebnis zahlreicher Vorgänge im Organismus, die sich in die pharmakokinetische und die pharmakodynamische Phase unterteilen lassen. Nach der oralen Applikation eines Arzneimittels kommt es in der pharmakokinetischen Phase zur Resorption, d. h. der Aufnahme des Arzneistoffes in den Organismus und zur weiteren Verteilung, dem Stofftransport aus dem Blut ins Gewebe. Aber auch Eliminationsprozesse, wie Biotransformation und Ausscheidung, die zu einer Konzentrationsabnahme des Arzneistoffes im Organismus führen, spielen eine große Rolle in der pharmakokinetischen Phase. Der Teil des Arzneistoffes, der schließlich seinen Wirkort erreicht, kann in der pharmakodynamischen Phase seinen pharmakologischen Effekt in Form einer klinischen Wirkung oder einer toxischen Wirkung entfalten (siehe Abbildung 1).

Da ein Pharmakon nur dann einen therapeutischen Effekt erzielen kann, wenn es in entsprechender Konzentration an den Wirkort gelangt, spielen Prozesse wie die Resorption und die Ausscheidung von Arzneimitteln eine wesentliche Rolle für die Arzneimitteltherapie. An diesen Prozessen sind unter anderem Transporterproteine beteiligt, welche einen aktiven Transport der Arzneimittel durch die Zellmembran vermitteln.

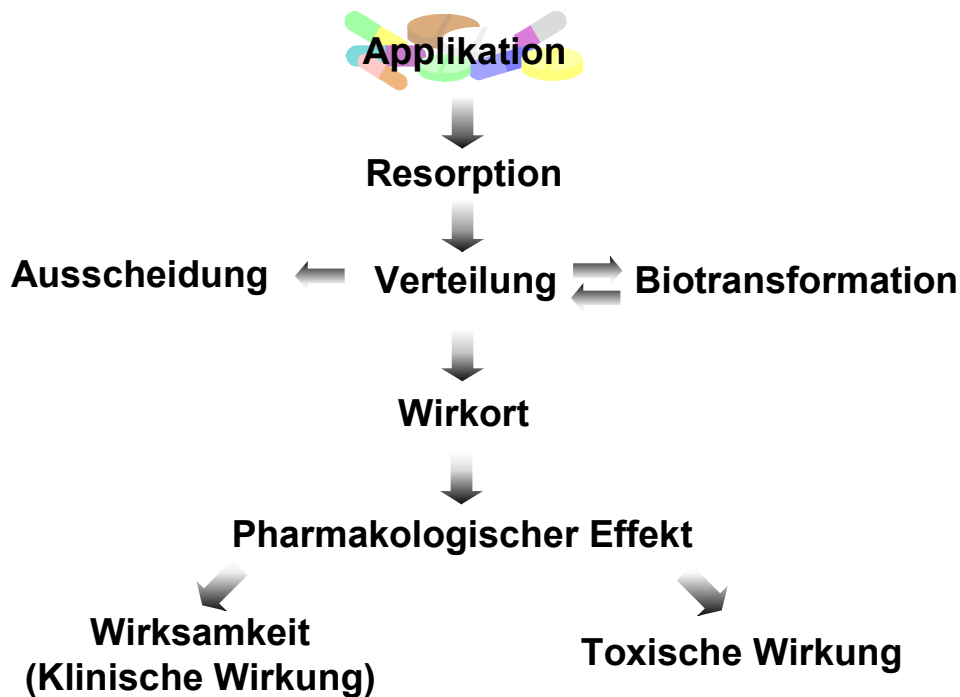


Abbildung 1: Bei oraler Gabe eines Arzneimittels im Organismus ablaufende Vorgänge

Es gibt eine Vielzahl von Transporterproteinen, darunter die Mitglieder der Familie der ATP-Binding Cassette Transporter (ABC-Transporter), welche in dieser Arbeit untersucht wurden. Diese Familie besteht aus zur Zeit 49 bekannten Mitgliedern, die in 7 Gruppen unterteilt sind (ABCA–G). Im Mittelpunkt dieser Arbeit stehen der ABCB1 Transporter, P-Glykoprotein und das ABCC3 Transporterprotein, Multidrug Resistance Protein 3.

3.2 Das ABC-Transporterprotein P-Glykoprotein

Das Membranprotein P-Glykoprotein ist das Produkt des auf dem langen Arm von Chromosom 7 liegenden *MDR1*-Gens und transportiert ATP-abhängig Xenobiotika aus der Zelle. Es wurde erstmals vor 26 Jahren in Tumorzellen beschrieben (Juliano and Ling, 1976) und trägt zur **Multidrug Resistenz (MDR)** gegen Zytostatika in diesen Zellen bei. Beim Auftreten der Multidrug Resistenz von Tumorzellen während einer Chemotherapie werden Zytostatika ATP-abhängig durch das in der Plasmamembran überexprimierte P-Glykoprotein aus der Tumorzelle transportiert. Dieser Transportmechanismus schützt die Tumorzelle durch Erniedrigung der intrazellulären Zytostatikakonzentrationen. Zytostatika, für die das

Phänomen der Multidrug Resistenz beobachtet wurde, sind z. B. Anthrazykline, Vinca-Alkaloide, Etoposid und Paclitaxel (Schinkel, 1997).

3.2.1 Die Lokalisation von P-Glykoprotein

P-Glykoprotein wird jedoch nicht nur in Tumorzellen exprimiert, sondern auch in gesunden Geweben mit Ausscheidungsfunktion, wie Leber, Niere und Darmmukosa, der Blut-Hirn-Schranke und in der Plazenta (Thiebaut et al., 1987; Cordon-Cardo et al., 1989). Die Lokalisation der P-Glykoproteinexpression in diesen Geweben ist in Tabelle 1 angegeben. *MDR1* mRNA wurde auch in Leukozyten gefunden; dabei hatten $CD56^+$ NK-Zellen die höchste *MDR1* mRNA Expression, gefolgt von $CD4^+$, $CD15^+$, $CD19^+$ und $CD14^+$ Zellen (Klimecki et al., 1994). Die Expression von P-Glykoprotein in den $CD34^+$ Stammzellen des Knochenmarks wurde von Gottesmann et al. beschrieben (Gottesman et al., 1996).

Tabelle 1: Lokalisation von P-Glykoprotein in für die Pharmakokinetik von Arzneimitteln wichtigen Geweben und seine Bedeutung für die Arzneimittelelimination

Organ	Zelltyp	Lokalisation	Transport
Leber	Hepatozyt	kanalikuläre Membran	in die Galle
Darm	Enterozyt	apikale (luminale) Membran	in das Lumen des Gastrointestinaltraktes
Niere	Epithelzellen des proximalen Tubulus	apikale (luminale) Membran	in das Lumen des Tubulus
Gehirn	Endothelzellen der Gehirnkapillaren	luminale Membran	ins Blut
Plazenta	Endothelzellen der Blutgefäße Syncytiotrophoblasten	luminale Membran apikale Membran	ins Blut
Testis	Endothelzellen der Blutgefäße	luminale Membran	ins Blut
Leukozyten	$CD56^+$, $CD4^+$, $CD15^+$, $CD19^+$ u. $CD14^+$ Zellen	Zellmembran	aus der Zelle
Knochenmark	$CD34^+$ Stammzellen	Zellmembran	aus der Zelle

3.2.2 Die Struktur von P-Glykoprotein

Das 170 kDa große Membranprotein P-Glykoprotein ist phosphoryliert, glykosyliert und besteht aus 1280 Aminosäuren. Es ist aus zwei homologen Hälften mit je 6 Transmembransegmenten und einer ATP Bindungsstelle aufgebaut. Die beiden Hälften sind durch ein flexibles Polypeptidbindeglied verbunden. Ein zweidimensionales Strukturmodell ist in Abbildung 2 dargestellt.

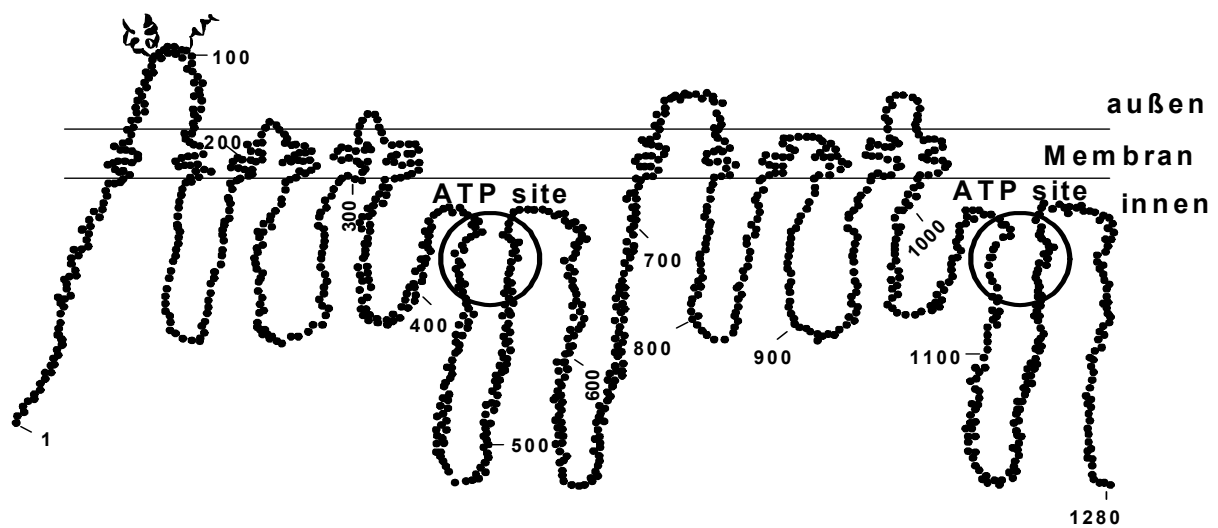


Abbildung 2: Strukturmodell des ABC Transporters P-Glykoprotein (modifiziert aus (Gottesman et al., 1996))

Im Gegensatz zum Menschen, der nur ein *MDR1*-Gen besitzt, wurden in der Maus zwei *Mdr1*-Gene beschrieben, *Mdr1a* und *Mdr1b*. Eine Strukturanalyse mittels Elektronenmikroskopie zeigte, dass P-Glykoprotein einen Zylinder mit einem Durchmesser von 10 nm und einer Höhe von 8 nm bildet. Da die Lipid-Doppelschicht eine Breite von 4 nm hat, ist das Protein zur Hälfte in der Membran verankert. P-Glykoprotein hat eine zentrale Pore von etwa 5 nm Durchmesser und bildet eine wässrige Kammer in der Membran. Diese ist zur extrazellulären Seite hin geöffnet und zum Zytoplasma hin verschlossen (Rosenberg et al., 1997). Mutationsanalysen zeigten, dass die beiden Hälften von P-Glykoprotein interagieren, um den aktiven Transport durchzuführen. Als Substratbindestellen wurden die

Transmembrandomänen 5, 6, 11 und 12 identifiziert (Ambudkar et al., 1999). Substrate werden von P-Glykoprotein erkannt und transportiert. Es sind zwei Mechanismen dafür beschrieben. Ein Modell beschreibt P-Glykoprotein als hydrophoben „Vacuum Cleaner“, wobei Substrate erkannt und anschließend aus der Lipid-Doppelschicht entfernt werden (Gottesman and Pastan, 1993). Ein zweites Modell schlägt eine Flippaseaktivität von P-Glykoprotein vor, bei der Substrate von der inneren Membranseite zur äußeren Membranseite befördert werden (Higgins and Gottesman, 1992).

3.2.3 Die Funktion von P-Glykoprotein und seine Substrate

In vielen Geweben wird P-Glykoprotein in der apikalen Membran von polarisierten Epithelzellen exprimiert. P-Glykoprotein ist aufgrund dieser Lokalisation für den Transport seiner Substrate von den Epithelzellen ins angrenzende Lumen zuständig und stellt dadurch einen Schutzmechanismus der Zelle vor natürlich vorkommenden Toxinen dar, die mit der Nahrung aufgenommen werden. Intestinales P-Glykoprotein limitiert die Resorption von Substraten, hingegen unterstützt renales und hepatisches P-Glykoprotein die Elimination von Substraten in den Urin und die Galle. Die P-Glykoproteinexpression in der Blut-Hirn-Schranke und der Blut-Testis-Schranke führt zu einer verminderten Aufnahme dieser Substanzen in das Gehirn und in den Testis. P-Glykoprotein wird ebenfalls in der Plazentaschranke exprimiert und dient zum Schutz des Fötus vor Toxinen. Es scheint ebenfalls am Hormontransport beteiligt zu sein, da es in den Nebennieren, im Uterus und der Plazenta exprimiert wird und Cortisol, Corticosteron und Aldosteron transportiert (Ueda et al., 1992). Studien an P-Glykoprotein überexprimierenden Zellen (CaCo-2, L-MDR1) und P-Glykoprotein Knock-out-Mäusen gaben Aufschluss über die Bedeutung von P-Glykoprotein für den Arzneimitteltransport (Schinkel et al., 1994; Schinkel, 1997). Eine Reihe von strukturell nicht verwandten, hydrophoben und amphiphatischen Arzneimitteln wie Zytostatika, herzwirksame Glykoside und Antiarrythmika, HIV-Protease Inhibitoren, β -Adrenoceptorantagonisten und Antihistaminika werden von P-Glykoprotein transportiert. Wichtige P-Glykoproteinsubstrate sind in der Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Zusammenfassung der Arzneimittel, die P-Glykoproteinsubstrate darstellen

Arzneimittelgruppe	Arzneimittelbezeichnung
Zytostatika	Actinomycin D, Etoposid, Docetaxel, Doxorubicin, Daunorubicin, Irinotecan, Mitomycin C, Mitoxantron, Paclitaxel, Teniposid, Topotecan, Vinblastin, Vincristin
Kardiaka	β -Acetyldigoxin, α -Methyldigoxin, Digitoxin, Digoxin, Chinidin
HIV-Proteaseinhibitoren	Amprenavir, Indinavir, Nelfinavir, Saquinavir, Ritonavir
Immunsuppressiva	Cyclosporin A, Tacrolimus
Antiemetika	Domperidon, Ondansetron
Antidiarrhetika	Loperamid
Antibiotika	Erythromycin, Levofloxacin, Sparfloxacin
Steroide	Dexamethason
HMG-CoA-Reduktasehemmer	Atorvastatin, Lovastatin
Calciumkanalblocker und Metabolite	Diltiazem, Mibefradil, Verapamil, D-617, D-620
β -Adrenozeptor Antagonisten	Bunitrolol, Celiprolol, Talinolol
H ₁ Antihistaminika	Fexofenadin, Terfenadin
H ₂ Antihistaminika	Cimetidin, Ranitidin
weitere	Debrisoquin, Losartan, Morphin, Phenytoin, Rifampicin

3.2.4 Der Einfluss von exogenen Faktoren auf die P-Glykoprotein-expression

Obwohl das P-Glykoproteinsubstrat Digoxin im Körper nicht metabolisiert wird, wurden bereits Arzneimittelwechselwirkungen beobachtet, welche zu einer erhöhten oder erniedrigten Plasmakonzentration von Digoxin führten. Die Interaktion zwischen Digoxin und Chinidin führte zu einem 2- bis 3-fachen Anstieg der Digoxinplasmakonzentration (Doering et al., 1979; Leahey et al., 1978). Pharmakokinetische Studien zeigten eine erhöhte Resorption und eine reduzierte biliäre und renale Ausscheidung von Digoxin bei gleichzeitiger Gabe von Chinidin (Hager et al., 1979; Pedersen et al., 1983; Angelin et al., 1987; De Lannoy et al.,

1992). Dieser Anstieg der Plasmakonzentration des P-Glykoproteinsubstrates Digoxin bei Patienten, welche gleichzeitig mit dem Antiarrhythmikum Chinidin behandelt wurden, beruht auf einer Hemmung des P-Glykoprotein vermittelten Digoxintransportes durch Chinidin.

Zusätzlich zu dem oben angeführten Beispiel für eine Arzneimittelwechselwirkung, die zu erhöhter Plasmakonzentration führt, wurden reduzierte Digoxinplasmakonzentrationen bei gleichzeitiger Gabe von Rifampicin beobachtet. Es wurde bereits gezeigt, dass das Tuberkulostatikum Rifampicin P-Glykoprotein in einer humanen Kolonkarzinom-Zelllinie induziert (Schuetz et al., 1996). Daraufhin wurde getestet, ob eine Induktion von intestinalem P-Glykoprotein durch Rifampicin zu einer reduzierten Digoxinplasmakonzentration im Menschen führen kann (Greiner et al., 1999). Tatsächlich fand man eine signifikant reduzierte AUC des oral verabreichten Digoxin bei gleichzeitiger Gabe von Rifampicin und eine 3,5-fache Erhöhung der P-Glykoproteinexpression in Duodenalbiopsien. Die gleichzeitige Gabe von Rifampicin und Digoxin führt demnach zu einem erhöhten Digoxintransport durch P-Glykoprotein und somit zu reduzierten Digoxinplasmakonzentrationen aufgrund einer Induktion von intestinalem P-Glykoprotein durch Rifampicin.

3.2.5 Der Einfluss von Polymorphismen im *MDR1*-Gen auf die P-Glykoproteinexpression und -funktion

In den letzten Jahren wurden einige Polymorphismen im *MDR1*-Gen gefunden und deren Auswirkung auf die P-Glykoproteinexpression und -funktion überprüft. Die erste Mutation wurde von Mickley et al. beschrieben (G2677T, G2995A (Mickley et al., 1998)). Eine erste systematische Analyse des *MDR1*-Gens wurde von Hoffmeyer et al. durchgeführt (Hoffmeyer et al., 2000). Sie analysierten alle 28 Exons des *MDR1*-Gens inklusive der Promotorregion und der Intron-Exon-Übergänge von Kaukasiern und fanden 15 Polymorphismen. Sechs davon waren in der kodierenden Region lokalisiert (siehe Abbildung 3). Weitere Analysen wurden von Cascorbi et al. durchgeführt (Cascorbi et al., 2001). Insgesamt wurden bisher 20 Polymorphismen beschrieben, wobei ein Polymorphismus in Exon 26 (C3435T) existiert, welcher mit einer reduzierten P-Glykoproteinexpression und -funktion beim Menschen assoziiert ist (Hoffmeyer et al., 2000). Homozygote Träger dieses Polymorphismus 3435 TT zeigten eine 50 % niedrigere P-Glykoproteinexpression im

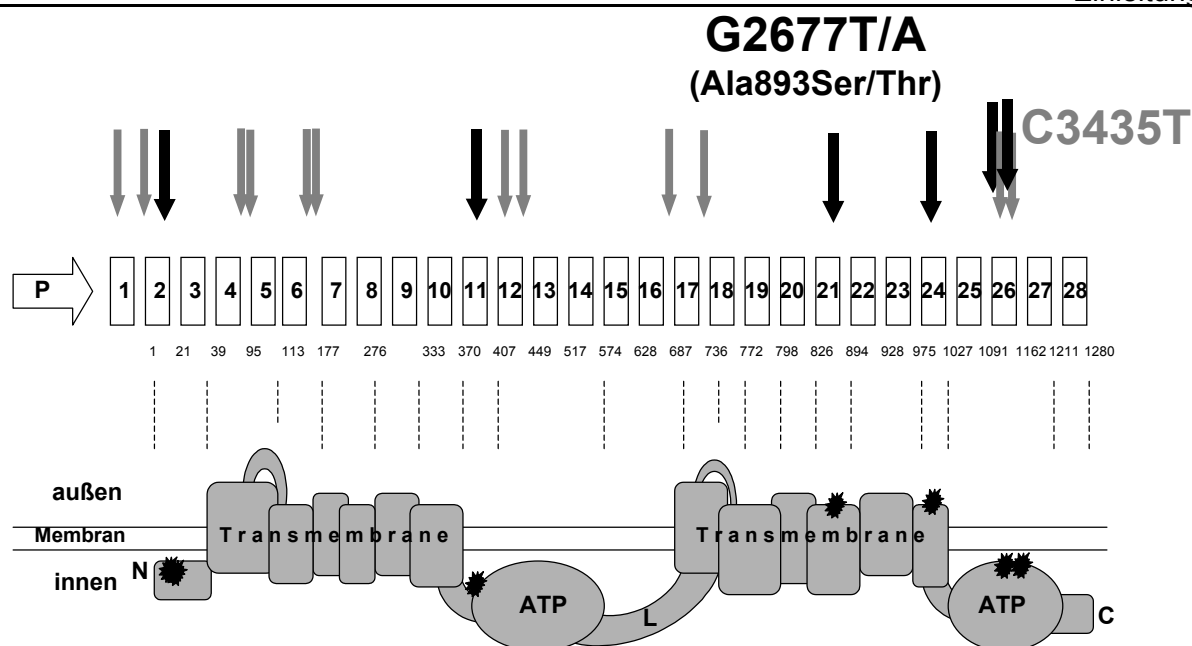


Abbildung 3: Polymorphismen im humanen *MDR1*-Gen. Die Polymorphismen (Pfeile) sind in Relation zur Exon-Intron-Struktur des humanen *MDR1*-Gens und den zugehörigen P-Glykoprotein-domänen. Graue Pfeile zeigen Polymorphismen, welche keinen Aminosäureaustausch bewirken; schwarze Pfeile signalisieren Polymorphismen die zu einem Aminosäureaustausch führen.

Dünndarm als die Wildtyp-Gruppe (CC). Zudem zeigten die homozygoten Träger dieses Polymorphismus (3435 TT) eine höhere AUC des oral verabreichten P-Glykoproteinsubstrates Digoxin als die Wildtyp-Gruppe (3435 CC). Dieser Polymorphismus ist an Position 3435 in Exon 26 des *MDR1*-Gens lokalisiert (siehe Abbildung 3) und führt zu keinem Aminosäureaustausch.

Wie dieser Polymorphismus mit einer reduzierten P-Glykoproteinexpression assoziiert ist, ist derzeit noch unklar. Eine Verbindung dieser Mutation mit einem Polymorphismus in Exon 21 des *MDR1*-Gens wurde bereits beschrieben (Cascorbi et al., 2001; Kim et al., 2001). Der Polymorphismus in Exon 21 führt zu einem Austausch von Guanin zu Thymin/Adenin an Position 2677 und bewirkt einen Aminosäureaustausch von Alanin zu Serin bzw. Threonin an Position 893 (siehe Abbildung 3). Allerdings zeigten Zellkulturexperimente von Kim et al. keine unterschiedliche P-Glykoproteinexpression in Zellen nach einer Transfektion mit *MDR1*-Alanin893 im Vergleich zu Zellen, welche mit *MDR1*-Serin893 transfiziert wurden (Kim et al., 2001). Digoxin-Akkumulationsexperimente zeigten zudem eine erhöhte P-Glykoproteinfunktion in *MDR1*-Serin Zellen verglichen mit *MDR1*-Alanin Zellen. Neuere in vitro Experimente von Kimchi-Sarfaty et al. zeigten hingegen, dass sich der Arzneimitteltransport der 893-Serin und 893-Alanin (Wildtyp) Variante nicht unterscheidet (Kimchi-Sarfaty et al., 2002).

3.3 Das ABC-Transporterprotein Multidrug Resistance Protein 3

3.3.1 Multidrug Resistance Proteine

Nach der Aufnahme von toxischen Substanzen werden diese zumeist oxidiert (Phase I Metabolismus) und/oder durch Konjugation mit Glutathion, Sulfat oder Gucuronat in eine wasserlösliche Form umgewandelt (Phase II Metabolismus). Die dabei entstehenden Konjugate sind zu hydrophil, um aus der Zelle zu diffundieren. Sie müssen daher mit Hilfe eines Transportmechanismus aus der Zelle geschleust werden. P-Glykoprotein ist für den Transport dieser Konjugate nicht geeignet, da es nicht-anionische Substrate transportiert. Ishikawa beschrieb erstmals die Existenz von Glutathion-X Konjugat-Pumpen (Ishikawa, 1992). Multidrug Resistance Protein 1 (MRP1) wurde als erste Glutathion-X Konjugat Pumpe in Zellen identifiziert, welche Multidrug Resistance zeigten (Cole et al., 1992). 1996 wurde der zweite Transporter der ABCC-Gruppe, Multidrug Resistance Protein 2 (MRP2), kloniert (König et al., 1996; Paulusma et al., 1996). Kurze Zeit später folgten die Mitglieder Multidrug Resistance Protein 3 – 5 (MRP3 – MRP5) (Allikmets et al., 1996; Kool et al., 1997). Die letzten bekannten Mitglieder sind Multidrug Resistance Protein 6 – 9 (MRP6 – MRP9), welche erst kürzlich entdeckt wurden (Hopper et al., 2001; Tammur et al., 2001). MRP1 – MRP5 sind Transporter für organische Anionen, welche sich in ihrer Substratspezifität, Gewebeverteilung und in ihrer zellulären Lokalisation unterscheiden (siehe Tabelle 3).

Die Topologie der verschiedenen Multidrug Resistance Proteine ist sehr ähnlich. Sie bestehen aus 3 Transmembrandomänen und 2 Nukleotid-Bindungsdomänen, die ATP binden und hydrolysieren. Die Anzahl der Transmembransegmente variiert zwischen den unterschiedlichen Multidrug Resistance Proteinen und lässt sich in zwei Gruppen zusammenfassen. MRP1, 2, 3 und 6 besitzen 17 Transmembransegmente, MRP4, 5, 7 und 8 hingegen nur 12. Experimente von Bakos (Bakos et al., 1998) zeigten, dass die Transmembrandomäne TMD₀ (siehe Abbildung 4) nicht für die katalytische Funktion oder das Protein-Targeting von Bedeutung ist. Die Funktion dieser Domäne ist bislang unbekannt. Multidrug Resistance Proteins mit 17 Transmembransegmenten haben ein, in Abbildung 4 mit L₀ bezeichnetes Segment mit einer hoch konservierten Sequenz nahe dem N-Terminus. Diese Sequenz, welche sich ebenfalls nahe dem N-Terminus in den Multidrug Resistance Proteine mit 12 Transmembransegmenten wiederfindet, ist für die Funktion des Proteins von großer Bedeutung und scheint an die Membran zu binden. Im Folgenden wird das in dieser Arbeit untersuchte Multidrug Resistance Protein 3 näher beschrieben.

Tabelle 3: Lokalisation der Multidrug Resistance Proteins in Geweben und deren bereits bekannte Substrate

Name	Gewebe	Lokalisation	Substrate	
			physiologische	weitere
MRP1	ubiquitär	Plasmamembran (basolateral), Endosomen	LTC ₄	GSSG, GSH, anionische Konjugate
MRP2	Leber, Darm, Niere	Plasmamembran (apikal)	Bilirubin-Glucuronide, GSSG, GSH, Gallensäuren	anionische Konjugate
MRP3	Leber, Gallengänge, Darm, Niere, Pankreas	Plasmamembran (basolateral)	Gallensäuren	anionische Konjugate
MRP4		Plasmamembran	zyklische Nukleotide	Nukleotidanaloga, organische Anionen
MRP5	ubiquitär	Plasmamembran (basolateral)	zyklische Nukleotide	Nukleotidanaloga, organische Anionen
MRP6	Niere, Leber	Plasmamembran (basolateral)		BQ-123 (saures Peptid)

3.3.2 Topologie, Lokalisation und Expression von MRP3

Das *MRP3*-Gen ist auf Chromosom 17q21.3 lokalisiert und besteht aus 31 Exons. MRP3 Protein ist aus 1527 Aminosäuren aufgebaut und besitzt die in Abbildung 4 gezeigte Struktur. Exprimiert wird dieses ABC-Transporterprotein in der basolateralen Plasmamembran in den Nebennieren, der Niere, in Geweben des Intestinaltrakts, wie Dünndarm, Kolon, Pankreas, in der Gallenblase und in der Leber (Kool et al., 1997; Scheffer et al., 2002).

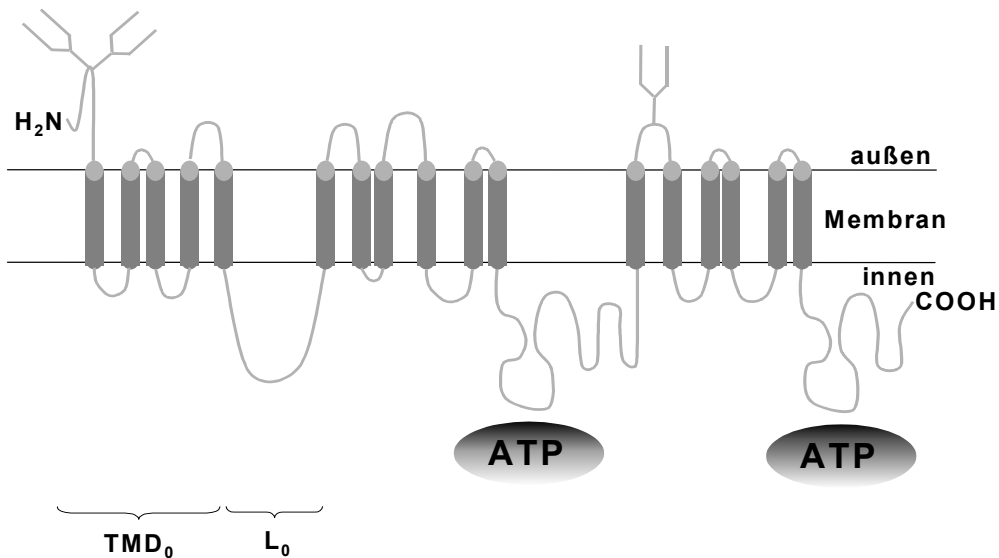


Abbildung 4: Zweidimensionales Membrantopologie-Modell für MRP3.

3.3.3 Substratspezifität von MRP3

MRP3 transportiert organische Anionen, wie zunächst in Studien mit Mrp3 der Ratte gezeigt wurde. Der Transport von Glucuronid-Konjugaten (Hirohashi et al., 1999) und Gallensäuren, wie Taurocholat, Glykocholat, Taurochenodeoxycholat-3-Sulfat und Tauroolithocholate-3-Sulfat durch MRP3 konnte in Experimenten mit Mrp3-Transportvesikeln nachgewiesen werden. Ähnliche Resultate ergaben später Untersuchungen mit humanem MRP3; es konnte jedoch kein Taurocholat-Transport festgestellt werden (Zeng et al., 1999). Als weitere Substrate für MRP3 wurden anschließend Estradiol-17- β -D-Glucuronid, Leukotrien C₄, Dinitrophenyl-S-Glutathion, Etoposid-Glucuronid und Etoposid beschrieben (Zelcer et al., 2001).

3.3.4 Die Rolle von MRP3 bei der Arzneimittelresistenz

In MRP3-überexprimierenden Ovariarkarzinomzellen 2008 wurde eine Resistenz gegen Etoposid und Teniposid gezeigt (Kool et al., 1999). Ebenso konnte Resistenzbildung gegen Methotrexat in MRP3-überexprimierenden Zellen festgestellt werden (König et al., 1999; Hirohashi et al., 2000; Zeng et al., 2000). Außerdem fand man eine Korrelation zwischen der

MRP3-Expression in einer Lungenkarzinom-Zelllinie und deren Doxorubicinresistenz (Young et al., 1999; Young et al., 2001).

3.3.5 Physiologische Funktion von MRP3

Aufgrund der starken MRP3-Expression in der Nebennierenrinde (Scheffer et al., 2002) und der hohen Affinität von MRP3 zu Estradiol-17- β -Glucuronid (Hirohashi et al., 1999; Zeng et al., 1999; Hirohashi et al., 2000), ist ein Beitrag von MRP3 zum Transport von endogenen Steroidkonjugaten denkbar.

Eine starke Induktion der MRP3-Expression in der Leber ist während Cholestase zu beobachten. Rattenleber, in welcher eine Cholestase durch die Ligation des Gallenganges induziert wurde, zeigte eine sehr starke Induktion der MRP3-Expression (Hirohashi et al., 1998; Ogawa et al., 2000; Soroka et al., 2001). Die Erhöhung der MRP3-Expression während Cholestase oder im Rahmen eines Dubin-Johnson-Syndroms wurde auch in humanen Lebern beobachtet (König et al., 1999; Kool et al., 1999). MRP3 scheint somit für den Transport von toxischen, organischen Anionen aus der Leber ins Blut von großer Bedeutung zu sein, wenn eine Sekretion dieser Substanzen in die Galle nicht möglich ist.

Da MRP3 Gallensäuren transportiert, wäre es denkbar, dass MRP3 am enterohepatischen Kreislauf beteiligt ist (siehe Abbildung 5). An der sinusoidalen Membran der Hepatozyten werden Gallensäuren durch das „Na⁺ taurocholate cotransporting polypeptide“ (NTCP) aus dem Blut aufgenommen (Hagenbuch et al., 1991; Hagenbuch and Meier, 1996). Die Sekretion der Gallensäuren an der kanalikulären Membran der Hepatozyten in die Galle erfolgt durch die „canalicular bile salt export pump“ (BSEP) oder auch „Sister P-Glykoprotein“ genannt, einem weiteren Protein der ABC-Familie (Gerloff et al., 1998; Strautnieks et al., 1998). Die Aufnahme der Gallensäuren in die Enterozyten des distalen Ileums erfolgt durch den apikalen „ileal sodium dependent bile acid transporter“ (IBAT) (Wong et al., 1994; Craddock et al., 1998; Sun et al., 1998). Aus den Enterozyten werden die Gallensäuren durch die basolaterale Membran in das Pfortaderblut transportiert. Das Transporterprotein für diesen letzten Schritt wurde bisher noch nicht identifiziert. Als möglicher Kandidat für den Gallensäuretransport durch die basolaterale Membran der Enterozyten wurde MRP3 diskutiert (Inokuchi et al., 2001).

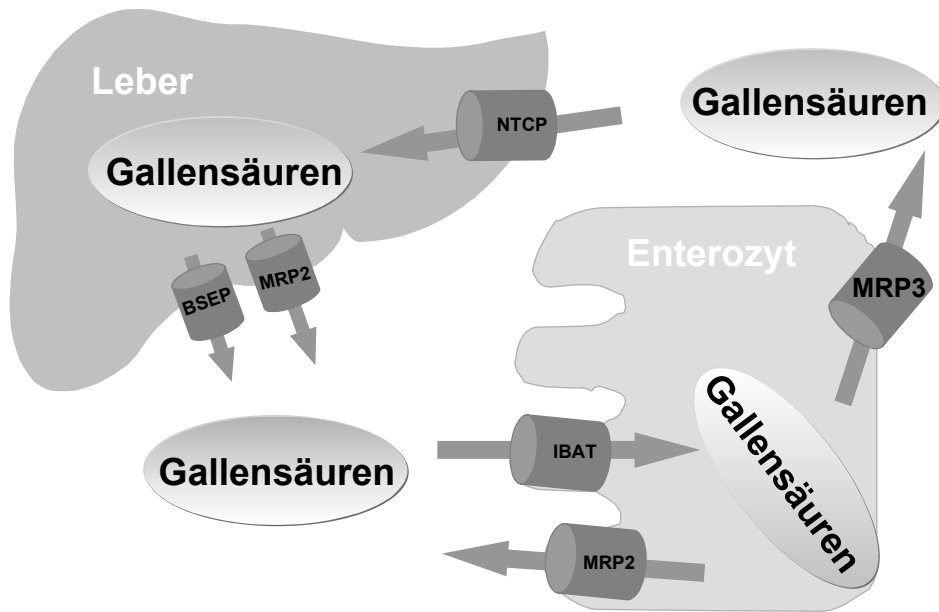


Abbildung 5: Die Beteiligung von MRP3 am enterohepatischen Kreislauf

In der Literatur wurde ein Anstieg der Gallensäurekonzentration im Serum von Patienten bei Rifampicingabe beschrieben (Berg et al., 1984). Daraus wurde der Schluss gezogen, dass Rifampicin die MRP3-Expression in Enterozyten induzieren könnte (Schuetz et al., 2001) und somit, neben einer durch Rifampicin hervorgerufenen Inhibition von BSEP (Stieger et al., 2000), zu einem Anstieg der Gallensäurekonzentration im Serum beiträgt. Allerdings sind momentan noch keine Untersuchungen zum Einfluss von Rifampicin auf die MRP3-Expression in humanen Enterozyten in der Literatur beschrieben.

3.4 Ziele der Arbeit:

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde der mögliche Zusammenhang zwischen den Polymorphismen in Exon 26 (C3435T) und Exon 21 (G2677T) des *MDR1*-Gens und der P-Glykoproteinexpression und -funktion in verschiedenen Geweben untersucht. Im einzelnen wurden folgende Ziele verfolgt:

- P-Glykoproteinexpression und -funktion in peripheren mononukleären Blutzellen von Individuen mit unterschiedlichem Genotyp in Exon 26 und Exon 21 des *MDR1*-Gens.
- P-Glykoproteinexpression von Individuen mit unterschiedlichem Genotyp in Exon 26 und Exon 21 des *MDR1*-Gens in humanem Plazenta- und Kolongewebe.

Der zweite Teil dieser Arbeit soll einen Beitrag zum Verständnis der variablen Expression des Multidrug Resistance Protein 3 (MRP3) in humanen Geweben leisten. Untersuchungen zu folgenden Punkten wurden durchgeführt:

- Einfluss von Rifampicin auf die MRP3-Expression in Enterozyten
- Expression von MRP3 in einer großen Anzahl von humanen Lebern
- Einfluss von Cortisol und Omeprazol auf die MRP3-Expression in humanem Lebergewebe und HepG2 Zellen.
- Mechanismus der Induktion von MRP3
- Einfluss von Gallensäuren auf die MRP3-Expression in CaCo-2 Zellen
- Vergleich der Expression von MRP3 in gesundem Kolongewebe und Kolon-Tumorgewebe.

4 Methoden

4.1 P-Glykoprotein

4.1.1 Molekularbiologische Methoden

4.1.1.1 Isolierung von humaner genomischer DNA aus Vollblut

Zur Isolierung von humaner genomischer DNA aus Vollblut wurde ein Kit der Firma Qiagen verwendet. Dabei wurde DNA zunächst an eine Silica-Gel-Membran gebunden, gewaschen und anschließend eluiert. Nukleinsäuren wurden bei hohen Konzentrationen an chaotropen Salzen, welche den hydrierten Molekülen Wasser entziehen, an die Silica-Gel-Membran gebunden. Polysaccharide und Proteine konnten nicht adsorbieren und wurden entfernt. Nach einem Waschschrift wurden die Nukleinsäuren unter Nidrigsalzbedingungen eluiert.

Lösungen:

QIAamp DNA Mini Kit: Qiagen, # 51306

Durchführung:

40 µl Proteinase K wurden mit 400 µl Vollblut und 400 µl Lysepuffer (AL) versetzt und 10 min bei 56°C inkubiert. Anschließend wurden 400 µl Ethanol (96%) zugesetzt und gemischt. Das Lysat wurde auf die Silica-Gel-Säule geladen und 1 min mit 6000 x g zentrifugiert. Die Säule wurde mit je 500 µl Waschpuffer AW1 und AW2 gewaschen und 1 min mit 20000 x g zentrifugiert. Zur Elution der DNA wurden 200 µl Wasser für 5 min auf der Säule bei RT inkubiert und danach für 1 min bei 6000 x g zentrifugiert.

4.1.1.2 Genotypisierung mittels „Denaturing High-performance liquid chromatography“ (DHPLC)

Die Trennung von DNA Fragmenten mittels DHPLC beruht auf zwei Prinzipien, der längenabhängigen Trennung von doppelsträngiger DNA und den unterschiedlichen Affinitäten von doppelsträngiger und einzelsträngiger DNA zur Säulenmatrix. Vor allem letzteres Prinzip kommt bei der Analyse von DNA Polymorphismen zur Anwendung. Ein Primerpaar wurde so positioniert, dass es die zu untersuchende DNA-Region flankiert. Bei

der Amplifizierung genomischer, heterozygoter DNA nach Denaturierung und anschließender Renaturierung durch langsames Abkühlen werden Hetero- und Homoduplices gebildet (siehe Abbildung 6):

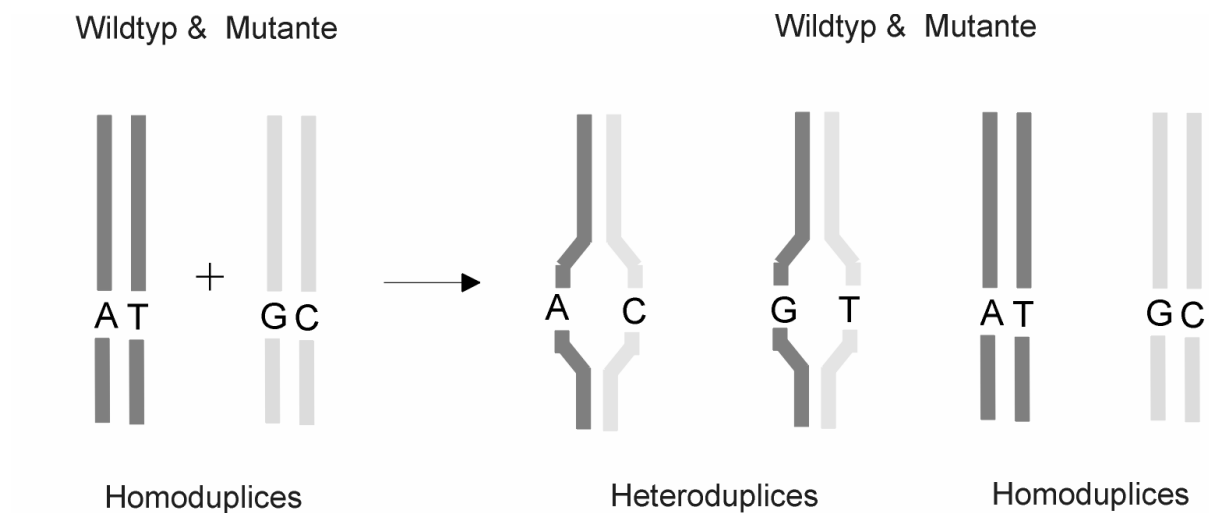


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Duplexbildung

Hingegen zeigt die Amplifizierung genomischer homozygoter DNA nur die Bildung von Homoduplices. Heteroduplices schmelzen an der Stelle des Mismatch bei niedrigeren Temperaturen als die entsprechenden Homoduplices. Dadurch werden teilweise denaturierte Bereiche der DNA erzeugt. Einzelsträngige DNA zeigt eine geringere Affinität zur Säulenmatrix als doppelsträngige DNA. Folglich weisen Heteroduplices bei einer Temperatur, bei welcher Homoduplices von Wildtyp und Mutante teilweise denaturiert sind, einen höheren Denaturierungsgrad auf und zeigen eine geringere Retentionszeit als Homoduplices. Um innerhalb der Homozygoten zwischen Trägern von zwei Wildtypallelen und zwei mutanten Allelen zu unterscheiden, werden im gleichen Anteil PCR Produkte einer Wildtyp-DNA zugemischt, denaturiert und durch langsames Abkühlen renaturiert. Für den Wildtyp ergeben sich dabei wieder Homoduplices. Träger zweier mutanter Allele bilden Homoduplices und Heteroduplices aus.

4.1.1.2.1 Nachweis der C3435T Mutation in Exon 26 des *MDR1*-Gens

Zunächst wurde ein Fragment aus dem Exon 26 des *MDR1*-Gens amplifiziert:

PCR Ansatz für 1 Probe:

50 ng DNA	2,00 µl
10 x PCR-Puffer inkl. 15 mM MgCl ₂ (Promega)	2,50 µl
Forward Primer: 5' GATCTGTGAACTCTTGTTC 3' (100 pmol/µl)	0,20 µl
Reverse Primer: 5' GAAGAGAGACTTACATTAGGC 3' (100 pmol/µl)	0,20 µl
1,25 mM dNTP (Amersham, Pharmacia Biotech)	2,50 µl
H ₂ O	17,40 µl
Taq Polymerase (5 U/µl, Promega)	0,25 µl
<i>Gesamtvolumen</i>	<i>25,00 µl</i>

Thermocycler PCR Programm:

94 °C	5 min	
94 °C	30 s	} 35 Zyklen
60 °C	30 s	
70 °C	30 s	
70 °C	7 min	

Die Analyse der PCR Produkte wurde mittels Ion-Pair Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography mit dem WAVE Nucleic Acid Fragment Analysensystem von Transgenomic unter Verwendung von C-18 alkylierter, nichtporöser Poly(styrene divinylbenzol)-Matrix (DNASep Cartridge) durchgeführt. Alle PCR Produkte wurden rein und als Mischung mit 50 % homozygoter DNA (TT), zur Detektion von homozygoten Mutanten, analysiert. Die PCR Produkte wurden 5 min bei 95 °C denaturiert und anschließend durch Abkühlen von 1 °C/min auf 65 °C renaturiert. Die Proben wurden dann bei 4 °C gelagert bis 5 µl davon auf die Säule geladen wurden. DNA wurde in einem linearen Acetonitril Gradient, bestehend aus Puffer A (0,1 M TEAA) und Puffer B (0,1 M TEAA, 25 % Acetonitril), bei einem Fluss von 0,9 ml/min eluiert:

Beladen:	0,5 min	53 % A, 47 % B
Gradient:	6,8 min	48 % A bis 39 % A, 52 % B bis 61 % B
Waschen:	0,5 min	0 % A, 100 % B
Äquilibrieren:	0,1 min	53 % A, 47 % B

Die Lauftemperatur, bei welcher Heteroduplices analysiert wurden, betrug 62 °C. Die Bildung von Heteroduplices wurde anhand des Schmelzprofils detektiert, welches mit den Schmelzprofilen von sequenzierten Wildtyp- und Mutanten-Kontrollen verglichen wurde.

4.1.1.2.2 Nachweis der G2677T Mutation in Exon 21 des *MDR1*-Gens

Ein Fragment von Exon 21 des *MDR1*-Gens wurde mit dem unten angeführtem Ansatz wie in 4.1.1.2.1 beschrieben amplifiziert.

PCR Ansatz für 1 Probe:

50 ng DNA	2,00 µl
10 x PCR-Puffer inkl. 15 mM MgCl ₂ (Promega)	2,50 µl
Forward Primer: 5' TTTCTCTAATTTGTTTTGTTTTGC 3' (100 pmol/µl)	0,20 µl
Reverse Primer: 5' TTTAGTTTGACTCACCTTCCC 3' (100 pmol/µl)	0,20 µl
1,25 mM dNTP (Amersham, Pharmacia Biotech)	2,50 µl
H ₂ O	17,40 µl
Taq Polymerase (5 U/µl, Promega)	0,25 µl
<i>Gesamtvolumen</i>	<i>25,00 µl</i>

Die DHPLC-Analyse der PCR Produkte erfolgte ebenso wie in 4.1.1.2.1 beschrieben unter folgenden Bedingungen:

Beladen:	0,5 min	53 % A, 47 % B
Gradient:	4,5 min	48 % A bis 39 % A, 52 % B bis 61 % B
Waschen:	0,5 min	0 % A, 100 % B
Äquilibrieren:	0,9 min	53 % A, 47 % B
 Lauftemperatur:	 56 °C	

Alle PCR Produkte wurden rein und als Mischung mit 50 % Wildtyp-DNA (GG) zur Detektion von homozygoten Mutanten analysiert.

4.1.1.3 **RNA Isolierung aus Vollblut**

Zunächst wurden die Erythrozyten in einem ammoniumchloridhaltigen Puffer lysiert und die resultierende Leukozytenfraktion in einem denaturierenden guanidinisothiocyanathaltigen Puffer, welcher RNasen inaktiviert, aufgenommen und homogenisiert. Das Homogenat wurde mit Ethanol versetzt, um geeignete Bedingungen für die Bindung der RNA an die Silica-Gel-Membran zu gewährleisten. Die RNA wurde gewaschen und schließlich mit Wasser eluiert. Im Eluat war mRNA angereichert, da diese Methode selektiv die Isolation von Molekülen mit einer Größe über 200 Nukleotiden gewährleistet.

Lösungen:

Erythrozytenlysepuffer:	Qiagen, # 79217
RNeasy Midi Kit:	Qiagen, # 75144
RNase-Free DNase Set:	Qiagen, # 79254

Durchführung:

Von den Probanden wurden 8 ml Blut in einem EDTA-Röhrchen abgenommen und je 4 ml des EDTA-Blutes mit 20 ml Erythrozytenlysepuffer versetzt und gut gemischt. Die Mischung wurde 15 min auf Eis inkubiert und anschließend 10 min bei 4 °C und 3000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet erneut in 15 ml Erythrozytenlysepuffer resuspendiert. Nach 10 min Zentrifugation bei 4 °C mit 3000 x g wurde das gereinigte Leukozytenpellet in 3,8 ml guanidiniumthiocyanathaltigem Puffer (RLT, Qiagen) resuspendiert, mit 38 µl β-Mercaptoethanol versetzt und durch 5- bis 10-faches Aufziehen durch eine Kanüle (20 G) homogenisiert. Die Proben wurden dann bei –20 °C gelagert oder sofort weiter aufgearbeitet.

Die weitere Aufarbeitung der Proben erfolgte mit einem RNeasy Midi Kit (Qiagen). Das Lysat wurde dazu mit 4 ml Ethanol (70 %) gemischt, auf die Säule (Silica-Gel-Membran) pipettiert und 5 min mit 3000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säulenmembran mit 2 ml RW1 Puffer gewaschen. Anschließend wurde die DNA auf der Säulenmembran mit DNase I verdaut (RNase-Free DNase Set, Qiagen). Dazu wurden 20 µl DNase I mit 140 µl RDD Puffer gemischt und 15 min bei RT auf der Membran inkubiert. Die Membran wurde dann mit 2 ml RW1 Puffer und 2 x 2,5 ml RPE Puffer gewaschen, getrocknet und die RNA schließlich mit 150 µl H₂O eluiert.

4.1.1.4 RNA Isolierung aus humanem Gewebe (Plazenta, Kolon)

Die RNA Isolierung aus humanem Gewebe erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie in Abschnitt 4.1.1.3 beschrieben, unter Verwendung eines Kits der Firma Qiagen.

Lösungen:

RNAlater:	Qiagen, # 76106
RNeasy Mini Kit:	Qiagen, # 74104
QIAshredder:	Qiagen, # 79654
RNase-Free DNase Set:	Qiagen, # 79254

Durchführung:

Kolongewebe zur RNA Isolierung wurde in RNAlater (Qiagen), einem RNA Stabilisierungsreagenz, bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Plazentagewebe wurde direkt nach der Gewinnung in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

30 mg Gewebe wurden in 600 μl RLT Puffer mit Ultraschall und QIAshredder-Säulen homogenisiert, mit 600 μl Ethanol (70 %) gemischt und auf die Säule (Silica-Gel-Membran) pipettiert. Nach 15 s Zentrifugation mit 8000 x g wurde der Durchfluss verworfen und die Säulenmembran mit 350 μl RW1 Puffer gewaschen. Anschließend wurde die DNA auf der Säulenmembran mit DNase I verdaut (RNase-Free DNase Set, Qiagen); dazu wurden 10 μl DNase I mit 70 μl RDD Puffer gemischt und 15 min bei RT auf der Membran inkubiert. Die Membran wurde dann mit 350 μl RW1 Puffer und 2 x 500 μl RPE Puffer gewaschen, getrocknet und die RNA schließlich mit 50 μl H_2O eluiert.

4.1.1.5 RNA Quantifizierung

Die Konzentration der RNA wurde durch eine photometrische Messung der Absorption bei 260 nm (A_{260}) bestimmt. Eine Absorption von 1 bei 260 nm (gemessen in H_2O) entspricht einer Konzentration von 40 $\mu\text{g/ml}$. RNA wurde mit RNase freiem H_2O 1/10 verdünnt, in eine Quarzglasküvette überführt und die Absorption bei 260 nm im Photometer gemessen. Die Konzentration wurde aus folgender Formel berechnet:

$$[\text{RNA}] = 40 \times A_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor (10)}$$

Um Verunreinigungen der RNA durch Protein festzustellen, wurde zusätzlich die Absorption bei 280 nm gemessen und der Quotient A_{260} / A_{280} gebildet. Idealerweise sollte der Quotient zwischen 1,8 und 2,0 liegen; er ist jedoch stark pH abhängig und daher in wässrigen RNA Verdünnungen wenig sensitiv.

4.1.1.6 Qualitative Analyse der RNA

Zur Beurteilung der Qualität der RNA wurde eine Formaldehyd Agarose Gel Elektrophorese durchgeführt.

Lösungen:

10 x Puffer:	200 mM MOPS (Roth, # 69272) 50 mM Natrium Acetat (Merck, # 6264) 10 mM EDTA (Sigma, # E1644) pH 7,0 auf 1000 ml mit RNase-freiem H ₂ O auffüllen autoklavieren
1 % Agarosegel:	1 g Agarose (GIBCO BRL, # 15510-027) 87 ml RNase-freies H ₂ O aufkochen und auf 60 °C abkühlen 3 ml 37 %iges Formaldehyd (Fluka, # 47629) zugeben
RNA-Probenpuffer:	100 µl 10 x Puffer 500 µl Formamid (Intergen, # S4117) 178 µl Formaldehyd (37 %ig) (Fluka, # 47629) 222 µl RNase-freies H ₂ O
Farbmarker:	10 % Ficoll (Amersham Biosciences, # 17-0300-10) 0,1 % Bromphenolblau (Sigma, # B-6896)
Ethidiumbromidlösung:	5 µg Ethidiumbromid (Sigma, # E1510) 10 µl RNase-freies H ₂ O

Durchführung:

250 ng RNA wurden mit RNA-Probenpuffer auf 16 µl aufgefüllt, 0,8 µl Ethidiumbromidlösung wurden dann zugesetzt und 10 min bei 60 °C inkubiert. Anschließend wurden 4 µl Farbmarker zugeben, gemischt und die Probe auf das Agarose Gel (1 %) geladen. Die Elektrophorese wurde in 1 x Puffer durchgeführt (Laufzeit: ca. 1 h bei 100-150 V konstant). Die Detektion der RNA erfolgte unter UV-Licht.

4.1.1.7 Quantifizierung der MDR1 mRNA durch RT-PCR mit real time TaqMan Technologie

Die TaqMan Technologie bietet die Möglichkeit PCR Produkte während ihrer Amplifikation zu detektieren. Grundlage für diese Methode bildet eine Arbeit von Holland (Holland et al., 1991), in welcher erstmals ein 5'-Nuklease-Assay, der die 5'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase zur Detektion einer sequenz-spezifischen Amplifikation ausnutzt, beschrieben wurde. Erweitert wurde die Methode durch die Entwicklung einer fluorogenen Sonde von Lee

(Lee et al., 1993). Zur Quantifizierung der mRNA wird zunächst eine RT-PCR durchgeführt und cDNA hergestellt. Ein ausgewählter Nukleinsäurebereich dieser cDNA kann anschließend durch eine real time TaqMan PCR quantifiziert werden. Kernstück der TaqMan-Reaktion ist eine Sonde, die im Bereich zwischen den beiden Primerbindungsstellen der PCR spezifisch mit der gewünschten Zielsequenz hybridisiert. Diese Sonde ist mit einem Fluoreszenz-Farbstoff am 5'-Ende (Reporterfluoreszenz) und einem Fluoreszenz-Farbstoff am 3'-Ende (Quencherfluoreszenz) markiert. Aufgrund von physikalischen Interaktionen zwischen diesen beiden Fluoreszenz-Farbstoffen unterdrückt im angeregten Zustand der Quencherfarbstoff die Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffs. Voraussetzung für dieses, auch als Quenching bezeichnete physikalische Phänomen, ist eine bestimmte räumliche Nähe der Fluoreszenz-Farbstoffe. Während der Amplifikation in der PCR hybridisiert die oben beschriebene Sonde mit dem Ausgangs-Template im Bereich zwischen den beiden Primerbindungsstellen. Trifft die Taq-Polymerase im Rahmen der Polymerisation auf die Sonde, beginnt sie diese mit Hilfe ihrer 5'-Nuklease-Aktivität am 5'-Ende abzubauen. In diesem Augenblick kommt es zu einer räumlichen und physikalischen Trennung der beiden Fluoreszenzfarbstoffe, wodurch der Quenching-Effekt aufgehoben wird. Neben der Fluoreszenz des Quencherfarbstoffs wird nun auch die des Reporter-Farbstoffs meßbar. In Abhängigkeit von der Konzentration des Ausgangs-Template schreitet die Degradation der Sonde mit zunehmender Kopienzahl fort, wodurch die Emission der Reporterfluoreszenz ansteigt. Auf diese Weise kann die Stärke der Reporter-Fluoreszenz als ein Maß für die zu quantifizierende Template-Konzentration der Probe dienen.

Lösungen:

TaqMan Reverse Transcription Reagents (PE Applied Biosystems, P/N N808-0234)

TaqMan Universal PCR Master Mix (PE Applied Biosystems, # 4304447)

Human β -Actin PDAR (PE Applied Biosystems, # 4310881E)

Human Cyclophilin PDAR (PE Applied Biosystems, # 4310883E)

4.1.1.7.1 Durchführung der cDNA Synthese:

Zunächst wurde cDNA durch RT-PCR aus der isolierten RNA hergestellt:

RT-PCR Ansatz für 1 Probe:

1 μ g RNA in RNase-freiem H ₂ O	19,25 μ l
10 x TaqMan RT Puffer	5,00 μ l
25 mM MgCl ₂	11,00 μ l

2,5 mM dNTP Mix	10,00 µl
50 µM Random Hexamere	2,50 µl
RNase Inhibitor (20 U/µl)	1,00 µl
Multi Scribe Reverse Transkriptase (50 U/µl)	1,25 µl
<i>Gesamtvolumen</i>	<i>50,00 µl</i>

Thermocycler PCR Programm:

10 min 25 °C

30 min 48 °C

5 min 95 °C

4.1.1.7.2 Durchführung der real time TaqMan PCR:

Ein ausgewählter Nukleinsäurebereich der cDNA wurde durch real time TaqMan PCR amplifiziert und dadurch quantifiziert.

real time TaqMan PCR-Ansatz zur MDR1 Bestimmung:

TaqMan Universal PCR Master Mix	12,50 µl
Forward Primer: 5' TAGAAGATCTGATGTCAAACATCACTAATAGA 3' (5 µM)	1,50 µl
Reverse Primer: 5' GTGTATTTGTCTTCCAGCTGCCA 3' (5 µM)	1,50 µl
Sonde:	
^{FAM} 5' AGGAAGACATGACCAGGTATGCCTATTATTACAG 3' ^{TAMRA} -OH (5 µM)	1,00 µl
aus 50 ng RNA umgeschriebene cDNA bzw. 100 ng bei Plazenta cDNA	5,00 µl
H ₂ O	3,50 µl
<i>Gesamtvolumen</i>	<i>25,00 µl</i>

real time TaqMan PCR-Ansatz zur Villin Bestimmung:

TaqMan Universal PCR Master Mix	12,50 µl
Forward Primer: 5' CTGGCAACCTTAGGGACTGG 3' (5 µM)	1,50 µl
Reverse Primer: 5' GTTAGCATTGAACACGTCCACTTT 3' (5 µM)	1,50 µl
Sonde:	
^{FAM} 5' CCAGATCACTGCTGAGGTCACAAGC 3' ^{TAMRA} -OH (5 µM)	1,00 µl
aus 50 ng RNA umgeschriebene cDNA	5,00 µl
H ₂ O	3,50 µl
<i>Gesamtvolumen</i>	<i>25,00 µl</i>

real time TaqMan PCR-Ansatz zur β -Actin bzw. Cyclophilin Bestimmung:

TaqMan Universal PCR Master Mix	12,50 μ l
PDAR System für β -Actin/Cyclophilin	1,25 μ l
aus 50 ng RNA umgeschriebene cDNA	5,00 μ l
H ₂ O	6,25 μ l
<i>Gesamtvolumen</i>	<i>25,00 μl</i>

Die PCR wurde mittels „ABI Prism Sequence Detection System SDS 7700“ von Applied Biosystems unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Thermocycler Programm:

2 min 50 °C	
10 min 95 °C	
15 s 95 °C	} 40 Zyklen
1 min 60 °C	

Das Signal der TaqMan PCR repräsentiert die Veränderung in der Fluoreszenzemission des Reporterfarbstoffs aufgrund der Hydrolyse der sequenzspezifischen Sonde. Störende Fluktuationen der Fluoreszenz werden mit Hilfe eines, dem Reaktionspuffer zugesetzten, passiven Referenzfarbstoffs ausgeglichen. Dieser normalisierende Effekt geht in die Berechnung als normalisiertes Reportersignal (R_n) ein. Ein R_n Wert entspricht dem Quotienten der Emissionsintensität des Reporterfarbstoffes, dividiert durch die Emissionsintensität des passiven Referenzfarbstoffs. Unspezifische Einflüsse wie Konzentrationsänderungen aufgrund von Voluminaschwankungen (Pipettierfehler) können somit ausgeglichen werden. Weitere Schwankungen, die nicht auf dem PCR-abhängigen Nuklease-Verdau basieren, werden ausgeglichen, indem das binnen der PCR-Zyklen erstellte Hintergrundsignal (Signal ohne Template) vom jeweiligen R_n -Wert abgezogen wird. Als Meßwert erhält man den sogenannten C_T -Wert (Threshold Cycle), welcher die Zyklenzahl ausdrückt, bei der zum ersten Mal ein Anstieg der Reporterfluoreszenz über die Grundlinie erfaßt wird. Für die Quantifizierung wird bei jeder PCR eine serielle Verdünnung einer Referenz-cDNA mitgeführt und daraus eine Kalibriergerade aus C_T gegen den Logarithmus der eingesetzten RNA Menge erstellt. Die Quantifizierung der gemessenen Proben erfolgt anschließend relativ zu dieser Kalibriergeraden durch folgende Formel:

$$\log(\text{Menge Zielgen}) = (\text{CT-Wert der Probe} - d) / k$$

d = y-Achsenabschnitt der Kalibriergeraden

k = Steigung der Kalibriergeraden

Als Referenz-cDNA zur Quantifizierung von *MDR1* diente cDNA, welche aus humaner Leber-mRNA hergestellt wurde bzw. *MDR1*-Plasmid DNA. Für die Quantifizierung von Villin wurde Villin-Plasmid DNA verwendet; zur Quantifizierung von Cyclophilin diente cDNA aus einer mRNA Präparation von humaner Leber und zur Bestimmung von β -Actin wurde cDNA aus HepG2 Zellen verwendet.

4.1.2 Bestimmung der P-Glykoproteinfunktion in CD56⁺ NK-Zellen mit der Methode des Rhodaminefflux

4.1.2.1 Übersicht

Das P-Glykoprotein-Substrat Rhodamin123 eignet sich aufgrund seiner fluoreszierenden Eigenschaft besonders gut zur Bestimmung der P-Glykoproteinfunktion. Bei dieser Methode werden zunächst mononukleäre Zellen aus heparinisiertem Blut durch Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation gewonnen. Diese Zellen werden mit Rhodamin123 inkubiert, dabei akkumuliert Rhodamin123 in den Zellen. Die Zellen werden dann für 10 min in Rhodamin123-freiem Medium inkubiert. Dabei wird einem Teil der Zellen der P-Glykoproteininhibitor PSC833 (Novartis) zugesetzt. Bei den Zellen ohne P-Glykoproteininhibitor wird Rhodamin123 via P-Glykoprotein aus den Zellen gepumpt. Im Parallelansatz, welcher mit PSC833 behandelt wurde, findet kein Rhodamin123-Efflux statt. Betrachtet werden im Rahmen dieser Arbeit nur die CD56⁺ Natürlichen Killer Zellen aufgrund ihrer besonders hohen P-Glykoproteinexpression. Für den Nachweis des CD56-Antigens werden die Zellen mit einem Fluoreszenz-markierten Anti CD56-Antikörper gefärbt. Die CD56-Expression und die intrazelluläre Rhodamin123-Fluoreszenz der Zellen kann mit einem Durchflußzytometer bestimmt werden. Der Meßwert der Probe ohne P-Glykoproteininhibitor wird als Prozentsatz des Messwertes der Probe mit P-Glykoproteininhibitor angegeben.

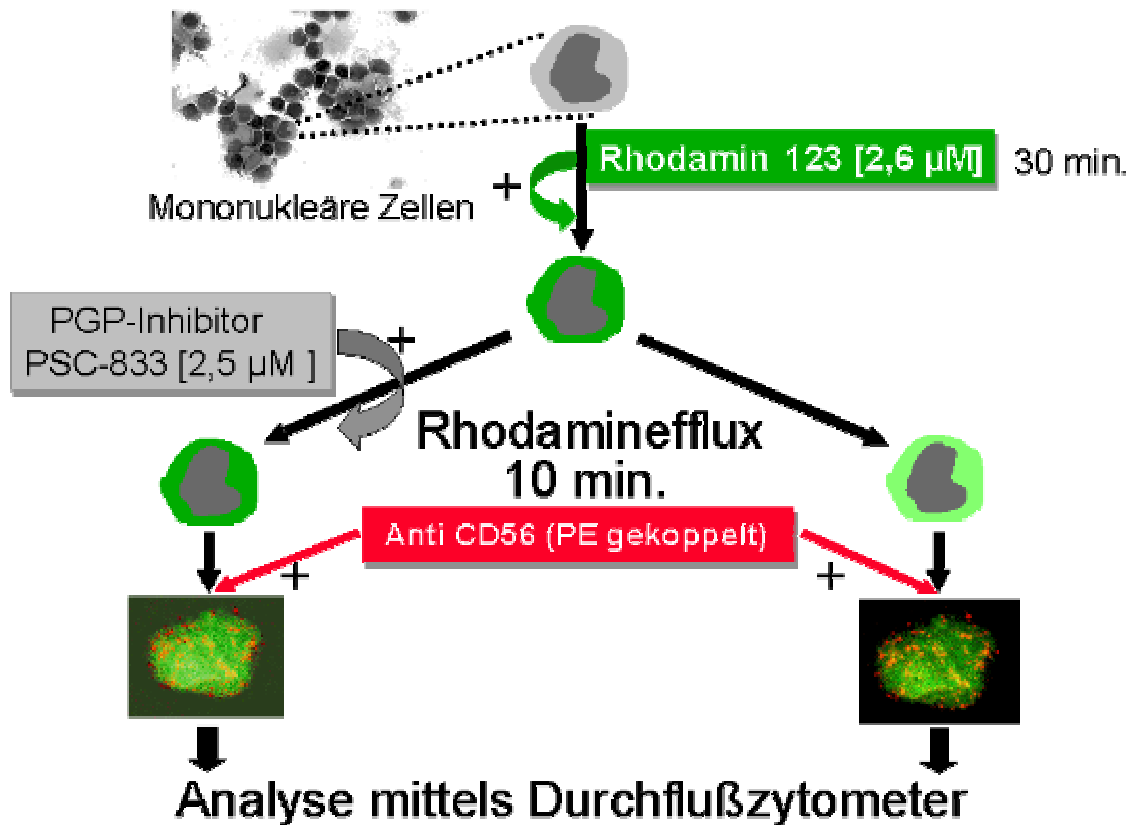


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Durchführung des Rhodaminefflux

4.1.2.2 Isolierung der mononukleären Zellen aus Vollblut

Lösungen:

Heparin-Natrium 25000 I.E. (Liquemin N25 000, Roche)

Ficoll Separating Solution (Biochrom KG, # L 6115)

PBS Dulbecco's (GIBCO, # 14190-094)

Durchführung:

Aus 30 ml heparinisiertem Vollblut wurden zunächst durch Dichtegradientenzentrifugation mononukleäre Zellen isoliert. Das Zentrifugationsmedium hierfür war Ficoll mit einer Dichte von 1,077 g/ml. In einer Spritze wurden zunächst 7500 I. E. Heparin (1,5 ml) vorgelegt und danach 30 ml Blut aufgenommen. Das heparinisierte Blut wurde anschließend 1:1 mit PBS verdünnt. 25 ml dieser Lösung wurden langsam über 25 ml Ficoll geschichtet und 25 min bei 400 x g und 20 °C zentrifugiert (Hettich Rotanta/S mit Swing-out-Rotor 5084). Die Zellen der Interphase wurden mit einer 10 ml Pipette abgesaugt, mit 10 ml PBS versetzt und das

Gemisch zentrifugiert (5 min, 400 x g, 20 °C). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in PBS aufgenommen und die Zellzahl bestimmt.

4.1.2.3 Rhodaminefflux

Lösungen:

Zellmedium: RPMI 1640 (Biochrom AG, # F1215)
10 % FCS (GIBCO BRL, # 10270-106)

PBS Dulbecco's (GIBCO, # 14190-094)

PBS/BSA: 1 % BSA (Merck, # 1120180025)
0,01 % Natriumazid (Sigma, # S2002)
in PBS

Rhodamin123-Stocklösung: 1 mg Rhodamin123 (Sigma, # R8004)
in 1 ml Ethanol

PSC833-Stocklösung: 1 mg PSC833 (Novartis)
in 1 ml Ethanol

Mouse IgG1-PE (Immunotech, # PN IM0670)

Anti CD56-PE (Immunotech, # 2073)

Durchführung:

2 x 10⁶ mononukleäre Zellen wurden in 1 ml Zell-Medium aufgenommen und anschließend wurde die Zellsuspension in einer 12 well Platte ausgesät (1 ml pro Well). Zunächst wurden die Zellen für 30 min bei 37 °C und 5 % CO₂ im Inkubationsmedium inkubiert. Das Inkubationsmedium für die einzelnen Wells setzte sich aus Zellmedium plus dem Zusatz, welcher in Tabelle 4 aufgelistet ist, zusammen. Nach der Inkubationszeit wurde die Zellsuspension der einzelnen Wells in ein 1,5 ml Eppendorf Gefäß überführt und 2 x mit je 1 ml PBS gewaschen. Der Kontroll-Ansatz (Kontrolle) wurde anschließend in PBS auf Eis gelagert. Die restlichen Zellpellets wurden in 1 ml Efflux-Medium aufgenommen (Zellmedium plus Zusätze laut Tabelle 4) und bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Ansätze „Blank“ und „PSC/Efflux“ wurden 15 min inkubiert, die Ansätze „Efflux“ wurden je 5, 10 oder 15 min inkubiert. Nach der Effluxzeit wurden diese erneut in 1,5 ml Eppendorf Gefäße überführt, 2 x mit je 1 ml eiskaltem PBS gewaschen und die Zellpellets anschließend in 200 µl eiskalter PBS-BSA-Lösung aufgenommen. Die Ansätze wurden nun auf Eis gelagert, um weiteren Rhodamin123-Efflux zu vermeiden. Zur Bestimmung der P-Glykoproteinfunktion in den CD56⁺ Zellen wurden die Ansätze „Blank“, „PSC/Efflux“ und „Efflux“ mit 10 µl PE

gekoppeltem Anti-CD56-Antikörper versetzt. Der Ansatz „Kontrolle“ wurde geteilt und mit 10 μ l PE gekoppeltem Anti-CD56 bzw. PE-gekoppeltem Maus IgG als Negativkontrolle versetzt. Nach 10 min Inkubation bei 4 °C wurden die Proben 2 x mit 1 ml kalter PBS-BSA-Lösung gewaschen und anschließend in 1 ml dieser Lösung aufgenommen. Die Ansätze wurden nun immer auf Eis im Dunklen gelagert, bis sie mittels Durchflußzytometer gemessen wurden.

Tabelle 4: Zusätze des Inkubations- und Efflux-Mediums für die einzelnen Ansätze des Rhodaminefflux

Well #	Ansatz Bezeichnung	Inkubations-Medium		Efflux-Medium	
		Rhodamin123 Stocklösung	PSC 833 Stocklösung	Rhodamin123 Stocklösung	PSC 833 Stocklösung
1	Blank	-	-	-	-
2	Kontrolle	+ 1 μ l	-	auf Eis lagern	
3	PSC / Efflux	+ 1 μ l	-	-	+ 3 μ l
4	Efflux 5 min	+ 1 μ l	-	-	-
5	Efflux 10 min	+ 1 μ l	-	-	-
6	Efflux 15 min	+ 1 μ l	-	-	-

4.1.2.4 Messung der intrazellulären Rhodamin123 Fluoreszenz von CD56⁺ NK-Zellen mittels Durchflußzytometer

Die Messung wurde an einem FACScan-Durchflußzytometer der Firma Becton Dickinson durchgeführt. In diesem Gerät wurde die Probe mittels einer isotonischen Trägerflüssigkeit in die Meßkammer eingebracht (Hydrodynamische Fokussierung), mit monochromatischem Laserlicht angeregt und analysiert. Als Lichtquelle diente ein 15 mW Argonlaser mit einer Emissionslinie von 488 nm. Hiermit konnten Fluorochrome angeregt werden, die dann ihrerseits mit einem charakteristischen Emissionsspektrum auf das energetische Grundniveau zurückkehren. Dabei geht ein Teil der Energie als Wärme verloren, wodurch das Emissionsspektrum zum längerwelligen Bereich hin verschoben wird. Die benutzten

Fluorochrome dienten zum Nachweis von CD56-positiven Zellen und zum Nachweis des Rhodaminefflux. Neben der Detektion des Fluoreszenzstrahles mittels eines Photomultipliers wurde auch die Lichtstreuung im Kleinwinkelbereich (FSC) und bei 90° (SSC) zum Lichtstrahl gemessen. Mit den beiden letztgenannten Parametern konnten die Leukozytenfraktionen, wie Lymphozyten, Monozyten und neutrophile Granulozyten unterschieden werden. Hierbei diente FSC als Maß für die relative Größe und SSC als Maß für die Granulierung der Zellen. In einem Histogramm wurden zunächst durch Auftragung des Vorwärts-Streulichtes (FSC) gegen das Seitwärts-Streulicht (SSC) die Lymphozyten identifiziert und ein „Gate“ um diese Population gesetzt. Aus dieser Population wurden die CD56-positiven Zellen durch den Bandpassfilter 2 (585 nm) identifiziert und wiederum ein „Gate“ um diese Population gesetzt. Analysiert wurde nun die intrazelluläre Rhodamin123-Fluoreszenz der CD56-positiven Zellen. Zur Detektion der Rhodamin123-Fluoreszenz wurde Bandpassfilter 1 (530 nm) benützt, die Kompensation wurde auf FL2 = 61% FL1 eingestellt. Die intrazelluläre Rhodamin123-Fluoreszenz der CD56-positiven Zellen in den Ansätzen ohne P-Glykoproteininhibitor (Ansatz „Efflux“) wurde als Prozentsatz des Messwertes des Ansatzes mit P-Glykoproteininhibitor (Ansatz „PSC/Efflux“) angegeben.

4.1.3 Proteinchemische Methoden

4.1.3.1 Aufarbeitung von Plazentagewebe

Das Plazentagewebe wurde nach der Geburt sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei – 80 °C gelagert. Bei der Aufarbeitung wurde das Gewebe in Salzpuffer aufgetaut und gespült, um restliches Blut zu entfernen. Das Gewebe wurde anschließend zerkleinert, DNA mit DNase I verdaut und homogenisiert.

Lösungen:

EBSS: 1,8 mM CaCl₂ * 2 H₂O (Roth, # 52391)
116,4 mM NaCl (Merck, # 106404)
26,2 mM NaHCO₃ (Fluka, # 71627)
5,4 mM KCl (Merck, # 4936)
0,8 mM MgSO₄ * 7 H₂O (Sigma, M1880)
1,2 mM NaH₂PO₄ * 2 H₂O (Merck, # 106580500)
pH 7,4 (mit HCl eingestellt)

Lysepuffer :	50 mM Tris (Roth, # 48553)
	250 mM Sucrose (Roth, # 90971)
	1 mM EDTA (Roth, # 80431)
	1 mM Pefa Bloc (Roth, # A154)
	1µg/ml Pepstatin (Sigma, # L2884)
	1µg/ml Leupeptin (Sigma, # P5318)
	pH 7,4 (mit HCl eingestellt)
Puffer für den DNase I Verdau:	20 mM Tris (Roth, # 48553)
	10 mM MgCl ₂ (Merck, # 5833)
	pH 8,0
DNase I (GIBCO BRL, # 18047019)	

Durchführung:

1 g gefrorenes Plazentagewebe wurde in einem Becherglas mit 25 ml EBSS bei 4 °C gerührt bis es aufgetaut war, dann 2 x mit EBSS gespült und in 2 ml Puffer für den DNase I Verdau aufgenommen. Das Gewebe wurde mit dem Ultraturrax zerkleinert, die Suspension mit 300 U/ml DNase I versetzt und 30 min bei 37 °C inkubiert. 3 ml Lysepuffer wurden zugesetzt, die Mischung wurde 10 min auf Eis inkubiert und anschließend mit dem Dounce Homogenisator homogenisiert. Das Homogenat wurde bei – 80 °C gelagert.

4.1.3.2 Aufarbeitung von Kolongewebe

Die Aufarbeitung von Kolongewebe wurde auf drei Arten durchgeführt. Zunächst wurden 2 unterschiedliche Lysepuffer getestet, um den geeigneten Puffer für eine maximale Signalintensität von P-Glykoprotein bei der Western Blot Analyse zu ermitteln. Der gewählte Puffer wurde anschließend in Protokollen mit unterschiedlicher Gewebepreparierung getestet.

Lösungen:

EBSS:	1,8 mM CaCl ₂ * 2 H ₂ O (Roth, # 52391)
	116,4 mM NaCl (Merck, # 106404)
	26,2 mM NaHCO ₃ (Fluka, # 71627)
	5,4 mM KCl (Merck, # 4936)
	0,8 mM MgSO ₄ * 7 H ₂ O (Sigma, M1880)
	1,2 mM NaH ₂ PO ₄ * 2 H ₂ O (Merck, # 106580500)
	pH 7,4 (mit HCl eingestellt)

Lysepuffer 1:	50 mM Tris (Roth, # 48553)
	250 mM Sucrose (Roth, # 90971)
	1 mM EDTA (Roth, # 80431)
	1 mM Pefa Bloc (Roth, # A154)
	1µg/ml Pepstatin (Sigma, # L2884)
	1µg/ml Leupeptin (Sigma, # P5318)
	pH 7,4 (mit HCl eingestellt)
Lysepuffer 2:	1mM EDTA (Roth, # 80431)
	0,2 mM Pefa Bloc (Roth, # A154)
	10 mM HEPES (Roth, # 70202)
	150 mM KCl (Merck, # 4936)

Durchführung:

Aufarbeitung I:

0,5 g gefrorenes Gewebe wurden in 2,5 ml Lysepuffer 1 aufgenommen und mit dem Ultraturrax (9500 upm) zerkleinert. Anschließend wurde die Mischung mit dem Dounce Homogenisator homogenisiert und 10 min bei 400 x g zentrifugiert (4 °C). Das Pellet („Kernpellet“), welches Zelldebris und –kerne beinhaltet, wurde in Lysepuffer 1 aufgenommen und der Überstand 40 min bei 100000 x g und 4 °C zentrifugiert. Das resultierende Pellet („Membranpellet“) wurde in 0,5 ml Lysepuffer 1 aufgenommen. Alle Fraktionen der Aufarbeitung wurden teilweise oder vollständig in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei – 80 °C bis zur Proteinbestimmung gelagert.

Aufarbeitung II:

Die Durchführung erfolgte wie in Aufarbeitung I beschrieben mit Lysepuffer 2.

Aufarbeitung III:

0,5 g gefrorenes Gewebe wurde in einem Becherglas mit 5 ml EBSS unter ständigem Rühren bei 4°C aufgetaut. Das Gewebe wurde dann 2 x mit EBSS gespült, in 2,5 ml Lysepuffer 1 aufgenommen und wie in Aufarbeitung I beschrieben weiter aufgearbeitet.

4.1.3.3 Bestimmung der Proteinmenge nach der Methode von Smith

Diese Methode basiert auf einer alkalischen Reduktion von Cu(II) zu Cu(I) durch Proteine und der Bildung eines Bicinchoninsäure Cu(I) Komplexes mit einem Absorptionsmaximum bei 562 nm.

Lösungen:

Smith Reagenz:	Bicinchoninsäure (Sigma B-9643) 2 % (v/v) 4 % Kupfer-II-sulfat (Sigma C-2284)
BSA-Standard-Lösung:	1 mg Albumin Fraktion V (Roth, # 8076.2) in 1 ml H ₂ O

Durchführung:

Zunächst wurden Verdünnungen der BSA-Standard-Lösung in einem Konzentrationsbereich von 0,2 mg/ml bis 1 mg/ml zur Erstellung einer Kalibriergeraden hergestellt. Von den Kalibrierproben und zwei Qualitätskontrollen (200 und 800 µg/ml) wurden je 10 µl in einer 96 Multititerplatte doppelt aufgetragen. Die Proben wurden entsprechend der zu erwartenden Proteinkonzentrationen verdünnt und ebenfalls jeweils 10 µl und 5 µl + 5 µl H₂O aufgetragen. Nach Zugabe von 200 µl Smith Reagenz wurde kurz auf dem Elisa-Schüttler gemischt und dann 1 h bei 37°C im Trockenschrank inkubiert. Nach erneutem Schütteln wurde die Absorption der Proben bei 562 nm im Elisa Reader (Multilabel Counter 1420, Victor (Filter 570 nm)) gemessen.

4.1.4 Biochemische Methoden

4.1.4.1 Western Blot Analyse von P-Glykoprotein

Zunächst wurde eine eindimensionale Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat durchgeführt. Durch die gleichmäßige Anlagerung von Natriumdodecylsulfat an die Aminosäuren erhalten Proteine eine negative Ladung und können so während der Gelelektrophorese zur Anode wandern. Die Migration der Proteine in einer Polyacrylamidmatrix während der Elektrophorese ist von der Größe der Proteine abhängig und ermöglicht so eine Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht. Membranfraktionen von Kolongewebe und Plazenta-Proteinhomogenate wurden nach der Methode von Lämmli (Laemmli, 1970) elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine mit der Nassblot-Technik von Towbin (Towbin et al., 1979) auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und P-Glykoprotein mit einer spezifischen Immunfärbung analysiert.

Lösungen:

Tris/HCl pH 6,8	0,5 M Tris (Roth, # 48553) in H ₂ O pH 6,8 (HCl)	
Tris/HCl pH 8,8	1,5 M Tris (Roth, # 48553) in H ₂ O pH 8,8 (HCl)	
2-fach Probenpuffer:	Tris/HCl pH 6,8	2,0 ml
	Glycerol	1,6 ml
	10 % (w/v) SDS (Sigma, # L4390)	3,2 ml
	2-β-Mercaptoethanol (Sigma, # M3148)	0,8 ml
	0,05 % (w/v) Bromphenolblau (Sigma, # B-6896)	0,4 ml
10 x Gelelektrophoresepuffer:	Tris (Roth, # 48553)	25 mM
	Glycin (Serva, # 23390)	190 mM
	SDS (Sigma, # L4390)	0,1%
Transferpuffer:	Tris (Roth, # 48553)	25 mM
	Glycin (Serva, # 23390)	192 mM
	Methanol	10% (v/v)
Waschpuffer TBST:	Tris (Roth, # 48553)	1 mM
	NaCl (Merck, # 106404)	15 mM
	Tween 20 (Merck, # 8221840500)	0,01% (v/v)
	pH 7,4	
4 % Sammelgel (für 10 ml):	H ₂ O dest.	6,1 ml
	Tris/HCl, pH 6,8	2,5 ml
	10 % (w/v) SDS (Sigma, # L4390)	100 µl
	Acrylamide/bis (30 % stock)	1,3 ml
	10 % APS (Merck, # 101201)	50 µl
	TEMED (GIBCO BRL, # 15524010)	10 µl
7,5 % Trenngel (für 10 ml):	H ₂ O dest.	4,85 ml
	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	2,5 ml
	10 % (w/v) SDS (Sigma, # L4390)	100 µl
	Acrylamide/Bis (30 % Stock)	2,5 ml
	10 % APS (Merck, # 101201)	50 µl
	TEMED (GIBCO BRL, # 15524010)	10 µl
Blockpuffer:	5 % Milchpulver (Fluka, # 70166) in Waschpuffer	

Durchführung:

50 µg Protein (Plazentahomogenat, Kolon-Membranprotein) wurden 1:1 mit Probenpuffer versetzt und zusammen mit Kalibrierstandards und einem Proteinmarker auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel (4 % Sammelgel, 7,5 % Trenngel) aufgetragen. Als Kalibrierstandards wurde L-MDR1 Zellhomogenat verwendet. Es handelte sich dabei um Homogenat aus einer von Schinkel (Schinkel et al., 1995) beschriebenen LLC-PK1 Zelllinie, welche mit cDNA für humanes MDR-1 transfiziert wurde. Die Gelelektrophorese wurde in einer vertikalen Elektrophoresekammer (TransBlot Cell IIxi, BioRad, München) mit Laufpuffer als Elektrolyt bei 200 V während 4 Stunden durchgeführt.

Der Proteintransfer vom SDS-Polyacrylamid-Gel auf eine Nitrozellulose-Membran wurde mit dem Nassblot-Verfahren nach Towbin (Towbin et al., 1979) durchgeführt. Die Nitrozellulose-Membran wurde kurz mit H₂O benetzt und anschließend zusammen mit Filterpapier und Schwämmen in Transferpuffer äquilibriert. Die Nitrozellulose-Membran mit SDS-Polyacrylamid-Gel, umgeben von Filterpapier und Schwämmen, wurde in die Blotvorrichtung (TankBlot Cell, BioRad) eingelegt und der Proteintransfer während 20 h bei 5 W und 4 °C durchgeführt.

Die mit Protein beladene Nitrozellulose-Membran wurde dann zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für 60 Minuten in Blockpuffer unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Inkubation mit Primärantikörper erfolgte in einer 1:5 Verdünnung des Blockpuffers für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C unter leichtem Schütteln. Nach drei Waschschrritten mit je 50 ml Waschpuffer für je 10 min unter leichtem Schütteln wurde die Nitrozellulose-Membran mit Peroxidase gekoppeltem Sekundärantikörper während 30 min bei RT unter leichtem Schütteln (20x/min) inkubiert. Es folgten drei weitere Waschschrritte wie oben beschrieben.

Die Detektion des Antigens erfolgte mit einem Supersignal System von Pierce nach den Angaben des Herstellers. Dabei wurde ein Diacylhydrazid im Alkalischen unter Katalyse von H₂O₂ von der Peroxidase oxidiert. Die dabei erzeugte Chemilumineszenz mit einer Wellenlänge von 428 nm wurde mit einer hochempfindlichen Digitalkamera (LAS-1000, Fuji) mit Flat-Frame Korrektur, Abzug des Dunkelbildes und ohne Binning gemessen.

Tabelle 5: Antikörper für Western Blot Analyse von P-Glykoprotein

Antikörper	Typ	Herkunft	Verdünnung
Anti P-Glykoprotein Clone F4	Monoklonal, Maus	Sigma, # 7965	1 : 4000
Anti m-IgG Peroxidase gekoppelt	anti-Maus	Oncogene, # DC02L	1 : 1500

4.1.5 Immunhistochemische Methoden

4.1.5.1 Nachweis von P-Glykoprotein in humaner Plazenta

Zur Analyse der Lokalisation von P-Glykoprotein in Plazentagewebe wurden folgende Immundoppelfärbungen an Plazentagewebe durchgeführt:

- Färbung von P-Glykoprotein und „Von Willebrand Faktor“ (Endothelzellenmarker)
- Färbung von P-Glykoprotein und „Placental Lactogen“ (Syncytiotrophoblastenmarker)

Negativkontrollen wurden durch Färbung mit den entsprechenden Isotypkontrollen durchgeführt.

Lösungen:

PBS:	1,4 M NaCl (Merck, # 1064041000)
	0,08 M Na ₂ HPO ₄ (Merck, # 1065800500)
	0,03 M KCl (Merck, # 4936)
	0,015 M KH ₂ PO ₄ (Merck, # 4873)
PBS-BSA:	0,2 % BSA (Roth, # 8076.2)
	in PBS
PBS-BSA-Triton:	0,2 % BSA (Roth, # 8076.2)
	0,2 % Triton X-100 (Roth, # 30512)
	in PBS

Durchführung:

Frisches Plazentagewebe wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei -80 °C gelagert bis 5 µm dicke Kryoschnitte angefertigt wurden. Zum Fixieren des Plazentagewebes wurden die Kryoschnitte für 10 min bei -20 °C in Aceton inkubiert. Die Schnitte wurden dreimal je 10 min mit PBS gewaschen und anschließend 1 h mit 5 % Schweineserum in PBS-BSA-Triton inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Danach wurden die Schnitte mit den jeweiligen Primärantikörpern in einer Feuchtkammer bei 4 °C über Nacht inkubiert. Nach drei Waschschritten mit PBS-BSA-Triton für je 10 min wurden die Schnitte mit Sekundärantikörper 1 h bei RT inkubiert. Erneut wurden die Schnitte 3 x mit PBS-BSA-Triton für je 10 min und einmal kurz mit H₂O gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte in Vecta Shield (LINARIS, # H1000) eingebettet und am konfokalen Laser-Mikroskop analysiert.

Tabelle 6: Primärantikörper zur Immunfärbung von Plazenta

Antikörper	Typ	Herkunft	Verdünnung
Anti P-Glykoprotein Clone F4	Monoklonal, Maus	Sigma, # 7965	1 : 100
Anti human von Willebrand Faktor	Polyklonal, Kaninchen	Sigma # F 3520	1 : 500
Anti human Placental Lactogen	Polyklonal, Kaninchen	Novo Castra # NCL-PLp	1 : 800
Mouse IgG1	Maus	Coulter, # PN 6602872	1 : 80

Tabelle 7: Sekundärantikörper zur Immunfärbung von Plazenta

Antikörper	Typ	Herkunft	Verdünnung
FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG	Anti-Kaninchen	Dianova, #111-095-003	1 : 50
Cy5-conjugated goat anti-mouse IgG	Anti-Maus	Dianova, #115-175-003	1 : 250

4.1.5.2 Nachweis von P-Glykoprotein in humanem Kolongewebe

Frisches Kolongewebe wurde in Sterofundin BG-5 (Braun) eingelegt, sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert bis 5 μm dicke Kryoschnitte angefertigt wurden. P-Glykoprotein wurde wie in Abschnitt 4.1.5.1 beschrieben gefärbt. Als Negativkontrolle wurde eine Färbung mit der entsprechenden Isotypkontrolle mitgeführt.

4.2 Multidrug Resistance Protein 3

4.2.1 Zellbiologische Methoden

4.2.1.1 In vitro Inkubationsexperimente mit CaCo-2 Zellen

CaCo-2 Zellen wurden 48 h mit den unten angeführten Substanzen inkubiert und anschließend MRP3 mRNA und/oder MRP3 Protein analysiert.

Zellen:

CaCo-2 humane Colon-Carcinom-Zelllinie (ATTC)

Lösungen:

Wachstumsmedium: DMEM (25 mM HEPES) (GIBCO BRL)
2 mM L-Glutamin (Biochrom AG, # K0282)
1% (v/v) nicht essentielle AS (Biochrom AG, #K0293)
100 U/ml Penicillin (GIBCO BRL, # 15140122)
100 µg/ml Streptomycin (GIBCO BRL, # 15140122)
10% (v/v) FCS (GIBCO BRL, # 10270106)

PBS: 1,4 M NaCl (Merck, # 1064041000)
0,08 M Na₂HPO₄ (Merck, # 1065800500)
0,03 M KCl (Merck, # 4936)
0,015 M KH₂PO₄ (Merck, # 4873)

Durchführung:

CaCo-2 Zellen wurden in einer Dichte von $0,5 \times 10^6$ Zellen/well in einer 6-well-Platte ausgesät und 1 Woche vor Inkubationsbeginn mit Wachstumsmedium kultiviert. Dabei wurde das Wachstumsmedium nach 3 Tagen erneuert. Zur Inkubation wurde das Wachstumsmedium erneut gewechselt und die jeweilige Substanz zugesetzt. Nach 48 h Inkubation wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für die mRNA- bzw. Protein-Analytik, wie im Folgenden beschrieben, weiterverarbeitet.

4.2.1.1.1 Inkubation von CaCo-2 Zellen mit Rifampicin

Lösungen

- 10 mM Rifampicin Stocklösung: 10 mM Rifampicin (Merck, #7607)
in DMSO
- 20 mM Rifampicin Stocklösung: 20 mM Rifampicin (Merck, #7607)
in DMSO

Durchführung:

Der Inkubationsversuch wurde wie unter 4.2.1.1 beschrieben durchgeführt. Für die Inkubation wurden zu 5 ml Wachstumsmedium je 5 µl Rifampicin Stocklösung zugesetzt. Als Kontrolle dienten CaCo-2 Zellen, deren Wachstumsmedium während der Inkubationszeit mit 5 µl DMSO versetzt wurde und im Versuch mitgeführt wurden.

4.2.1.1.2 Inkubation von CaCo-2 Zellen mit Gallensäuren

Lösungen:

- GCA Stocklösung: 10 mM Glycocholic Acid (Sigma, # G-7132)
in H₂O
- GDCA Stocklösung: 10 mM Glycodeoxycholic Acid (Sigma, # G-2358)
in H₂O
- GCDCA Stocklösung: 10 mM Glycochenodeoxycholic Acid (Sigma, # G-0759)
in H₂O
- LA Stocklösung: 10 mM Lithocholic Acid (Sigma, # L-6250)
in Ethanol
- CDA Stocklösung: 10 mM Chenodeoxycholic Acid (Sigma, # C-9377)
in Ethanol
- TCA Stocklösung: 50 mM Taurocholic Acid (Sigma, # T4009)
in H₂O
- TCDCA Stocklösung: 50 mM Taurochenodeoxycholic Acid (Sigma, # T6260)
in H₂O
- CA Stocklösung: 50 mM Cholic Acid (Sigma, # C6445)
in H₂O
- GA Stocklösung: 50 mM Glycolithocholic Acid (Sigma, # G0134)
in H₂O

DA Stocklösung:	50 mM Deoxycholic Acid (Sigma, # D6750) in H ₂ O
TUA Stocklösung:	50 mM Tauroursodeoxycholic Acid (Sigma, # T0266) in H ₂ O
UA Stocklösung:	50 mM Ursodeoxycholic Acid (Sigma, # U5127) in H ₂ O
TDA Stocklösung:	50 mM Taurodeoxycholic Acid (Sigma) in H ₂ O

Durchführung:

Der Inkubationsversuch wurde wie unter 4.2.1.1 beschrieben durchgeführt. CaCo-2 Zellen wurden mit je 100 µM bzw. 500 µM Gallensäuren inkubiert, dazu wurden zu 5 ml Wachstumsmedium je 50 µl Stocklösung zugesetzt. Als Kontrolle dienten CaCo-2 Zellen, deren Wachstumsmedium während der Inkubationszeit mit 50 µl Lösungsmittel versetzt und im Versuch mitgeführt wurden.

4.2.1.2 In vitro Inkubationsexperimente mit HepG2 Zellen

HepG2 Zellen wurden für 48 h mit den unten angeführten Substanzen inkubiert und anschließend MRP3 mRNA und/oder MRP3 Protein analysiert. Die Inkubation erfolgte in einem Medium, welches Dextran-Aktivkohle behandeltes fötales Kälberserum (DCCT-FCS) enthält. FCS wurde mit Dextran-Aktivkohle behandelt, um Steroidhormone zu beseitigen und somit eine Aktivierung des untersuchten Proteins durch FCS zu vermeiden.

Zellen:

HepG2 (Aden et al., 1979)

Lösungen:

Wachstumsmedium: MEM (GIBCO BRL)

10 % FCS (GIBCO BRL, # 10270106)

1 % Glutamin (GIBCO BRL, # 25030-024)

1 % Penicillin/Streptomycin (GIBCO BRL, # 15140-114)

Tris/HCl pH 8: 10 mM Tris (Roth, # 48553)

in H₂O

pH 8 (HCl)

DCC:	25 g Norit A Aktivkohle (Serva) 200 ml Tris/HCl pH 8 25 g Dextran T70 (Pharmacia)
Inkubationsmedium:	MEM (GIBCO BRL) 10 % DCCT-FCS 1 % Glutamin (GIBCO BRL, # 25030-024) 1 % Penicillin/Streptomycin (GIBCO BRL, # 15140-114)
PBS:	1,4 M NaCl (Merck, # 1064041000) 0,08 M Na ₂ HPO ₄ (Merck, # 1065800500) 0,03 M KCl (Merck, # 4936) 0,015 M KH ₂ PO ₄ (Merck, # 4873)

Durchführung:

Zunächst wurde DCCT-FCS durch Zugabe von 10 ml DCC zu 500 ml FCS hergestellt. Die Suspension wurde über Nacht bei 4 °C gerührt und anschließend bei 16000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit weiteren 10 ml DCC versetzt und 30 min bei 50 °C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand ein zweites Mal mit 10 ml DCC versetzt und 30 min bei 50 °C inkubiert. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand über eine PES-Membran von Nalgene mit einer Porengröße von 0,2 µm sterilfiltriert und bei -20 °C gelagert.

Für die MRP3 mRNA Analyse wurden die in vitro Inkubationsexperimente in einer 6-well-Platte durchgeführt. Dazu wurden die Zellen in einer Dichte von 0,5 x 10⁶ Zellen/well ausgesät. Für die Proteinanalytik wurden HepG2 Zellen in Petrischalen mit einem Durchmesser von 10 cm in einer Dichte von 2,5 x 10⁶ Zellen/Schale ausgesät. Die Zellen wurden 24 h vor Inkubationsbeginn in Wachstumsmedium kultiviert.

Zur Inkubation mit den unten angeführten Substanzen wurde das Wachstumsmedium durch Inkubationsmedium ersetzt und die Substanz zugesetzt. Im 48 h Inkubationsversuch wurde das Inkubationsmedium nach 24 h erneuert und wiederum Substanz zugesetzt. Nach 24 h bzw. 48 h Inkubation wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für die mRNA- bzw. Protein-Analytik, wie im Folgenden beschrieben, weiterverarbeitet. Als Kontrolle wurden HepG2 Zellen im Versuch mitgeführt, deren Inkubationsmedium 5 µl Lösungsmittel der Substanz (DMSO) enthielt.

4.2.1.2.1 Inkubation von HepG2 Zellen mit Rifampicin

Lösungen

10 mM Rifampicin Stocklösung: 10 mM Rifampicin (Merck, #7607)
in DMSO

20 mM Rifampicin Stocklösung: 20 mM Rifampicin (Merck, #7607)
in DMSO

Durchführung:

HepG2 Zellen wurden für 48 h mit je 10 μ M und 20 μ M Rifampicin wie unter 4.2.1.2 beschrieben inkubiert. Dazu wurden die Zellen in 6-well-Platten mit je 5 ml Inkubationsmedium/well versetzt und 5 μ l Rifampicin Stocklösung/well zugesetzt.

4.2.1.2.2 Inkubation von HepG2 Zellen mit Cortisol

Lösungen:

0,413 mM Cortisol Stocklösung: 0,413 mM Cortisol (Sigma, # H-0888)
in DMSO

10 mM Cortisol Stocklösung: 10 mM Cortisol (Sigma, # H-0888)
in DMSO

Durchführung:

HepG2 Zellen wurden für 48 h mit je 0,413 μ M und 10 μ M Cortisol wie unter 4.2.1.2 beschrieben inkubiert. Die Zellen wurden in 6-well-Platten und Petrischalen mit 10 cm Durchmesser mit je 5 ml bzw. 10 ml Inkubationsmedium versetzt und je 5 μ l bzw. 10 μ l Cortisol Stocklösung zugegeben.

4.2.1.2.3 Inkubation von HepG2 Zellen mit Omeprazol

Lösungen:

10 μ M Omeprazol Stocklösung: 10 μ M Omeprazol (Hässle, Astra; Batch # 165)
in DMSO

100 µM Omeprazol Stocklösung: 100 µM Omeprazol (Hässle, Astra; Batch # 165)
in DMSO

Durchführung:

HepG2 Zellen wurden für 48 h mit je 10 µM und 100 µM Omeprazol wie unter 4.2.1.2 beschrieben inkubiert. Die Zellen wurden in 6-well-Platten und Petrischalen mit 10 cm Durchmesser mit je 5 ml bzw. 10 ml Inkubationsmedium versetzt und je 5 µl bzw. 10 µl Omeprazol Stocklösung zugegeben.

4.2.1.2.4 Inkubation von HepG2 Zellen mit β-Naphtoflavon

Lösungen:

1mM β-Naphtoflavon Stocklösung: 1 mM β-Naphtoflavon (Sigma, N-3633)
in DMSO

500 µM β-Naphtoflavon Stocklösung: 500 µM β-Naphtoflavon (Sigma, N-3633)
in DMSO

Durchführung:

HepG2 Zellen wurden für 48 h mit je 5 µM und 10 µM β-Naphtoflavon wie unter 4.2.1.2 beschrieben inkubiert. Die Zellen wurden in 6-well-Platten mit je 5 ml bzw. 10 ml Inkubationsmedium versetzt 50 µl β-Naphtoflavon Stocklösung zugegeben. Als Kontrolle wurden Zellen mit 50 µl DMSO Zusatz zum Inkubationsmedium im Experiment mitgeführt.

4.2.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.2.1 RNA Isolierung aus humanem Gewebe (Leber, Kolon, Duodenalbiopsien)

Die RNA Isolierung aus humanem Kolongewebe und Duodenalbiopsien erfolgte wie in Abschnitt 4.1.1.4 beschrieben. Gewebestücke von humaner Leber mit einer maximalen Seitenlänge von 5 mm wurden für 24 h bei 4 °C in RNAlater gelagert und anschließend maximal 2 Monate bei –80 °C aufbewahrt. Die RNA Isolierung erfolgte ebenfalls wie in Abschnitt 4.1.1.4 beschrieben.

Nach der RNA Isolierung erfolgte eine Quantifizierung der RNA wie in Abschnitt 4.1.1.5 beschrieben und eine qualitative Analyse wie unter 4.1.1.6 beschrieben.

4.2.2.2 RNA Isolierung aus Zellen (HepG2, CaCo-2)

Die RNA Isolierung aus Zellen erfolgte mit einem Kit von Qiagen nach dem Prinzip wie in Abschnitt 4.1.1.3 beschrieben.

Lösungen:

RNeasy Midi Kit: Qiagen, # 75144

RNase-Free DNase Set: Qiagen, # 79254

Durchführung:

HepG2 Zellen bzw. CaCo-2 Zellen wurden mit 350 µl bzw. 600 µl RLT Puffer versetzt und 3,5 µl bzw. 6 µl β-Mercaptoethanol zugegeben. Das Lysat wurde anschließend zum Homogenisieren 5 x durch eine 20-G Kanüle (Ø 0,9 mm) gezogen. Die Proben wurden dann entweder bei -20 °C gelagert oder gleich weiterverarbeitet. Dazu wurden 350 µl bzw. 600 µl 70 % EtOH zugegeben und durch auf- und abpipetieren gemischt. Die Suspension wurde auf eine Rneasy mini spin column aufgetragen und 15 s bei mindestens 8000 x g zentrifugiert. Der Durchfluß wurde verworfen und die Säule mit 350 µl RW1 Puffer gewaschen. Anschließend wurde eine DNase I Behandlung der Membran mit dem RNase-Free DNase Set von Qiagen nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Membran wurde dann erneut mit 350 µl RW1 Puffer und anschließend 2 x mit 500 µl RPE Puffer gewaschen. Zuletzt wurde die RNA mit 50 µl Rnase-freiem Wasser eluiert (Zentrifugation 1 min bei 8000 x g).

Nach der RNA Isolierung erfolgte eine Quantifizierung der RNA wie in Abschnitt 4.1.1.5 beschrieben und eine qualitative Analyse wie unter 4.1.1.6 beschrieben.

4.2.2.3 RNA Isolierung aus CaCo-2 Zellen mit Trizol

Lösungen:

Trizol (GIBCO BRL, # 15596)

Durchführung:

Nach dem Inkubationsexperiment wurden die Zellen mit 1 mL Trizol lysiert und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 200 µL Chloroform zugegeben, 15 s geschüttelt und 3 min bei RT inkubiert. Die Proben wurden dann 15 min bei 4 °C und 12000 x g zentrifugiert. Die oberste Phase, welche die RNA beinhaltet, wurde vorsichtig in ein Eppendorf Gefäß überführt und mit 500 µL Isopropanol versetzt. Nach kurzem Schütteln wurden die Proben 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei 12000 x g und 4 °C während 10 min zentrifugiert und das RNA Pellet in 1 mL 75 % Ethanol aufgenommen. Nach erneuter Zentrifugation bei 7500 x g und 4 °C während 5 min wurde das Pellet bei RT 15 min getrocknet. Die RNA wurde anschließend in 25 µl RNase freiem H₂O durch 10 min Inkubation bei 55 °C gelöst und danach bei –80 °C gelagert.

4.2.2.4 Quantifizierung der MRP3 mRNA durch RT-PCR über real time TaqMan Technologie

Das Prinzip der RT-PCR über real time TaqMan Technologie wurde bereits in Abschnitt 4.1.1.7 beschrieben

Lösungen:

TaqMan Reverse Transcription Reagents (PE Applied Biosystems, P/N N808-0234)

TaqMan Universal PCR Master Mix (PE Applied Biosystems, # 4304447)

Human β-actin PDAR (PE Applied Biosystems, # 4310881E)

4.2.2.4.1 Durchführung der cDNA Synthese

Die cDNA Synthese wurde wie in Abschnitt 4.1.1.7.1 beschrieben durchgeführt.

4.2.2.4.2 Durchführung der real time TaqMan PCR:

Die real time TaqMan PCR wurde wie in Abschnitt 4.1.1.7.2 beschrieben durchgeführt. Zusätzlich wurden für die Quantifizierung von MRP3 mRNA folgende PCR Bedingungen etabliert. Der Forward Primer befindet sich in Exon 11 der MRP3 mRNA Sequenz mit der

Gendatenbank Nummer Acc. No. AF085690, der Reverse Primer in Exon 12. Die Sonde ist am Exon 11/12 Übergang lokalisiert. Das PCR Produkt der real time TaqMan PCR wurde durch Sequenzierung als Fragment des *MRP3*-Gens bestätigt.

real time TaqMan PCR-Ansatz zur MRP3 Bestimmung:

TaqMan Universal PCR Master Mix	12,50 µl
Forward Primer: TGATTCCAACGGAGCT (5 µM)	1,50 µl
Reverse Primer: TGATGCGCGAGTCCTTCA (5 µM)	1,50 µl
Sonde:	
^{FAM} CGCGCCTTCCAGGTAAAGCAAATG ^{TAMRA} -OH (5 µM)	1,00 µl
50 ng cDNA	5,00 µl
H ₂ O	3,50 µl
<i>Gesamtvolumen</i>	<i>25,00 µl</i>

Als Houskeeping Gene wurden Villin bzw. β-Actin, wie in 4.1.1.7.2 beschrieben, gemessen.

real time TaqMan PCR-Ansatz zur Villin Bestimmung:

TaqMan Universal PCR Master Mix	12,50 µl
Forward Primer: CTGGCAACCTTAGGGACTGG (5 µM)	1,50 µl
Reverse Primer: GTTAGCATTGAACACGTCCACTTT (5 µM)	1,50 µl
Sonde:	
^{FAM} CCAGATCACTGCTGAGGTCACAAGC ^{TAMRA} -OH (5 µM)	1,00 µl
50 ng cDNA	5,00 µl
H ₂ O	3,50 µl
<i>Gesamtvolumen</i>	<i>25,00 µl</i>

real time TaqMan PCR-Ansatz zur β-Actin Bestimmung:

TaqMan Universal PCR Master Mix	12,50 µl
PDAR System für β-Actin	1,25 µl
1 ng cDNA	5,00 µl
H ₂ O	6,25 µl
<i>Gesamtvolumen</i>	<i>25,00 µl</i>

4.2.3 Proteinchemische Methoden

4.2.3.1 Aufarbeitung von Kolongewebe

Die Aufarbeitung von humanem Kolongewebe erfolgte wie in Abschnitt 4.1.3.2 unter Aufarbeitung III beschrieben.

4.2.3.2 Aufarbeitung von Lebergewebe

Frisches Lebergewebe wurde sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur Aufarbeitung gelagert.

Lösungen:

Homogenisierungspuffer:	1 mM EDTA (Roth, # 80431)
	1 mM DTT (Sigma)
	0,2 mM Pefa Bloc (Roth, # A154)
	10 mM HEPES (Roth, # 70202)
	0,15 M KCl (Merck, # 4936)
Proteinlagerungspuffer:	100 mM Tris (Roth, # 48553)
	1 mM EDTA (Roth, # 80431)
	1 mM Pefa Bloc (Roth, # A154)
	1µg/ml Pepstatin (Sigma, # L2884)
	1µg/ml Leupeptin (Sigma, # P5318)

Durchführung :

1 g Leber wurde in 4 ml Homogenisierungspuffer mit dem Ultraturrax bei 9.500 upm zerkleinert. Anschließend wurde die Suspension mit dem Dounce Homogenisator durch 5 – 10 strokes mit 1.000 upm homogenisiert. Das Homogenat wurde 30 min bei 15000 x g und 4 °C zentrifugiert. Das Kernpellet wurde in 2 ml Homogenisierungspuffer aufgenommen und erneut mit dem Dounce Homogenisator homogenisiert. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 15000 x g und 4 °C wurde das Kernpellet in 1 ml Proteinlagerungspuffer aufgenommen und bei -80°C gelagert.

4.2.3.3 Aufarbeitung von Zellen (HepG2, CaCo-2)

Lösungen:

Lysepuffer:	10 mM Tris (Roth, # 48553)
	1 mM Pefa Bloc (Roth, # A154)
PBS:	1,4 M NaCl (Merck, # 1064041000)
	0,08 M Na ₂ HPO ₄ (Merck, # 1065800500)
	0,03 M KCl (Merck, # 4936)
	0,015 M KH ₂ PO ₄ (Merck, # 4873)

Durchführung:

Die Zellen wurden mit einem Zellschaber geerntet und mit PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde in hypotonem Lysepuffer aufgenommen und 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mittels Ultraschall und 5- bis 10-fachem Aufziehen durch eine Kanüle (20 G) homogenisiert.

4.2.3.4 Bestimmung der Proteinkonzentration nach der Methode von Smith

Siehe Abschnitt 4.1.3.3

4.2.4 Biochemische Methoden

4.2.4.1 Western Blot Analyse von MRP3

Die Western Blot Analyse von MRP3 wurde wie in Abschnitt 4.1.4.1 beschrieben durchgeführt. 50 µg Protein (Leber-Kernpellet-Fraktion, Kolon-Membranprotein bzw. Zellhomogenate) wurden eingesetzt. Als Kalibrierstandards wurden Verdünnungen einer Standard-Leberprobe bzw. MD2 176 Zellhomogenat verwendet. Es handelte sich dabei um Homogenat aus einer von Zelcer (Zelcer et al., 2001) beschriebenen Maus Fibroblasten Zelllinie, welche mit humanem MRP3 transfiziert wurde.

Tabelle 8: Antikörper für Western Blot Analyse von MRP3

Antikörper	Typ	Herkunft	Verdünnung
Monoclonal antibody to MRP3 (human) (M3II-9)	Monoklonal, Maus	Alexis #801-019-C250	1 : 50
Anti m-IgG Peroxidase gekoppelt	anti-Maus	Oncogene, # DC02L	1 : 1500

4.2.5 Immunhistochemische Methoden

4.2.5.1 Nachweis von MRP3 in Kolongewebe

Frisches Kolongewebe wurde in Sterofundin BG-5 (Braun) eingelegt, sofort mit flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert bis 5 μm dicke Kryoschnitte angefertigt wurden. Zur Analyse von MRP3 wurde ein Antikörper gegen ein intrazelluläres Antigen verwendet, daher musste das Gewebe vor der Immunfärbung durch eine „High temperature antigen unmasking technique“ für den Antikörper zugänglich gemacht werden.

Lösungen:

PBS:	1,4 M NaCl (Merck, # 1064041000) 0,08 M Na_2HPO_4 (Merck, # 1065800500) 0,03 M KCl (Merck, # 4936) 0,015 M KH_2PO_4 (Merck, # 4873)
Fixierlösungen:	4 % Paraformaldehyd in PBS
PBS-BSA:	0,2 % BSA (Roth, # 8076.2) in PBS
PBS-BSA-Triton:	0,2 % BSA (Roth, # 8076.2) 0,2 % Triton X-100 (Roth, # 30512) in PBS
Unspezifisches Schweineserum	
Vorbehandlungspuffer:	1 mM EDTA (Roth, # 80431) in H_2O (pH 8,0)

Durchführung:

Die Gewebeschnitte wurden 15 min in 4 % PFA-PBS Lösung bei RT fixiert. Nach 3 Waschschritten mit PBS für je 10 min wurde die „High temperature antigen unmasking technique“ durchgeführt. Dazu wurde der Vorbehandlungspuffer 30 min im Dampftopf vorgewärmt. Die Gewebeschnitte wurden dann in den heißen Puffer gestellt und 1 min inkubiert. Anschließend wurden die Gewebeschnitte mit Wasser gespült und 5 min mit PBS gewaschen. Nach 60 minütigem Blocken mit 5 % USS in PBS-BSA-Triton wurden die Gewebeschnitte mit anti MRP3 bzw. mouse IgG1 als Kontrolle (siehe Tabelle 9) bei 4 °C über Nacht in einer Feuchtkammer inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Schnitte drei mal je 10 min mit PBS-BSA-Triton gewaschen und anschließend mit Cy5-conjugated goat anti-mouse IgG für 2 h bei RT inkubiert. Abschließend wurden die Gewebeschnitte 3 x für je 10 min mit PBS-BSA-Triton gewaschen, kurz mit H₂O gespült und in Vectashield (LINARIS, # H1000) eingebettet.

Tabelle 9: Antikörper zur immunhistochemischen Analyse von MRP3

Antikörper	Typ	Herkunft	Verdünnung
Monoclonal antibody to MRP3 (human) (M3II-9)	Monoklonal, Maus	Alexis #801-019-C250	1 : 50
Mouse IgG1	Maus	Coulter Cop. #PN 6602872	1 : 80
Cy5-conjugated goat anti-mouse IgG	Anti-Maus	Dianova, #115-175-003	1 : 100

4.2.6 Cytochrom P450 1A Aktivitätsmessung

Es ist bekannt, dass β -Naphthoflavon Cytochrom P450 1A induziert. HepG2 Zellen wurden daher mit β -Naphthoflavon, wie in Abschnitt 4.2.1.2.4 beschrieben, inkubiert. Ein Teil der Zellen wurde anschließend mit dem Cytochrom P450 1A Substrat Ethoxyresorufin versetzt und die Bildung des fluoreszierenden Metabolit Resorufin im Vergleich zu unbehandelten Zellen gemessen.

Lösungen:

Ethoxyresorufin Stocklösung:	2,5 µM Ethoxyresorufin (Sigma, # E3763) in DMSO
Resorufin Stocklösung:	5 mM Resorufin (Sigma, # R 3257) in DMSO
PBS:	1,4 M NaCl (Merck, # 1064041000) 0,08 M Na ₂ HPO ₄ (Merck, # 1065800500) 0,03 M KCl (Merck, # 4936) 0,015 M KH ₂ PO ₄ (Merck, # 4873)

Durchführung:

Die HepG2 Zellen in den 6-well Platten wurden mit je 5 ml PBS pro well versetzt und 25 µM Ethoxyresorufin (= 50 µl Stocklösung) zugegeben. Zu den Zeitpunkten 0, 1,5 h und 3 h wurden je 300 µl Überstand aus den wells entnommen und für 10 min bei 10000 x g zentrifugiert. Der Resorufingehalt dieser Proben wurde anschließend mit einem Fluoreszenzdetektor analysiert.

<i>Messbedingungen:</i>	Injektionsvolumen: 50 µl
	Laufmittel: PBS + 1 % DMSO
	Fluß: 0,2 ml / min
	Detektion: Extinktion: 522 nm Emission: 586 nm

Zur Quantifizierung der Proben wurden Resorufin-Standardproben in folgenden Konzentrationen aus der Resorufin-Stocklösung hergestellt: 50 µM, 10 µM, 2 µM, 0,4 µM, 0,08 µM. Die Peakflächen der Standardproben wurden gemessen und eine Regressionsgerade erstellt, mit welcher die Konzentration der Proben bestimmt werden konnte.

4.3 Statistische Auswertung

Zur statistischen Analyse normalverteilter Daten wurde der nichtgepaarte t-Test bzw. eine Varianzanalyse (ANOVA) mit anschließendem Student-Newman-Keuls Test verwendet. Alle statistischen Auswertungen wurden mit der GraphPad Prism Software (Version 3.02) bzw. der GraphPad InStat Software (Version 3.05) durchgeführt.

5 Ergebnisse

5.1 P-Glykoprotein

5.1.1 P-Glykoproteinexpression und -funktion in peripheren mononukleären Zellen in Abhängigkeit vom *MDR1*-Genotyp

Die P-Glykoproteinexpression und -funktion in peripheren mononukleären Blutzellen wurde analysiert und eine Abhängigkeit vom *MDR1*-Genotyp untersucht. Dazu wurde zunächst eine Methode zur Bestimmung der P-Glykoproteinfunktion in peripheren mononukleären Blutzellen entwickelt. Die P-Glykoproteinfunktion von Individuen mit unterschiedlichem *MDR1*-Genotyp wurde analysiert und ein Zusammenhang mit den Polymorphismen C3435T in Exon 26 und G2677T in Exon 21 des *MDR1*-Gens untersucht. Außerdem wurde geprüft, ob ein Zusammenhang zwischen der P-Glykoproteinexpression und der P-Glykoproteinfunktion besteht.

5.1.1.1 Probandendokumentation

In die Studie wurden 31 gesunde Kaukasier eingeschlossen. Alle Probanden waren Nichtraucher und nahmen keine Medikamente ein. Die Charakterisierung der Probanden ist in Tabelle 10 und Tabelle 11 gezeigt. Nach Information über Ziele und Risiken der Blutentnahme wurde von jedem Probanden eine schriftliche Einverständniserklärung unterschrieben. Diese Studie wurde durch die zuständige Ethikkommission zustimmend bewertet.

Tabelle 10: Charakterisierung der Probanden mit unterschiedlichem *MDR1*-Genotyp in Exon 26 an Position 3435

Genotyp	Anzahl der Probanden	Geschlecht m/w	Alter [Jahre]	Gewicht [kg]
CC	10	6/4	31,3 ± 5,8	78,3 ± 15,5
CT	10	6/4	33,2 ± 6,2	73,6 ± 15,1
TT	11	6/5	34,4 ± 9,2	72,8 ± 14,4

Tabelle 11: Charakterisierung der in Tabelle 10 gezeigten Probanden in Abhängigkeit vom *MDR1*-Genotyp in Exon 21 an Position 2677 (ein Proband mit Genotyp GA wurde in dieser Tabelle nicht aufgeführt)

Genotyp	Anzahl der Probanden	Geschlecht m/w	Alter [Jahre]	Gewicht [kg]
GG	10	6/4	33,1 ± 4,4	77,6 ± 14,7
GT	14	6/8	32,0 ± 6,3	72,3 ± 15,6
TT	6	4/2	36,2 ± 12,2	72,6 ± 10,8

5.1.1.2 Genotypisierung

Die *MDR1*-Genotypen in Exon 26 an Position 3435 und in Exon 21 an Position 2677 wurden mittels DHPLC analysiert.

5.1.1.2.1 Analyse des *MDR1*-Genotyps in Exon 26 an Position 3435:

Bei der DHPLC Analyse von Wildtyp DNA (CC) zeigte das Chromatogramm einen Peak für die gebildeten Homoduplices (siehe graue Linie in Abbildung 8). Nach Zusatz von DNA eines Trägers zweier mutierter Allele (TT) waren im Chromatogramm drei Peaks zu erkennen (siehe schwarze Linie in Abbildung 8). Zwei schwächere Signale bei kürzeren Retentionszeiten für die gebildeten Heteroduplices und ein stärkeres Signal bei längerer Retentionszeit für die gebildeten Homoduplices. Heterozygote DNA (CT) zeigte drei Peaks für die gebildeten Hetero- und Homoduplices (siehe graue Linie in Abbildung 9). Nach Zugabe von DNA eines Trägers zweier mutierter Allele (TT) wurde das Signal für die Homoduplices verstärkt (Abbildung 9, schwarze Linie). Die Analyse von DNA eines Trägers zweier mutierter Allele (TT) führte zur Bildung von Homoduplices und zeigte ein Signal (siehe Abbildung 10, graue Linie), welches durch Zugabe weiterer DNA eines Trägers zweier mutierter Allele (TT) verstärkt wurde (Abbildung 10, schwarze Linie).

Die ermittelten Genotypen für die Probanden der Studie sind zusammen mit der Charakterisierung der Probanden in Tabelle 10 aufgeführt.

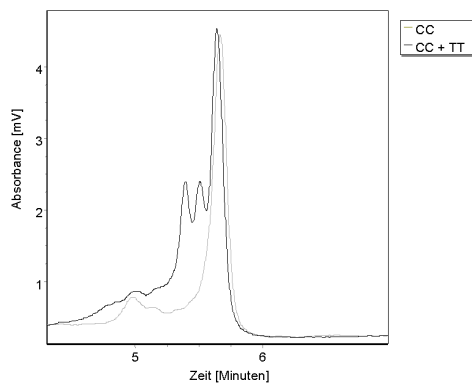


Abbildung 8: Chromatogramm zur Analyse der DNA eines Probanden mit Genotyp CC an Position 3435 in Exon 26 des *MDR1*-Gens.

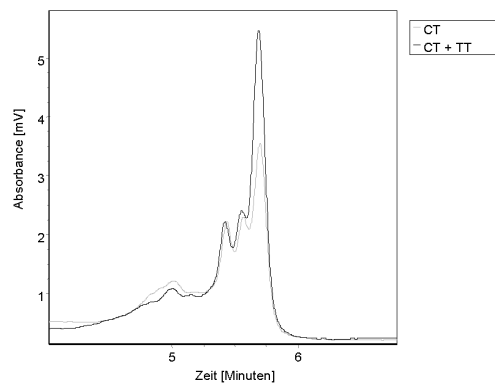


Abbildung 9: Chromatogramm zur Analyse der DNA eines Probanden mit Genotyp CT an Position 3435 in Exon 26 des *MDR1*-Gens.

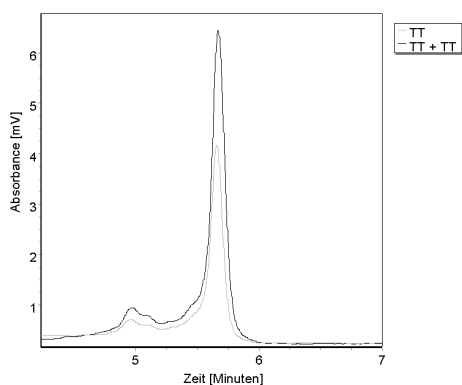


Abbildung 10: Chromatogramm zur Analyse der DNA eines Probanden mit Genotyp TT an Position 3435 in Exon 26 des *MDR1*-Gens.

5.1.1.2.2 Analyse des *MDR1*-Genotyps in Exon 21 an Position 2677:

Die Chromatogramme zur Analyse des *MDR1*-Genotyps in Exon 21 an Position 2677 der Probanden sind in Abbildung 11 bis Abbildung 13 dargestellt. Die DHPLC Analyse von homozygoter- und heterozygoter DNA an Position 2677 ergab das gleiche Signaltbild wie in Abschnitt 5.1.1.2.1 beschrieben. Die grauen Linien zeigen jeweils die Signale für die DNA

des Probanden, schwarze Linien sind das Ergebnis einer Mischung von Wildtyp DNA mit der DNA des Probanden. Signale für Hetero- und Homoduplices zeigten größere Unterschiede in den Retentionszeiten als es bei der Analyse der PCR Produkte von Exon 26 des *MDR1*-Gens der Fall war.

Die ermittelten Genotypen für die Probanden der Studie sind zusammen mit der Charakterisierung der Probanden in Tabelle 11 aufgeführt.

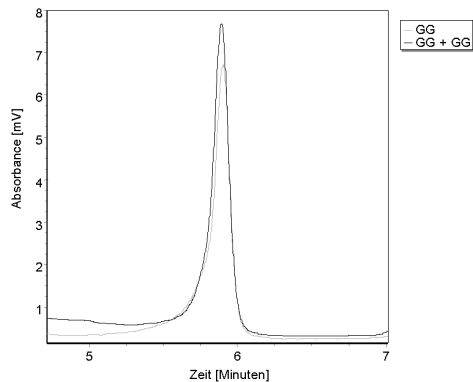


Abbildung 11: Chromatogramm zur Analyse der DNA eines Probanden mit Genotyp GG an Position 2677 in Exon 21 des *MDR1*-Gens.

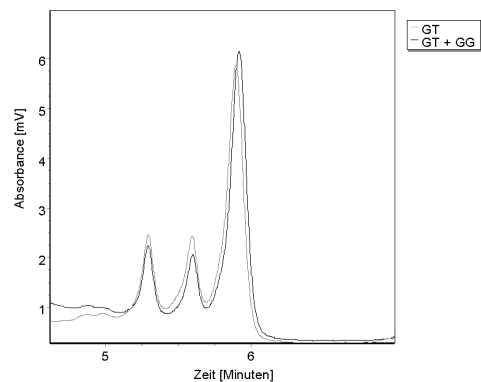


Abbildung 12: Chromatogramm zur Analyse der DNA eines Probanden mit Genotyp GT an Position 2677 in Exon 21 des *MDR1*-Gens.

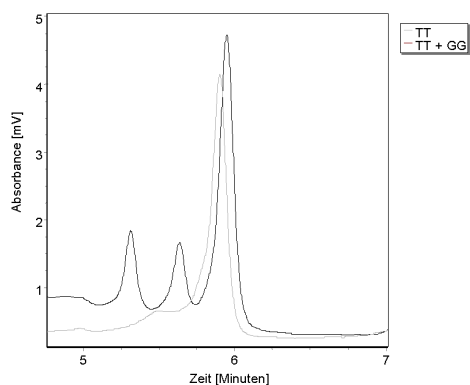


Abbildung 13: Chromatogramm zur Analyse der DNA eines Probanden mit Genotyp TT an Position 2677 in Exon 21 des *MDR1*-Gens.

5.1.1.3 Quantifizierung der *MDR1* mRNA aus Leukozyten

Die *MDR1* mRNA von 27 Probanden wurde mittels TaqMan real time RT-PCR quantifiziert und die Mittelwerte für die untersuchten Genotypen angegeben. In Tabelle 12 sind die *MDR1* mRNA Mengen von Probanden mit dem Genotyp 3435 CC, CT und TT in Exon 26 aufgelistet. Die Expression von *MDR1* mRNA war in Probanden mit Genotyp 3435 CC am höchsten, gefolgt von Probanden mit Genotyp 3435 CT und am niedrigsten in Probanden mit Genotyp 3435 TT.

Tabelle 12: *MDR1* mRNA Mengen in Leukozyten von Probanden mit unterschiedlichem *MDR1*-Genotyp in Exon 26 an Position 3435

<i>MDR1</i> -Genotyp	<i>MDR1</i> mRNA/Cyclophilin mRNA	Anzahl
CC	1,92 ± 0,94	10
CT	1,60 ± 0,76	7
TT	1,29 ± 1,02	10

Die *MDR1* mRNA Mengen in Abhängigkeit des *MDR1*-Genotyps in Exon 21 an Position 2677 sind in Tabelle 13 aufgelistet. Probanden mit dem Genotyp 2677 GG hatten eine höhere *MDR1* mRNA Expression als Probanden mit dem Genotyp 2677 GT und 2677 TT.

Tabelle 13: *MDR1* mRNA Mengen von Probanden mit unterschiedlichem *MDR1*-Genotyp in Exon 21 an Position 2677

<i>MDR1</i> -Genotyp	<i>MDR1</i> mRNA/Cyclophilin mRNA	Anzahl
GG	1,97 ± 0,96	10
GT	1,56 ± 0,99	11
TT	0,99 ± 0,57	5

Wurden die Genotypen in Exon 26 und Exon 21 gemeinsam betrachtet, so ergab sich ein statistisch nicht signifikanter Unterschied in der *MDR1* mRNA Menge ($P = 0,0508$) für die Gruppen CC/GG und TT/TT (siehe Tabelle 14). Probanden mit Genotyp CC in Exon 26 und GG in Exon 21 zeigten eine höhere *MDR1* mRNA Expression im Vergleich zu Probanden mit Genotyp TT in Exon 26 und Exon 21 ($P = 0,0508$).

Tabelle 14: *MDR1* mRNA Mengen von Probanden mit unterschiedlichen *MDR1*-Genotyp. Zusammenfassung der *MDR1*-Genotypen in Exon 26 an Position 3435 und Exon 21 an Position 2677

<i>MDR1</i> -Genotyp	<i>MDR1</i> mRNA/Cyclophilin mRNA	Anzahl
CC/GG	$2,07 \pm 0,99$	8
CT/GT	$1,62 \pm 0,79$	5
TT/GT	$1,58 \pm 1,33$	5
TT/TT	$0,99 \pm 0,57(*)$	5

CC/GG versus TT/TT: (*) $P = 0,0508$ (t-Test)

5.1.1.4 P-Glykoproteinfunktion in CD56⁺ NK-Zellen

Die P-Glykoproteinfunktion in CD56⁺ NK-Zellen von 31 gesunden Probanden wurde mit der Methode des Rhodaminefflux ermittelt.

5.1.1.4.1 Methodenvalidierung:

Die Reproduzierbarkeit der Methode wurde durch Messung des Rhodaminefflux in CD56⁺ NK-Zellen von 3 Probanden an mehreren Tagen und durch mehrere Messungen des Rhodamineffluxes in CD56⁺ NK-Zellen zweier Probanden an einem Tag überprüft. Der Variationskoeffizient für die Messungen an unterschiedlichen Tagen betrug 9 %, der Intra-Tag-Variationskoeffizient betrug 2 %. Die Messwerte sind in Tabelle 15 aufgelistet.

Tabelle 15: Rhodamin123 Fluoreszenz in CD56⁺ NK-Zellen (in % der PSC-833 behandelten Kontrolle) zur Ermittlung der Variationskoeffizienten für die Inter- und Intra-Tages-Variabilität der Methode

Proband	Tag	Rhodamin123 Fluoreszenz [%]	
		Messung 1	Messung 2
1	1	47	
1	2	38	
1	3	48	
2	1	59	58
2	2	45	
2	3	54	
3	1	56	
3	2	58	
4	1	68	70

5.1.1.4.2 Messung der Probanden

Die Rhodaminefflux-Experimente zeigten einen signifikanten Unterschied in der Rhodamin123-Fluoreszenz von CD56⁺ NK-Zellen zwischen Probanden mit unterschiedlichem Genotyp in Exon 26 des *MDR1*-Gens (siehe Tabelle 16).

Tabelle 16: Rhodamine123-Fluoreszenz in CD56⁺ NK-Zellen (in % der PSC-833 behandelten Kontrolle) von 31 gesunden Probanden nach 5, 10 und 15 min Effluxzeit.

<i>MDR1</i> -Genotyp Exon 26 Position 3435	Rhodamin123-Fluoreszenz [%]		
	5 min	10 min	15 min
CC	65,9 ± 10,0	51,1 ± 11,4	40,2 ± 13,1
CT	71,8 ± 11,9	61,4 ± 6,3 [#]	48,7 ± 14,2
TT	82,5 ± 7,3 ^{**##}	67,5 ± 9,5 ^{**}	54,5 ± 9,2 [*]

CC versus TT: * P < 0,05, ** P < 0,01; CC versus CT: [#] P < 0,05; CT vs TT: ^{##} P < 0,05

Probanden mit dem Genotyp 3435 CC zeigten zu allen untersuchten Zeitpunkten einen höheren Rhodaminefflux (bzw. niedrigere intrazelluläre Rhodaminfluoreszenz) als Probanden, welche homozygot für 3435 TT waren. Der Messwert für heterozygote Probanden lag zu allen untersuchten Zeitpunkten zwischen den Messwerten für homozygote

Probanden. In Abbildung 14 ist ein repräsentatives Ergebnis der FACScan Durchflusszytometer Analyse für einen Probanden mit dem Genotyp 3435 CC und einen Probanden mit dem Genotyp 3435 TT gezeigt. Die Darstellung des Rhodamin123-Efflux aus $CD56^+$ NK-Zellen von dem Proband mit CC-Genotyp zeigt eine wesentlich größere Verschiebung der Rhodamin123-Fluoreszenz nach 10 min Effluxzeit als bei dem Proband mit TT-Genotyp. Das bedeutet, dass der Proband mit dem Genotyp CC größeren P-Glykoprotein vermittelten Rhodamin123-Efflux aus $CD56^+$ NK-Zellen hat als der Proband mit dem Genotyp TT. Die Ergebnisse für jeden einzelnen Probanden dieser Studie sind in Abbildung 15 gezeigt. Zwei Probanden (1 CC, 1 TT) zeigten eine Abweichung vom Mittelwert, welche größer als zwei Standardabweichungen war.

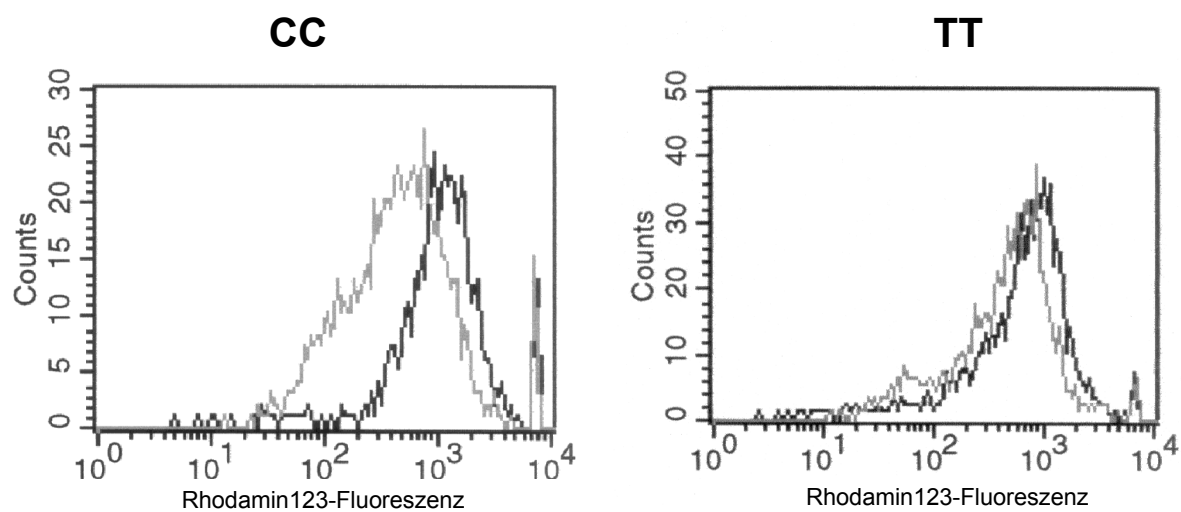


Abbildung 14: Rhodamin123-Fluoreszenz in $CD56^+$ NK-Zellen von zwei gesunden Probanden mit unterschiedlichem *MDR1*-Genotyp in Exon 26 (Position 3435) nach einer Effluxzeit von 10 min (graue Linie) verglichen mit der Kontrolle (schwarze Linie; entspricht der Rhodamin123-Fluoreszenz von $CD56^+$ NK-Zellen derselben Person unter Zusatz des P-Glykoprotein-Inhibitors PSC-833 zum Effluxmedium)

Probanden mit einem unterschiedlichen *MDR1*-Genotyp in Exon 21 (Position 2677) zeigten nach 10 min Effluxzeit einen signifikant (ANOVA, $P = 0,0145$) unterschiedlichen Rhodamin123-Efflux aus $CD56^+$ NK-Zellen (siehe Tabelle 17). Die Einzelwerte für die Messung der intrazellulären Rhodamine123-Fluoreszenz in $CD56^+$ NK-Zellen der Probanden dieser Studie sind in Abbildung 16 gezeigt. Betrachtet man den *MDR1*-Genotyp in Exon 26 (Position 3435) zusammen mit dem *MDR1*-Genotyp in Exon 21 (Position 2677), so ergibt die Varianzanalyse (ANOVA) einen signifikanten ($P = 0,0034$) Unterschied der Messwerte für die

drei Gruppen CC/GG, CT/GT, TT/GT und TT/TT nach einer Effluxzeit von 10 min (siehe Tabelle 18).

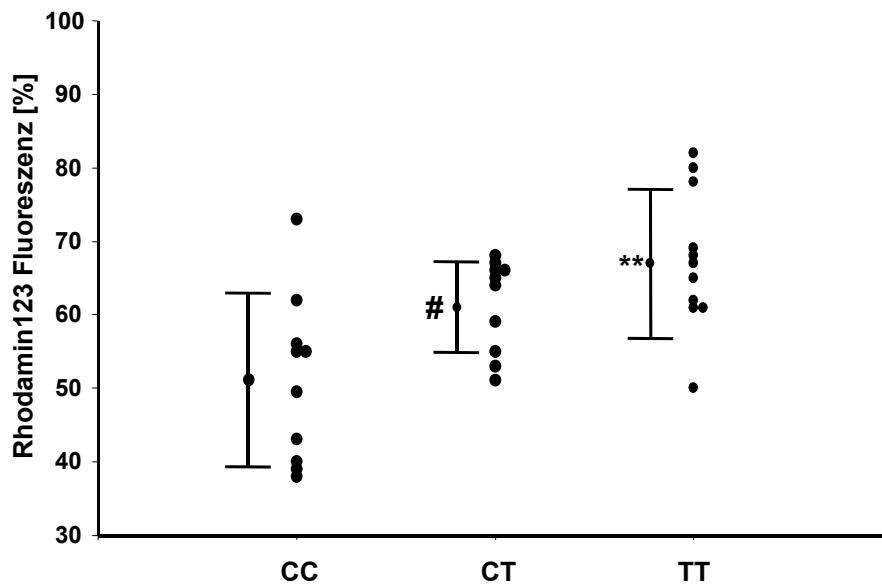


Abbildung 15: Einzelresultate (und Mittelwert \pm Standardabweichung) der Rhodamin123-Fluoreszenz in CD56⁺ NK-Zellen von 31 gesunden Probanden mit unterschiedlichem *MDR1*-Genotyp in Exon 26 (Position 3435) nach 10 min Effluxzeit als Prozentsatz der Kontrolle. **CC versus TT, $P < 0,01$; #CC versus CT, $P < 0,05$.

Tabelle 17: Rhodamine123-Fluoreszenz in CD56⁺ NK-Zellen (in % der PSC-833 behandelten Kontrolle) von 30 gesunden Probanden nach 5, 10 und 15 min Effluxzeit.

<i>MDR1</i> -Genotyp Exon 21 Position 2677	Rhodamin123-Fluoreszenz [%]		
	5 min	10 min	15 min
GG	67,8 \pm 13,0	52,4 \pm 12,2	40,2 \pm 13,0
GT	74,9 \pm 11,0	65,0 \pm 9,2 [#]	52,0 \pm 14,5
TT	80,8 \pm 9,4	63,2 \pm 9,2 [*]	52,0 \pm 4,4

GG versus TT: * $P < 0,05$; GG versus GT: [#] $P < 0,05$;

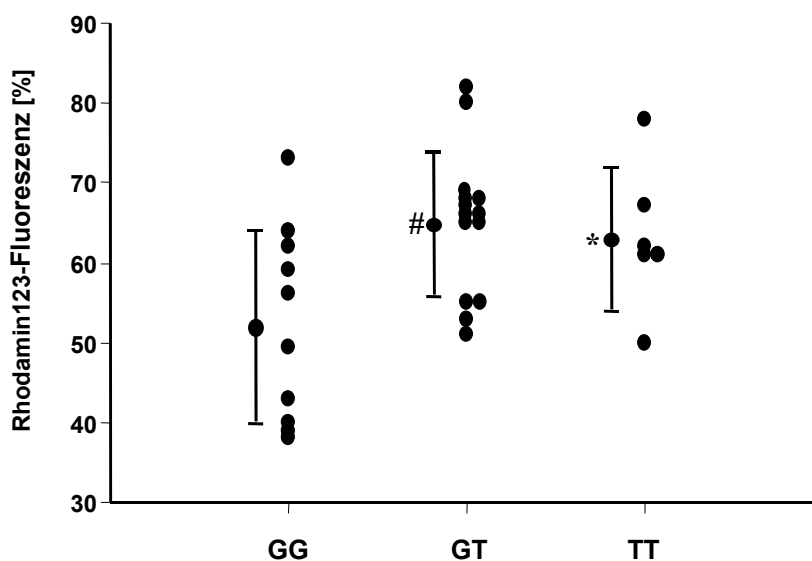


Abbildung 16: Einzelresultate (und Mittelwert \pm Standardabweichung) der Rhodamin123-Fluoreszenz in CD56⁺ NK-Zellen von 30 gesunden Probanden mit unterschiedlichem *MDR1*-Genotyp in Exon 21 (Position 2677) nach 10 min Effluxzeit als Prozentsatz der Kontrolle. *GG versus TT, $P < 0,05$; #GG versus GT, $P < 0,05$.

Tabelle 18: Rhodamine123-Fluoreszenz in CD56⁺ NK-Zellen (in % der PSC-833 behandelten Kontrolle) von 22 gesunden Probanden nach 5, 10 und 15 min Effluxzeit.

<i>MDR1</i> -Genotyp	Rhodamin123-Fluoreszenz [%]		
	5 min	10 min	15 min
Exon 26 (3435)/Exon 21 (2677)			
CC/GG	65,1 \pm 11,1	50,1 \pm 12,7	39,6 \pm 14,6
CT/GT	70,1 \pm 10,7	61,4 \pm 7,1 [#]	50,3 \pm 15,6
TT/GT	84,2 \pm 4,76	72,8 \pm 7,66 ^{**}	57,4 \pm 12,97
TT/TT	80,8 \pm 9,4	63,2 \pm 9,2 [*]	52,0 \pm 4,4

CC/GG versus TT/GT: ^{**} $P < 0,01$; CC/GG versus TT/TT: ^{*} $P < 0,05$; CC/GG versus CT/GT: [#] $P < 0,05$;

5.1.2 P-Glykoproteinexpression in humaner Plazenta in Abhängigkeit vom *MDR1*-Genotyp

In dieser Studie wurde das Plazentagewebe von 73 Kaukasierinnen untersucht. Das mittlere Alter der Frauen betrug $30,25 \pm 6,03$ Jahre; die Schwangerschaft war bei allen Frauen unauffällig und dauerte im Mittel $39,2 \pm 2,1$ Wochen. Es wurde die Expression von *MDR1* mRNA und P-Glykoprotein analysiert und die Resultate in Abhängigkeit vom *MDR1*-Genotyp der Mütter und Kinder ausgewertet.

5.1.2.1 Genotypisierung

Aus der genomischen DNA der Mütter und ihrer Kinder wurden die *MDR1*-Genotypen in Exon 26 an Position 3435 und in Exon 21 an Position 2677 mittels DHPLC bestimmt (siehe Tabelle 19).

Tabelle 19: Anzahl der Mütter bzw. Kinder mit unterschiedlichen *MDR1*-Genotypen in Exon 26 an Position 3435 und in Exon 21 an Position 2677. Der mütterliche Genotyp in Exon 21 von 4 Plazenten ist unbekannt.

	<i>MDR1</i> -Genotyp Exon 26			<i>MDR1</i> -Genotyp Exon 21		
	Position 3435			Position 2677		
	CC	CT	TT	GG	GT (GA)	TT (TA)
Mütter	14	39	20	29	30	8 (2)
Kinder	19	27	27	23	30 (3)	16 (1)

5.1.2.2 Quantifizierung der *MDR1* mRNA in humanem Plazentagewebe

Aus 35 Plazenten konnte mRNA in ausreichend guter Qualität isoliert werden. Die *MDR1* mRNA Analyse dieser Proben ergab keinen signifikanten Unterschied der Messwerte zwischen den einzelnen Genotyp-Gruppen.

Betrachtet wurde zunächst nur der Genotyp der Mutter (siehe Tabelle 20) bzw. nur der Genotyp des Kindes (Tabelle 21). Es ist keine Abhängigkeit der *MDR1* mRNA Expression in Plazentagewebe vom mütterlichen *MDR1*-Genotyp in Exon 26 (Position 3435) bzw. in Exon 21 (Position 2677) feststellbar (siehe Tabelle 20).

Obwohl die Unterschiede zwischen den einzelnen kindlichen *MDR1*-Genotyp-Gruppen (cc versus ct versus tt bzw. gg versus gt versus tt) nicht signifikant sind, war ein Trend zu einer niedrigeren *MDR1* mRNA Expression in Kindern mit dem Genotyp 3435 TT und 2677 TT zu erkennen (siehe Tabelle 21). Das gleiche Resultat zeigte eine Betrachtung von Mutter und Kind mit übereinstimmendem *MDR1*-Genotyp in Exon 26 (Position 3435) und in Exon 21 (Position 2677) (siehe Tabelle 22).

Eine weitere Analyse der *MDR1* mRNA Expression in Plazenta durch das Zusammenfassen der *MDR1*-Genotypen in Exon 26 (Position 3435) und in Exon 21 (CC/GG, CT/GT und TT/TT) wurde durchgeführt und ergab ebenfalls keinen signifikanten Einfluss von C3435T und G2677T auf die *MDR1* mRNA Expression.

Tabelle 20: *MDR1* mRNA Mengen (normalisiert auf β -Actin) von Plazentagewebe mit unterschiedlichem mütterlichen *MDR1*-Genotyp in Exon 26 (Position 3435) und in Exon 21 (Position 2677)

	mütterlicher <i>MDR1</i> -Genotyp in Exon 26 (Position 3435)		
	CC	CT	TT
Mittelwert	$5,62 \times 10^{-6}$	$5,51 \times 10^{-6}$	$8,20 \times 10^{-6}$
STABW	$4,88 \times 10^{-6}$	$6,70 \times 10^{-6}$	$3,67 \times 10^{-6}$
Anzahl	7	16	12

	mütterlicher <i>MDR1</i> -Genotyp in Exon 21 (Position 2677)		
	GG	GT	TT
Mittelwert	$8,10 \times 10^{-6}$	$4,37 \times 10^{-6}$	$8,41 \times 10^{-6}$
STABW	$6,63 \times 10^{-6}$	$3,78 \times 10^{-6}$	$6,54 \times 10^{-6}$
Anzahl	16	15	2

	mütterlicher <i>MDR1</i> -Genotyp in Exon 26 und Exon 21		
	CC/GG	CT/GT	TT/TT
Mittelwert	$5,25 \times 10^{-6}$	$3,58 \times 10^{-6}$	$8,41 \times 10^{-6}$
STABW	$5,24 \times 10^{-6}$	$3,82 \times 10^{-6}$	$6,54 \times 10^{-6}$
Anzahl	6	11	2

Tabelle 21: *MDR1* mRNA Mengen (normalisiert auf β -Actin) von Plazentagewebe mit unterschiedlichem kindlichen *MDR1*-Genotyp in Exon 26 (Position 3435) und in Exon 21 (Position 2677)

	kindlicher <i>MDR1</i> -Genotyp in Exon 26 (Position 3435)		
	cc	ct	tt
Mittelwert	$8,48 \times 10^{-6}$	$5,38 \times 10^{-6}$	$6,27 \times 10^{-6}$
STABW	$7,83 \times 10^{-6}$	$4,49 \times 10^{-6}$	$4,40 \times 10^{-6}$
Anzahl	9	15	11

	kindlicher <i>MDR1</i> -Genotyp in Exon 21 (Position 2677)		
	gg	gt	tt
Mittelwert	$7,82 \times 10^{-6}$	$6,00 \times 10^{-6}$	$4,26 \times 10^{-6}$
STABW	$7,15 \times 10^{-6}$	$4,46 \times 10^{-6}$	$4,69 \times 10^{-6}$
Anzahl	12	15	6

	kindlicher <i>MDR1</i> -Genotyp in Exon 26 und Exon 21		
	cc/gg	ct/gt	tt/tt
Mittelwert	$8,90 \times 10^{-6}$	$5,32 \times 10^{-6}$	$4,53 \times 10^{-6}$
STABW	$8,89 \times 10^{-6}$	$5,03 \times 10^{-6}$	$5,99 \times 10^{-6}$
Anzahl	7	9	4

Tabelle 22: *MDR1* mRNA Mengen (normalisiert auf β -Actin) von Plazentagewebe mit unterschiedlichem *MDR1*-Genotyp in Exon 26 (Position 3435) und in Exon 21 (Position 2677). Der Genotyp der Mutter ist mit Großbuchstaben, der kindliche Genotyp mit Kleinbuchstaben gekennzeichnet.

	<i>MDR1</i> -Genotyp in Exon 26 (Position 3435)		
	CC/cc	CT/ct	TT/tt
Mittelwert	$6,00 \times 10^{-6}$	$3,74 \times 10^{-6}$	$7,81 \times 10^{-6}$
STABW	$5,22 \times 10^{-6}$	$3,41 \times 10^{-6}$	$2,66 \times 10^{-6}$
Anzahl	6	9	7

	<i>MDR1</i> -Genotyp in Exon 21 (Position 2677)		
	GG/gg	GT/gt	TT/tt
Mittelwert	$8,47 \times 10^{-6}$	$4,80 \times 10^{-6}$	$1,30 \times 10^{-5}$
STABW	$7,55 \times 10^{-6}$	$4,18 \times 10^{-6}$	
Anzahl	10	7	1

	<i>MDR1</i> -Genotyp in Exon 26 und Exon 21		
	CC/cc GG/gg	CT/ct GT/gt	TT/tt TT/tt
Mittelwert	$5,65 \times 10^{-6}$	$2,88 \times 10^{-6}$	$1,30 \times 10^{-5}$
STABW	$5,76 \times 10^{-6}$	$2,42 \times 10^{-6}$	
Anzahl	5	3	1

5.1.2.3 Quantifizierung von P-Glykoprotein in humanem Plazentagewebe

5.1.2.3.1 Methodenvalidierung

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Methode wurde das Plazentagewebe einer Mutter an drei verschiedenen Tagen aufgearbeitet und P-Glykoprotein mittels Western Blot quantifiziert (siehe Abbildung 17). In Tabelle 23 sind die Ergebnisse der Analyse zusammengefasst; der Variationskoeffizient betrug 8 %.

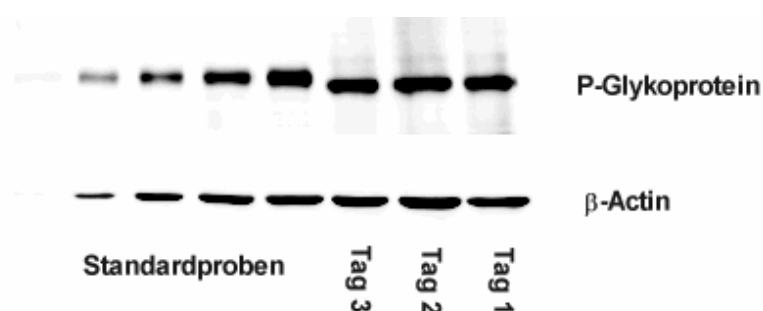


Abbildung 17: Western-Blot-Analyse von P-Glykoprotein in humanem Plazentagewebe zur Ermittlung des Variationskoeffizienten der Methode. Je 50 µg Gesamtprotein von Plazenta-Aufarbeitungen an drei verschiedenen Tagen wurde zusammen mit Standardproben analysiert. Als Kontrolle wurde die β-Actin-Menge in den einzelnen Proben analysiert.

Tabelle 23: Ergebnisse der Western-Blot-Analyse von Abbildung 17. Die angeführten Werte sind in µg relativ zur Gesamtproteinmenge der Standardproben angegeben.

	P-Glykoprotein [µg]
Tag 1	1,83
Tag 2	2,31
Tag 3	1,90
Mittelwert	2,01
STABW	0,26

5.1.2.3.2 Messergebnisse

Es konnte eine Assoziation der P-Glykoproteinexpression mit dem mütterlichen *MDR1*-Genotyp gezeigt werden. Trägerinnen der Mutation in Exon 26 an Position 3435 des *MDR1*-Gens (3435 TT) hatten eine signifikant niedrigeren P-Glykoproteinexpression in Plazentagewebe als Mütter mit dem Genotyp 3435 CT und 3435 CC ($P = 0,0494$). G2677T in mütterlicher DNA führte ebenfalls zu einer tendenziell niedrigeren P-Glykoproteinexpression in der Plazenta.

Mütter, welche Trägerinnen beider mutierter Allele, 3435 TT und 2677 TT, waren (TT/TT), wiesen ebenfalls eine signifikant niedrigere P-Glykoproteinexpression in Plazentagewebe auf als Trägerinnen von heterozygot mutierten Allelen CT/GT und Wildtypallelen CC/GG (siehe Tabelle 24).

Die Analyse des kindlichen *MDR1*-Genotyps (siehe Tabelle 25) zeigte ein ähnliches Ergebnis, jedoch ohne signifikante Unterschiede in der P-Glykoproteinexpression. Hingegen ist die P-Glykoproteinexpression in Abhängigkeit des identischen mütterlichen und kindlichen *MDR1*-Genotyps mit einer signifikant niedrigeren P-Glykoproteinexpression in Plazentagewebe assoziiert (siehe Tabelle 26).

Eine Zusammenfassung der signifikanten Unterschiede der P-Glykoproteinexpression in Abhängigkeit des *MDR1*-Genotyps ist in Abbildung 18 dargestellt. Abbildung 19 zeigt einen repräsentativen Western Blot der P-Glykoproteinanalyse in Plazentagewebe.

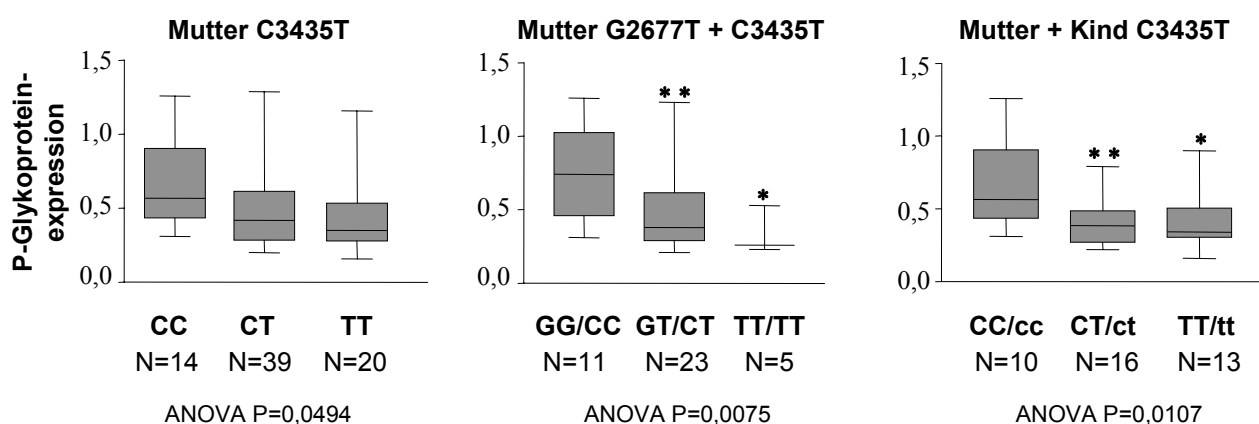


Abbildung 18: P-Glykoproteinexpression in Plazentagewebe in Abhängigkeit vom *MDR1*-Genotyp.

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$

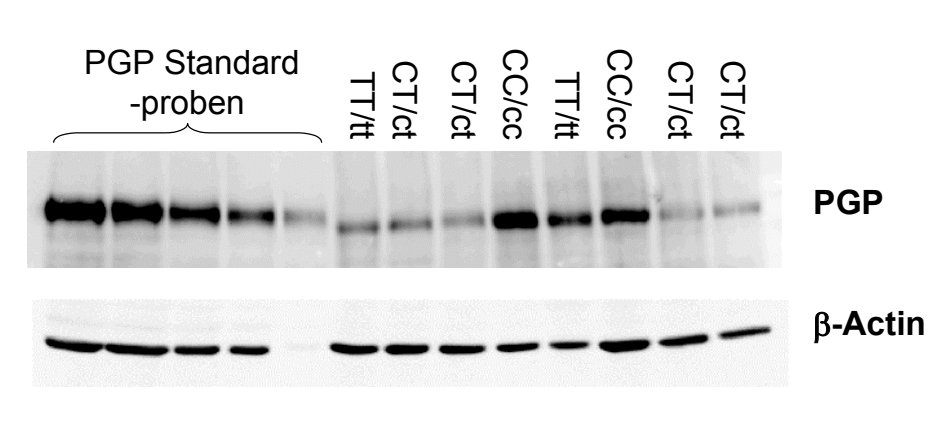


Abbildung 19: Repräsentatives Beispiel einer Western Blot Analyse von P-Glykoprotein in Plazentagewebe. Der mütterliche *MDR1*-Genotyp (C3435T) ist mit Großbuchstaben, der kindliche *MDR1*-Genotyp (C3435T) mit Kleinbuchstaben gekennzeichnet.

Tabelle 24: P-Glykoprotein Mengen (in μg relativ zu Standardproben) von Plazentagewebe mit unterschiedlichem mütterlichen *MDR1*-Genotyp in Exon 26 (Position 3435) und Exon 21 (Position 2677)

mütterlicher <i>MDR1</i> -Genotyp in Exon 26 (Position 3435)			
	CC	CT	TT
Mittelwert	0,66	0,47	0,46
STABW	0,30	0,25	0,26
Anzahl	14	39	20

mütterlicher <i>MDR1</i> -Genotyp in Exon 21 (Position 2677)			
	GG	GT	TT
Mittelwert	0,58	0,47	0,34
STABW	0,29	0,27	0,12
Anzahl	29	30	8

mütterlicher <i>MDR1</i> -Genotyp in Exon 21 und Exon 26			
	CC/GG	CT/GT	TT/TT
Mittelwert	0,71	0,45**	0,31*
STABW	0,31	0,24	0,12
Anzahl	11	23	5

TT/TT versus CC/GG: * $P < 0,05$; CT/GT versus CC/GG: ** $P < 0,01$

Tabelle 25: P-Glykoprotein Mengen (in µg relativ zu Standardproben) von Plazentagewebe mit unterschiedlichem kindlichen *MDR1*-Genotyp in Exon 26 (Position 3435) und Exon 21 (Position 2677)

	kindlicher <i>MDR1</i> -Genotyp in Exon 26 (Position 3435)		
	cc	ct	tt
Mittelwert	0,61	0,49	0,44
STABW	0,30	0,27	0,23
Anzahl	19	27	27

	kindlicher <i>MDR1</i> -Genotyp in Exon 21 (Position 2677)		
	gg	gt	tt
Mittelwert	0,50	0,47	0,41
STABW	0,26	0,24	0,18
Anzahl	23	30	16

	kindlicher <i>MDR1</i> -Genotyp in Exon 21 und Exon 26		
	cc/gg	ct/gt	tt/tt
Mittelwert	0,57	0,50	0,40
STABW	0,29	0,25	0,18
Anzahl	15	20	13

Tabelle 26: P-Glykoprotein Mengen (in µg relativ zu Standardproben) von Plazentagewebe mit unterschiedlichem *MDR1*-Genotyp in Exon 26 (Position 3435) und Exon 21 (Position 2677). Der Genotyp der Mütter ist mit Großbuchstaben, der kindliche Genotyp mit Kleinbuchstaben gekennzeichnet.

	<i>MDR1</i> -Genotyp in Exon 26 (Position 3435)		
	CC/cc	CT/ct	TT/tt
Mittelwert	0,66	0,41**	0,40*
STABW	0,29	0,18	0,18
Anzahl	10	16	13

	<i>MDR1</i> -Genotyp in Exon 21 (Position 2677)		
	GG/gg	GT/gt	TT/tt
Mittelwert	0,56	0,46	0,41
STABW	0,28	0,22	0,15
Anzahl	15	11	3

	<i>MDR1</i> -Genotyp in Exon 26 und Exon 21		
	CC/cc GG/gg	CT/ct GT/gt	TT/tt TT/tt
Mittelwert	0,73	0,46	0,38
STABW	0,32	0,18	0,21
Anzahl	7	6	2

CT/ct versus CC/cc: ** P < 0,01; TT/tt versus CC/cc: * P < 0,05

5.1.2.4 Immunhistochemischer Nachweis von P-Glykoprotein in Plazenta

Durch immunhistochemische Färbung wurde P-Glykoproteinexpression in kindlichen Syncytiotrophoblasten und in den Endothelzellen der mütterlichen und kindlichen Blutgefäße der Plazenta nachgewiesen. In Abbildung 20 sind die Ergebnisse zusammengefasst. Im Teil A, B und AB ist der Nachweis von P-Glykoprotein in den Endothelzellen der Blutgefäße zu sehen. Zusätzlich ist P-Glykoprotein in der apikalen Membran von Syncytiotrophoblasten zu erkennen (siehe weißer Pfeil in Teil AB). Teil C, D und CD zeigt die P-Glykoproteinexpression in der Membran von Syncytiotrophoblasten (siehe weißer Pfeil in Teil CD). Außerdem ist P-Glykoprotein in den Endothelzellen der Blutgefäße zu erkennen; es handelt sich dabei um kindliche Blutgefäße. Teil E, F und EF zeigt die P-Glykoproteinexpression in den Endothelzellen der Blutgefäße. Es handelt sich dabei vermutlich um mütterliche Blutgefäße aufgrund des fehlenden Signals des Syncytiotrophoblasten-Markers.

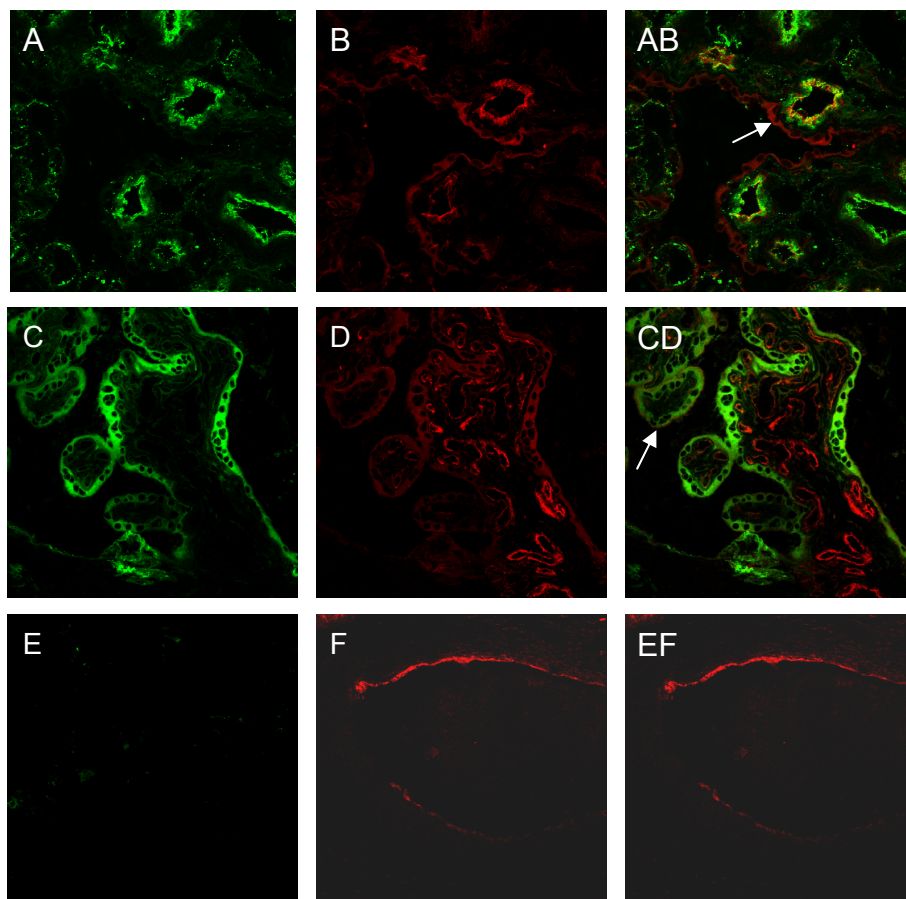


Abbildung 20: A: Färbung der Endothelzellen der Blutgefäße mit Anti-human von Willebrand Faktor. B, D, F: Färbung von P-Glykoprotein mit Anti-P-Glykoprotein (MDR) Clone F4. AB: Überlagerung der Abbildungen A und B. C: Färbung der Syncytiotrophoblasten mit Placentales Lactogen. CD: Überlagerung der Abbildungen C und D. E: Behandlung des Krypschnittes mit Placentales Lactogen. EF: Überlagerung der Abbildungen E und F.

5.1.3 P-Glykoproteinexpression in Kolongewebe in Abhängigkeit vom *MDR1*-Genotyp

In dieser Studie wurde die *MDR1* mRNA Menge und P-Glykoproteinexpression in Kolongewebe bestimmt und eine Assoziation mit dem *MDR1*-Genotyp untersucht.

5.1.3.1 Patientendokumentation und Genotypisierung

12 Patienten, bei welchen eine chirurgische Entfernung von Kolonabschnitten wegen eines Karzinoms vorgenommen wurde, waren in die Studie eingeschlossen. Teile des Restgewebes der Operation wurden gesammelt. Zusätzlich wurde den Patienten Blut zur Isolierung von genomischer DNA für die Genotypisierung entnommen. Nach Information über die Ziele der Studie und die Risiken der Blutentnahme wurde von jedem Patienten eine schriftliche Einverständniserklärung unterschrieben. Die Studie wurde durch die zuständige Ethikkommission zustimmend bewertet. In Tabelle 27 sind die Ergebnisse der Genotypisierung und die Charakterisierung der Patienten angeführt.

Tabelle 27: Charakterisierung der Patienten mit unterschiedlichem *MDR1*-Genotyp in Exon 26 (Position 3435) und Exon 21 (Position 2677)

Genotyp		Anzahl der Probanden	Geschlecht m/w	Alter [Jahre]
Exon 26 (Position 3435)	CC	3	1/2	68,3 ± 4,2
	CT	6	2/4	72,5 ± 8,9
	TT	3	2/1	70,7 ± 4,2
Exon 21 (Position 2677)	GG	3	1/2	68,3 ± 4,2
	GT	8	3/5	72,6 ± 7,6
	TT	1	1/0	66,0

5.1.3.2 Quantifizierung der *MDR1* mRNA

MDR1 mRNA der einzelnen Kolongewebe-Proben wurde mittels real time TaqMan RT-PCR bestimmt und auf die *Villin* mRNA Menge der jeweiligen Probe normalisiert. Die Ergebnisse der Messung bezogen auf die *MDR1*-Genotypen sind in Tabelle 28 aufgeführt. Obwohl die

Unterschiede zwischen den Genotyp-Gruppen nicht signifikant sind, war der Polymorphismus an Position 3435 (TT) und 2677 (TT) mit einer niedrigeren *MDR1* mRNA Expression in Kolongewebe verbunden.

Tabelle 28: *MDR1* mRNA Mengen in Kolongewebe (normalisiert auf Villin mRNA) in Abhängigkeit vom *MDR1*-Genotyps.

Genotyp		<i>MDR1</i> mRNA / Villin mRNA Mittelwert \pm STABW	Anzahl
Exon 26 (Position 3435)	CC	$8,83 \times 10^{-5} \pm 4,75 \times 10^{-5}$	3
	CT	$5,14 \times 10^{-5} \pm 3,64 \times 10^{-5}$	5
	TT	$6,16 \times 10^{-5} \pm 1,74 \times 10^{-5}$	3
Exon 21 (Position 2677)	GG	$8,83 \times 10^{-5} \pm 4,75 \times 10^{-5}$	3
	GT	$5,21 \times 10^{-5} \pm 3,04 \times 10^{-5}$	7
	TT	$7,71 \times 10^{-5}$	1
Exon 26 und Exon 21	CC/GG	$8,83 \times 10^{-5} \pm 4,75 \times 10^{-5}$	3
	CT/GT	$5,14 \times 10^{-5} \pm 3,64 \times 10^{-5}$	5
	TT/TT	$7,71 \times 10^{-5}$	1

5.1.3.3 Quantifizierung von P-Glykoprotein in Kolongewebe

5.1.3.3.1 Methodenoptimierung

Die Detektion von P-Glykoprotein in Kolongewebe erwies sich als schwierig, da das Gewebe nicht unmittelbar nach der Entnahme eingefroren werden konnte. Aufgrund der großen Zahl an Proteasen im Kolongewebe wurde P-Glykoprotein stark degradiert. Um trotz der Degradation ein möglichst optimales Signal für P-Glykoprotein zu erhalten, wurden 3 Aufarbeitungsmethoden getestet. In Abbildung 21 ist das Ergebnis gezeigt; die Aufarbeitung I (Membranpellet) in Teil B dieser Abbildung dargestellt, ergab das beste Signal für P-Glykoprotein.

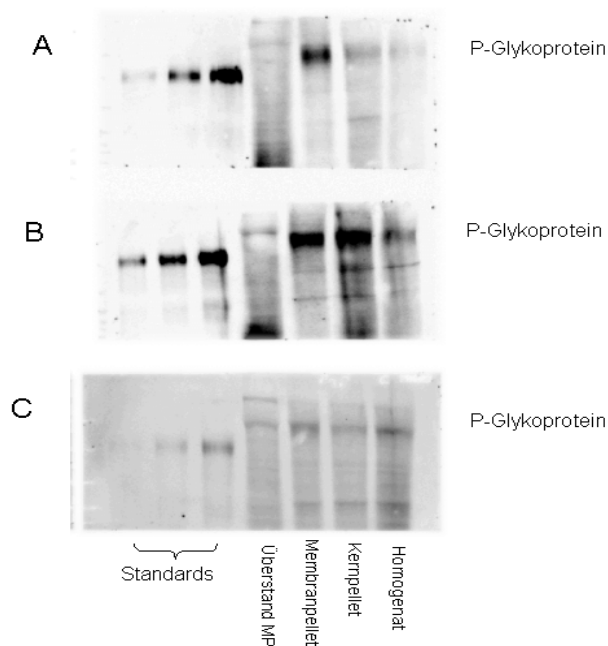


Abbildung 21: Detektion von P-Glykoprotein in Kolongewebe mittels Western Blot Technik nach drei unterschiedlichen Gewebeaufarbeitungen. Das Ergebnis von Aufarbeitung I ist in Teil B zu sehen. Aufarbeitung II ist in Teil C dargestellt und Aufarbeitung III in Teil A

5.1.3.3.2 Messung der Proben

Aufgrund der Proteindegradation konnte P-Glykoprotein nur in 7 Proben detektiert werden. In Tabelle 29 sind die Ergebnisse nach *MDR1*-Genotyp geordnet aufgelistet. Die geringe Probenzahl erlaubt keinen statistischen Vergleich der P-Glykoproteinexpression in den unterschiedlichen *MDR1*-Genotypgruppen.

Tabelle 29: P-Glykoproteinexpression in Kolongewebe (in μg relativ zu einer Standardprobe) in Abhängigkeit vom *MDR1*-Genotyps.

Genotyp		P-Glykoprotein [μg] Mittelwert \pm STABW	Anzahl
Exon 26 (Position 3435)	CC	5,4	1
	CT	$5,8 \pm 1,9$	4
	TT	$5,0 \pm 0,6$	2
Exon 21 (Position 2677)	GG	5,4	1
	GT	$5,5 \pm 1,5$	6
	TT	0	0
Exon 26 und Exon 21	CC/GG	5,4	1
	CT/GT	$5,8 \pm 1,9$	4
	TT/TT	0	0

5.1.3.4 Immunhistochemischer Nachweis von P-Glykoprotein in Kolongewebe

P-Glykoprotein konnte mittels immunhistochemischer Färbung an der apikalen Membran der Enterozyten in Kolongewebe nachgewiesen werden (siehe Abbildung 22).

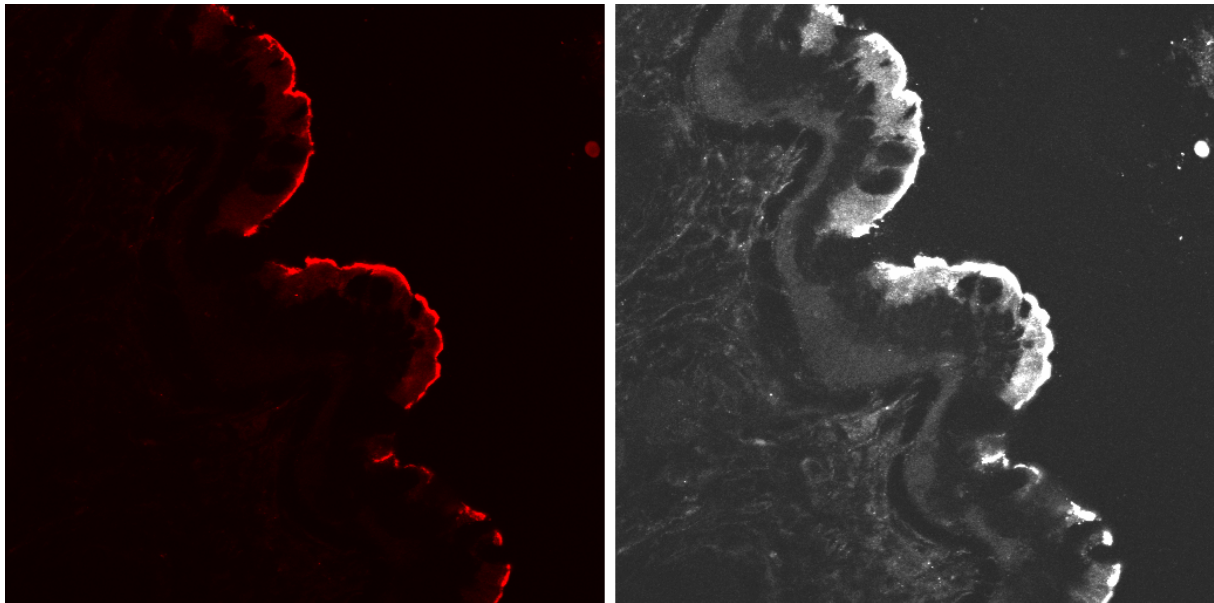


Abbildung 22: P-Glykoproteinexpression in humanem Kolongewebe. Links ist die P-Glykoprotein Färbung in der apikalen Membran der Enterozyten zu erkennen. Rechts ist eine überbelichtete Aufnahme des Gewebes zur Darstellung der Gewebestruktur gezeigt.

5.2 Multidrug Resistance Protein 3 (MRP3)

5.2.1 Regulation der MRP3-Expression

Untersucht wurde die Regulation der MRP3-Expression in Enterozyten und Hepatozyten in humanem Gewebe und/oder durch in vitro Zellkulturmodelle. Getestet wurde der Einfluss von Rifampicin, Cortisol, Omeprazol, β -Naphthoflavon und verschiedenen Gallensäuren auf die MRP3-Expression (Alle angegebenen MRP3 Proteinmengen wurden relativ zur Menge an Gesamtprotein [μ g] einer Standardprobe ermittelt).

5.2.1.1 Der Einfluss von Rifampicin auf die *MRP3* mRNA Expression

5.2.1.1.1 *MRP3* mRNA Expression in humanem Duodenum

8 Probanden erhielten 600 mg Rifampicin pro Tag während eines Zeitraumes von 10 Tagen. Vor und nach Rifampicingabe wurden Duodenalbiopsien entnommen und die *MRP3* mRNA Mengen analysiert. *MRP3* mRNA konnte in allen Proben detektiert werden, jedoch gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen der *MRP3* mRNA Menge in den Duodenalbiopsien vor Rifampicingabe verglichen mit der *MRP3* mRNA Menge nach Rifampicingabe. Die *MRP3* mRNA Menge (normalisiert auf β -Actin mRNA) vor Rifampicingabe betrug $6,86 \times 10^{-5} \pm 1,97 \times 10^{-5}$ ($n = 8$) und während Rifampicingabe $7,96 \times 10^{-5} \pm 2,27 \times 10^{-5}$ ($n = 8$).

5.2.1.1.2 *MRP3* mRNA Expression in CaCo-2 Zellen

Zur Bestätigung des Ergebnisses aus Abschnitt 5.2.1.1.1 wurde die Studie in einem in vitro Zellkulturmodell nachgestellt. CaCo-2 Zellen wurden mit Rifampicin inkubiert und die *MRP3* mRNA Mengen von Zellen ohne Rifampicinbehandlung mit den *MRP3* mRNA Mengen in Zellen nach Rifampicinbehandlung (10 μ M und 20 μ M) verglichen. Die *MRP3* mRNA Menge (normalisiert auf *Villin* mRNA) ohne Rifampicinbehandlung betrug $6,51 \times 10^{-4} \pm 6,62 \times 10^{-7}$ ($n = 2$), mit 10 μ M Rifampicinbehandlung $8,30 \times 10^{-4} \pm 9,58 \times 10^{-5}$ ($n = 2$) und mit 20 μ M Rifampicinbehandlung $7,69 \times 10^{-4} \pm 5,29 \times 10^{-5}$ ($n = 2$). Auch im in vitro Versuch ergab sich kein signifikanter Unterschied der *MRP3* mRNA Menge in Rifampicin behandelten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen, obwohl eine leichte Zunahme der *MRP3* mRNA Menge durch Rifampicin feststellbar war.

5.2.1.1.3 *MRP3* mRNA Expression in HepG2 Zellen

Auch in HepG2-Zellen zeigte Rifampicin nur einen geringen Einfluss auf die *MRP3* mRNA Expression. Die Inkubation von HepG2 Zellen mit Rifampicin ergab für die Behandlung mit 10 μ M Rifampicin $3,98 \times 10^{-4} \pm 4,78 \times 10^{-5}$ ($n = 2$) und mit 20 μ M Rifampicin $3,50 \times 10^{-4} \pm 2,66 \times 10^{-5}$ ($n = 2$) im Vergleich zu $2,57 \times 10^{-4} \pm 9,23 \times 10^{-5}$ ($n = 4$) für unbehandelte Zellen. Alle *MRP3* mRNA Mengen wurden auf β -Actin mRNA normalisiert.

5.2.1.2 Der Einfluss von Cortisol auf die MRP3-Expression in HepG2 Zellen

5.2.1.2.1 MRP3 mRNA Expression in HepG2 Zellen

Cortisol zeigte keinen Effekt auf die *MRP3* mRNA Expression in HepG2 Zellen. Die *MRP3* mRNA Menge (normalisiert auf β -Actin mRNA) in unbehandelten Zellen betrug $9,54 \times 10^{-6} \pm 6,01 \times 10^{-7}$ (n = 2) im Vergleich zu Zellen mit 10 μ M Cortisolbehandlung $9,94 \times 10^{-6} \pm 1,47 \times 10^{-6}$ (n = 2) und 100 μ M Cortisolbehandlung $9,18 \times 10^{-6} \pm 1,43 \times 10^{-6}$ (n = 2).

5.2.1.2.2 MRP3 Proteinexpression in HepG2 Zellen

Das Ergebnis aus der *MRP3* mRNA Analyse wurde durch die *MRP3* Protein Analyse bestätigt. In Abbildung 23 ist gezeigt, dass Cortisol keinen Einfluss auf die *MRP3* Proteinexpression in HepG2 Zellen zeigt. Der Western Blot zeigt die für *MRP3* typischen Signale bei 170 und 190 kDa in den Leberstandardproben. Vermutlich aufgrund unterschiedlicher Glykosilierung ist das *MRP3* Signal in den Zellversuchsansätzen zu 170 und 220 kDa verschoben. Es zeigte die gleiche Intensität in allen Ansätzen und somit keine unterschiedliche Expression von *MRP3*.

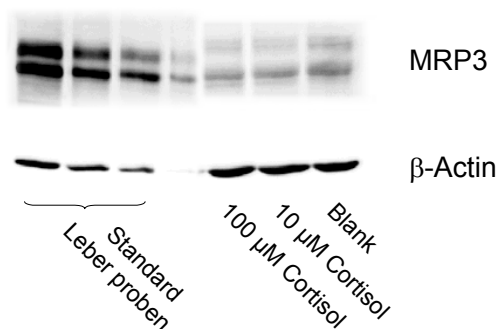


Abbildung 23: Western Blot Analyse der *MRP3* Proteinexpression in HepG2 Zellen nach Inkubation mit Cortisol.

5.2.1.3 Der Einfluss von Omeprazol auf die MRP3-Expression in Hepatozyten

5.2.1.3.1 MRP3-Expression in humaner Leber

Tumorfrees Lebergewebe von 62 Patienten aus den Resektionsrändern eines chirurgisch entfernten Lebertumors oder aus einer anders begründeten Leber-Resektion wurde analysiert. Das mittlere Alter der Patienten betrug $56,1 \pm 16,5$ Jahre in einem Bereich von 4 – 85 Jahren. 50 % der Patienten waren weiblich; es befanden sich 11 Raucher und 49 Nichtraucher unter den Patienten (von 2 Patienten lagen keine Daten vor). Aufgrund einer genauen Dokumentation war die Medikation der Patienten bekannt. Es konnte somit die MRP3-Expression in Leberproben von Patienten nach Medikamentengabe (z. B. Omeprazolgabe) mit der MRP3-Expression in Leberproben von Patienten ohne Medikamentengabe verglichen werden.

Zunächst wurden die Stichproben der Lebern mit besonders hoher und niedriger MRP3-Expression histologisch auf Anzeichen von Cholestase durch einen Pathologen untersucht. Es ist bekannt, dass Cholestase zu einer Induktion der MRP3-Expression in Leber führt. Keine der Leberproben wies jedoch Anzeichen für lokale Cholestase auf; außerdem wurde gezeigt, dass es sich um kein zirrhotisches und kein Tumor-Gewebe handelte.

MRP3 mRNA Expression

Die Analyse von *MRP3* mRNA in 62 humanen Lebern durch real time TaqMan RT-PCR ergab eine *MRP3* mRNA Verteilung wie in Abbildung 24 dargestellt. Die Expression von *MRP3* mRNA in den humanen Lebern war sehr variabel und variierte um den Faktor 86. *MRP3* mRNA wurde durch Alter, Geschlecht, Rauchen oder Medikation mit Omeprazol nicht beeinflusst.

MRP3 Proteinexpression

In Abbildung 25 ist ein repräsentativer Western Blot für die Analyse von MRP3 in humaner Leber gezeigt. Die MRP3-Expression in den 62 untersuchten humanen Lebern war sehr variabel und ist in Abbildung 26 gezeigt. Trotz der Variabilität ist die β -Actin Menge in den Proben konstant (siehe Abbildung 25). Obwohl *MRP3* mRNA messbar war, konnte in 2 Lebern kein MRP3 Protein nachgewiesen werden. Die MRP3-Expression im Rest der

Population variierte 193-fach. Es konnte keine Korrelation zwischen *MRP3* mRNA Expression und *MRP3* Proteinexpression festgestellt werden.

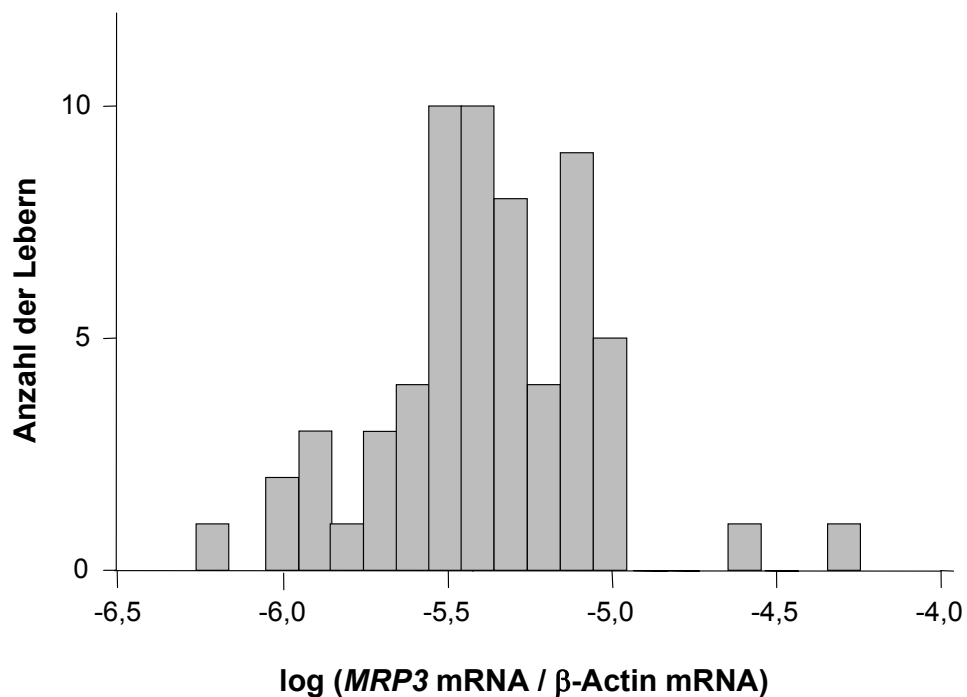


Abbildung 24: Verteilung der *MRP3* mRNA Mengen in 62 humanen Lebern. Die *MRP3* mRNA Menge wurde auf β -Actin mRNA normalisiert.

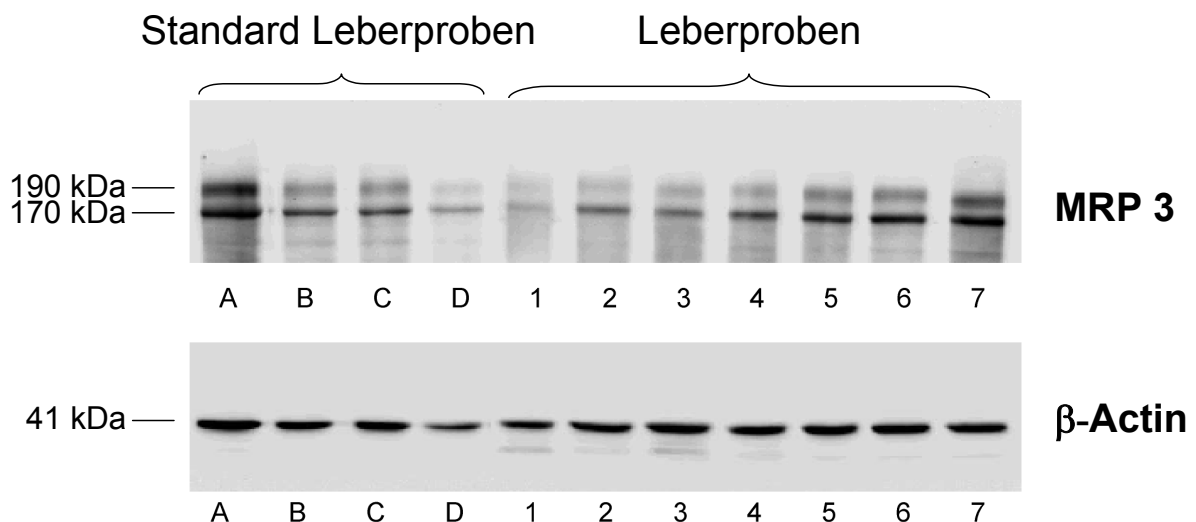


Abbildung 25: *MRP3* Proteinexpression in humanem Lebergewebe. Ein repräsentativer Western Blot zeigt die variable *MRP3*-Expression in 7 Kernpellet-Fractionen von humanem Lebergewebe bei konstanter β -Actin Expression. 50 μ g Protein wurden analysiert und relativ zu einer Verdünnungsreihe von Standardleberproben quantifiziert.

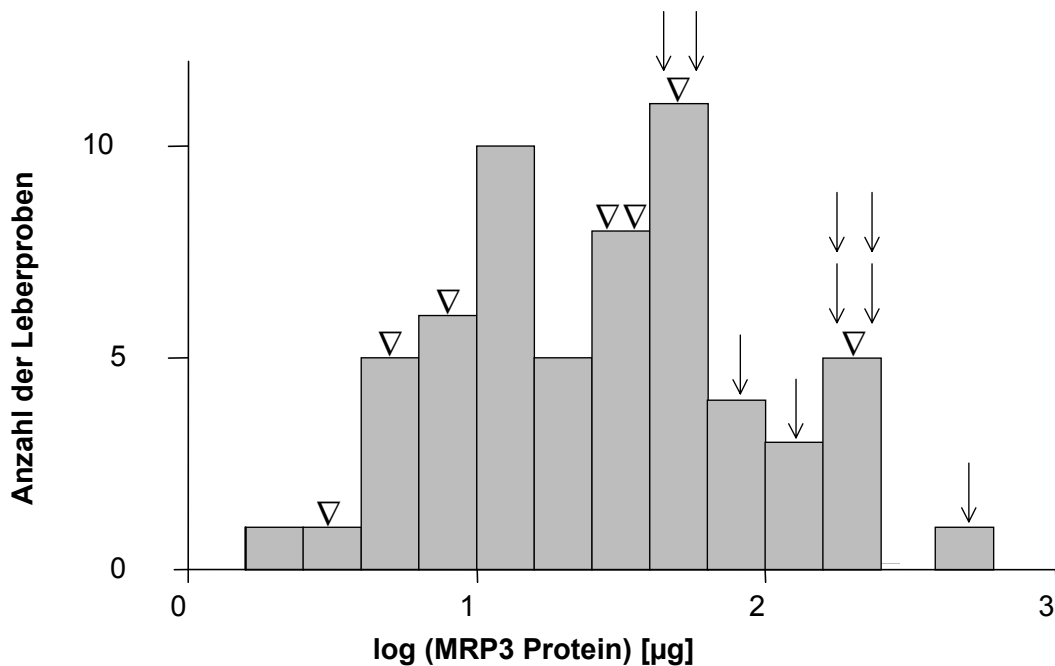


Abbildung 26: MRP3 Proteinexpression in 60 humanen Lebern. Jeder Pfeil zeigt die Leberprobe eines Patienten mit Omeprazolbehandlung (n = 9). Zwei zusätzliche Patienten sind in dieser Abbildung nicht gezeigt, da sie keine detektierbare MRP3 Proteinmenge in den Leberproben hatten. Einer dieser Patienten wurde ebenfalls mit Omeprazol behandelt. Die Dreiecke symbolisieren Leberproben von Rauchern (ohne Omeprazolbehandlung; n = 7).

Die Analyse des Einflusses von Omeprazol auf die MRP3 Proteinexpression ergab eine signifikant höhere MRP3 Proteinexpression in Patienten mit Omeprazolbehandlung im Vergleich zu unbehandelten Patienten. Die mittlere MRP3 Proteinmenge in Leberproben von Patienten mit Omeprazolbehandlung betrug $152,1 \pm 117,0 \mu\text{g}$ (n = 10) im Vergleich zu $31,8 \pm 35,1 \mu\text{g}$ (n = 52) in Leberproben von Patienten ohne Omeprazolbehandlung ($P < 0,0001$).

Zudem konnte ein Trend zu einer höheren MRP3 Proteinexpression bei Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern festgestellt werden. Die mittlere MRP3 Proteinmenge in Leberproben von Rauchern ohne Omeprazolbehandlung betrug $43,1 \pm 61,5 \mu\text{g}$ (n = 7) im Vergleich zu $30,1 \pm 30,4 \mu\text{g}$ (n = 43) in Leberproben von Nichtrauchern ohne Omeprazolbehandlung. In der Patientendokumentation waren für zwei Patienten keine Angaben bezüglich Rauchen vorhanden.

Faktoren wie Geschlecht und Alter hatten keinen Einfluss auf die MRP3 Proteinexpression in Lebergewebe.

5.2.1.3.2 MRP3-Expression in HepG2 Zellen

Um die Induktion von MRP3 Protein durch Omeprazol zu bestätigen, wurden in vitro Inkubationen von HepG2 Zellen mit Omeprazol durchgeführt. Im Einklang mit den Daten aus den Leberproben konnte an einem in vitro Modell eine Induktion von MRP3 mRNA und MRP3 Protein durch Omeprazol festgestellt werden.

MRP3 mRNA Mengen

Es konnte eine signifikant höhere ($P < 0,01$) MRP3 mRNA Menge in HepG2 Zellen nach Inkubation mit 100 μM Omeprazol im Vergleich zu unbehandelten Zellen festgestellt werden. Die MRP3 mRNA Mengen betragen $1,14 \pm 0,61$ bzw. $2,46 \pm 0,54$ für die Zellen mit 10 μM bzw. 100 μM Omeprazolbehandlung im Vergleich zu den unbehandelten Zellen ($1,04 \pm 0,36$; siehe Abbildung 27). Alle Werte für MRP3 mRNA wurden auf β -Actin mRNA normalisiert.

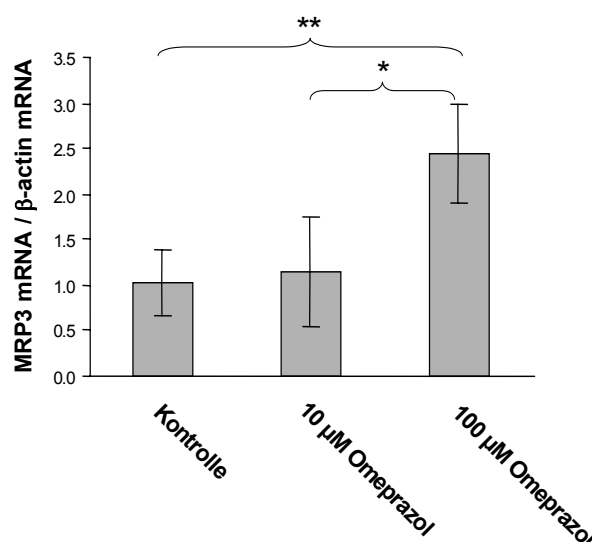


Abbildung 27: Induktion von MRP3 mRNA durch Omeprazol in In vitro-Experimenten. HepG2 Zellen wurden mit Lösungsmittel (0,1 % DMSO), 10 μM und 100 μM Omeprazol behandelt. MRP3 mRNA wurde mittels real time TaqMan RT-PCR analysiert. MRP3 mRNA wurde auf β -Actin mRNA normalisiert (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$).

MRP3 Protein

Die MRP3 Proteinmenge in HepG2 Zellen nach 100 μM Omeprazolbehandlung war ebenfalls signifikant höher als die MRP3 Proteinmenge in unbehandelten Zellen. Die mittlere MRP3 Proteinexpression in HepG2 Zellen nach 10 μM bzw. 100 μM Omeprazolbehandlung betrug $6,3 \pm 2,3$ bzw. $8,2 \pm 2,7$ μg im Vergleich zu unbehandelten Zellen ($4,5 \pm 0,7$ μg). Die Proteinmengen beziehen sich auch hier auf die Menge Gesamtprotein [μg] einer Standardleberprobe. In Abbildung 28 sind die Ergebnisse graphisch dargestellt.

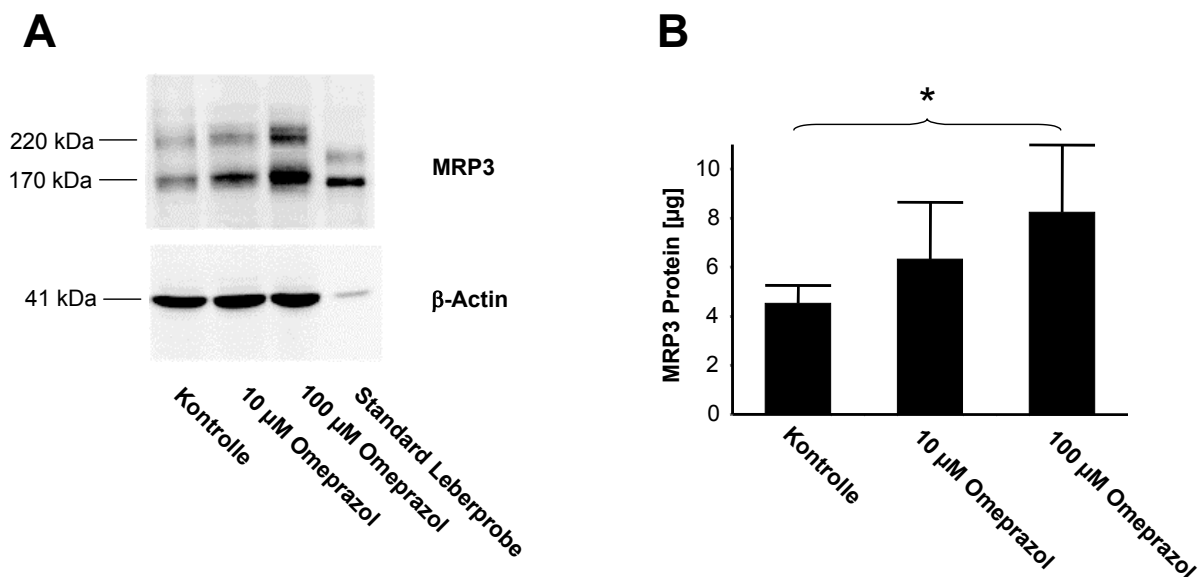


Abbildung 28: Induktion von MRP3 Protein durch Omeprazol in In vitro-Experimenten. Nach 48 h Inkubation von HepG2 Zellen mit Lösungsmittel (0,1 % DMSO), 10 μM oder 100 μM Omeprazol wurden die Zellen homogenisiert und mittels Western Blot analysiert. 50 μg Homogenat wurden analysiert und relativ zu einer Verdünnungsreihe von Standardleberproben quantifiziert. A: MRP3 Western Blot. B: Mittlere MRP3 Proteinexpression von Doppelwerten aus 3 unabhängigen Experimenten (* $P < 0,05$).

5.2.1.3.3 Untersuchungen zum Mechanismus der MRP3 Induktion durch Omeprazol

Es stellte sich nun die Frage, durch welchen Mechanismus Omeprazol eine Induktion der MRP3-Expression bewirkt. Aus der Literatur geht hervor, dass Omeprazol Cytochrom P450 1A über die Aktivierung des Ah-Rezeptors induziert. Auf Grund dessen wurde zunächst die Promotorregion von *MRP3* auf potentielle Bindungsstellen für das Heterodimer aus Ah-Rezeptor (AHR) und ARNT-Protein untersucht.

Potentielle Bindungsstellen des Ah-Rezeptors am MRP3 Promotor

Die Promotorsequenz von *MRP3* (aus AC004590: nuc. 90961-101612) wurde mittels TRANSFAC-Analyse darauf hin untersucht, ob Bindungsstellen für das Heterodimer aus Ah-Rezeptor (AHR) und ARNT-Protein existieren. Das Xenobiotic responsive element für den AHR/ARNT Komplex wurde in einer Arbeit von Swanson (Swanson et al., 1995) mit der Sequenz T(C/T)GCGTG beschrieben.

Die Analyse ergab 9 potentielle Bindungsstellen des AHR/ARNT Komplexes am *MRP3* Promotor mit einem bzw. zwei von der Sequenz abweichenden Nukleotiden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 30 zusammengefasst.

Tabelle 30: Potentielle Bindungsstellen des AHR/ARNT (Matrix: T(C/T)GCGTG) Komplexes am *MRP3* Promotor (AC004590).

#	Position	Übereinstimmung	Sequenz
1	-9715	0,863	GATTACAGGCGTGAGC
2	-9635	0,865	AGGCATGAGCGTGGAC
3	-9265	0,891	GCGGGGAGGCGTGAAG
4	-8585	0,859	GTGCTACAGCGTGGAG
5	-7304	0,865	ATATGAGTGCCTGTGT
6	-6867	0,917	GGCTGGAATGCCTGACC
7	-6504	0,926	GGGGAGTGGCGTGGCC
8	-2314	0,853	CTCTGAGGCGCTGGTG
9	-1630	0,905	TTGTTACGCGCTGCCT

Induktion von MRP3 durch β -Naphthoflavin

Als nächster Schritt wurde der Einfluss von β -Naphthoflavin, einem Liganden des Ah-Rezeptors, auf die MRP3-Expression untersucht. HepG2 Zellen wurden mit 5 μ M und 10 μ M β -Naphthoflavin inkubiert und anschließend MRP3 mRNA analysiert. Als Kontrolle wurde die Induktion von Cytochrom P450 1A durch β -Naphthoflavin gemessen. Dies erfolgte durch einen Enzym-Aktivitätstest mit dem Cytochrom P450 1A Substrat Ethoxyresorufin. Nach Inkubation der HepG2 Zellen mit β -Naphthoflavin wurden diese mit Ethoxyresorufin inkubiert und die Bildung des fluoreszierenden Metaboliten Resorufin gemessen.

MRP3 mRNA Mengen in HepG2 Zellen nach Inkubation mit β -Naphthoflavon

Zellen, welche mit 5 μ M bzw. 10 μ M β -Naphthoflavon behandelt wurden, zeigten im Mittel eine 3-fach höhere MRP3 mRNA Menge als unbehandelte Zellen. Die MRP3 mRNA Menge (normalisiert auf β -Actin mRNA) in den Kontrollzellen betrug 1.78 ± 0.86 im Vergleich zu Zellen nach 5 μ M bzw. 10 μ M β -Naphthoflavon-Behandlung (5.47 ± 0.94 bzw. 5.81 ± 0.29 ; siehe Abbildung 29 A).

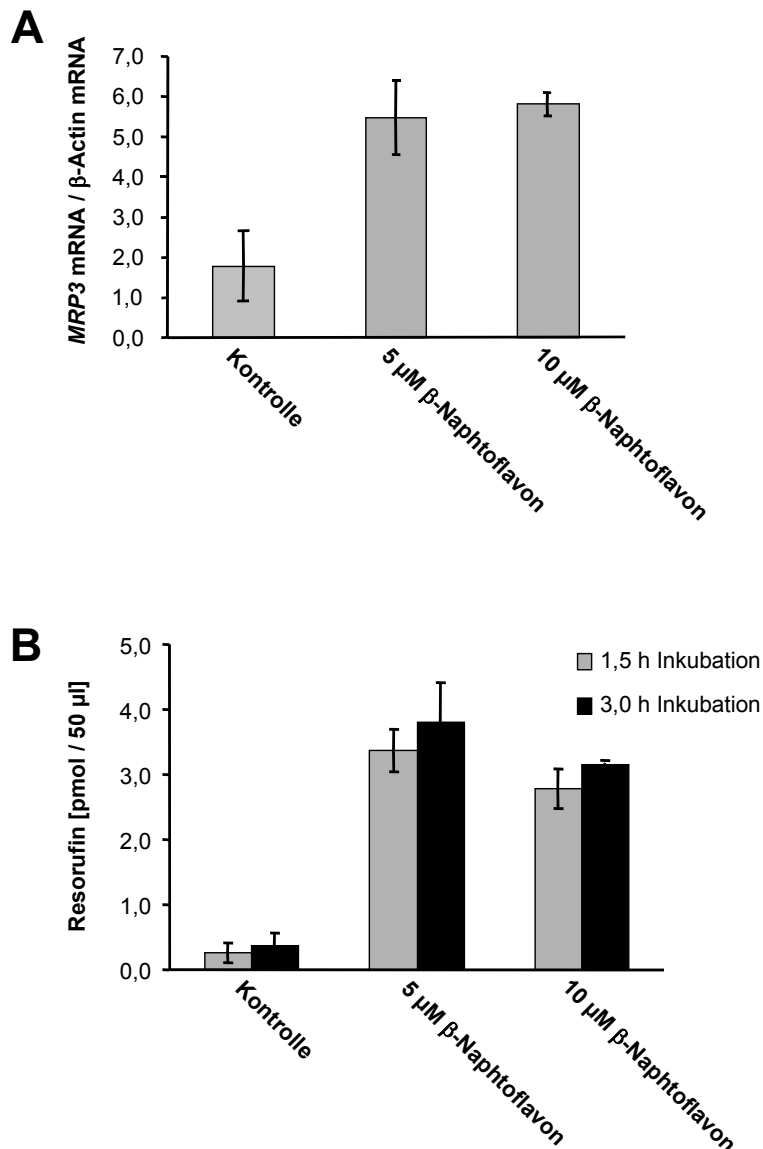


Abbildung 29: Induktion der MRP3 mRNA und Cytochrom P450 1A Aktivität in HepG2 Zellen durch β -Naphthoflavon. Die Zellen wurden mit Lösungsmittel (1 % DMSO), 5 μ M oder 10 μ M β -Naphthoflavon für 48 h inkubiert und anschließend MRP3 mRNA isoliert und analysiert. MRP3 mRNA wurde auf β -Actin mRNA normalisiert (**A**). Die Cytochrom P450 1A Aktivität in diesen Zellen wurde mit dem Cytochrom P450 1A Substrat Ethoxyresorufin charakterisiert (**B**). Der Metabolit Resorufin wurde mittels HPLC Fluoreszenz Detektor nach 1,5 h und 3 h Inkubation der HepG2 Zellen mit 25 μ M Ethoxyresorufin analysiert.

Cytochrom P450 1A Aktivitätsmessung

HepG2 Zellen, welche mit 5 μM bzw. 10 μM β -Naphtoflavon behandelt wurden, zeigten eine 10,5-fach bzw. 8,5-fach höhere Resorufinbildung im Vergleich zu den Kontrollzellen (siehe Abbildung 29 B).

5.2.1.4 Einfluss von Gallensäuren auf die MRP3-Expression in CaCo-2 Zellen

In der Literatur wurde MRP3 bereits als Gallensäuretransporter in Enterozyten beschrieben und damit die Beteiligung von MRP3 am enterohepatischen Kreislauf diskutiert. In dieser Arbeit wurde nun eine mögliche Regulation von MRP3 durch Gallensäuren untersucht. Dazu wurden CaCo-2 Zellen als in vitro Modell für Enterozyten verwendet und mit verschiedenen Gallensäuren inkubiert.

Abbildung 30 zeigt die Ergebnisse der Inkubation von CaCo-2 Zellen mit verschiedenen Gallensäuren in einer Konzentration von 500 μM . Die Inkubation mit CDA, GCA, GDCA, GCDCA, LA und TCA zeigte eine leichte Induktion der *MRP3* mRNA Expression. Zur Bestätigung dieses Ergebnisses wurde der Inkubationsversuch mit einer Konzentration von 100 μM dieser Gallensäuren wiederholt und die *MRP3* mRNA und MRP3 Proteinmengen bestimmt.

5.2.1.4.1 MRP3 mRNA Mengen

CaCo-2 Zellen, welche mit 100 μM LA und 100 μM CDA inkubiert wurden, zeigten eine signifikant höhere *MRP3* mRNA Menge als unbehandelte Zellen ($1,16 \times 10^{-1} \pm 1,39 \times 10^{-2}$ und $1,20 \times 10^{-1} \pm 1,66 \times 10^{-2}$ versus $7,70 \times 10^{-2} \pm 2,52 \times 10^{-3}$). Die Inkubation von GCA, GDCA und GCDCA ergab keine signifikante Induktion der *MRP3* mRNA Expression (siehe Abbildung 31).

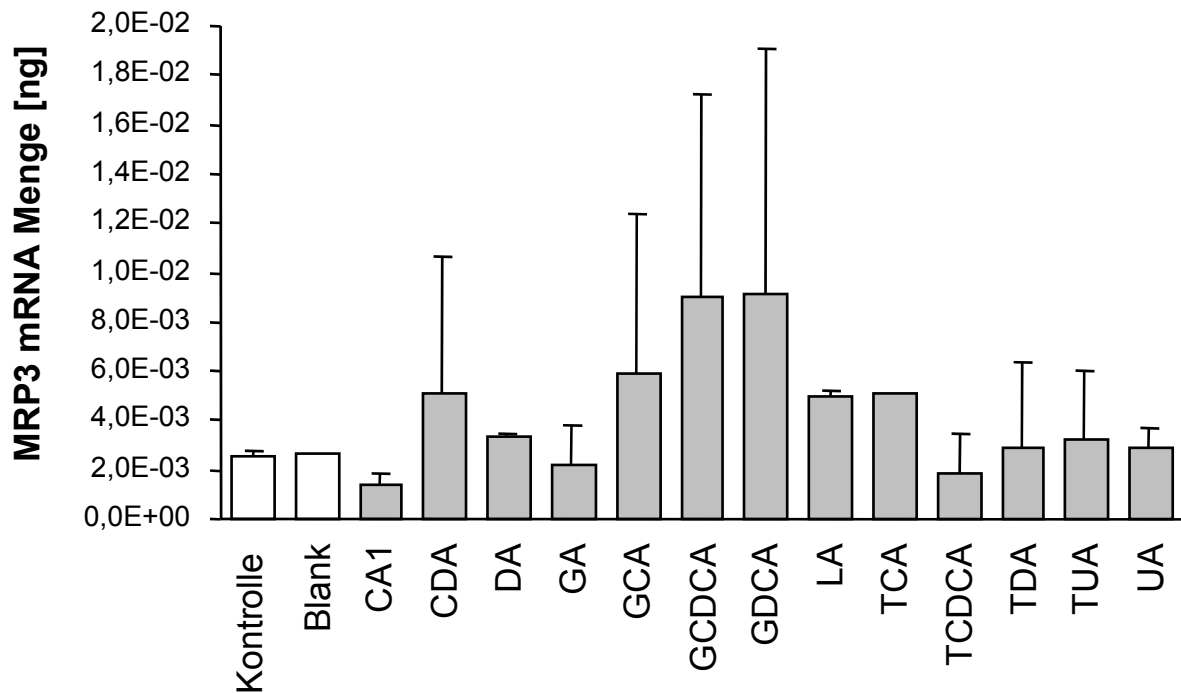


Abbildung 30: *MRP3* mRNA Mengen in CaCo-2 Zellen nach Inkubation mit Gallensäuren in einer Konzentration von 500 µM. Die *MRP3* mRNA Mengen sind in [ng] relativ zu *MRP3*-Standard-Plasmid-DNA.

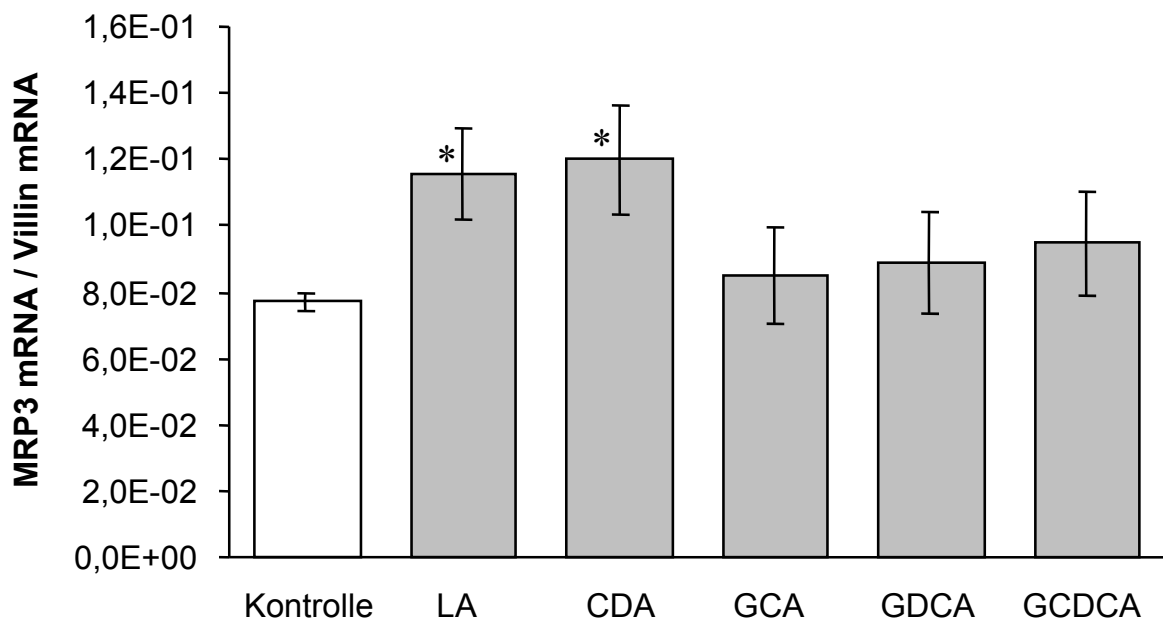


Abbildung 31: *MRP3* mRNA Mengen normalisiert auf Villin mRNA in CaCo-2 Zellen nach einer Inkubation mit 100 µM Gallensäure. * $P < 0,05$

5.2.1.4.2 MRP3 Protein

Die Analyse von MRP3 Protein nach der Inkubation von CaCo-2 Zellen mit den verschiedenen Gallensäuren zeigte keine Induktion von MRP3 Protein durch diese Gallensäuren (siehe Abbildung 32).

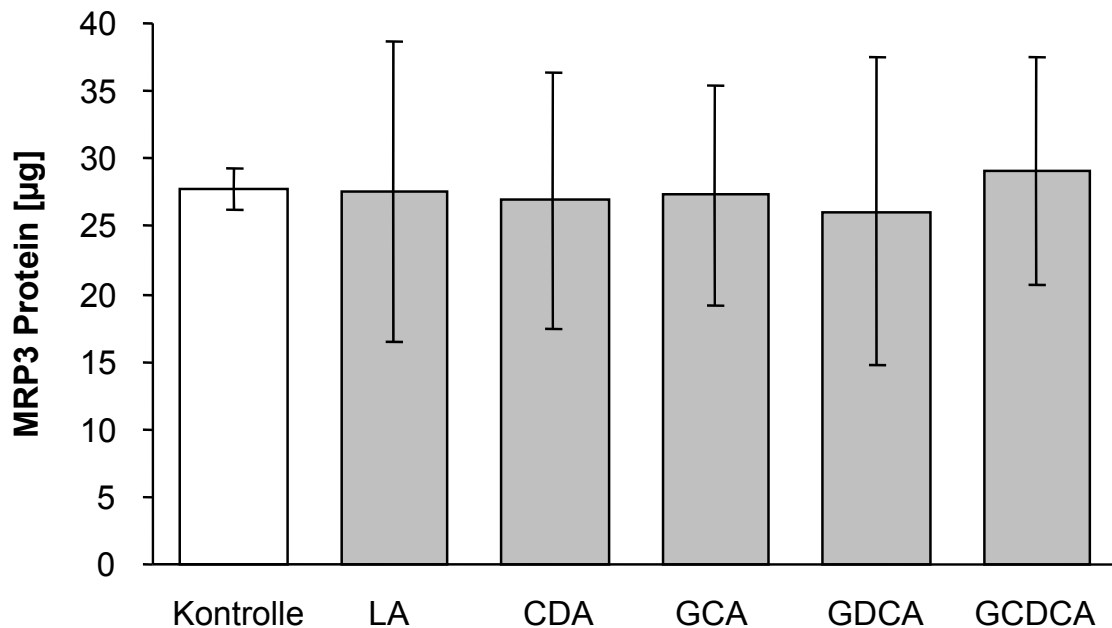


Abbildung 32: MRP3 Protein in [µg] relativ zur Gesamtproteinmenge von Standardproben in CaCo-2 Zellen nach einer Inkubation mit 100 µM Gallensäure.

5.2.2 MRP3-Expression in gesundem Kolongewebe und Kolon-Tumorgewebe

Der Unterschied der MRP3-Expression in gesundem Kolongewebe und Kolon-Tumorgewebe von 9 dieser Patienten wurde auf mRNA- und Proteinebene untersucht.

5.2.2.1 Patientendokumentation

12 Patienten, bei welchen eine chirurgische Entfernung von Kolonabschnitten vorgenommen wurde, wurden in die Studie aufgenommen. Teile des Restgewebes der Operation

(gesundes Kolon-Gewebe und Kolon-Tumorgewebe) wurden gesammelt. Nach Information über Ziele der Studie wurde von jedem Patienten eine schriftliche Einverständniserklärung unterschrieben. Diese Studie wurde durch die zuständige Ethikkommission zustimmend bewertet. In die Studie wurden 7 weibliche und 5 männliche Patienten mit einem mittleren Alter von $71,2 \pm 6,1$ Jahren eingeschlossen.

5.2.2.2 MRP3 mRNA Mengen in Kolongewebe

Die real time TaqMan RT-PCR Analyse von *MRP3* mRNA zeigte eine signifikant geringere *MRP3* mRNA Menge in Kolon-Tumorgewebe im Vergleich zu gesundem Kolon-Gewebe ($P < 0,05$). Die Ergebnisse sind in Tabelle 31 zusammengestellt.

Tabelle 31: MRP3 mRNA Mengen normalisiert auf Villin mRNA in gesundem Kolon-Gewebe und Kolon-Tumorgewebe.

	<i>MRP3</i> mRNA / <i>Villin</i> mRNA	
	gesundes Kolon-Gewebe	Kolon-Tumorgewebe
Mittelwert	$2,12 \times 10^{-3}$	$8,70 \times 10^{-4}$
STABW	$1,33 \times 10^{-3}$	$6,35 \times 10^{-4}$
Anzahl	9	9

5.2.2.3 MRP3 Proteinexpression in Kolongewebe

Die MRP3 Proteinmengen in gesundem Kolon-Gewebe und Kolon-Tumorgewebe von 6 Patienten konnten mittels Western Blot Analyse bestimmt werden. Es wurde kein Unterschied in der Expression von MRP3 Protein in den unterschiedlichen Geweben festgestellt. In Tabelle 32 sind die mittleren MRP3 Proteinmengen normalisiert auf die Villin Proteinmengen in den Geweben aufgelistet.

Tabelle 32: MRP3 Proteinmengen normalisiert auf Villin Protein in gesundem Kolon-Gewebe und Kolon-Tumorgewebe.

	MRP3 Protein [μg] / Villin Proteinmenge [μg]	
	gesundes Kolon-Gewebe	Kolon-Tumorgewebe
Mittelwert	2,09	2,35
STABW	1,20	1,95
Anzahl	6	6

5.2.2.4 Immunhistochemischer Nachweis von MRP3 in Kolongewebe

MRP3 Protein ist in gesundem Kolon-Gewebe an der basolateralen Membran der Enterozyten lokalisiert. Abbildung 33 zeigt eine Krypte des Kolonepithels und die etwas diffus erscheinende Lokalisation von MRP3 an der basolateralen Membran der Enterozyten. Im Kolon-Tumorgewebe konnte immunhistochemisch kein MRP3 Protein nachgewiesen werden.

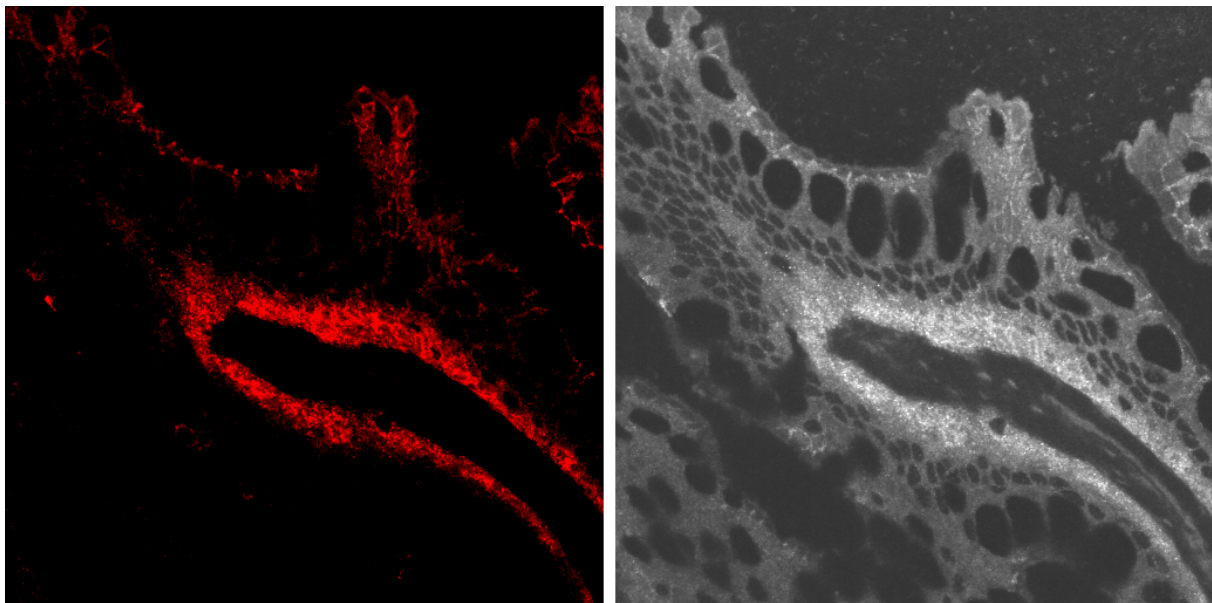


Abbildung 33: Lokalisation von MRP3 in gesundem Kolon-Gewebe. Das linke Bild zeigt eine Krypte mit einer Färbung von MRP3 an der basolateralen Membran der Enterozyten. Rechts ist eine überbelichtete Aufnahme des Gewebes zur Darstellung der Gewebestruktur gezeigt.

6 Diskussion

6.1 P-Glykoprotein

6.1.1 P-Glykoproteinexpression und –funktion in peripheren, mononukleären Zellen in Abhängigkeit vom *MDR1*-Genotyp

Mit Rhodaminefflux Experimenten konnten in dieser Arbeit genetisch bedingte Unterschiede in der P-Glykoproteinfunktion von peripheren Blutzellen nachgewiesen werden. Homozygote Träger des Polymorphismus C3435T in Exon 26 des *MDR1*-Gens (TT) zeigten signifikant niedrigeren Rhodamin123 Efflux aus CD56⁺ NK-Zellen als Individuen mit dem CC-Genotyp. Diese Ergebnisse sind im Einklang mit einer Studie von Hoffmeyer (Hoffmeyer et al., 2000), in welcher niedrigere Mengen an P-Glykoprotein im Duodenum von Individuen mit dem Genotyp TT im Vergleich zu Individuen mit dem Genotyp CC nachgewiesen wurden. Die damit verbundene höhere P-Glykoproteinfunktion in Individuen mit Genotyp CC führte zu einer niedrigeren Plasmakonzentration des P-Glykoproteinsubstrates Digoxin in diesen Probanden, verglichen mit homozygoten Trägern des 3435 T Allels (TT; Hoffmeyer et al., 2000). Diese Arbeit zeigt nun, dass genetisch bedingte Unterschiede in der P-Glykoproteinfunktion in leicht zugänglichen peripheren Blutzellen nachgewiesen werden können.

Die *MDR1* mRNA Expression in den Leukozyten der Probanden mit unterschiedlichem *MDR1*-Genotyp war nicht signifikant unterschiedlich. Es konnte jedoch ein Trend zu einer niedrigeren *MDR1* mRNA Expression bei Trägern des Polymorphismus 3435 TT im Vergleich zu Individuen mit dem Genotyp CC festgestellt werden. Ein ähnliches Ergebnis beschreibt Fellay et al. (Fellay et al., 2002). In dieser Arbeit wurde eine geringere *MDR1* mRNA Menge in peripheren mononukleären Zellen von Individuen mit dem 3435 TT Genotyp im Vergleich zu Individuen mit dem Genotyp CC beschrieben. Außerdem konnte eine Korrelation der *MDR1* mRNA Mengen in den peripheren mononukleären Zellen von Individuen mit unterschiedlichem *MDR1*-Genotyp mit der P-Glykoproteinexpression in diesen Zellen nachgewiesen werden.

6.1.2 P-Glykoproteinexpression in humaner Plazenta in Abhängigkeit vom *MDR1*-Genotyp

In dieser Arbeit konnte die Abhängigkeit der P-Glykoproteinexpression in Plazentagewebe vom *MDR1*-Genotyp gezeigt werden. Die P-Glykoproteinexpression in Plazentagewebe von Müttern mit dem Genotyp TT in Exon 26 an Position 3435 des *MDR1*-Gens war signifikant niedriger als die P-Glykoproteinexpression in Plazentagewebe von Müttern mit dem Genotyp CC. Für Trägerinnen der zwei *MDR1*-Polymorphismen, C3435T in Exon 26 und G2677T in Exon 21, konnten ähnliche Beobachtungen gemacht werden. Mütter mit dem Genotyp TT/TT zeigten eine signifikant niedrigere P-Glykoproteinexpression als CC/GG Trägerinnen. Signifikante Unterschiede der P-Glykoproteinexpression in Plazentagewebe in den einzelnen Genotypgruppen konnten auch festgestellt werden, wenn Mutter und Kind den gleichen Genotyp hatten. Bei einer Betrachtung des kindlichen Genotyps hinsichtlich dieser beiden Polymorphismen war die P-Glykoproteinexpression in Plazentagewebe jedoch nicht mehr signifikant unterschiedlich. Tanabe (Tanabe et al., 2001) beschreibt in seiner Arbeit eine Korrelation der Mutation im Promotor des *MDR1*-Gens (T-129C), des Polymorphismus G2677T in Exon 21 und des Polymorphismus C3435T in Exon 26 mit der P-Glykoproteinexpression in Plazentagewebe. Dabei war nur der Polymorphismus T-129C mit einer signifikant niedrigeren P-Glykoproteinexpression in Plazentagewebe verbunden. Die Mutation im Promotor des *MDR1*-Gens (T-129C) wurde auch in dieser Arbeit untersucht, jedoch trat der Polymorphismus T-129C in keinem Individuum auf. Ein wesentlicher Kritikpunkt an der Arbeit von Tanabe (Tanabe et al., 2001) ist jedoch, dass keine Differenzierung von mütterlichem und kindlichem Genotyp vorgenommen wurde. Die Isolierung der DNA für die *MDR1*-Genotypisierung erfolgte aus Plazentagewebe. Zunächst wurde Gesamt-RNA aus Plazentagewebe isoliert, anschließend in cDNA umgeschrieben und der *MDR1*-Genotyp aus dem Gemisch von mütterlicher und kindlicher cDNA bestimmt. Dadurch könnten sich die in der Arbeit von Tanabe beschriebenen nicht signifikanten Unterschiede der P-Glykoproteinexpression in Plazentagewebe von Individuen mit unterschiedlichem Genotyp in Exon 26 (C3435T) und Exon 21 (G2677T) des *MDR1*-Gens erklären.

Die Assoziation der P-Glykoproteinexpression in Plazentagewebe mit dem mütterlichen *MDR1*-Genotyp wurde in dieser Doktorarbeit erstmals beschrieben; jedoch konnte keine Assoziation der P-Glykoproteinexpression mit dem kindlichen *MDR1*-Genotyp gezeigt werden. Nur bei einer Übereinstimmung des mütterlichen mit dem kindlichen *MDR1*-Genotyp zeigte sich ebenfalls eine Korrelation zur P-Glykoproteinexpression in Plazentagewebe. Mittels immunhistochemischer Untersuchungen von Plazentagewebe konnte gezeigt werden,

dass P-Glykoprotein in den Endothelzellen der Blutgefäße und den Syncytiotrophoblasten exprimiert ist. Sowohl mütterliche als auch kindliche Blutgefäße wiesen eine P-Glykoprotein-färbung auf (siehe Abbildung 34). Somit wird die P-Glykoproteinexpression in Plazentagewebe sowohl vom mütterlichen als auch vom kindlichen Genotyp bestimmt. Es wäre zudem denkbar, dass die vorhandenen Lymphozyten aus mütterlichem Blut in der Plazenta die Analyse der P-Glykoproteinexpression beeinflussen und daher eine Assoziation des mütterlichen *MDR1*-Genotyps mit der P-Glykoproteinexpression in Plazenta messbar ist.

Die *MDR1* mRNA Expression in Plazentagewebe war zwischen den verschiedenen *MDR1*-Genotypen nicht signifikant unterschiedlich. Es konnte jedoch ein Trend zu einer höherer *MDR1* mRNA Expression in Plazentagewebe von Individuen mit dem Genotyp CC im Vergleich zu Trägern des Polymorphismus 3435 TT in Exon 26 des *MDR1*-Gens festgestellt werden.

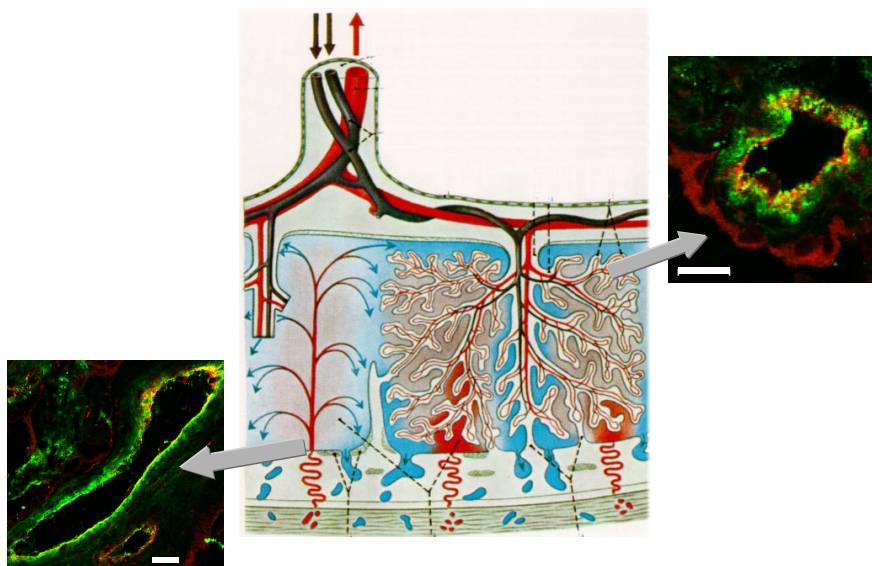


Abbildung 34: Immunhistochemischer Nachweis von P-Glykoprotein in mütterlichem (links) und kindlichem (rechts) Plazentagewebe. Die Endothelzellen der Blutgefäße sind durch ein grünes Signal zu erkennen, P-Glykoprotein ist mit einem roten Fluoreszenzfarbstoff gefärbt. Im mütterlichen Gewebe ist P-Glykoprotein in den Blutgefäßen zu erkennen. Kindliches Gewebe zeigt P-Glykoproteinexpression in den Blutgefäßen und Syncytiotrophoblasten.

6.1.3 Die Auswirkungen einer genetisch bedingten Veränderung der P-Glykoproteinexpression und –funktion auf die Arzneimitteltherapie

P-Glykoprotein transportiert ATP-abhängig eine Vielzahl von Arzneimitteln im Körper. Es ist für die Resorption von Arzneimitteln aus dem Gastrointestinaltrakt, die Arzneimittelverteilung ins Zentralnervensystem, die Elimination von Arzneimitteln über die Galle, die Sekretion von Arzneimitteln in den Urin und den Schutz des Fötus vor Xenobiotikern verantwortlich. Genotyp bedingte Unterschiede in der P-Glykoproteinexpression sind demnach möglicherweise von großer Bedeutung, da sie sich auf die Arzneimittelverfügbarkeit in den einzelnen Individuen auswirken und ein erhöhtes Risiko für Erkrankungen darstellen. Eine Übersicht dazu ist in Tabelle 33 aufgeführt.

Ein Beispiel dafür ist das erhöhte Risiko von Trägern des Polymorphismus 3435 TT in Exon 26 des *MDR1*-Gens an einem Nierenzellkarzinomen zu erkranken (Siegsmund et al., 2002). Individuen mit dem Genotyp TT zeigten eine niedrigere renale P-Glykoproteinexpression im Vergleich zu Individuen mit dem Genotyp CC. Sie waren möglicherweise höheren Konzentrationen an toxischen Substanzen ausgesetzt und hatten dadurch ein erhöhtes Risiko für Zellschäden.

Die P-Glykoproteinexpression spielt auch bei der HIV Therapie eine Rolle, da HIV-Proteaseinhibitoren P-Glykoproteinsubstrate sind. Durch eine genetisch bedingte höhere P-Glykoproteinexpression in der Blut-Hirn-Schranke und der Blut-Testis-Schranke könnte die therapeutische Effizienz von HIV-Proteaseinhibitoren in diesen Kompartimenten vermindert werden und dem Virus eine bessere Überlebenschance bieten. In Tierexperimenten wurde eine verminderte Konzentration an HIV-Proteaseinhibitor in Gehirn und Testis im Vergleich zum Plasma festgestellt (Kim et al., 1998; Polli et al., 1999; Choo et al., 2000). Durch eine pharmakologische Inhibition von P-Glykoprotein konnte eine relative Anreicherung an HIV-Proteaseinhibitoren in diesen Geweben erzielt werden. Eine genetisch bedingte Reduktion der P-Glykoproteinfunktion in CD4⁺ Zellen, dem Hauptzielort für HIV-Proteaseinhibitoren, würde sich ebenfalls auf den Therapieerfolg auswirken. Eine erniedrigte P-Glykoproteinfunktion in Individuen mit dem Genotyp TT in Exon 26 des *MDR1*-Gens könnte möglicherweise zu einem besseren Ergebnis bei der Behandlung mit HIV-Proteaseinhibitoren führen. In einer Arbeit von Lee (Lee et al., 2000) wurde aber auch gezeigt, dass die HIV-Virusproduktion in einer CD4⁺ T-Lymphozyten-Zelllinie deutlich reduziert war, wenn P-Glykoprotein überexprimiert wurde. Das würde bedeuten, dass Zellen mit hoher P-Glykoproteinexpression relativ resistent gegenüber einer HIV-Infektion sind,

jedoch nach Infektion wesentlich schwerer mit HIV-Proteaseinhibitoren zu therapieren sind. In einer Arbeit von Fellay (Fellay et al., 2002) wurde in der Tat erstmals gezeigt, dass Individuen mit dem Genotyp TT in Exon 26 des *MDR1*-Gens durch eine verminderte P-Glykoproteinexpression ein besseres Ansprechen (höhere CD4-Zell-Wiederfindung) bei einer Therapie mit dem HIV-Proteaseinhibitor Nelfinavir aufwiesen.

Zheng et al. (Zheng et al., 2002) zeigte in seiner Arbeit eine Abhängigkeit des Therapieverlaufes bei Herztransplantationspatienten vom *MDR1*-Genotyp. Ein Jahr nach einer Herztransplantation bei Kindern mussten 67 % der Patienten mit dem *MDR1*-Genotyp 3435 CC noch mit Steroiden behandelt werden, jedoch nur 38 % der 3435 CT bzw. TT Träger. Ein ähnliches Ergebnis wurde für den Polymorphismus G2677T beschrieben.

Eine Arbeit von Lankas (Lankas et al., 1998) zeigt auch die Bedeutung der P-Glykoproteinexpression in der Plazenta für den Schutz des Fötus. Heterozygote *Mdr1a* (+ / -) Mäuse wurden mit einem Ivermectin-Analog behandelt und alle Föten mit dem Genotyp (- / -) bildeten eine Gaumenspalte aus, hingegen waren die Föten mit dem Genotyp (+ / +) gesund. Außerdem hatten etwa 30 % der heterozygoten Föten (+ / -) ebenfalls eine Gaumenspalte. Dieses Experiment zeigt, dass P-Glykoprotein für den Schutz des Fötus vor teratogenen Effekten, hervorgerufen von amphipathischen Toxinen, sehr wichtig ist.

Tabelle 33: Der Effekt einer genetisch bedingten Veränderung der P-Glykoproteinexpression in verschiedenen Geweben auf die Arzneimittelverfügbarkeit und das Risiko für Erkrankungen

<i>MDR1</i> -Genotyp	Gewebe mit verminderter P-Glykoproteinexpression	Auswirkung
Exon 26, 3435 TT	Niere	erhöhtes Risiko für Nierenzellkarzinome (Siegsmond et al., 2002)
Exon 26, 3435 TT	CD4 ⁺ T-Lymphozyten	besseres Ansprechen auf eine Therapie mit HIV-Proteaseinhibitoren (Nelfinavir); geringere <i>MDR1</i> mRNA Menge; verminderte P-Glykoproteinfunktion; (Fellay et al., 2002)
Exon 26, 3435 TT und Exon 21, 2677 TT		geringer Häufigkeit einer Steroidbehandlung 1 Jahr nach der Herztransplantation (Zheng et al., 2002)
<i>Mdr1a</i> -/-	Plazenta	Maus-Fötus mit Gaumenspalte nach einer Behandlung der Mutter mit einem Ivermectin-Analog (Lankas et al., 1998)
Exon 26, 3435 TT	Dünndarm	niedrigere P-Glykoproteinexpression; höhere Bioverfügbarkeit von Digoxin (Hoffmeyer et al., 2000)
Exon 26, 3435 TT	CD56 ⁺ NK-Zellen	geringere <i>MDR1</i> mRNA Menge; verminderte P-Glykoproteinfunktion; (Hitzl et al., 2001)
Exon 26, 3435 TT und Exon 21, 2677 TT	Plazenta	geringere <i>MDR1</i> mRNA Menge; verminderte P-Glykoproteinexpression
Exon 26, 3435 TT und Exon 21, 2677 TT	Knochenmark	höhere Überlebensrate bei AML-Patienten (Illmer et al., 2002)
Exon 26, 3435 TT		erhöhtes Risiko für die Ausbildung von Colitis ulcerosa (Schwab et al., 2003)

6.1.4 Mögliche Mechanismen, die den Einfluss der Mutationen im *MDR1*-Gen auf die P-Glykoproteinexpression und -funktion erklären

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass der Polymorphismus 3435 TT in Exon 26 des *MDR1*-Gens mit einer erniedrigten P-Glykoproteinexpression und -funktion assoziiert ist. Obwohl dieser synonyme Polymorphismus zu keinem Aminosäureaustausch führt, wäre es denkbar, dass das 3435 T Allel eine reduzierte Translationseffizienz bewirkt. Die Häufigkeit mit welcher das ATT Codon für Isoleucin im humanem Genom auftritt ist dreimal niedriger als die Häufigkeit des Isoleucin-Codons ATC des Wildtyp-Allels (Tang et al., 2002). Allelspezifische Unterschiede in der RNA-Faltung, welche das Splicing der RNA oder die Translation beeinflussen, könnten ebenfalls eine Ursache für die erniedrigten P-Glykoproteinexpression und -funktion bei homozygoten Trägern des 3435 T Allels darstellen. Es ist allerdings auch möglich, dass der Polymorphismus C3435T keinen direkten Einfluss auf die P-Glykoproteinexpression und -funktion hat, sondern eine Verbindung zu einem anderen Polymorphismus im *MDR1* Gen besteht, der eine direkte Auswirkung auf die P-Glykoproteinexpression und -funktion hat. In einer Arbeit von Tanabe (Tanabe et al., 2001) wurde eine Verbindung des C3435T Polymorphismus mit einer Mutation in Exon 21 des *MDR1*-Gens (G2677T) (Chen 1990) beschrieben. Es handelt sich dabei um eine Mutation, die zu einem Aminosäureaustausch von Alanin 893 zu Serin führt. Die apolare, strukturell neutrale Aminosäure Alanin wird durch die polare Aminosäure Serin substituiert. Dadurch kann es zu einer Geometrieänderung mit einer Auswirkung auf die Sekundärstruktur des Proteins und einer damit verbundenen Limitation der P-Glykoproteinfunktion kommen. Im Gegensatz dazu beschreibt Kimchi-Sarfaty in einer Arbeit, dass der Polymorphismus G2677T keinerlei Auswirkung auf die P-Glykoproteinexpression und -funktion zeigt (Kimchi-Sarfaty et al., 2002). Er untersuchte die P-Glykoproteinexpression und -funktion von 5 kodierenden Polymorphismen des *MDR1*-Gens in einem transienten Expressionssystem. Eine weitere Arbeit von Kim zeigte wiederum, dass der Polymorphismus G2677T mit den stillen Mutationen in Exon 12 (C1236T) und Exon 26 (C3435T) gekoppelt ist und dieser Haplotyp die P-Glykoproteinfunktion beeinflusst (Kim et al., 2001). In einem in vitro Expressionssystem mit den Genotypen 2677 TT, 3435 TT und 1236 TT fand er einen erhöhten Efflux des P-Glykoproteinsubstrates Digoxin, verglichen zum Wildtyp-Expressionssystem. Diese Resultate aus in vitro Expressionsstudien sind widersprüchlich und können den Einfluss der Mutationen im *MDR1*-Gen auf die P-Glykoproteinexpression und -funktion in den in vivo Ergebnissen dieser Doktorarbeit nicht erklären. Eine Arbeit von Tanabe (Tanabe et al., 2001) beschreibt eine Kopplung von G2677T in Exon 21 des *MDR1*-Gens mit einer Mutation in der Promotor Region (Exon 1b)

des *MDR1*-Gens (T-129C). Für die Träger eines oder beider Polymorphismen (G2677T, T-129C) wurde eine geringere P-Glykoproteinexpression in Plazenta im Vergleich zu Wildtyp beschrieben. Die Mutation T-129C tritt bei Japanern mit einer Allelfrequenz von 8,3 % auf; in den Plazentaprobe von Kaukasiern aus dieser Doktorarbeit konnte die Mutation jedoch nicht detektiert werden. Untersuchungen zu möglichen weiteren Kopplungen und die Konstruktion von Haplotypen sind zum besseren Verständnis der beobachteten Expressionsunterschiede nötig.

6.2 Multidrug Resistance Protein 3

6.2.1 Regulation der MRP3-Expression

6.2.1.1 Der Einfluss von Rifampicin auf die MRP3-Expression

In einer Arbeit von Schuetz (Schuetz et al., 2001) wurde die Vermutung geäußert, dass Rifampicin die Expression von MRP3 in humanen Enterozyten induziert. Man stützte sich dabei auf die Beobachtung eines erhöhten Gallensäurespiegels im Plasma von Patienten nach Gabe von Rifampicin. Die Schlussfolgerung daraus war eine Beteiligung von MRP3 am enterohepatischen Kreislauf mit der Funktion Gallensäuren von den Enterozyten ins Blut zu transportieren. Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen jedoch diese Vermutung nicht. Die Analyse von *MRP3* mRNA in Duodenalbiopsien von Probanden vor Rifampicingabe und nach Rifampicingabe zeigte keinen signifikanten Unterschied in der *MRP3* mRNA Menge. Diese Ergebnisse wurden durch in vitro Experimente bestätigt; CaCo-2 bzw. HepG2 Zellen zeigten nur einen geringen Anstieg der *MRP3* mRNA Menge nach der Inkubation mit Rifampicin im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Die *MRP3* mRNA Menge in diesen Ansätzen waren nicht signifikant unterschiedlich. Eine Arbeit von Schrenk (Schrenk et al., 2001) zeigte ebenfalls nur eine geringe Erhöhung der *MRP3* mRNA Menge in HepG2 Zellen nach Inkubation mit Rifampicin und bestätigt somit diese Ergebnisse.

In der Literatur wurde eine Induktion von MRP2 durch Rifampicin über ein PXR Bindeelement in der 5' flankierenden Region des *MRP2* Gens nachgewiesen (Fromm et al., 2000; Kast et al., 2002). Untersuchungen zeigten, dass der MRP3 Promotor keine PXR Bindungsstelle aufweist (Stöckel et al., 2000; Inokuchi et al., 2001), welche die fehlende Induktion von MRP3 durch Rifampicin erklären könnte. Demzufolge müssen andere Faktoren

für die erhöhte Gallensäurekonzentration im Plasma von Probanden nach Rifampicingabe verantwortlich sein. Eine Möglichkeit wäre die Hemmung der Bile salt export pump durch Rifampicin (Byrne et al., 2002) und der damit verbundene erhöhte Transport der Gallensäuren durch MRP3 aus der Leber ins Blut. Der Export von Gallensäuren aus der Leber durch eine erhöhte MRP3-Expression während Cholestase wurde bereits von Ogawa et al. (Ogawa et al., 2000) beschrieben. Zelcer et al. untersuchte (Zelcer et al., 2002) den Transport von Gallensäuren durch MRP3 und beschreibt, dass MRP3 Glykocholsäuren und Taurocholsäuren mit niedriger Affinität transportiert. Da das physiologische Gallensäuregemisch im Menschen hauptsächlich aus diesen Gallensäuren besteht, vermutet Zelcer, dass MRP3 nicht das einzige basolaterale Transportsystem für Gallensäuren in Enterozyten darstellt. Diese Arbeit unterstützt damit ebenfalls die Ergebnisse dieser Doktorarbeit. Es stellt sich jedoch die Frage, welches andere Transporterprotein für den basolateralen Transport von Gallensäuren in Enterozyten in Frage kommen könnte. Eine Arbeit von Lazaridis beschreibt einen weiteren Kandidaten für den basolateralen Transport von Gallensäuren in Enterozyten (Lazaridis et al., 2000). Eine trunkierte Form der Bile salt export pump (t-Asbt), welche an der basolateralen Membran von Ileozyten und Cholangiozyten exprimiert ist und natriumabhängig Taurocholat transportiert.

6.2.1.2 Der Einfluss von Omeprazol auf die MRP3-Expression

Die MRP3-Expression in einer großen Sammlung von humanen Lebern wurde in dieser Arbeit analysiert. Dabei konnte eine erhebliche Variabilität der MRP3-Expression in diesen Geweben festgestellt werden. Der Protonenpumpenhemmer Omeprazol wurde als Faktor für eine Induktion der MRP3-Expression in Lebergewebe identifiziert. Dieses Ergebnis wurde durch in vitro Inkubationsexperimente mit HepG2 Zellen bestätigt. HepG2 Zellen zeigten eine konzentrationsabhängige MRP3-Induktion durch Omeprazol. In den Experimenten mit HepG2 Zellen konnte sowohl eine MRP3-Induktion auf mRNA- als auch auf Proteinebene festgestellt werden; im Gegensatz dazu wurde in humanem Lebergewebe nur eine MRP3-Induktion auf Proteinebene, jedoch nicht auf mRNA-Ebene gezeigt. Die Gründe für diesen Unterschied in der MRP3-Induktion sind noch unklar; es wurden jedoch ähnliche Beobachtungen für die mrp3-Induktion in der Ratte gemacht (Ogawa et al., 2000).

Aufgrund der im folgenden angeführten Resultate dieser Doktorarbeit kann eine Beteiligung des Ah-Rezeptors an der MRP3-Induktion angenommen werden. Zunächst wurde gezeigt, dass Omeprazol CYP1A1 durch die Aktivierung des Ah-Rezeptor induziert (Daujat et al., 1992; Backlund et al., 1997; Dzeletovic et al., 1997). In weiterer Folge wurden in der 5'

flankierenden Region des humanen *MRP3*-Gens Bindungsstellen für das Heterodimer aus Ah-Rezeptor und ARNT-Protein identifiziert (Takada et al., 2000). Für die bereits bekannten Aktivatoren des Ah-Rezeptors β -Naphthoflavon (Ergebnisse dieser Arbeit) und 2-Acetylaminofluoren (Stöckel et al., 2000; Schrenk et al., 2001) wurde bei in vitro Experimenten eine Induktion der *MRP3*-Expression beschrieben. Außerdem wurde in den Ergebnissen dieser Doktorarbeit eine 1,4-fache Induktion der *MRP3*-Expression in Lebergewebe von Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern gezeigt. Zusammenfassend wurde der häufig verordnete Protonenpumpen-Inhibitor Omeprazol als Faktor für die Induktion der *MRP3*-Expression in humanem Lebergewebe identifiziert. Dieser Induktion liegt vermutlich eine Aktivierung des Ah-Rezeptors zugrunde.

6.2.1.3 Der Einfluss von Gallensäuren auf die *MRP3*-Expression

Inokuchi (Inokuchi et al., 2001) untersuchte in seiner Arbeit die Regulation der Transkription von *MRP3* durch Gallensäuren. Er beschrieb ein mögliches Gallensäurebindeelement in der Region -229/-138 des *MRP3*-Gens und zwei α -1 Fetoprotein-Transkriptionsfaktor ähnliche Elemente im *MRP3*-Gen, welche für eine Induktion der Transkription von *MRP3* durch Gallensäuren verantwortlich waren. Es wurde eine dreifache Induktion der *MRP3*-Expression in CaCo-2 Zellen durch Chenodeoxycholsäure beschrieben. In dieser Doktorarbeit wurde der Einfluss von Chenodeoxycholsäure und 12 weiterer Gallensäuren auf die *MRP3*-Expression untersucht. Neben der Induktion der *MRP3*-Expression durch Chenodeoxycholsäure wurde eine Induktion von *MRP3* durch Glycocholsäure, Glycodeoxycholsäure, Glycochenodeoxycholsäure, Lithocholsäure und Taurocholsäure gefunden. Die *MRP3*-Induktion war jedoch in keinem Fall signifikant, da die Standardabweichungen sehr groß waren. Ein Grund dafür kann die nicht durchgeführte Normalisierung der *MRP3*-Messwerte auf ein konstitutionell exprimiertes Gen sein. Die Normalisierung konnte nicht durchgeführt werden, da die im Inkubationsexperiment eingesetzte Gallensäurekonzentration zu einer Induktion des Haushaltsgens führte und daher die Messwerte für das Haushaltsgen sehr variabel waren. Die eingesetzten Gallensäurekonzentrationen entsprachen in etwa den Gallensäurekonzentrationen im Plasma während Cholestase (500 μ M). Eine Induktion von *mrp3* während Choletase wurde bereits beschrieben (Hirohashi et al., 1998; Ortiz et al., 1999). In weiterer Folge wurde die *MRP3*-Expression in CaCo-2 Zellen nach Behandlung mit 100 μ M Gallensäuren untersucht. Es zeigte sich eine signifikante Induktion der *MRP3*-Expression durch Chenodeoxycholsäure, wie bereits von Inokuchi beschrieben (Inokuchi et al., 2001) und Lithocholsäure. Die *MRP3*-Proteinexpression wurde jedoch durch die untersuchten Gallensäuren nicht beeinflusst. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass *MRP3*

einer Transkriptionskontrolle durch Gallensäuren unterliegt, jedoch zur Translationskontrolle noch weitere unbekannte Faktoren beitragen. Die endogenen Gallensäuren Glycocholsäure und Glycodeoxycholsäure zeigten unter physiologischen Bedingungen keine Induktion der MRP3-Expression. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass MRP3 möglicherweise nicht das hauptverantwortliche Transporterprotein für den basolateralen Gallensäuretransport in Enterozyten darstellt. Es scheint jedoch, dass MRP3 unter cholestatischen Bedingungen (Hirohashi et al., 1998; Ortiz et al., 1999) und bei Patienten mit Dubin-Johnson Syndrom (König et al., 1999) eine wesentliche Rolle beim basolateralen Transport von Gallensäuren in Hepatozyten und Enterozyten spielt.

6.2.2 MRP3-Expression in gesundem Kolon-Gewebe und Kolon-Tumorgewebe

Die Ergebnisse dieser Doktorarbeit zeigen eine tendenziell geringere *MRP3* mRNA Expression in Kolon-Tumorgewebe verglichen zu gesundem Gewebe und werden durch eine Arbeit von Hinoshita (Hinoshita et al., 2000) bestätigt. Die niedrige *MRP3*-Konzentration in Kolon-Tumorgewebe ist von einer erhöhten *MRP2*-Konzentration in diesem Gewebe begleitet, welche zur Resistenz gegen eine Behandlung mit Cisplatin beiträgt (Hinoshita et al., 2000). Das Prinzip einer inversen Regulation von *MRP3* und *MRP2* wurde bereits mehrmals beobachtet (Hirohashi et al., 1998; König et al., 1999; Ortiz et al., 1999). Interessant war die Tatsache, dass die *MRP3*-Proteinexpression in Tumorgewebe und gesundem Gewebe nicht unterschiedlich war.

7 Literaturverzeichnis

- Aden, D. P., A. Fogel, S. Plotkin, I. Damjanov and B. B. Knowles (1979). "Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line." Nature **282**(5739): 615-6.
- Allikmets, R., B. Gerrard, A. Hutchinson and M. Dean (1996). "Characterization of the human ABC superfamily: isolation and mapping of 21 new genes using the expressed sequence tags database." Hum Mol Genet **5**(10): 1649-55.
- Ambudkar, S. V., S. Dey, C. A. Hrycyna, M. Ramachandra, I. Pastan and M. M. Gottesman (1999). "Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter." Annu Rev Pharmacol Toxicol **39**: 361-98.
- Angelin, B., A. Arvidsson, R. Dahlqvist, A. Hedman and K. Schenck-Gustafsson (1987). "Quinidine reduces biliary clearance of digoxin in man." Eur J Clin Invest **17**(3): 262-5.
- Backlund, M., I. Johansson, S. Mkrtchian and M. Ingelman-Sundberg (1997). "Signal transduction-mediated activation of the aryl hydrocarbon receptor in rat hepatoma H4IIE cells." J Biol Chem **272**(50): 31755-63.
- Bakos, E., R. Evers, G. Szakacs, G. E. Tusnady, E. Welker, K. Szabo, M. de Haas, L. van Deemter, P. Borst, A. Varadi and B. Sarkadi (1998). "Functional multidrug resistance protein (MRP1) lacking the N-terminal transmembrane domain." J Biol Chem **273**(48): 32167-75.
- Bellamy, W. T. (1996). "P-glycoproteins and multidrug resistance." Annu Rev Pharmacol Toxicol **36**: 161-83.
- Berg, J. D., H. I. Pandov and H. G. Sammons (1984). "Serum total bile acid levels in patients receiving rifampicin and isoniazid." Ann Clin Biochem **21**(Pt 3): 218-22.
- Borst, P., R. Evers, M. Kool and J. Wijnholds (2000). "A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins." J Natl Cancer Inst **92**(16): 1295-302.
- Borst, P. and A. H. Schinkel (1996). "What have we learnt thus far from mice with disrupted P-glycoprotein genes?" Eur J Cancer **32A**(6): 985-90.
- Byrne, J. A., S. S. Strautnieks, G. Mieli-Vergani, C. F. Higgins, K. J. Linton and R. J. Thompson (2002). "The human bile salt export pump: Characterization of substrate specificity and identification of inhibitors." Gastroenterology **123**(5): 1649-1658.
- Cascorbi, I., T. Gerloff, A. Johne, C. Meisel, S. Hoffmeyer, M. Schwab, E. Schaeffeler, M. Eichelbaum, U. Brinkmann and I. Roots (2001). "Frequency of single nucleotide polymorphisms in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene in white subjects." Clin Pharmacol Ther **69**(3): 169-74.

- Choo, E. F., B. Leake, C. Wandel, H. Imamura, A. J. Wood, G. R. Wilkinson and R. B. Kim (2000). "Pharmacological inhibition of P-glycoprotein transport enhances the distribution of HIV-1 protease inhibitors into brain and testes." Drug Metab Dispos **28**(6): 655-60.
- Cole, S. P., G. Bhardwaj, J. H. Gerlach, J. E. Mackie, C. E. Grant, K. C. Almquist, A. J. Stewart, E. U. Kurz, A. M. Duncan and R. G. Deeley (1992). "Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line." Science **258**(5088): 1650-4.
- Cordon-Cardo, C., J. P. O'Brien, D. Casals, L. Rittman-Grauer, J. L. Biedler, M. R. Melamed and J. R. Bertino (1989). "Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(2): 695-8.
- Craddock, A. L., M. W. Love, R. W. Daniel, L. C. Kirby, H. C. Walters, M. H. Wong and P. A. Dawson (1998). "Expression and transport properties of the human ileal and renal sodium-dependent bile acid transporter." Am J Physiol **274**(1 Pt 1): G157-69.
- Daujat, M., B. Peryt, P. Lesca, G. Fourtanier, J. Domergue and P. Maurel (1992). "Omeprazole, an inducer of human CYP1A1 and 1A2, is not a ligand for the Ah receptor." Biochem Biophys Res Commun **188**(2): 820-5.
- De Lannoy, I. A., G. Koren, J. Klein, J. Charuk and M. Silverman (1992). "Cyclosporin and quinidine inhibition of renal digoxin excretion: evidence for luminal secretion of digoxin." Am J Physiol **263**(4 Pt 2): F613-22.
- Donner, M. G. and D. Keppler (2001). "Up-regulation of basolateral multidrug resistance protein 3 (Mrp3) in cholestatic rat liver." Hepatology **34**(2): 351-9.
- Drach, J., A. Gsur, G. Hamilton, S. Zhao, J. Angerler, M. Fiegl, N. Zojer, M. Raderer, I. Haberl, M. Andreeff and H. Huber (1996). "Involvement of P-glycoprotein in the transmembrane transport of interleukin-2 (IL-2), IL-4, and interferon-gamma in normal human T lymphocytes." Blood **88**(5): 1747-54.
- Dzeletovic, N., J. McGuire, M. Daujat, J. Tholander, M. Ema, Y. Fujii-Kuriyama, J. Bergman, P. Maurel and L. Poellinger (1997). "Regulation of dioxin receptor function by omeprazole." J Biol Chem **272**(19): 12705-13.
- Fellay, J., C. Marzolini, E. R. Meaden, D. J. Back, T. Buclin, J. P. Chave, L. A. Decosterd, H. Furrer, M. Opravil, G. Pantaleo, D. Retelska, L. Ruiz, A. H. Schinkel, P. Vernazza, C. B. Eap and A. Telenti (2002). "Response to antiretroviral treatment in HIV-1-infected individuals with allelic variants of the multidrug resistance transporter 1: a pharmacogenetics study." Lancet **359**(9300): 30-6.
- Fromm, M. F. (2000). "P-glycoprotein: a defense mechanism limiting oral bioavailability and CNS accumulation of drugs." Int J Clin Pharmacol Ther **38**(2): 69-74.

- Fromm, M. F., H. M. Kauffmann, P. Fritz, O. Burk, H. K. Kroemer, R. W. Warzok, M. Eichelbaum, W. Siegmund and D. Schrenk (2000). "The effect of rifampin treatment on intestinal expression of human MRP transporters." Am J Pathol **157**(5): 1575-80.
- Fromm, M. F., R. B. Kim, C. M. Stein, G. R. Wilkinson and D. M. Roden (1999). "Inhibition of P-glycoprotein-mediated drug transport: A unifying mechanism to explain the interaction between digoxin and quinidine." Circulation **99**(4): 552-7.
- Gerloff, T., B. Stieger, B. Hagenbuch, J. Madon, L. Landmann, J. Roth, A. F. Hofmann and P. J. Meier (1998). "The sister of P-glycoprotein represents the canalicular bile salt export pump of mammalian liver." J Biol Chem **273**(16): 10046-50.
- Gotoh, Y., H. Suzuki, S. Kinoshita, T. Hirohashi, Y. Kato and Y. Sugiyama (2000). "Involvement of an organic anion transporter (canalicular multispecific organic anion transporter/multidrug resistance-associated protein 2) in gastrointestinal secretion of glutathione conjugates in rats." J Pharmacol Exp Ther **292**(1): 433-9.
- Gottesman, M. M., S. V. Ambudkar, M. M. Cornwell, I. Pastan and U. A. Germann (1996). Multidrug Resistance Transporter. Molecular Biology of Membrane Transport Disorders. S. G. S. e. al. New York, Plenum Press. **13**: 243 - 257.
- Gottesman, M. M. and I. Pastan (1993). "Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter." Annu Rev Biochem **62**: 385-427.
- Greiner, B., M. Eichelbaum, P. Fritz, H. P. Kreichgauer, O. von Richter, J. Zundler and H. K. Kroemer (1999). "The role of intestinal P-glycoprotein in the interaction of digoxin and rifampin." J Clin Invest **104**(2): 147-53.
- Hagenbuch, B. and P. J. Meier (1996). "Sinusoidal (basolateral) bile salt uptake systems of hepatocytes." Semin Liver Dis **16**(2): 129-36.
- Hagenbuch, B., B. Stieger, M. Foguet, H. Lubbert and P. J. Meier (1991). "Functional expression cloning and characterization of the hepatocyte Na⁺/bile acid cotransport system." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(23): 10629-33.
- Hager, W. D., P. Fenster, M. Mayersohn, D. Perrier, P. Graves, F. I. Marcus and S. Goldman (1979). "Digoxin-quinidine interaction Pharmacokinetic evaluation." N Engl J Med **300**(22): 1238-41.
- Higgins, C. F. and M. M. Gottesman (1992). "Is the multidrug transporter a flippase?" Trends Biochem Sci **17**(1): 18-21.
- Hinoshita, E., T. Uchiumi, K. Taguchi, N. Kinukawa, M. Tsuneyoshi, Y. Maehara, K. Sugimachi and M. Kuwano (2000). "Increased expression of an ATP-binding cassette superfamily transporter, multidrug resistance protein 2, in human colorectal carcinomas." Clin Cancer Res **6**(6): 2401-7.

- Hirohashi, T., H. Suzuki, K. Ito, K. Ogawa, K. Kume, T. Shimizu and Y. Sugiyama (1998). "Hepatic expression of multidrug resistance-associated protein-like proteins maintained in Eisai hyperbilirubinemic rats." Mol Pharmacol **53**(6): 1068-75.
- Hirohashi, T., H. Suzuki and Y. Sugiyama (1999). "Characterization of the transport properties of cloned rat multidrug resistance-associated protein 3 (MRP3)." J Biol Chem **274**(21): 15181-5.
- Hirohashi, T., H. Suzuki, H. Takikawa and Y. Sugiyama (2000). "ATP-dependent transport of bile salts by rat multidrug resistance-associated protein 3 (Mrp3)." J Biol Chem **275**(4): 2905-10.
- Hitzl, M., S. Drescher, H. van der Kuip, E. Schaffeler, J. Fischer, M. Schwab, M. Eichelbaum and M. F. Fromm (2001). "The C3435T mutation in the human MDR1 gene is associated with altered efflux of the P-glycoprotein substrate rhodamine 123 from CD56⁺ natural killer cells." Pharmacogenetics **11**(4): 293-8.
- Hoffmeyer, S., O. Burk, O. von Richter, H. P. Arnold, J. Brockmöller, A. Johné, I. Cascorbi, T. Gerloff, I. Roots, M. Eichelbaum and U. Brinkmann (2000). "Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(7): 3473-8.
- Holland, P. M., R. D. Abramson, R. Watson and D. H. Gelfand (1991). "Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(16): 7276-80.
- Hopper, E., M. G. Belinsky, H. Zeng, A. Tosolini, J. R. Testa and G. D. Kruh (2001). "Analysis of the structure and expression pattern of MRP7 (ABCC10), a new member of the MRP subfamily." Cancer Lett **162**(2): 181-91.
- Inokuchi, A., E. Hinoshita, Y. Iwamoto, K. Kohno, M. Kuwano and T. Uchiumi (2001). "Enhanced expression of the human multidrug resistance protein 3 by bile salt in human enterocytes. A transcriptional control of a plausible bile acid transporter." J Biol Chem **276**: 46822-9.
- Ishikawa, T. (1992). "The ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump." Trends Biochem Sci **17**(11): 463-8.
- Juliano, R. L. and V. Ling (1976). "A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants." Biochim Biophys Acta **455**(1): 152-62.
- Kast, H. R., B. Goodwin, P. T. Tarr, S. A. Jones, A. M. Anisfeld, C. M. Stoltz, P. Tontonoz, S. Kliewer, T. M. Willson and P. A. Edwards (2002). "Regulation of multidrug resistance-associated protein 2 (ABCC2) by the nuclear receptors pregnane X receptor, farnesoid X-activated receptor, and constitutive androstane receptor." J Biol Chem **277**: 2908-15.

- Keppler, D. and J. König (2000). "Hepatic secretion of conjugated drugs and endogenous substances." Semin Liver Dis **20**(3): 265-72.
- Kim, R. B., M. F. Fromm, C. Wandel, B. Leake, A. J. Wood, D. M. Roden and G. R. Wilkinson (1998). "The drug transporter P-glycoprotein limits oral absorption and brain entry of HIV-1 protease inhibitors." J Clin Invest **101**(2): 289-94.
- Kim, R. B., B. F. Leake, E. F. Choo, G. K. Dresser, S. V. Kubba, U. I. Schwarz, A. Taylor, H. G. Xie, J. McKinsey, S. Zhou, L. B. Lan, J. D. Schuetz, E. G. Schuetz and G. R. Wilkinson (2001). "Identification of functionally variant MDR1 alleles among European Americans and African Americans." Clin Pharmacol Ther **70**(2): 189-99.
- Kimchi-Sarfaty, C., J. J. Gripar and M. M. Gottesman (2002). "Functional characterization of coding polymorphisms in the human MDR1 gene using a vaccinia virus expression system." Mol Pharmacol **62**(1): 1-6.
- Klimecki, W. T., B. W. Futscher, T. M. Grogan and W. S. Dalton (1994). "P-glycoprotein expression and function in circulating blood cells from normal volunteers." Blood **83**(9): 2451-8.
- Klimecki, W. T., C. W. Taylor and W. S. Dalton (1995). "Inhibition of cell-mediated cytotoxicity and P-glycoprotein function in natural killer cells by verapamil isomers and cyclosporine A analogs." J Clin Immunol **15**(3): 152-8.
- König, J., A. T. Nies, Y. Cui, I. Leier and D. Keppler (1999). "Conjugate export pumps of the multidrug resistance protein (MRP) family: localization, substrate specificity, and MRP2-mediated drug resistance." Biochim Biophys Acta **1461**(2): 377-94.
- König, J., D. Rost, Y. Cui and D. Keppler (1999). "Characterization of the human multidrug resistance protein isoform MRP3 localized to the basolateral hepatocyte membrane." Hepatology **29**(4): 1156-63.
- König, P., R. Giraldo, L. Chapman and D. Rhodes (1996). "The crystal structure of the DNA-binding domain of yeast RAP1 in complex with telomeric DNA." Cell **85**(1): 125-36.
- Kool, M., M. de Haas, G. L. Scheffer, R. J. Scheper, M. J. van Eijk, J. A. Juijn, F. Baas and P. Borst (1997). "Analysis of expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, homologues of the multidrug resistance-associated protein gene (MRP1), in human cancer cell lines." Cancer Res **57**(16): 3537-47.
- Kool, M., M. van der Linden, M. de Haas, G. L. Scheffer, J. M. de Vree, A. J. Smith, G. Jansen, G. J. Peters, N. Ponne, R. J. Scheper, R. P. Elferink, F. Baas and P. Borst (1999). "MRP3, an organic anion transporter able to transport anti-cancer drugs." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(12): 6914-9.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(259): 680-5.

- Lankas, G. R., L. D. Wise, M. E. Cartwright, T. Pippert and D. R. Umbenhauer (1998). "Placental P-glycoprotein deficiency enhances susceptibility to chemically induced birth defects in mice." Reprod Toxicol **12**(4): 457-63.
- Lazaridis, K. N., P. Tietz, T. Wu, S. Kip, P. A. Dawson and N. F. LaRusso (2000). "Alternative splicing of the rat sodium/bile acid transporter changes its cellular localization and transport properties." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(20): 11092-7.
- Lee, J. M., M. Trauner, C. J. Soroka, B. Stieger, P. J. Meier and J. L. Boyer (2000). "Expression of the bile salt export pump is maintained after chronic cholestasis in the rat." Gastroenterology **118**(1): 163-72.
- Lee, L. G., C. R. Connell and W. Bloch (1993). "Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes." Nucleic Acids Res **21**(16): 3761-6.
- Lown, K. S., R. R. Mayo, A. B. Leichtman, H. L. Hsiao, D. K. Turgeon, P. Schmiedlin-Ren, M. B. Brown, W. Guo, S. J. Rossi, L. Z. Benet and P. B. Watkins (1997). "Role of intestinal P-glycoprotein (mdr1) in interpatient variation in the oral bioavailability of cyclosporine." Clin Pharmacol Ther **62**(3): 248-60.
- Lucia, M. B., R. Cauda, A. L. Landay, W. Malorni, G. Donelli and L. Ortona (1995). "Transmembrane P-glycoprotein (P-gp/P-170) in HIV infection: analysis of lymphocyte surface expression and drug-unrelated function." AIDS Res Hum Retroviruses **11**(8): 893-901.
- Mickley, L. A., J. S. Lee, Z. Weng, Z. Zhan, M. Alvarez, W. Wilson, S. E. Bates and T. Fojo (1998). "Genetic polymorphism in MDR-1: a tool for examining allelic expression in normal cells, unselected and drug-selected cell lines, and human tumors." Blood **91**(5): 1749-56.
- Ogawa, K., H. Suzuki, T. Hirohashi, T. Ishikawa, P. J. Meier, K. Hirose, T. Akizawa, M. Yoshioka and Y. Sugiyama (2000). "Characterization of inducible nature of MRP3 in rat liver." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **278**(3): G438-46.
- Ortiz, D. F., S. Li, R. Iyer, X. Zhang, P. Novikoff and I. M. Arias (1999). "MRP3, a new ATP-binding cassette protein localized to the canalicular domain of the hepatocyte." Am J Physiol **276**(6 Pt 1): G1493-500.
- Paulusma, C. C., P. J. Bosma, G. J. Zaman, C. T. Bakker, M. Otter, G. L. Scheffer, R. J. Scheper, P. Borst and R. P. Oude Elferink (1996). "Congenital jaundice in rats with a mutation in a multidrug resistance-associated protein gene." Science **271**(5252): 1126-8.
- Pedersen, K. E., B. D. Christiansen, N. A. Klitgaard and F. Nielsen-Kudsk (1983). "Effect of quinidine on digoxin bioavailability." Eur J Clin Pharmacol **24**(1): 41-7.

- Polli, J. W., J. L. Jarrett, S. D. Studenberg, J. E. Humphreys, S. W. Dennis, K. R. Brouwer and J. L. Woolley (1999). "Role of P-glycoprotein on the CNS disposition of amprenavir (141W94), an HIV protease inhibitor." Pharm Res **16**(8): 1206-12.
- Rosenberg, M. F., R. Callaghan, R. C. Ford and C. F. Higgins (1997). "Structure of the multidrug resistance P-glycoprotein to 2.5 nm resolution determined by electron microscopy and image analysis." J Biol Chem **272**(16): 10685-94.
- Rost, D., J. König, G. Weiss, E. Klar, W. Stremmel and D. Keppler (2001). "Expression and localization of the multidrug resistance proteins MRP2 and MRP3 in human gallbladder epithelia." Gastroenterology **121**(5): 1203-8.
- Rost, D., S. Mahner, Y. Sugiyama and W. Stremmel (2002). "Expression and localization of the multidrug resistance-associated protein 3 in rat small and large intestine." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **282**(4): G720-6.
- Scheffer, G. L., M. Kool, M. de Haas, J. M. de Vree, A. C. Pijnenborg, D. K. Bosman, R. P. Oude Elferink, P. van Der Valk, P. Borst and R. J. Scheper (2002). "Tissue distribution and induction of human multidrug resistant protein 3." Lab Invest **82**: 193-201.
- Schinkel, A. H. (1997). "The physiological function of drug-transporting P-glycoproteins." Semin Cancer Biol **8**(3): 161-70.
- Schinkel, A. H., J. J. Smit, O. van Tellingen, J. H. Beijnen, E. Wagenaar, L. van Deemter, C. A. Mol, M. A. van der Valk, E. C. Robanus-Maandag, H. P. te Riele and et al. (1994). "Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs." Cell **77**(4): 491-502.
- Schinkel, A. H., E. Wagenaar, L. van Deemter, C. A. Mol and P. Borst (1995). "Absence of the *mdr1a* P-Glycoprotein in mice affects tissue distribution and pharmacokinetics of dexamethasone, digoxin, and cyclosporin A." J Clin Invest **96**(4): 1698-705.
- Schrenk, D., P. R. Baus, N. Ermel, C. Klein, B. Vorderstemann and H. M. Kauffmann (2001). "Up-regulation of transporters of the MRP family by drugs and toxins." Toxicol Lett **120**(1-3): 51-7.
- Schuetz, E. G., A. H. Schinkel, M. V. Relling and J. D. Schuetz (1996). "P-glycoprotein: a major determinant of rifampicin-inducible expression of cytochrome P4503A in mice and humans." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(9): 4001-5.
- Schuetz, E. G., S. Strom, K. Yasuda, V. Lecreur, M. Assem, C. Brimer, J. Lamba, R. B. Kim, V. Ramachandran, B. J. Komoroski, R. Venkataramanan, H. Cai, C. J. Sinal, F. J. Gonzalez and J. D. Schuetz (2001). "Disrupted bile acid homeostasis reveals an unexpected interaction among nuclear hormone receptors, transporters, and cytochrome P450." J Biol Chem **276**(42): 39411-8.

- Siegmund, M., U. Brinkmann, E. Schaffeler, G. Weirich, M. Schwab, M. Eichelbaum, P. Fritz, O. Burk, J. Decker, P. Alken, U. Rothenpieler, R. Kerb, S. Hoffmeyer and H. Brauch (2002). "Association of the P-Glycoprotein Transporter MDR1(C3435T) Polymorphism with the Susceptibility to Renal Epithelial Tumors." J Am Soc Nephrol **13**(7): 1847-54.
- Soroka, C. J., J. M. Lee, F. Azzaroli and J. L. Boyer (2001). "Cellular localization and up-regulation of multidrug resistance-associated protein 3 in hepatocytes and cholangiocytes during obstructive cholestasis in rat liver." Hepatology **33**(4): 783-91.
- Sparreboom, A., J. van Asperen, U. Mayer, A. H. Schinkel, J. W. Smit, D. K. Meijer, P. Borst, W. J. Nooijen, J. H. Beijnen and O. van Tellingen (1997). "Limited oral bioavailability and active epithelial excretion of paclitaxel (Taxol) caused by P-glycoprotein in the intestine." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(5): 2031-5.
- Stieger, B., K. Fattinger, J. Madon, G. A. Kullak-Ublick and P. J. Meier (2000). "Drug- and estrogen-induced cholestasis through inhibition of the hepatocellular bile salt export pump (Bsep) of rat liver." Gastroenterology **118**(2): 422-30.
- Stöckel, B., J. König, A. T. Nies, Y. Cui, M. Brom and D. Keppler (2000). "Characterization of the 5'-flanking region of the human multidrug resistance protein 2 (MRP2) gene and its regulation in comparison with the multidrug resistance protein 3 (MRP3) gene." Eur J Biochem **267**(5): 1347-58.
- Strautnieks, S. S., L. N. Bull, A. S. Knisely, S. A. Kocoshis, N. Dahl, H. Arnell, E. Sokal, K. Dahan, S. Childs, V. Ling, M. S. Tanner, A. F. Kagalwalla, A. Nemeth, J. Pawlowska, A. Baker, G. Mieli-Vergani, N. B. Freimer, R. M. Gardiner and R. J. Thompson (1998). "A gene encoding a liver-specific ABC transporter is mutated in progressive familial intrahepatic cholestasis." Nat Genet **20**(3): 233-8.
- Sun, A. Q., M. Ananthanarayanan, C. J. Soroka, S. Thevananther, B. L. Shneider and F. J. Suchy (1998). "Sorting of rat liver and ileal sodium-dependent bile acid transporters in polarized epithelial cells." Am J Physiol **275**(5 Pt 1): G1045-55.
- Swanson, H. I., W. K. Chan and C. A. Bradfield (1995). "DNA binding specificities and pairing rules of the Ah receptor, ARNT, and SIM proteins." J Biol Chem **270**(44): 26292-302.
- Takada, T., H. Suzuki and Y. Sugiyama (2000). "Characterization of 5'-flanking region of human MRP3." Biochem Biophys Res Commun **270**(3): 728-32.
- Tammur, J., C. Prades, I. Arnould, A. Rzhetsky, A. Hutchinson, M. Adachi, J. D. Schuetz, K. J. Swoboda, L. J. Ptacek, M. Rosier, M. Dean and R. Allikmets (2001). "Two new genes from the human ATP-binding cassette transporter superfamily, ABCC11 and ABCC12, tandemly duplicated on chromosome 16q12." Gene **273**(1): 89-96.
- Tanabe, M., I. Ieiri, N. Nagata, K. Inoue, S. Ito, Y. Kanamori, M. Takahashi, Y. Kurata, J. Kigawa, S. Higuchi, N. Terakawa and K. Otsubo (2001). "Expression of P-

- glycoprotein in human placenta: relation to genetic polymorphism of the multidrug resistance (MDR)-1 gene." J Pharmacol Exp Ther **297**(3): 1137-43.
- Thiebaut, F., T. Tsuruo, H. Hamada, M. M. Gottesman, I. Pastan and M. C. Willingham (1987). "Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(21): 7735-8.
- Towbin, H., T. Staehelin and J. Gordon (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(9): 4350-4.
- Ueda, K., N. Okamura, M. Hirai, Y. Tanigawara, T. Saeki, N. Kioka, T. Komano and R. Hori (1992). "Human P-glycoprotein transports cortisol, aldosterone, and dexamethasone, but not progesterone." J Biol Chem **267**(34): 24248-52.
- Wong, M. H., P. Oelkers, A. L. Craddock and P. A. Dawson (1994). "Expression cloning and characterization of the hamster ileal sodium-dependent bile acid transporter." J Biol Chem **269**(2): 1340-7.
- Young, L. C., B. G. Campling, S. P. Cole, R. G. Deeley and J. H. Gerlach (2001). "Multidrug resistance proteins MRP3, MRP1, and MRP2 in lung cancer: correlation of protein levels with drug response and messenger RNA levels." Clin Cancer Res **7**(6): 1798-804.
- Young, L. C., B. G. Campling, T. Voskoglou-Nomikos, S. P. Cole, R. G. Deeley and J. H. Gerlach (1999). "Expression of multidrug resistance protein-related genes in lung cancer: correlation with drug response." Clin Cancer Res **5**(3): 673-80.
- Zelcer, N., T. Saeki, I. Bot, A. Kuil and P. Borst (2002). "Transport of bile acids in multidrug resistance protein 3 over-expressing cells co-transfected with the ileal sodium-dependent bile acid transporter." Biochem J Pt.
- Zelcer, N., T. Saeki, G. Reid, J. H. Beijnen and P. Borst (2001). "Characterization of drug transport by the human Multidrug Resistance Protein 3 (ABCC3)." J Biol Chem **276**(49): 46400-7.
- Zeng, H., L. J. Bain, M. G. Belinsky and G. D. Kruh (1999). "Expression of multidrug resistance protein-3 (multispecific organic anion transporter-D) in human embryonic kidney 293 cells confers resistance to anticancer agents." Cancer Res **59**(23): 5964-7.
- Zeng, H., G. Liu, P. A. Rea and G. D. Kruh (2000). "Transport of amphipathic anions by human multidrug resistance protein 3." Cancer Res **60**(17): 4779-84.
- Zheng, H., S. Webber, A. Zeevi, E. Schuetz, J. Zhang, J. Lamba, P. Bowman and G. J. Burckart (2002). "The MDR1 polymorphisms at exons 21 and 26 predict steroid weaning in pediatric heart transplant patients." Hum Immunol **63**(9): 765-70.

8 Lebenslauf

Monika Hitzl

Geburtsdatum: 13.09.1972

Nationalität Österreich

Adresse: Dienstlich: Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institut für Klin. Pharm.
Auerbachstraße 112
D-70376 Stuttgart
Tel.: 0049/711/8101-3755
FAX: 0049/711/859295
e-mail: monika.hitzl@ikp-stuttgart.de

Privat: Elsa-Brändströmstraße 7
A-5020 Salzburg
e-mail: Monika.Hitzl@gmx.de

Ausbildung

ab Feb. 2000 **Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institut für Klinische Pharmakologie, Stuttgart**
Doktorarbeit zum Thema: „Untersuchungen zur Expression, Funktion und Regulation der ABC-Transporter P-Glykoprotein und Multidrug Resistance Protein 3“

1992 – 2000 **Leopold-Franzens-Universität Innsbruck**
Jan. 2000 Diplom der Fachrichtung Chemie
1992 - 1999 Chemiestudium
Vertiefte Ausbildung auf dem Gebiet der Biochemie
Ausbildung zur Strahlenschutzbeauftragten für offene und umschlossene radioaktive Stoffe
Absolvierung einer viersemestrigen Vorlesungsreihe zum Thema “Signaltransduktion” an der medizinischen Fakultät Innsbruck
Diplomarbeit am Institut für Biochemische Pharmakologie an der Medizinischen Fakultät der Universität Innsbruck
Thema: „Immunpräzipitations-Analyse der Bindungsaffinität von rekombinanten α_1 und β Untereinheiten des L-Typ Ca^{2+} -Kanals“

1987 - 1992 **Bundeshandelsakademie I, Salzburg (Matura: Juni 1992)**

1983 - 1987 **Priv. Mädchenschule der Schulschwestern Schwarzstraße, Salzburg**

1979 - 1983 **Volksschule Josefiaw, Salzburg**

Auslandsaufenthalt

1997 **Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines (Frankreich)**
Auslandssemester im Rahmen des Studienaustausch-Programmes Erasmus:
Studie über Diels Alder Reaktionen mit inversem Elektronenbedarf im Laboratoire de Synthèse, Interaction et Réactivité en Chimie Organique et Bioorganique

Publikationen

- Originalarbeiten:
1. M. Hitzl, K. Klein, U.M. Zanger, P. Fritz, A.K. Nüssler, P. Neuhaus, M.F. Fromm. "Influence of omeprazole on MRP3-Expression in human liver" *JPET*; 304:524-530 (2003)
 2. S. Drescher, H. Glaeser, T. Mürdter, M. Hitzl, M. Eichelbaum, M.F. Fromm. "P-glycoprotein-mediated intestinal and biliary digoxin transport in humans" *Clin Pharmacol Ther*, 73(3):223-31 (2003)
 3. M. Hitzl, J. Striessnig, B. Neuhuber, B.E. Flucher. "A mutation in the β interaction domain of the Ca^{2+} channel α_{1C} subunit reduces the affinity of the (+)- ^3H Isradipine binding site" *FEBS Lett*; 31;524(1-3):188-92 (2002)
 4. S. Drescher, E. Schaeffeler, M. Hitzl, U. Hofmann, M. Schwab, U. Brinkmann, M. Eichelbaum, M.F. Fromm. "*MDR1* gene polymorphisms and disposition of the P-glycoprotein substrate fexofenadine" *Br J Clin Pharmacol*; 53(5):526-534 (2002)
 5. M. Hitzl, S. Drescher, H. van der Kuip, E. Schaeffeler, J. Fischer, M. Schwab, M. Eichelbaum, M.F. Fromm. "The C3435T mutation in the human *MDR1* gene is associated with altered efflux of the P-glycoprotein substrate rhodamine 123 from CD 56⁺ natural killer cells" *Pharmacogenetics*; 11:293-298 (2001)
- Abstracts/Poster:
1. M. Hitzl, K. Klein, A.K. Nüssler, P. Neuhaus, H. Glaeser, S. Drescher, P. Fritz, U.M. Zanger, M. Eichelbaum and M.F. Fromm. "Influence of rifampin and omeprazole on MRP3-Expression in human enterocytes and hepatocytes" *Archives of Pharmacology*; 365(1):466 (2002)
 2. S. Drescher, E. Schaeffeler, M. Hitzl, U. Hofmann, M. Schwab, U. Brinkmann, M. Eichelbaum, M.F. Fromm. "Disposition of the P-Glycoprotein substrate fexofenadine in relation to *MDR1* Polymorphisms" *Archives of Pharmacology*; 365(1):450 (2002)
 3. M. Hitzl, S. Drescher, H. van der Kuip, E. Schaeffeler, J. Fischer, M. Schwab, M. Eichelbaum, M.F. Fromm. "CD 56⁺ natural killer cells from humans with the C3435T mutation of the *MDR1* gene display altered efflux of rhodamine 123" 3rd FEBS Advanced Lecture Course "ATP-Binding Cassette (ABC) Proteins: From Genetic Disease to Multidrug Resistance" (2001)
 4. S. Drescher, H. Glaeser, M. Hitzl, M. Eichelbaum, M.F. Fromm. "Digoxin elimination in humans by intestinal secretion" *Drug Metabolism Reviews*; 33(1):278 (2001)
 5. M. Hitzl, S. Drescher, H. van der Kuip, E. Schaeffeler, J. Fischer, M. Schwab, M. Eichelbaum, M.F. Fromm. "A mutation in the human *MDR1* gene determines efflux of the P-glycoprotein substrate rhodamine 123 in CD56⁺ natural killer cells" *Clin. Pharmacology*; 56(6-7):A49 (2000)
 6. S. Drescher, H. Glaeser, M. Hitzl, C. Herrlinger, H. van der Kuip, M. Eichelbaum, M.F. Fromm. "Direct intestinal excretion is an important route of digoxin elimination in humans" *Clin. Pharmacology*; 56(6-7):A54 (2000)
 7. M. Hitzl, J. Striessnig, B. Neuhuber, B.E. Flucher. „A Mutation in the β interaction domain of the Ca^{2+} channel α_{1C} subunit affects isradipine-binding and β association" *Biophysical Journal*; 78(1/2):1176 (2000)
 8. M. Hitzl, B. Neuhuber, U. Gerster, J. Striessnig, B.E. Flucher. "Effects of a Mutation (Y467S) in the β Interaction Domain of the Ca^{2+} Channel α_{1C} Subunit on its Association with β_{1a} " 6th Meeting of the Austrian Neuroscience Association (1999)
- Posterpreis 6th Meeting of the Austrian Neuroscience Association (1999)

9 Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen bedanken, die mich während meiner Doktorarbeit unterstützt haben.

Herrn Prof. Dr. Michel Eichelbaum danke ich für die Bereitstellung des interessanten Themas und die Möglichkeit, die Doktorarbeit am Dr. Margarete Fischer-Bosch Institut für Klinische Pharmakologie anzufertigen.

Bei Herrn Prof. Dr. Dieter H. Wolf vom Institut für Biochemie bedanke ich mich für seine Unterstützung und die Bereitschaft, diese Arbeit zu betreuen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD. Dr. Martin F. Fromm für die Betreuung dieser Arbeit, seine zahlreichen Anregungen und die ständige Diskussionsbereitschaft, die zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben.

Für die gute Zusammenarbeit und die Unterstützung im Labor danke ich Frau Silvia Kubitzsch.

Herrn Dr. Ulrich Zanger, Herrn Dr. Nüssler, Herrn Dr. Matthias Schwab und Herrn Dr. Berthold Hoher danke ich für die Bereitstellung und Organisation der Gewebeproben.

Herrn Dr. Heiko van der Kuip danke ich für die Einführung in das FACS-System und seine beständige Hilfsbereitschaft.

Ebenso danke ich Frau Dr. Elke Schäffeler für die Unterstützung bei der Durchführung der DHPLC-Analysen.

Bei Herrn Dr. Peter Fritz möchte ich mich für die Unterstützung bei den histologischen Untersuchungen und die Hilfsbereitschaft bei der Erstellung der Gewebesammlung bedanken.

Besonders herzlich möchte ich mich bei allen Kolleginnen und Kollegen am IKP für die gute Arbeitsatmosphäre, Hilfsbereitschaft und freundschaftliche Zusammenarbeit bedanken.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie danken, die mich während meines Studiums stets unterstützt hat.