

**Aufklärung genetischer Faktoren für die
Variabilität von Expression und Funktion des
membranständigen ABC-Transporters
P-glycoprotein (P-gp)**

Vom Fachbereich Chemie
der Universität Kaiserslautern
zur Verleihung des akademischen Grades
“Doktor der Naturwissenschaften”
genehmigte Dissertation

(D386)

vorgelegt von

Dipl.-Chem. Ragna Hussong

Betreuer der Arbeit: Prof. Dr. Dr. D. Schrenk

Kaiserslautern 2003

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 28. Februar 2003

Promotionskommission:

Vorsitzender	Prof. Dr. S. Ernst
1. Berichterstatter	Prof. Dr. Dr. D. Schrenk
2. Berichterstatter	Prof. Dr. G. Eisenbrand

Der experimentelle Teil dieser Arbeit wurde im Fachbereich Chemie, Fachrichtung Lebensmittelchemie und Umwelttoxikologie Universität Kaiserslautern zwischen April 1999 und Oktober 2002 durchgeführt.

Diese Arbeit wurde vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) finanziert.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Chemotherapeutische Behandlung maligner Tumore	1
1.2	Resistenzen bei der Krebstherapie	3
1.2.1	Das Phänomen der Mehrfachresistenz	3
1.2.2	Ursachen für die Ausbildung von Resistenzen	4
1.3	Die Familie der ABC-Transporter	6
1.3.1	Eigenschaften	6
1.3.2	Mitglieder der ABC-Superfamilie	7
1.3.3	Funktion und Bedeutung	9
1.4	MDR1 und P-glycoprotein	9
1.4.1	Lokalisation von MDR1	9
1.4.2	Struktur und Eigenschaften von P-glycoprotein	10
1.4.3	Physiologische Funktionen von P-glycoprotein	16
1.4.4	Funktionsweise und Transportmechanismen	18
1.5	Reversion der Pgp-vermittelten Multidrug Resistenz	19
1.6	Genetische Polymorphismen	21
2	Problemstellung	22
3	Material und Methoden	24
3.1	Zellkulturen	24
3.2	Medien	25
3.3	Puffer und Lösungen	25
3.4	Gele	28
3.5	Chemikalien	29
3.6	Enzyme	32
3.7	Antikörper	32
3.8	Kits	33
3.9	Geräte	33
3.10	Zellkulturmethoden	36
3.10.1	Herstellung von Ratten-Kollagenlösung und Beschichtung der Kulturplatten	36
3.10.2	Kultivierung	36

3.10.3	Bevorratung	36
3.10.4	Zellernte	37
3.11	Proteinisolierung	37
3.11.1	Gewinnung von Plasmamembranproteinen aus Zellkulturen	37
3.11.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	37
3.12	DNA-Isolierung	38
3.12.1	DNA-Isolierung aus Blut	38
3.12.2	DNA-Isolierung aus Zellkulturen	38
3.13	RNA-Isolierung	39
3.13.1	RNA-Isolierung aus Gesamtblut	39
3.13.2	RNA-Isolierung aus Zellkulturen	39
3.14	Polymerase Ketten Reaktion	40
3.14.1	Amplifizierung kleiner Fragmente	41
3.14.2	Amplifizierung großer Fragmente	43
3.15	Single Strand Conformation Polymorphism	44
3.15.1	Versuchsdurchführung	44
3.15.2	Silberfärbung der SSCP-Gele	45
3.16	Plasmidisolierung aus Bakterienkulturen	45
3.16.1	QIAprep Spin Miniprep Plasmidisolierung	45
3.16.2	Wizard Miniprep Plasmidisolierung	45
3.16.3	Plasmidisolierung nach der Kochmethode	46
3.17	Restriktionsverdau	46
3.18	Expressionsuntersuchungen	47
3.18.1	Untersuchung der RNA-Expression	47
3.18.2	Untersuchung der Proteinexpression	48
3.19	Transportassay mit Rhodamin	51
3.20	Klonierung eines DNA-Fragmentes in ein Vektorkonstrukt	53
3.21	Ortsgerichtete Mutagenese	54
3.22	Transfektion	57
3.22.1	Calciumphosphat Copräzipitationsmethode	57
3.22.2	Transfektion mittels FuGENE 6	58
3.23	Reportergenassay	58
4	Ergebnisse	60
4.1	Identifizierung natürlich auftretender Polymorphismen des humanen MDR1 Gens	60
4.1.1	MDR1-Polymorphismen in humanen peripheren Lymphozyten in Kaukasiern	60
4.1.2	MDR1-Polymorphismen in humanem Lebergewebe (Kaukasier)	64
4.1.3	MDR1-Polymorphismen in humanen peripheren Lymphozyten (Chilenen)	65
4.2	Funktionelle Charakterisierung genetischer Variationen	68
4.2.1	Bestimmung der MDR1-mRNA-Expression	68

4.2.2	Regulation der MDR1-Genexpression	75
4.2.3	Strategien zur Herstellung eines MDR1-Expressionssystems zur Untersuchung der Expression und Aktivität von P-glycoprotein	76
4.2.4	Ortsgerichtete Mutagenese zur Einführung der zu untersuchenden Polymorphismen in den Expressionsvektor	81
4.2.5	Transfektion in low-MDR1 exprimierende COS7-Zellen	82
4.2.6	Nachweis der P-glycoprotein Expression mittels Western-Blot	83
4.2.7	Bestimmung der Transportaktivität von P-glycoprotein	85
5	Diskussion	87
5.1	Identifizierung natürlich auftretender Polymorphismen des humanen MDR1-Gens	87
5.1.1	Genetische Variationen	87
5.1.2	Verteilung natürlicher MDR1-Polymorphismen in unterschiedlichen Populationen	89
5.2	Funktionelle Charakterisierung natürlich auftretender Polymorphismen des humanen MDR1-Gens	91
5.2.1	Analyse der <i>MDR1</i> -mRNA-Expression	91
5.2.2	Einfluss zweier Deletionen in der MDR1-Promotorregion auf die Regulation der Genexpression	93
5.2.3	Klonierung eines Expressionssystems für MDR1	93
5.2.4	Einfluss verschiedener codierender MDR1-Polymorphismen auf die P-glycoprotein-Expression	94
5.2.5	Einfluss verschiedener codierender MDR1-Polymorphismen auf die Transportaktivität von P-glycoprotein	95
5.3	Vergleich der Ergebnisse mit in der Literatur beschriebenen Studien	97
5.3.1	C3435T	97
5.3.2	G2677T	97
6	Zusammenfassung	100
	Literaturverzeichnis	101
A	Angaben zum MDR1-Gen	i
A.1	Sequenz des MDR1-Gens	i
A.2	Exon-Intron-Struktur des MDR1-Gens	i
B	Probandenstudien	iii
B.1	Periphere Lymphozyten (Studie I)	iii
B.2	Lebergewebe (Studie II)	iv
C	Vektoren	v

Abbildungsverzeichnis

1.1	MRP-vermittelter Transport	5
1.2	Abbildung der ATP-binding-cassette	7
1.3	Strukturvergleich einiger ABC-Transporter	7
1.4	Phylogenetischer Stammbaum	8
1.5	Darstellung des MDR1-Promotors	11
1.6	Topologie des humanen P-glycoproteins	13
1.7	Struktur einiger Pgp-Substrate	15
1.8	Pgp-Verteilung im Organismus	17
1.9	Modelle für den Transportmechanismus von Pgp	19
3.1	Zellkulturen	24
3.2	ECL-Reaktion	51
3.3	Struktur von Rhodamin123	51
3.4	Ortsgerichtete Mutagenese I	55
3.5	Ortsgerichtete Mutagenese II	56
3.6	firefly-Luciferase-katalysierte Oxidation	59
3.7	renilla-Luciferase-katalysierte Oxidation	59
4.1	Abbildung eines SSCP-Gels	61
4.2	Bandenmuster im RFLP	66
4.3	Röntgenfilm zur Bestimmung der <i>MDR1</i> -mRNA	68
4.4	mRNA-Expression in Lymphozyten (Probanden 5 -50)	69
4.5	mRNA-Expression in Lymphozyten (Probanden 51-95)	70
4.6	mRNA-Expression in humanen peripheren Lymphozyten (Kaukasier) in Abhängigkeit von verschiedenen SNPs	71
4.7	mRNA-Expression in Lebergewebe (Kaukasier)	73
4.8	mRNA-Expression in humanem Lebergewebe (Kaukasier) in Abhängigkeit von verschiedenen SNPs	74
4.9	Ergebnisse des Reportergenassays	76
4.10	Klonierung eines MDR1-Expressionssystems mittels Ligation	77
4.11	Herstellung des Expressionsvektors mittels Clonase	79
4.12	Sequenzen der mutierten Bereiche des pEx-MDR1-Vektors	82
4.13	Transfektionskontrolle	83

4.14	Transfektionseffizienz	83
4.15	P-glycoprotein-Expression	84
4.16	Densitometrische Auswertung der Proteinexpression	84
4.17	Ergebnisse des Rhodamin123-Transportassays	86
C.1	Schematische Darstellung des Reportergenvektors pGL2-basic (Promega).	v
C.2	Schematische Darstellung des Donorvektors pDONR (Invitrogen).	v
C.3	Schematische Darstellung des Zielvektors pDest12.2	vi
C.4	Schematische Darstellung des Expressionsvektors pCI-neo	vi
C.5	Schematische Darstellung des Expressionsvektors pCMV-Script	vii

Tabellenverzeichnis

1.1	Einteilung der ABC-Transporter in Unterfamilien	8
1.2	ABC-Transporter-vermittelte Krankheiten	10
1.3	Nomenklatur der MDR-Gene	12
1.4	Substrate von P-glycoprotein	14
1.5	Modulatoren für P-glycoprotein	20
3.1	Standard PCR-Temperaturprogramm	41
3.2	Primerpaare zur Amplifizierung der MDR1-Exons	42
3.3	PCR-Temperaturprogramm für große Fragmente I	43
3.4	PCR-Temperaturprogramm für große Fragmente II	44
3.5	Primerpaare für die RT-PCR	47
3.6	Temperaturprogramm für eine RT-Reaktion	48
3.7	Temperaturprogramm für eine radioaktive PCR	49
3.8	Temperaturprogramm für die QuikChange-Reaktion	57
4.1	Genetische Variationen des MDR1-Gens	62
4.2	Häufigkeitsverteilung genetischer MDR1-Variationen (Studie I)	63
4.3	Primerpaare zur Amplifizierung verschiedener MDR1-Exons mittels RT-PCR	64
4.4	Häufigkeitsverteilung genetischer MDR1-Variationen (Studie II)	65
4.5	Häufigkeitsverteilung genetischer MDR1-Variationen (Studie III)	67
4.6	mRNA-Expression in peripheren Lymphozyten (Kaukasier)	72
4.7	mRNA-Expression in humanem Lebergewebe (Kaukasier)	74
4.8	Primer zur Einführung zweier Deletionen in einen Reportergenvektor	75
4.9	Primer zur Amplifizierung der MDR1-cDNA	78
4.10	Primer mit <i>attB</i> -Adaptersequenzen	80
4.11	Primer zur Einführung verschiedener Mutationen in einen Expressionsvektor	81
4.12	Ergebnisse des Rhodamin123-Transportassays	85
5.1	Natürliche Polymorphismen des humanen MDR1-Gens	88
5.2	Ethnische Unterschiede in der Verteilung natürlicher SNPs	90
5.3	Effekte der codierenden Polymorphismen	96
5.4	Publikationen zum C3435T-Polymorphismus des humanen MDR1-Gens	98

B.1 Probandenstudie, periphäre Lymphozyten	iii
B.2 Probandenstudie, Lebergewebe	iv

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ABC	ATP-binding-cassette
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Antikörper
ALD	Adrenoleukodystrophie
AMV-RT	Avian Myeloblastosis Virus -Reverse Transcriptase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BCRP	Breast Cancer related Protein
bp	Basenpaare
Bisacrylamid	N,N'-Methylen-bis-acrylamid
BSEP (sPgp)	Bile Salt Export Pump (sister of P-glycoprotein)
C	Cytosin
cDNA	complementary Desoxyribonucleic Acid
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator
CIAP	Calf Intestinal Alkaline Phosphatase
CYP	Cytochrom P450
Da	Dalton
DE	Densitometrische Einheit
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic Acid
dNTP	2-Desoxynucleotid-5'-triphosphat
DS	Double Strand
DTT	Dithiothreitol

ECL	Enhanced Chemoluminescence
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
FE	Fluoreszenzeinheiten
FKS	Fötale Kälberserum
for	forward
5'-FR	5'-Flankierende Region
G	Guanin
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion
h	Stunde
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
HRP	Horseradish Peroxidase
Ig	Immunoglobulin
IHF	Integration Host Factor
IKP	Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institut für klinische Pharmakologie des Robert-Bosch Krankenhauses, Stuttgart
Int	Integrase
kDa	kilodalton
LB	Luria Bertani
LRP	Lung Resistance related Protein (= MVP: Major Vault Protein)
LTC ₄	Leukotrien C ₄
M	molar
MCS	Multiple Cloning Site
MDR	Multidrug Resistance
mg	Milligramm
min	Minute

MRP	Multidrug Resistance associated Protein
mRNA	messenger RNA
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
NBD	Nucleotide Binding Domain
nm	Nanometer
NTS	Natriumthiosulfat
OABP	Organic Anion Binding Protein
pa	pro analysis
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
Pgp	P-Glycoprotein
PM	Plasmamembran
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rev	reverse
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RNA	Ribonucleic Acid
RNAse	Ribonuclease
rpm	rounds per minute
RT	Reverse Transcriptase oder Raumtemperatur
s	Sekunde
SD	Standard Deviation
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SS	Single Strand
SSCP	Single Strand Conformation Polymorphism
SUR	Sulfonyl Urea Receptor
T	Thymin
T _A	Annealingtemperatur
TAP	Transporter associated with Antigen Processing
<i>Taq</i>	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borsäure-EDTA

TBS	Tris-Borsäure-Saline
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-teramethylethyldiamin
TM	Transmembran
Topo	Topoisomerase
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Uracil oder units
UV	Ultraviolett
V	Volt
WT	Wildtyp
Xis	Excisionase
ZNS	Zentralnervensystem

Kapitel 1

Einleitung

Seit Entstehung der pharmazeutischen Industrie im 19. Jahrhundert wurden in der medizinischen Forschung große Fortschritte erzielt. Durch die ständige Weiterentwicklung moderner Arzneimittel, die strenge Arzneimittelprüfung vor der Zulassung für den Markt und die Forschung auf dem medizinischen Gebiet werden die Heilungschancen für zahlreiche Krankheiten zunehmend verbessert. Diese Entwicklung führte im letzten Jahrhundert zu einer Steigerung der durchschnittlichen Lebenserwartung auf ca. 73 Jahre bei Männern und ca. 78 Jahre bei Frauen [WHO, 2001].

Dennoch steht die Wissenschaft auch heute noch einigen Krankheiten machtlos gegenüber. Obwohl in den letzten 40 Jahren erhebliche Fortschritte im Bereich der Krebsforschung erzielt werden konnten, gilt Krebs heute in den Industrienationen - neben Tod durch Herzversagen - als zweithäufigste Todesursache [WHO, 2001]. Jeder fünfte stirbt an einem malignen Tumor, und die Zahl der Krebserkrankungen nimmt stetig zu [Mutschler, 1991].

1.1 Chemotherapeutische Behandlung maligner Tumore

Neben der operativen Entfernung malignen Gewebes kommen hauptsächlich Bestrahlungsbehandlungen und Chemotherapie zum Einsatz. Bei Tumormetastasen, die weder operativ, noch durch Bestrahlung angegangen werden können, ist die Chemotherapie die bevorzugte Behandlungsmethode. Hier werden sogenannte Zytostatika eingesetzt, bei denen es sich um Substanzen handelt, die zur Schädigung bzw. Zerstörung von Tumorzellen führen. Somit besitzen diese Substanzen strenggenommen keine zytostatische, also wachstumshemmende, sondern eine zytotoxische Wirkung. Zytostatika greifen in den Zellzyklus ein. Entsprechend ihres Eingriffs wird zwischen *phasenspezifischen* bzw. *phasenunspezifischen* Zytostatika unterschieden. Aufgrund ihrer Funktionalität werden die Chemotherapeutika in verschiedene Gruppen unterteilt [Mutschler, 1991].

- **Mitosehemmstoffe** greifen ausschließlich in die Metaphase des Zellzyklus ein, wo sie die Ausbildung der Teilungsspindel verhindern und somit eine Hemmung der Zellteilung bewirken. Zu diesen sogenannten Spindelgiften gehören neben dem

lange bekannten Colchicin auch die Vinca-Alkaloide Vinblastin und Vincristin. Die Taxus-Alkaloide bzw. Taxane (Taxol, Docetaxel) wirken ebenfalls in der Metaphase, jedoch indem sie den koordinierten Umbau tubulärer Elemente stören und so zu einem Metaphase-Arrest führen.

- **Alkylantien** sind reaktionsfähige Zytostatika, die phasenunspezifisch durch Alkylierung von Nucleinsäuren zu verschiedenartigen DNA-Veränderungen (cross-link-Bildung, Basen-Fehlpaarung, etc.) führen, wodurch die Replikation und somit die Zellteilung beeinträchtigt wird. Aufgrund der Ähnlichkeit mit dem Effekt ionisierender Strahlung werden Alkylantien auch als “Radiomimetrika” bezeichnet. Zu den alkylierenden Zytostatika gehören Stickstoff-Lost Derivate (Cyclophosphamid, Melphalan), Aziridine (Thiotepa), Sulfonsäureester (Busulfan), N-Nitrosoharnstoff-Derivate (Carmustin, Nimustin) sowie bestimmte Platin-Komplexe (Cis-Platin).
- **Antimetaboliten** stören den Stoffwechsel und die Zellteilung durch Verdrängung natürlicher Stoffwechselbausteine (Metaboliten) und Bildung funktionsuntüchtiger Makromoleküle oder durch Blockade von Enzymen durch Komplexbildung. Zu den Antimetaboliten zählen die Folsäureantagonisten (Methotrexat) sowie die Antagonisten von Purin- und Pyrimidin-Basen (Mercaptopurin, Thioguanin, Fluorouracil).
- **Antibiotika**, die aufgrund ihrer starken Toxizität nicht zur Behandlung von Infektionskrankheiten eingesetzt werden können, finden ebenfalls häufig Anwendung als Chemotherapeutika. Actinomycine (Actinomycin D), Anthracycline (Doxorubicin, Daunorubicin), Bleomycin, Mitomycine (Mitomycin C) und das Anthrachinon-Derivat Mitoxantron gehören zur Gruppe dieser zytostatisch wirksamen Antibiotika.
- **Hormone und Hormonantagonisten** können erfolgreich bei Tumoren mit hormonabhängigem Wachstum (Prostata-, Mamma-, Uteruskarzinome) eingesetzt werden, obwohl sie nicht zu den Zytostatika zählen. Die Hormontherapie ist i. a. wesentlich verträglicher für den Patienten als die Behandlung mit zytotoxischen Chemotherapeutika. Zum Einsatz kommen Östrogene, Antiöstrogene, Gestagene sowie Hypothalamushormone.
- **Topoisomerase II α -Inhibitoren** führen durch Stabilisierung ternärer Komplexe mit Topoisomerase II α und der DNA zu dauerhaften DNA-Doppelstrangbrüchen. Etoposid (Etoposid, Tenoposid) wirken beispielsweise auf diese Art. Auch einige Alkylantien und Antibiotika können die Topoisomerase II α hemmen.

Heutzutage ist eine erfolgreiche Behandlung im Sinne einer Lebensverlängerung mit den oben aufgeführten Chemotherapeutika bei zahlreichen Tumorarten möglich. Voraussetzung dafür ist jedoch, dass der Tumor als solcher rechtzeitig erkannt wurde. Zu den relativ gut therapierbaren Krebserkrankungen gehören beispielsweise Neuroblastome, Leukämie, Lymphome und Sarkome [Gottesman & Pastan, 1993].

Ein großer Nachteil bei der Behandlung mit Chemotherapeutika ist jedoch die recht unspezifische Wirkung dieser Substanzen. Nicht nur Tumorzellen werden von den eingesetzten Zytostatika angegriffen, sondern es werden gleichzeitig Schäden an gesunden Zellen verursacht. Davon sind hauptsächlich Gewebe mit besonders hohen Proliferationsraten (z. B. Knochenmark, Keimdrüsen, Darmschleimhaut, Haare) betroffen [Mutschler, 1991]. Daneben haben Chemotherapeutika wie z. B. Alkylantien selbst kanzerogenes Potential, denn sie können häufig zur Schädigung der DNA gesunder Zellen führen.

1.2 Resistenzen bei der Krebstherapie

Ein weiterer wichtiger Aspekt bei der Behandlung maligner Tumoren mit Zytostatika ist die häufig zu beobachtende Resistenzentwicklung gegenüber den eingesetzten Substanzen, welche die Chancen für eine Langzeitregression oder Heilung erheblich herabsetzt.

Die Unempfindlichkeit von Tumoren gegenüber Zytostatika ist auf sehr unterschiedliche Ursachen zurückzuführen [Lehnert, 1996]. Zum einen kann falsche Medikamentierung eine Rolle spielen, wie z. B. ein ungeeignetes Applikationsschema der verwendeten Medikamente, zu geringe Konzentration der Zytostatika am Wirkort, Kombination von Substanzen, die sich in ihrer Wirkung abschwächen oder auch die Bildung inaktivierender Antikörper. Daneben spielen zahlreiche Gründe auf zellulärer Ebene eine wichtige Rolle für die Ausbildung von Resistenzen. Diese werden in Kapitel 1.2.2 näher erläutert. Um dieses Phänomen der Mehrfachresistenz zu umgehen, wird häufig eine Behandlung mit Kombinationspräparaten angewendet. Durch diese Behandlungsstrategie werden bei bestimmten Tumorarten gute Heilungserfolge erzielt (z. B. bei Morbus Hodgkin, Leukämie des Kindesalters, großzelligen Lymphomen oder Hodenkrebs [Bellamy & Dalton, 1994]), jedoch ist bei vielen Krebserkrankungen auch eine solche Kombinationstherapie nicht wirksam [Kartner & Ling, 1989].

1.2.1 Das Phänomen der Mehrfachresistenz

Unter dem Phänomen der Mehrfachresistenz versteht man das Auftreten einer Kreuzresistenz selektionierter Säugerzellen gegen eine Vielzahl strukturell oder chemisch nicht verwandter zytotoxischer Substanzen. Bei den betroffenen Verbindungen handelt es sich i. a. um hydrophobe Naturstoffe mit komplizierter Molekülstruktur, die häufig auch als Arzneimittel Verwendung finden.

Das Phänomen einer Kreuzresistenz wird oftmals bei der Behandlung maligner Tumore mit Chemotherapeutika beobachtet. Man bezeichnet diese Mehrfachresistenz als Multidrug Resistance, kurz MDR. Dabei wird zwischen intrinsischer MDR und erworbener MDR unterschieden [Chin et al., 1993]. Intrinsische MDR liegt dann vor, wenn ein Tumor schon a priori eine Mehrfachresistenz aufweist. Dies ist beispielsweise häufig bei Tumoren des Gastrointestinaltraktes, der Leber oder der Niere zu beobachten. Erworbene MDR tritt erst nach einer Behandlung mit Chemotherapeutika auf. Verantwortlich

dafür ist zumeist die während der Therapie stattfindende Selektionierung primär resistenter Tumorzellen durch die eingesetzten Medikamente. Daneben ist eine Resistenzausbildung der Krebszellen während der Therapie aufgrund von Spontanmutationen möglich [Choi et al., 1988]. Im Unterschied zu den parentalen Zellen weisen die mehrfach resistenten Zellen oft eine verminderte Arzneimittelaufnahme bei gleichzeitig erhöhtem Efflux auf. Dies resultiert in einer verminderten Anreicherung der betroffenen Substanzen in der Zelle [Endicott & Ling, 1989].

Die Mehrfachresistenz gegen zytotoxisch wirksame Medikamente stellt das wohl größte Problem bei der chemotherapeutischen Behandlung maligner Tumore dar. Aus diesem Grund werden zahlreiche Anstrengungen unternommen, um Ursachen und Mechanismen der Resistenzentwicklung zu erforschen und so Möglichkeiten zu deren Umgehung zu entwickeln.

1.2.2 Ursachen für die Ausbildung von Resistenzen

Im Jahr 1970 wurde von Biedler und Riehm erstmals eine Kreuzresistenz von Lungenzellen des chinesischen Hamsters, die für eine Colchicinresistenz selektioniert worden waren, gegen Vinblastin beschrieben [Biedler & Riehm, 1970]. Seither steht die Untersuchung der für eine solche Mehrfachresistenz verantwortlichen Ursachen im Mittelpunkt zahlreicher wissenschaftlicher Arbeiten. Durch *in vitro* Versuche konnte gezeigt werden, dass die in Kapitel 1.2.1 beschriebene Multidrug Resistenz in der Mehrzahl der Fälle in Zusammenhang mit der vermehrten Expression des MDR1-Genproduktes P-glycoprotein (Pgp) in den Tumorzellen steht, welches über aktiven Efflux die betroffenen Substanzen aus der Zelle ausschleusen kann [Endicott & Ling, 1989, Gottesman & Pastan, 1993, Germann, 1996]. Zellen, die den MDR-Phänotyp exprimieren, können nach Exposition mit einem einzigen zytotoxischen Medikament, wie z. B. Vincaalkaloiden, Anthracyclinen, Taxanen oder Actinomycin D P-glycoprotein überexprimieren. Als Folge davon ist nicht nur eine Resistenzentwicklung gegenüber dem selektiven Agens, sondern auch eine Kreuzresistenz gegenüber einem breiten Spektrum strukturell und funktionell unterschiedlicher Substanzen wie z. B. Antibiotika und Alkaloiden zu verzeichnen [Seelig, 1998].

Zu den Proteinen, die Multidrug Resistenz vermitteln, gehören neben dem schon genannten P-glycoprotein (Pgp) [Gerlach et al., 1986a, Endicott & Ling, 1989] z. B. auch das Multidrug Resistance-associated Protein (MRP) [Cole et al., 1992] und das Breast Cancer related Protein (BCRP) [Allikmets et al., 1998], welche zu den Mitgliedern der sogenannten ABC-Transporterfamilie (siehe Kapitel 1.3) gehören. Ein weiteres MDR-vermittelndes Transportprotein ist das Lung Resistance-related Protein (LRP), das zu den sogenannten Vault-Proteinen zählt. Die durch diese Transportproteine vermittelte Resistenz wird als (transportbasierte) klassische Multidrug Resistenz bezeichnet.

- **Das Multidrug Resistance-associated Protein (MRP)**

In einer mehrfach resistenten Zelllinie (H69AR = kleinzelliges Lungenkarzinom), die keine Pgp-Überexpression aufweist, wurde von Cole et al. erstmals MRP1 identifiziert und kloniert [Cole et al., 1992]. Es ist aus 1522 Aminosäuren aufgebaut

und wird in Lunge, Hoden sowie peripheren mononukleären Blutzellen exprimiert. Das MRP1-codierende Gen weist eine Größe von über 200 kb auf und besitzt insgesamt 31 Exons [Grant et al., 1997]. Isotopische *in situ* Hybridisierung ermöglichte die Lokalisierung des MRP1-Gens auf Chromosom 16p13.1 [Cole et al., 1992].

Ebenso wie auch Pgp ist MRP1 eine plasmamembranständige Effluxpumpe. Obwohl diese beiden Transporter lediglich eine Sequenzhomologie von ca. 15 % aufweisen, ist das Profil der chemotherapeutischen Agenzien, gegenüber denen eine Resistenz vermittelt wird, ähnlich [Slapak et al., 1994, Hasegawa et al., 1995, Kauffmann et al., 1997]. *In vitro* Studien haben ergeben, dass die Überexpression von entweder MRP1 oder Pgp die gleichzeitige Überexpression des jeweils anderen nicht ausschließt [Slapak et al., 1994, Hasegawa et al., 1995]. Ungeklärt ist jedoch die Frage, wodurch die bevorzugte Überexpression des einen oder anderen Transportproteins festgelegt wird. Inzwischen wurden sieben verschiedene MRP-Isoformen identifiziert.

Anders als Pgp transportiert MRP bevorzugt Konjugate mit Glutathion, wie z. B. bei Leukotrien C₄ [Jedlitschki et al., 1994], Glucuronsäure oder Sulfonate. In Abbildung 1.1 ist schematisch der MRP-vermittelte Transport dargestellt.

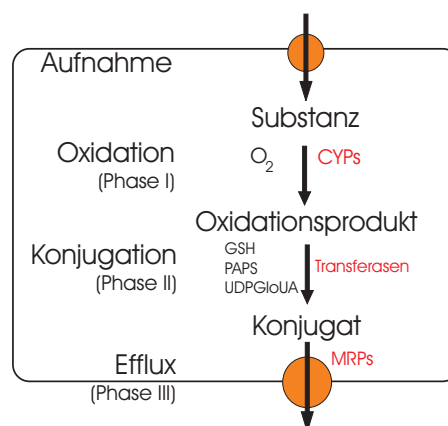


Abbildung 1.1: Abbildung der Phasen I, II und III des MRP-vermittelten Transports.

- **Das Breast Cancer-related Protein (BCRP)**

Allikmets et al. charakterisierten 1998 ein ABC-Transportergen, welches in großen Mengen in der Placenta exprimiert wird. Das auf Chromosom 4q22 lokalisierte Gen liefert zwei Transkripte, die sich am 5'-Ende unterscheiden, aber trotzdem für das gleiche Protein codieren [Allikmets et al., 1998]. Das 16 Exons umfassende und etwa 66 kb große Gen [Bailey-Dell et al., 2001] gehört zu den sogenannten "half" Transportern. BCRP spielt eine entscheidende Rolle bei speziellen Brusttumoren durch Resistenzvermittlung gegen Mitoxantron, Doxorubicin sowie Daunorubicin [Doyle et al., 1998]. Ross et al. detektierten das BCRP in der atypischen multi-drug resistenten humanen Brustkrebs-Zelllinie MCF-7/AdrVp. Es konnte gezeigt

werden, dass durch Transfektion des BCRP in drug-sensitive MCF-7 Zellen der MCF-7/AdrVp-Phänotyp vermittelt wird [Ross et al., 2000].

- **Das Lung Resistance-related Protein (LRP)**

Ebenfalls in einer nicht P-glycoprotein-vermittelten mehrfach resistenten Lungenkrebs-Zelllinie wurde 1993 die Überexpression des sogenannten LRPs detektiert [Scheper et al., 1993]. Zwei Jahre später machten Scheffer et al. die Feststellung, dass es sich bei dem 110 kDa großen LRP um den Hauptvertreter der sogenannten Vault-Proteine handelt [Scheffer et al., 1995], weshalb LRP auch den Namen Major Vault Protein (MVP) trägt. Das zugehörige MVP-Gen enthält 15 Exons und befindet sich in der gleichen chromosomalen Region (16p13.1-p11.2) wie die MDR-vermittelnden MRP-Gene [Lange et al., 2000]. LRP wird in den meisten normalen Geweben exprimiert. Höhere Gehalte an LRP finden sich in Epithelzellen mit sekretorischer und exkretorischer Funktion, wie Bronchialzellen und Darmgewebe. In multidrug resistenten Zellen (z. B. Lungenkarzinomen, Fibrosarkomen, Brustkrebs und Melanomen) wird LRP häufig überexprimiert. In nicht Pgp-vermittelten multidrug resistenten Zellen ist häufig eine gleichzeitige Überexpression von LRP und MRP zu beobachten [Ramachandra & Melnick, 1999]. Die genaue Funktion des Lung Resistance-related Proteins ist bisher nicht bekannt.

Neben den MDR-verwandten Proteinen wurden auch zahlreiche andere Mechanismen für das Auftreten von Mehrfachresistenz *in vitro* dokumentiert. Sie können sowohl auf Veränderungen der Target-Enzyme und Proteine basieren (wie bei Topoisomerase II) [Beck et al., 1993], als auch auf verstärkter Fremdstoff-Entgiftung wie im Falle des Glutathion-S-Transferase Gens [Morrow & Cowan, 1990]. Veränderungen im zellulären Metabolismus sowie die verstärkte Fähigkeit zur DNA-Reparatur oder auch fehlschlagende Apoptose sind weitere Gründe. Dies ist beispielsweise bei Genen des Bcl-2 Pathways der Fall [Reed, 1995]. Diese Mechanismen sind verantwortlich für die sogenannte nicht-klassische Multidrug Resistenz.

1.3 Die Familie der ABC-Transporter

1.3.1 Eigenschaften

Die Superfamilie der sogenannten ABC-Transporter, auch Traffic-ATPasen genannt, ist eine der größten Proteinfamilien, die sowohl in Prokaryonten, als auch in Eukaryonten bekannt ist. Gebildet wird diese Familie von großen Membranproteinen, die die Fähigkeit besitzen, unter Verbrauch von ATP zahlreiche Substanzen entgegen steiler Konzentrationsgradienten durch Membranen zu transportieren. Die Bezeichnung ABC-Transporter basiert auf der charakteristischsten Eigenschaft aller Mitglieder dieser Superfamilie, der hochkonservierten ATP-binding-cassette [Higgins, 1992]. In allen ABC-Transportern sind zwei Kern-Konsensussequenzen vorhanden, welche als Walker Motiv A bzw. B bezeichnet werden und direkt in die ATP-Bindung involviert sind [Walker, 1982].

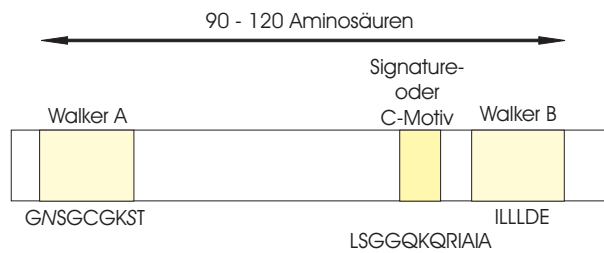


Abbildung 1.2: Schematische Abbildung der hochkonservierten ATP-binding-cassette. Die AS-Konsensussequenzen sind jeweils als Standard Einbuchstaben-Code angegeben (hier: ABCB-Subfamilie).

Der konservierte Abstand von 90-120 Aminosäuren zwischen diesen beiden Kern-Konsensussequenzen, sowie das sogenannte Signature- oder C-Motiv direkt upstream der Walker-B-Site unterscheidet die Mitglieder der ABC-Superfamilie von anderen ATP-bindenden Proteinen, wie z. B. den Kinasen [Higgins et al., 1986, Hyde et al., 1990]. In Abbildung 1.2 ist die hochkonservierte ATP-Bindungsstelle schematisch dargestellt.

Während die Gesamtsequenzhomologie dieser Nucleotidbindungsstelle (NBD) für alle ABC-Transporter ca. 30 % beträgt, gibt es signifikante Unterschiede in der Primärstruktur der Transmembran-Domänen (TM) [Germann, 1996]. Die nachfolgende Abbildung 1.3 zeigt schematisch die Struktur einiger ABC-Transporter im Vergleich.

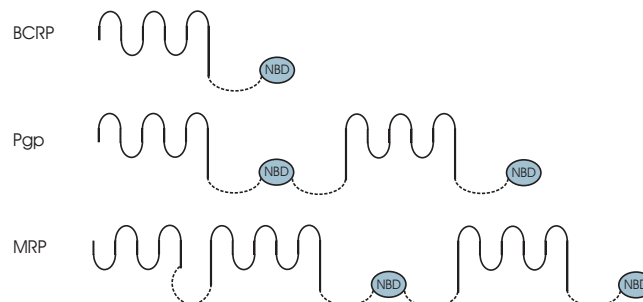


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der strukturellen Organisation einiger ABC-Transporter im Vergleich. Die meisten Mitglieder der ABC-Familie sind typischerweise als sogenannte "full"-Transporter organisiert, wie z. B. bei den Pgps. Die Anordnung der NBDs und TM-Regionen kann variieren. Die MRPs haben zusätzliche fünf TM-Helices (Abbildung modifiziert nach [Dean & Allikmets, 2001]).

1.3.2 Mitglieder der ABC-Superfamilie

Bislang wurden im humanen Genom 48 verschiedene ABC-Transportergene identifiziert, die für die ABC-Proteine codieren und auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert sind [Müller, 2001, Dean et al., 2001]. Aufgrund von Aminosäuresequenz-Analysen der

ATP-bindenden Domänen wurden die 48 humanen ABC-Transporter in sieben Unterfamilien eingeteilt, welche - abgesehen von OABP - mehrere Mitglieder enthalten. Die Gene der einzelnen Unterfamilien weisen daneben zumeist auch eine beachtliche Übereinstimmung in ihren TM-Domänen auf. Dennoch korrespondiert die Funktion der ABC-Gene häufig nur wenig mit der Einteilung in die verschiedenen Untergruppen. Oft zeigen Gene unterschiedlicher Subfamilien mehr Ähnlichkeit in der Substraterkennung als Gene der gleichen Untergruppe [Gottesman & Ambudkar, 2001]. In Tabelle 1.1 ist die Einteilung der ABC-Transporter in die sieben Subfamilien gezeigt. Die Zugehörigkeit einiger Gene der ABCB- und ABCC-Subfamilien wird in Form eines phylogenetischen Stammbaumes in Abbildung 1.4 dargestellt.

Trivialname	Neue Bezeichnung	Mitglieder
ABC1	ABCA	12
MDR / TAP	ABCB	11
MRP / CFTR	ABCC	12
ALD	ABCD	4
OABP	ABCE	1
GCN 20	ABCF	3
White	ABCG	5

Tabelle 1.1: Einteilung der Mitglieder der ABC-Transporterfamilie in sieben Subfamilien aufgrund der Sequenzhomologie ihrer ATP-binding-cassette [Müller, 2001].

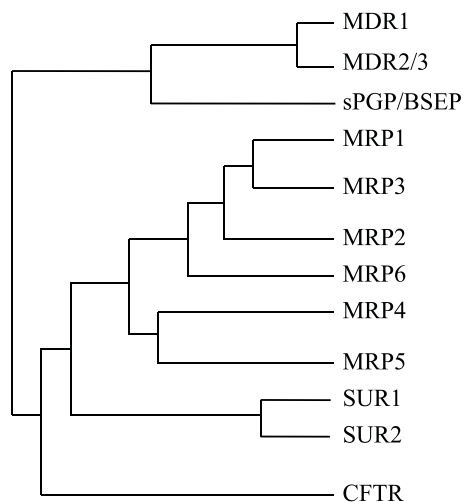


Abbildung 1.4: Abbildung eines Teils des phylogenetischen Stammbaums der ABC-Transporter-Superfamilie [Borst et al., 2000, Dean & Allikmets, 2001]. Gezeigt sind Mitglieder der ABCB- und ABCC-Unterfamilie.

1.3.3 Funktion und Bedeutung

Die von den Transportergenen codierten Membranproteine fungieren als zelluläre Effluxpumpen zur Kontrolle intrazellulärer Konzentrationen potentiell schädlicher Substanzen. Sie können zahlreiche Substanzklassen, wie z. B. Ionen, Phospholipide, Polysaccharide, Steroide, Aminosäuren sowie Gallensalze und auch Peptide für die Antigenproduktion entgegen dem Konzentrationsgradienten durch Membranen transportieren [Kerb et al., 2001, Borst & Oude Elferink, 2002]. Die exakte Funktionsweise der ABC-Transporterproteine ist bislang nicht geklärt. Für die unterschiedlichen Transporter werden verschiedene Modelle für den Transportmechanismus diskutiert.

Neben ihrer physiologischen Funktion als Lipidtransporter bzw. bei der biliären Ausscheidung wird einigen Proteinen der ABC-Familie eine bedeutende Rolle beim Transport von Medikamenten und deren Metaboliten zugeschrieben. Insgesamt sind acht der 48 humanen ABC-Transporter an der Vermittlung von Mehrfachresistenz beteiligt (MDR1, MRP1, 2, 3, 4, 5, 6, BCRP) [Gottesman & Ambudkar, 2001]. Andere fungieren als Peptidtransporter, die an der Antigenpräsentation beteiligt sind, wie z. B. TAP1 und 2 [Allikmets et al., 1996]. Aufgrund ihrer Transporteigenschaften sind die Mitglieder der ABC-Superfamilie somit nicht nur für die Physiologie des Menschen von Bedeutung, sondern es wird ihnen auch eine wichtige Rolle in der Pharmakologie und Toxikologie zugeschrieben. Als Hauptaufgaben der ABC-Transporter können folgende zwei Funktionen genannt werden:

1. Genereller Schutz des gesamten Organismus vor potentiell toxischen Substanzen durch aktiven Transport aus dem Zellinneren in den Extrazellularraum
2. Steuerung der Zellfunktion durch gezielten Transport von Zellbestandteilen

Daneben spielen einige Mitglieder der ABC-Familie aber auch eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung humaner Erbkrankheiten, die durch genetische Defekte der entsprechenden Transporter hervorgerufen werden. In Tabelle 1.2 sind diese Krankheiten sowie die damit in Verbindung stehenden ABC-Transporter aufgelistet [Dean & Allikmets, 2001, Borst & Oude Elferink, 2002].

1.4 MDR1 und P-glycoprotein

1.4.1 Lokalisation von MDR1

Das P-glycoprotein codierende Multidrug Resistance 1 (MDR1) Gen wurde auf dem langen Arm von Chromosom 7 (7q21) lokalisiert [Fojo et al., 1986, Callen et al., 1987]. Es setzt sich aus insgesamt 29 Exons zusammen, die von -1 bis 28 nummeriert sind. Diese Nummerierung spiegelt die Tatsache wider, dass die *MDR1*-mRNA von zwei verschiedenen Promotoren ausgehend transkribiert werden kann [Chen et al., 1990]. Dabei handelt es sich um einen upstream Promotor und einen downstream Promotor, wobei letzterer in den meisten Zelltypen bevorzugt exprimiert wird [Ueda et al., 1987a]. 1987

Transporter	Krankheit
ABC1 (ABCA1)	Tangier Krankheit
ABCR (ABCA4)	Stargard Krankheit (STGD) altersbedingte Macula Degeneration (AMD) Retinitis Pigmentosa
TAP2 (ABCB3)	Immundefizienz
PGY3 (ABCB4)	progressive familiäre intrahepatische Cholestasis (PFIC3)
ABC7 (ABCB7)	sideroplastische Anämie und Ataxie
BSEP (ABCB11)	progressive intrahepatische Cholestasis (ICP)
MRP2 (ABCC2)	Dubin-Johnson-Syndrom (DJS)
MRP6 (ABCC6)	Pseudoxanthoma elasticum
CFTR (ABCC7)	Cystische Fibrose (Mucoviszidose)
SUR1 (ABCC8)	familiäre persistente Hyperinsulinämie des Kindesalters
ALD (ABCD1)	Adrenoleukodystrophie
White3 / 4 (ABCG5 / 6)	Sitosterolämie

Tabelle 1.2: Humane Krankheiten, an deren Entstehung verschiedene ABC-Transporter maßgeblich beteiligt sind.

wurde die gesamte Promotorregion des humanen MDR1-Gens von Ueda et al. kloniert und sequenziert [Ueda et al., 1987b]. Der upstream Promotor des MDR1-Gens befindet sich am Anfang von Exon -1, während der downstream Promotor in Exon 1 lokalisiert ist. Die Haupttranskriptions-Initiationsstelle liegt bei Nukleotid -148, das ATG Translations-Startcodon in Exon 2. Die Exon-Intron-Struktur ist im Anhang in tabellarischer Form wiedergegeben. Die proteincodierende Sequenz des MDR1-Gens umfasst 27 Exons, von denen 14 die linke und 13 die rechte Hälfte des Proteins codieren [Chen et al., 1990].

Wie sich herausstellte, gehört MDR1 zu einer Gruppe von “housekeeping” Genen, die keine TATA-Box besitzen, aber ein Initiatorelement upstream der Haupttranskriptions-Startstelle haben. Dabei handelt es sich um eine invertierte CCAAT-Box (Y-Box) zwischen -219 und -229. Daneben besitzt der humane MDR1-Promotor einige Erkennungssequenzen für Transkriptionsfaktoren, darunter auch die für Sp1, NF-Y (CP-1), YB-1 und YY-1, sowie eine GC-reiche Region upstream der Haupttranskriptions-Startstelle [Sundseth et al., 1997]. In Abbildung 1.5 wird die Promotorstruktur des humanen MDR1-Gens schematisch dargestellt.

1.4.2 Struktur und Eigenschaften von P-glycoprotein

Wie zuvor beschrieben, gilt eine Überexpression des MDR1-Genproduktes P-glycoprotein als häufigste Ursache für das Auftreten von Kreuzresistenzen gegen verschiedene Chemotherapeutika in der Tumorbehandlung. Transfektionsstudien mit full-length MDR1-cDNA haben ergeben, dass diese die Ausbildung eines kompletten MDR-Phänotyps in drug-sensitiven Zellen bewirkt [Ueda et al., 1987]. Bei dem durch das MDR1-Gen codierten Protein Pgp handelt es sich um ein plasmamembranständiges Glycoprotein, das zu

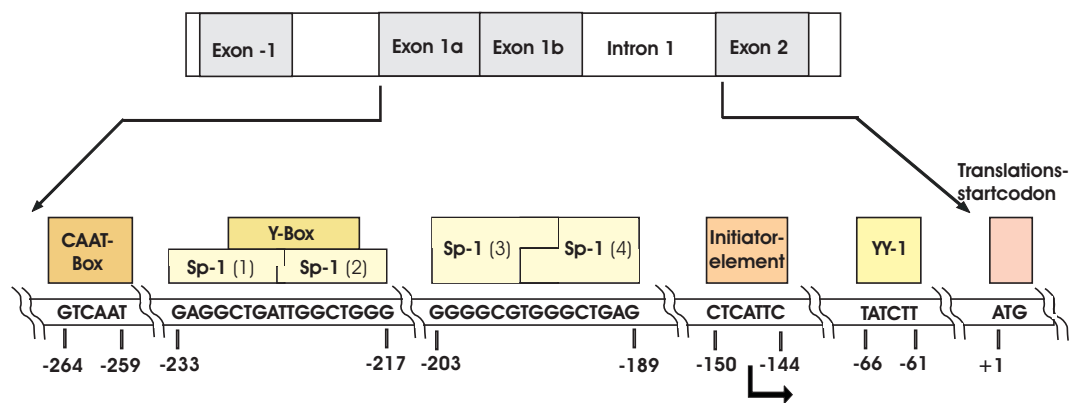


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung des humanen MDR1-Promotors und wichtiger Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren

den Mitgliedern der in Kapitel 1.3 beschriebenen, hochkonservierten Superfamilie der ABC-Transporter zählt [Higgins & Gottesman, 1992, Doige & Ames, 1993].

P-glycoprotein ist der wohl bekannteste und bislang auch bestuntersuchte Vertreter der Multidrug Resistenz-vermittelnden Proteine. Es wurde 1976 erstmals von Juliano & Ling in Ovarialzellen des chinesischen Hamsters gefunden [Juliano & Ling, 1976]. Seither ist der Fokus zahlreicher Untersuchungen auf Pgp gerichtet.

Vorkommen und Nomenklatur

P-glycoprotein wird nicht nur beim Menschen gefunden, sondern bei praktisch allen Organismen. Die Sequenzhomologie der einzelnen Transporter zwischen den unterschiedlichen Spezies ist beachtlich. So wird für P-glycoprotein bei Vergleich der gesamten Aminosäuresequenz des Menschen und der Maus eine Homologie von ca. 75 % gefunden. Bei Mensch und Hamster beträgt sie sogar 90 % [Ueda et al., 1987b].

Durch Klonierung konnte bestätigt werden, dass es beim Menschen zwei unterschiedliche Isoformen von P-glycoprotein gibt, während beim Nager sogar drei verschiedene Isoformen existieren (siehe Tabelle 1.3) [Lee et al., 1993]. Trotz der hohen Sequenzidentität von mehr als 70 % unter allen P-glycoproteinen werden die MDR-Genprodukte aufgrund ihrer unterschiedlichen Funktionen und Eigenschaften in zwei Klassen eingeteilt. Klasse 1 beinhaltet die Arzneimittel-transportierenden P-glycoproteine oder Multidrug-Transporter. Dazu zählen humanes MDR1 [Chen et al., 1986], Maus mdr1a und mdr1b [Gros et al., 1986], Hamster pgp1 und pgp2 [Gros et al., 1986a] sowie mdr1a und mdr1b der Ratte. Zur zweiten Klasse gehören die nicht Arzneimittel-transportierenden P-glycoproteine, die von humanem MDR2/3 [Schinkel et al., 1991], Maus mdr2 [Gros et al., 1988] sowie Hamster pgp3 [Endicott et al., 1991] codiert werden. Alle drei Isoformen von Pgp werden in verschiedenen gesunden Geweben exprimiert. Wie aus zahlreichen Studien hervorgeht, liefern P-glycoproteine der Klasse 1 mehrfach resistente Zellen, während Pgps der Klasse 2 keine Mehrfachresistenz-vermittelnden Funktionen zugeschrieben werden

Organismus	Drug Transporter		Phosphatidylcholin Translokatoren
Mensch	MDR1		MDR3
Maus	mdr1a	mdr1b	mdr2
Ratte	mdr1a	mdr1b	mdr2
Hamster	pgp1	pgp2	pgp3

Tabelle 1.3: Nomenklatur der Multidrug Resistance (MDR) Gene bei verschiedenen Säugern.

[Ueda et al., 1987, Schinkel et al., 1991]. Aus Studien an mdr2 knock-out Mäusen geht hervor, dass dieses als Phosphatidylcholin-spezifische Translokase in der kanalikulären Membran von Hepatocyten fungiert [Smit et al., 1993], da diese mdr2 defizienten Mäuse nicht dazu in der Lage waren, Phospholipid in die Galle zu transportieren. In neueren Studien wird jedoch berichtet, dass auch humanes MDR3 in die Ausbildung von Kreuzresistenzen involviert zu sein scheint [Smith et al., 2000].

Zur Orientierung ist in Tabelle 1.3 eine Übersicht über die Nomenklatur der Multidrug Resistance Gene bei Mensch, Maus, Ratte und Hamster gegeben.

Molekülstruktur

Humanes P-glycoprotein setzt sich aus 1280 Aminosäuren zusammen und hat ein Molekulargewicht von 170 kDa. Ein allgemein anerkanntes Modell für die Topologie von Pgp basiert im Wesentlichen auf computerunterstützten Hydrophatie-Berechnungen und Aminosäure-Sequenzvergleichen mit bakteriellen Transportproteinen [Chen et al., 1986, Gros et al., 1986, Gerlach et al., 1986, Higgins et al., 1986, Hyde et al., 1990].

Aus diesem Modell geht hervor, dass das P-glycoprotein-Molekül eine bilaterale Symmetrie besitzt. Es ist aus zwei homologen Hälften von jeweils 590 Aminosäuren aufgebaut, welche über eine 60 AS lange Linkerregion miteinander verknüpft sind [Chen et al., 1986, Gros et al., 1986, Gerlach et al., 1986, Ueda et al., 1986]. Daneben gibt es eine zusätzliche kurze Sequenz von 40 AS am Start. Jede dieser Hälften, die zueinander 43 % Sequenzhomologie aufweisen, besitzt ein kurzes, hydrophiles amino-terminales Segment, sechs Transmembran-Domänen (TM), die durch hydrophile Loops separiert sind, und eine hydrophile carboxy-terminale Region [Ambudkar et al., 1992, Gottesman & Pastan, 1993]. N- und C-Terminus sowie die beiden Nucleotid-Bindungsstellen (NBD) sind jeweils intrazellulär lokalisiert. Aufgrund der ringförmigen Orientierung der TM-Domänen in der Plasmamembran bildet P-glycoprotein eine Pore oder eine Art Kanal [Higgins, 1992, Rosenberg et al., 1997]. Abbildung 1.6 zeigt schematisch das 12-TM-Modell des humanen P-glycoproteins [Chen et al., 1986, Gottesman & Pastan, 1993, Germann, 1996].

Mit Hilfe von Epitop-Insertions-Untersuchungen gelang Kast et al. die experimentelle Bestätigung dieses berechneten 12-TM-Modells von P-glycoprotein [Kast et al., 1995]. Ebenfalls konsistent mit diesem Modell sind Lokalisations-Daten, die aus Studien mit

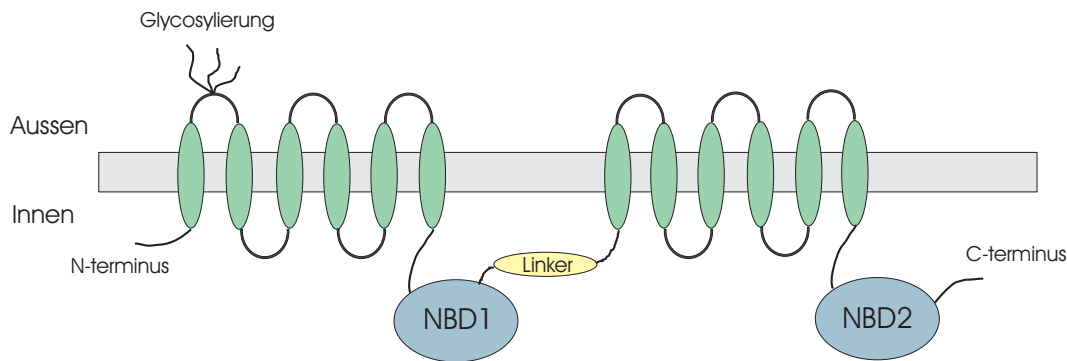


Abbildung 1.6: Schematische Darstellung der Topologie des humanen P-glycoproteins und seiner funktionellen Regionen, modifiziert nach [Higgins et al., 1997].

Antikörpern erhalten wurden, welche spezifisch den N- oder C-Terminus, die erste oder vierte extrazelluläre Region oder die ATP-Bindungsstellen erkennen [George et al., 1990, Cianfriglia et al., 1994]. Schinkel et al. konnten mittels Deletionsanalyse und ortsgerechter Mutagenese die vorhergesagte Position der Glycosylierung am ersten extrazellulären Loop (TM 1-TM 2) nachweisen [Schinkel et al., 1993].

Die Tatsache, dass einige Mutationen, die die Substratspezifität von P-glycoprotein verändern, über die membrandurchspannenden Regionen verteilt sind, führte zu der Annahme, ein Teil der TM-Domänen könne zu den Substratbindungsstellen beitragen. Tatsächlich konnte mit Hilfe von Photoaffinitäts-Labeling [Safa et al., 1994], Punktmutationen [Kajiji et al., 1994, Loo & Clarke, 1995] und der Konstruktion chimärer Proteine [Zhang et al., 1995] gezeigt werden, dass sich eine Substratbindungsstelle in der aminoterminalen Hälfte in oder nahe bei TM 5-6 befindet und eine zweite in der carboxyterminalen Hälfte in oder nahe bei TM 11-12. Die C-terminalen Regionen jeder Hälfte enthalten Konsensussequenzen, die für die ATP-Bindung und die Hydrolyse verantwortlich sind [Azzaria et al., 1989]. Beide Nucleotidbindungsstellen von Pgp vermitteln die Hydrolyse von Nucleotiden. Diese ATPase-Aktivität wird für den Transport von Substraten benötigt [Urbatsch et al., 1995, Sarkadi et al., 1992]. Darüberhinaus stellten Urbatsch et al. fest, dass eine katalytische Aktivität nur dann möglich ist, wenn beide Nucleotid-Bindungsstellen von Pgp synchron agieren [Urbatsch et al., 1995]. Dabei wird angenommen, dass die beiden NBDs in einer steady-state Katalyse alternieren. Die Kooperation der beiden Nucleotidbindungsstellen ist überdies so stark, dass bei Nichtfunktionieren einer der NBDs keine ATP-Hydrolyse stattfindet, selbst wenn die zweite NBD ein gebundenes Nucleotid enthält [Takada et al., 1998].

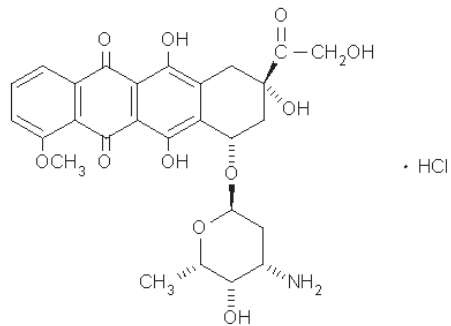
Substrate und Substratspezifität

Eine der Hauptaufgaben von P-glycoprotein liegt darin, zellfremde Substanzen aus der Zelle bzw. aus der Zellmembran nach außen zu befördern und somit den Organismus vor Fremdstoffen, insbesondere Toxinen bzw. toxischen Metaboliten zu schützen (vgl. Kapitel 1.3). Da es sich bei Pgp um eine energieabhängige Effluxpumpe für Fremdstoffe handelt, wird zum Transport der Substanzen aus der Zelle heraus Adenosintriphosphat (ATP) als Energielieferant benötigt [Endicott & Ling, 1989, Gottesman & Pastan, 1993, Germann, 1996].

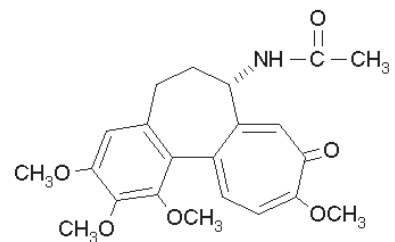
Zu den Substraten von P-glycoprotein zählen kationische oder nicht ionische organische Verbindungen mit relativ komplizierter Molekülstruktur, die zumeist hydrophobe und amphiphatische Eigenschaften aufweisen. Eine Konsensus-Struktur dieser Substanzen kann jedoch nicht definiert werden [Endicott & Ling, 1989, Moscow & Cowan, 1990, Gottesman & Pastan, 1993, Leveille-Webster & Arias, 1995, Seelig, 1998]. In den meisten Fällen handelt es sich um Naturstoffe mit komplexer Ringstruktur, die bei physiologischem pH-Wert eine positive Ladung am Stickstoffatom tragen [Bellamy & Dalton, 1994] und in Pflanzen, Bakterien, Pilzen oder Schwämmen gefunden werden. Die Größe der Substrate reicht von 250 Da (Cimitidin) bis 1900 Da (Gramicidin D) [Schinkel et al., 1997]. In der Medizin werden viele dieser Substanzen als Arzneimittel eingesetzt, insbesondere als Chemotherapeutika zur Behandlung maligner Tumore. Die bekannten Verbindungen Vinblastin, Colchicin oder Doxorubicin sind Beispiele hierfür [Gottesman & Pastan, 1993, Sharom, 1997, Seelig, 1998]. Eine Auswahl der Substrate von P-glycoprotein ist in Tabelle 1.4 zusammengestellt. Abbildung 1.7 zeigt die Struktur einiger Substanzen, die zu den Substraten von P-glycoprotein zählen.

Anthracycline	Epipodophyllotoxine	cytotoxische Substanzen
Doxorubicin	Etoposid	Colchicin
Daunorubicin	Teniposid	Emetin
		Actinomycin D
Vinca-Alkaloide	Immunsuppressiva	Puromycin
Vinblastin	Cyclosporin A	Mitoxantron
Vincristin	FK506	
		Sonstige
Steroide	lineare / cyclische Peptide	Rhodamin 123
Aldosteron	Leupeptin	Hoechst 33342
Dexamethason	Pepstatin A	Triton-X-100
	Gramicidin D	Prenyl-Cys methylester
Taxane	Nonactin	
Paclitaxel	Yeast <i>a</i> -factor	
Docetaxel		

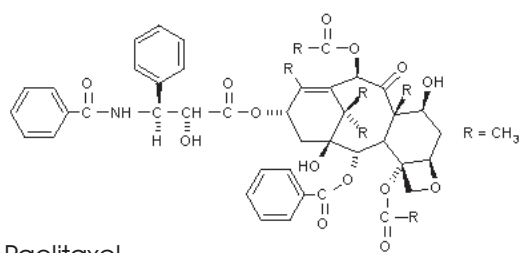
Tabelle 1.4: Substrate von P-glycoprotein [Sharom, 1997].



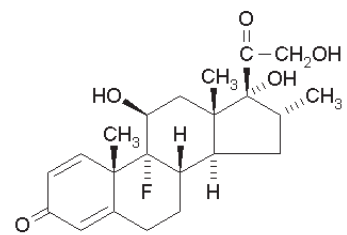
Doxorubicin



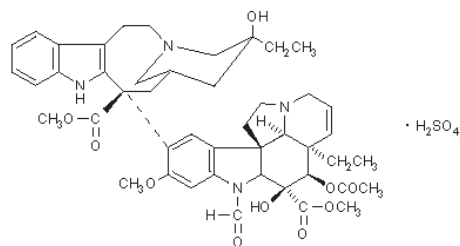
Colchicin



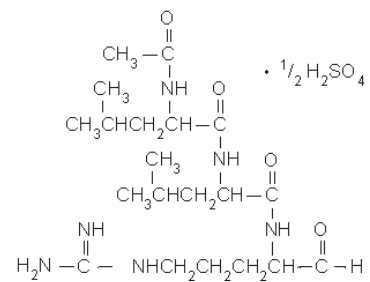
Paclitaxel



Dexamethason



Vincristin



Leupeptin

Abbildung 1.7: Struktur einiger Substrate von P-glycoprotein.

Für die Substratspezifität sind Bereiche der 1. Loop-Domäne, sowie der 6., 11. und 12. transmembranären Domäne verantwortlich (siehe Abbildung 1.6). Wird eine einzige Aminosäure in der Proteinsequenz durch eine andere ersetzt, so kann dies eine völlig veränderte Substratspezifität zur Folge haben [Fairchild et al., 1990]. Dies ist beispielsweise der Fall bei einer Spontanmutation des MDR1-Gens (Exon 7), die in einer Gly185Val Aminosäuresubstitution von P-glycoprotein resultiert [Currier et al., 1989, Ramachandra et al., 1996].

Als endogene Substrate von P-glycoprotein werden kürzerkettige Lipide diskutiert [Abulrob & Gumbleton, 1999]. Sowohl MDR1-Pgp als auch MDR3-Pgp sind dazu in der Lage, Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin zu transportieren. Beide Isoformen scheinen also zumindest einige Substrate zu teilen [van Helvoort et al., 1996]. Dieser Befund impliziert, dass MDR1- und MDR3-Pgp möglicherweise einen gemeinsamen Grundmechanismus für die Substrattranslokation haben.

Bislang bleibt ungeklärt, wie P-glycoprotein biochemisch dazu in der Lage ist, diese Vielzahl unterschiedlicher Strukturen zu erkennen und zu transportieren.

1.4.3 Physiologische Funktionen von P-glycoprotein

P-glycoprotein wird sowohl in neoplastischen Zellen, als auch in zahlreichen gesunden Geweben in unterschiedlichen Mengen exprimiert. Mit wenigen Ausnahmen ist P-glycoprotein grundsätzlich in polarisierten epithelischen Zellschichten zu finden, wo es in den apikalen oder luminalen Membrandomänen der Zelle lokalisiert ist. Diese Lokalisation von Pgp lässt vermuten, dass es primär an der Extrusion von Substanzen aus der Epithelschicht in den angrenzenden luminalen Raum beteiligt ist und so zum Schutz der Zelle gegen natürlich auftretende Toxine dient.

So werden an der apikalen Oberfläche von Epithelzellen des unteren Gastrointestinaltraktes (Jejunum, Ileum, Colon) hohe Gehalte an P-glycoprotein gefunden, was zu der naheliegenden Annahme führt, dass eine Aufgabe von Pgp darin besteht, die Resorption bestimmter Substrate über den Verdauungstrakt zu verhindern und gleichzeitig die Ausscheidung durch die intestinale Mucosa zu erleichtern [Thiebaut et al., 1987].

Daneben ist Pgp in Leber, Pankreas und Nebenniere, sowie in der Bürstensaummembran der proximalen Tubuli der Niere lokalisiert [Thiebaut et al., 1987]. Die Expression des MDR1-Genproduktes in diesen Geweben ist konsistent mit seiner Rolle bei der biliären und renalen Exkretion von Xenobiotika und endogenen Metaboliten [Cordon-Cardo et al., 1989, Sparreboom et al., 1997].

Anhand von Versuchen mit *mdr1a/1b* knock-out Mäusen konnte diese Efflux-Rolle von P-glycoprotein bestätigt werden. Diese Pgp-defizienten Tiere zeigten auf der einen Seite eine ganz normale Entwicklung, wiesen aber andererseits erhebliche Defekte sowohl in der Verteilung als auch in der Akkumulation und Exkretion von Medikamenten auf [Schinkel et al., 1994, 1995, 1997].

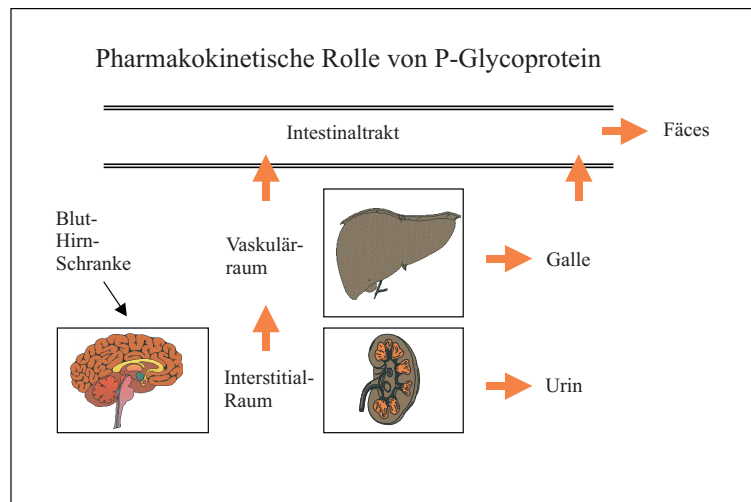


Abbildung 1.8: Schematische Darstellung der Verteilung und pharmakokinetischen Rolle von P-glycoprotein im Körper.

Desweiteren ist P-glycoprotein auch an wichtigen pharmakologischen Barrieren des Körpers vorhanden. So wird es z. B. auf der luminalen Oberfläche kapillarer Endothelzellen, die die Blut-Hirn-Schranke bilden, exprimiert, wo es die Akkumulation hydrophober Agenzien im ZNS verhindert [Thiebaut et al., 1989, Cordon-Cardo et al., 1989, Schinkel et al., 1994, Sparreboom et al., 1997]. Ebenso wie in der Blut-Hirn-Schranke nimmt Pgp im Knochenmark und in der Blut-Testis-Schranke eine protektive Rolle zur Vermittlung des xenobiotischen Efflux in diesen Geweben ein [Schinkel et al., 1994, van Helvoort et al., 1996].

Während der Schwangerschaft sind hohe P-glycoprotein-Gehalte auch in den placentalen Trophoblasten zu finden. Dort dient es vermutlich zum Schutz des sich entwickelnden Fötus gegen Toxine im Blutstrom [Arceci et al., 1988, Sugawara et al., 1988, Piekarz, et al., 1993]. Dagegen spricht jedoch eine ebenfalls hohe Konzentration an Pgp im Endometrium, aufgrund derer Pgp-Substrate eher in das Lumen transportiert würden als heraus [Schinkel et al., 1997].

Die Verteilung des MDR1-Genproduktes P-glycoprotein im Organismus und die damit zusammenhängende pharmakokinetische Rolle dieses Transporters wird in Abbildung 1.8 veranschaulicht.

In neoplastischen Geweben ist häufig eine Überexpression von Pgp zu beobachten, die zumeist auf der vermehrten MDR1-Genamplifizierung [Cordon-Cardo et al., 1990] beruht oder auf der Aktivierung der Genexpression.

Diese Überexpression von Pgp kann zum einen durch chemische Komponenten induziert werden. Zum anderen kann sie auch physikalischen Stress als Ursache haben. Dazu gehören beispielsweise Röntgenstrahlung [McClellan et al., 1993], ultraviolette Strahlung [Uchiyama et al., 1993] oder auch Hitzeschock [Chin et al., 1990].

Da die Pgp-Überexpression und die daraus resultierende Multidrug Resistenz ein Hauptproblem für die Tumorbehandlung mittels Chemotherapie darstellt, ist es besonders wichtig, Faktoren, die die Substratspezifität von Pgp beeinflussen, zu bestimmen.

1.4.4 Funktionsweise und Transportmechanismen

Die exakte Funktionsweise des ABC-Transporters P-glycoprotein ist bislang nicht bekannt, jedoch werden hauptsächlich zwei Vorschläge für den Mechanismus des Substrattransports aus dem Zellinneren in den Extrazellularraum diskutiert. Diese sind in Abbildung 1.9 schematisch dargestellt und werden im Folgenden näher erläutert.

- Bei dem allgemein anerkannten Modell des **Hydrophobic Vacuumcleaner** (obere Abbildung) wird P-glycoprotein eine aktive Transportfunktion zugeschrieben [Gottesman & Pastan, 1993].

Bei diesem Modell wird die Hypothese aufgestellt, dass P-glycoprotein aufgrund seiner ringförmigen Anordnung in der Membran einen hydrophilen Durchgang formt. Auf diese Weise wird eine Art Kanal gebildet, durch dessen Mitte die entsprechenden Substanzen vom Zytosol ins extrazelluläre Medium transportiert und gleichzeitig vor der hydrophoben Lipidphase abgeschirmt werden. Der Transport erfolgt dabei durch eine Konformationsänderung der Substratbindungsstellen, welche durch die Hydrolyse von Adenosintriphosphat hervorgerufen wird [Sonveaux et al., 1996, Loo & Clarke, 1996a].

- Daneben wird das sogenannte **Flippase-Modell** diskutiert (untere Abbildung) [Higgins & Gottesman, 1992]. Nach dieser Vorstellung fängt P-glycoprotein das Molekül ab, sobald es durch die Membran tritt, um es dann vom Innenblatt zum Außenblatt der Membran zu befördern. Von dort diffundiert es schließlich in den Extrazellularraum. Alternativ wird das im Innenblatt der Lipiddoppelschicht interkalierte Substrat ins Außenblatt "geflippt" und in den Extrazellularraum freigesetzt. Die Bewegung der Substanz vom Innen- ins Außenblatt verläuft schnell, während es sich bei der Bewegung vom Innenblatt ins Zytosol um einen relativ langsamen Prozess handelt.

Diese Flippasefunktion wurde auch schon für andere Transporter der ABC-Familie beschrieben, was auf eine mögliche Konservierung der Funktionsweise der Proteine dieser Familie hindeutet [Johnstone et al., 2000].

Ungeklärt ist bislang jedoch die Frage, wie es möglich ist, dass P-glycoprotein ein solch breites Spektrum an Substraten transportieren kann.

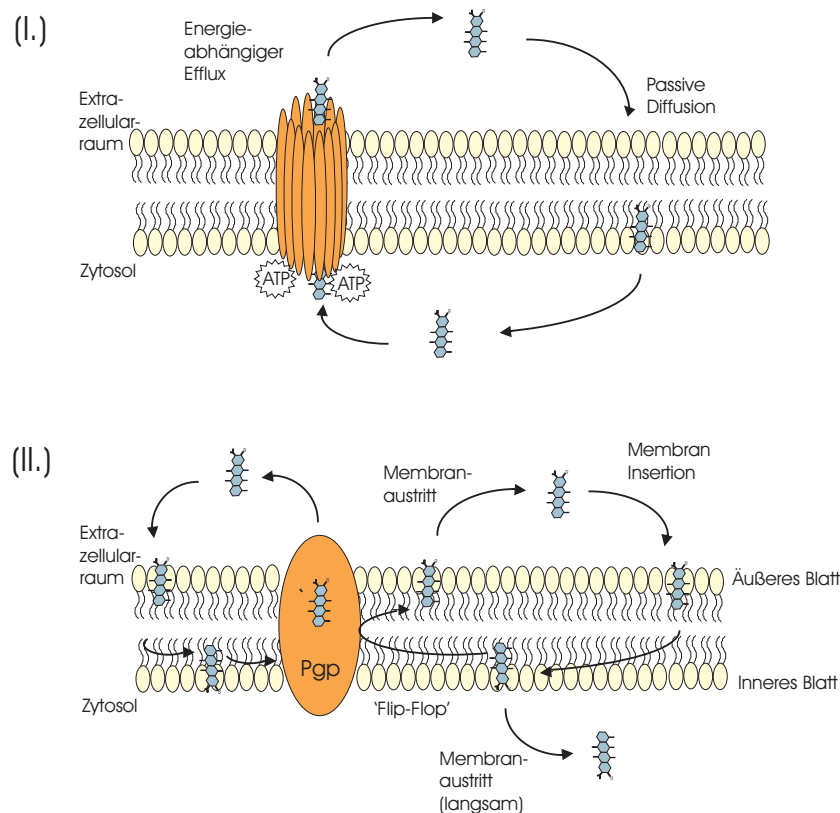


Abbildung 1.9: Schematische Darstellung der Funktionsweise von P-glycoprotein nach dem sogenannten Hydrophobic Vacuumcleaner-Modell [Gottesman & Pastan, 1993] bzw. nach dem Flippase-Modell [Higgins & Gottesman, 1992] (Abbildung modifiziert nach [Johnstone et al., 2000]).

1.5 Reversion der Pgp-vermittelten Multidrug Resistenz

Aufgrund seiner ursächlichen Rolle für das Auftreten von Resistenzen bei der chemotherapeutischen Behandlung maligner Tumore wurden zahlreiche Anstrengungen unternommen, um Modulatoren oder Inhibitoren für die P-glycoprotein-vermittelte Resistenz zu entwickeln. Ziel bei der Entwicklung dieser sogenannten Chemosensitizer ist es, die Sensitivität von Tumorzellen gegenüber Chemotherapeutika wiederherzustellen. Zwei Hauptansatzpunkte liegen den Strategien zur Reversion der Pgp-vermittelten Mehrfachresistenz zugrunde:

- die Reduktion der Expression und / oder
- die Inhibition der funktionellen Aktivität von P-glycoprotein

Durch die gleichzeitige Gabe von Chemotherapeutika und Modulatoren, die auf oben genannte Weise die Funktion von Pgp beeinträchtigen, soll eine verstärkte intrazelluläre Akkumulation der Medikamente erzielt werden.

Ca-Kanalblocker	Verapamil, Nifedipin
Calmodulin-Inhibitoren	Trifluoperazin
Immunsuppressiva	Cyclosporin A, FK 506
antihormonelle Agenzien	Tamoxifen
antipsychotische Agenzien	Phenothiazine
antiarrhythmische Agenzien	Chinidin

Tabelle 1.5: Bekannte Therapeutika, die als Chemosensitizer für die Pgp-vermittelte Mehrfachresistenz wirken.

Tsuro et al. gelang 1981 zum ersten Mal eine pharmakologische Reversion von Pgp-vermittelter MDR in *in vitro* Studien an einer Maus-Zelllinie [Tsuro et al., 1981]. Dabei stellte sich heraus, dass die gleichzeitige Gabe des Calcium-Kanal-Blockers Verapamil die intrazelluläre Akkumulation von Vincristin in den Zellen begünstigte. Als Folge davon wurde eine Verstärkung der antiproliferierenden Wirkung beobachtet. Seither wurden in der Literatur zahlreiche MDR-Modulatoren beschrieben, die die Drug-Efflux-Funktion von Pgp herabsetzen und so zu einer Reversion der zellulären Resistenz führen.

Da viele der Modulatoren für die Mehrfachresistenz selbst Substrate von P-glycoprotein sind, wie z. B. Verapamil, ist die Annahme einer kompetitiven oder nicht kompetitiven Inhibition naheliegend. Auch Interferenz mit der Substraterkennung kann der Reversion zugrunde liegen [Ford, 1996, Ayesch et al., 1996].

In ihrer Struktur und ihren Eigenschaften sind diese modulierenden Verbindungen ebenso unterschiedlich wie die zuvor beschriebenen Substrate von P-glycoprotein. MDR-reversierende Eigenschaften werden gefunden bei Calcium-Kanal-Blockern, antipsychotischen Agenzien, Calmodulin-Inhibitoren, antihormonellen und antiarrhythmischen Agenzien sowie bei Immunsuppressiva [Seelig, 1998, Krishna & Mayer, 2000] (vgl. Tabelle 1.5).

Die meisten Chemosensitizer sind somit Therapeutika, die ursprünglich in anderen Bereichen eingesetzt wurden und benötigen sowohl präklinisch als auch klinisch höhere Dosen, um genügend hohe Plasmakonzentrationen zur Reversion der MDR zu erreichen. In diesen Konzentrationsbereichen ist jedoch die Eigentoxizität vieler Modulatoren sehr hoch, und somit ist es nicht möglich, angemessene Plasmakonzentrationen der modulierenden Agenzien zu erreichen. Daneben sind weitere Aspekte zu berücksichtigen, die für das Scheitern vieler Modulatoren in klinischen Studien verantwortlich sind:

- In Tumorzellen sind neben MDR1/Pgp zahlreiche andere Mechanismen an der Ausbildung von Multidrug Resistenz beteiligt (siehe Kapitel 1.2.2), welche durch Pgp-Modulatoren nicht angegangen werden.
- Die Bioverfügbarkeit modulierender Substanzen *in vivo* kann durch fehlende Pgp-Bindungsspezifität ebenso beeinflusst werden, wie durch Serumproteine (z. B. Amidaron oder Pyridamol).
- Daneben ist zu berücksichtigen, dass Pgp-Modulatoren die Pharmakokinetik von Antitumormedikamenten ändern können. Sofern die Dosis dieser Chemotherapeuti-

ka nicht angemessen reduziert wird, kann dies zu einer gesteigerten Toxizität führen. Als Nebeneffekt wird zudem die normale Funktion von Pgp in gesunden Geweben vermindert.

Derzeit laufen klinische Studien mit nicht zytotoxischen Substanzen, die als Modulatoren Anwendung finden sollen [Ramachandra & Melnick, 1999, Krishna & Mayer, 2000]. Dazu gehört beispielsweise PSC833, ein nicht immunotoxisches Analogon von Cyclosporin A.

1.6 Genetische Polymorphismen

Genetische Variationen in der Nucleotidsequenz der DNA können aufgrund ihrer Lokalisation den Informationsgehalt der DNA ändern und somit interindividuelle funktionelle Unterschiede zur Folge haben. Beispielsweise könnten Polymorphismen die Suszeptibilität gegenüber xenobiotischen Agenzien verändern. Somit stellen sie auch einen möglichen Ansatzpunkt zur Erklärung der individuell unterschiedlichen Behandlungserfolge z. B. bei der Krebstherapie dar [Eichelbaum & Evert, 1996].

Mögliche Ursachen für solche genetischen Veränderungen sind beispielsweise fehlerhafte DNA-Replikation oder auch thermische Zusammenstöße der DNA mit anderen Molekülen. Sequenzveränderungen können auch durch Rekombination verschiedener Gene entstehen. Daneben können UV-Strahlung sowie chemische Induktion, z. B. durch toxische Metabolite, zu genetischen Veränderungen führen [Alberts et al., 1998]. Die häufigsten genetischen Variationen sind die sogenannten SNPs, die “single nucleotide polymorphisms”. Dabei handelt es sich um Veränderungen einzelner Basen der Nucleotidsequenz, die mit einer Häufigkeit von mindestens 1 % auftreten [Passarge, 1994]. Eines der best untersuchten polymorphen Gene ist das Cytochrom P450 2D6, von dem etwa 60 verschiedene Variationen bekannt sind [Marez et al., 1997, Ingelmann-Sundberg et al., 2001]. Auch in ABC-Transportergenen sind einige Polymorphismen bekannt, die z. B. bestimmte Krankheiten zur Folge haben (siehe Kapitel 1.3, Tabelle 1.2).

Ein bedeutender Aspekt der genetischen Forschung liegt darin, Zusammenhänge zwischen Sequenzvariationen und bestimmten Phänotypen zu ergründen. Genetische Variationen können sehr unterschiedliche Folgen haben. Veränderungen in der Promotorregion eines Gens könnten sich beispielsweise auf die Regulation der Genexpression auswirken, während Variationen in der codierenden Sequenz u. a. einen Einfluss auf die Gesamtstruktur eines Proteins, seine Stabilität sowie seine subzelluläre Lokalisation haben könnten. Im Falle von Transportergenen, wie dem MDR1-Gen, könnten solche Polymorphismen auch zu einer veränderten Substratspezifität führen [Choi et al., 1988].

Kapitel 2

Problemstellung

Untersuchungen an Genen der ABC-Transporterfamilie ergaben, dass einige natürlich auftretende Polymorphismen entscheidend zur Entstehung verschiedener Erbkrankheiten beitragen (siehe Kapitel 1.3, Tabelle 1.2). Die Aufklärung genetischer Faktoren, wie beispielsweise natürlich auftretende Mutationen humaner ABC-Transporter, ist aber nicht nur zum Verständnis der Ätiologie bestimmter Erkrankungen von Bedeutung, sondern sie soll darüberhinaus auch Aufschluss geben über pharmakokinetische bzw. pharmakodynamische Aspekte von Medikamenten.

Wie aus zahlreichen Studien hervorgeht, sind viele Medikamente Substrate von P-glycoprotein, dem bislang am meisten untersuchten ABC-Transporter. Damit ist Pgp in die Gewebeverteilung und Pharmakokinetik vieler Arzneistoffe involviert und agiert z. B. auch als Teil der Blut-Hirn- bzw. Blut-Testis-Schranke [Schinkel et al., 1996]. Aus diesem Grund kann die therapeutische Effektivität solcher Substanzen sowohl durch den Grad der Expression als auch durch die Funktionalität des MDR1-Genproduktes beeinflusst werden [Ambudkar et al., 1999].

Verschiedene Studien zeigen, dass die Expression von Pgp individuell sehr stark variieren kann [Sugawara et al., 1988, Schuetz et al., 1995, Hafkemeyer et al., 1998]. Die große Variabilität in der Expression dieses bedeutenden Transportproteins könnte einen Grund für unterschiedlich starke Arzneimittelwirkungen und -nebenwirkungen bei verschiedenen Individuen darstellen. Dies legt nahe, dass genetische Variationen für dieses Phänomen verantwortlich sein könnten. Tatsächlich konnte im Experiment an künstlich verursachten Mutationen gezeigt werden, dass diese sich auf die Substratspezifität von Pgp ebenso auswirken, wie auf die Transporteffektivität [Ramachandra et al., 1996, Germann et al., 1996, Hafkemeyer et al., 1998, Ambudkar et al., 1999]. Es ist daher naheliegend, dass auch natürlich auftretende Polymorphismen des humanen MDR1-Gens solche Effekte bewirken könnten.

Insbesondere Polymorphismen in funktionell relevanten Positionen wie beispielsweise in bestimmten transmembranspannenden Regionen oder den Nucleotidbindungsstellen sind von besonderem Interesse, da genetische Variationen in diesen Bereichen einen Einfluss auf Bindung und Transport von Pgp vermuten lassen.

Aus diesem Grund sollte in dieser Arbeit untersucht werden, inwieweit genetische Faktoren existieren und für die variable Expression dieses Transporters verantwortlich sind.

Die vorliegende Arbeit unterteilt sich im Wesentlichen in zwei Hauptaufgaben:

- Anhand einer Probandenstudie sollten zunächst mit Hilfe unterschiedlicher Screeningverfahren natürlich auftretende Mutationen des humanen P-glycoproteins detektiert und eine statistische Häufigkeitsverteilung der verschiedenen Polymorphismen aufgestellt werden. Daneben sollten Screeningverfahren etabliert werden, die es ermöglichen, gezielt und effektiv nach bestimmten Polymorphismen zu suchen.
- Als weitere Aufgabe sollten die gefundenen Mutationen bezüglich ihrer Effekte auf den Organismus untersucht werden. Dazu war zunächst die Entwicklung geeigneter Verfahren zur Untersuchung der Funktionalität genetischer Variationen notwendig. Für Polymorphismen, die sich in der nichtcodierenden Region des Gens befinden, war dazu die Etablierung eines geeigneten Reportergensystems erforderlich, während zur Untersuchung interessanter Mutationen in den Exonbereichen des Gens die Herstellung und Optimierung eines Expressionssystems notwendig war. Zusätzlich sollten die Auswirkungen codierender Polymorphismen auf die Transporteigenschaften von Pgp mittels eines Funktionalitäts-Assays (R123-Assay) untersucht werden.

Kapitel 3

Material und Methoden

3.1 Zellkulturen

- **HepG2-Zellen:** Bei der Zelllinie HepG2 handelt es sich um menschliche Hepatoblastomzellen eines 15jährigen männlichen Argentiniers [[Knowles & Aden, 1983](#), [ATCC](#)].
- **COS-7 Zellen:** Es handelt sich hierbei um Nierenzellen des Affen (African Green Monkey, *Cercopithecus aethiops*) [[ATCC](#)]. Diese fibroblasten-ähnliche Zelllinie wurde aus CV-1 Simian Zellen durch Transformation mit einer SV-40 Mutante, welche für das Wildtyp-T-Antigen kodiert, etabliert [[Gluzman, 1981](#)]. Da COS-7-Zellen eine sehr geringe Pgp-Basalexpression aufweisen, sind sie für Untersuchungen der Pgp-Expression besonders gut geeignet.

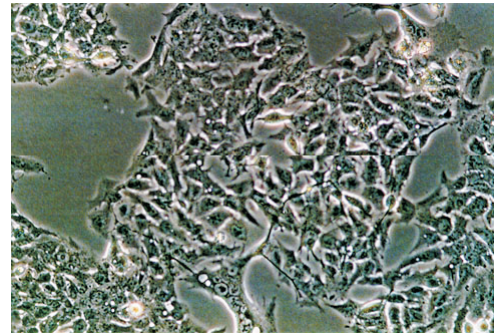
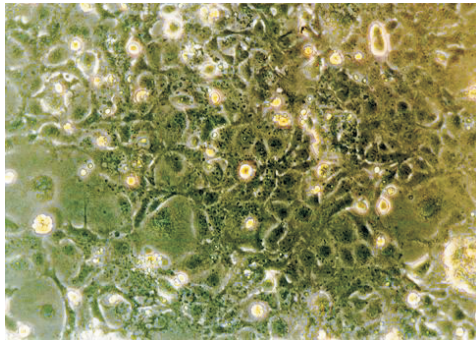


Abbildung 3.1: Kultur von COS-7-Zellen (links) und HepG2-Zellen (rechts).

3.2 Medien

Zellkulturmedium	DMEM	450 ml
	FKS	50 ml
	Pen/Strep	5 ml
	Lagerung bei 4°C	
Einfriermedium	FKS	88 %
	DMSO	12 %
	Lagerung bei -20°C	
2YT-Medium	NaCl	5 g
	Bacto-Trypton	16 g
	Yeast-Extract	10 g
	H ₂ O bidest	ad 1 l
	pH ad 7,0; autoklavieren	
LB-Medium	NaCl	10 g
	Bacto-Trypton	10 g
	Yeast-Extract	5 g
	H ₂ O bidest.	ad 1 l
	pH ad 7,0; autoklavieren	
LB-Agar	NaCl	5 g
	Bacto-Trypton	5 g
	Yeast-Extract	2,5 g
	Bacto-Agar	10 g
	H ₂ O bidest.	ad 500 ml
	pH ad 7,0; autoklavieren; nach Abkühlen auf ca. 50°C: 250 µl Ampicillin [100 mg/ml] zugeben, Petrischalen damit beschichten; Lagerung bei 4°C	

3.3 Puffer und Lösungen

TE-Puffer	Tris	10 mM
	EDTA · 2H ₂ O	1 mM
	pH ad 8,0	
TBE-Puffer (10x)	Tris	108 g
	Borsäure	55 g
	EDTA (0,5 M; pH 8,0)	40 ml
	H ₂ O bidest.	ad 1 l

Tris-Sucrose-Puffer	Tris	10 mM
	Sucrose	250 mM
	pH ad 7,4; Lagerung bei 4°C	
HBS-Puffer	HEPES	50 mM
	NaCl	280 mM
	Na ₂ HPO ₄ · H ₂ O	1,5 mM
	pH ad 7,4; sterilfiltrieren	
PBS-Puffer	KCl	0,1 g
	NaCl	4,0 g
	KH ₂ PO ₄	0,1 g
	Na ₂ HPO ₄	0,68 g
	pH ad 7,4; sterilfiltrieren	
DEPC-H₂O	DEPC	1 ml
	H ₂ O bidest.	ad 1 l
	mind. 1 h rühren; ÜN stehen lassen; autoklavieren	
GT-Lösung	Guanidiniumthiocyanat	4 M
	Tris	500 mM
	EDTA · 2H ₂ O	4 mM
	in DEPC-H ₂ O; pH ad 7,5 vor Gebrauch zugeben:	
	β-Mercaptoethanol	1 %
MOPS (10x)	MOPS	200 mM
	NaOAc	50 mM
	EDTA · 2H ₂ O	10 mM
	pH ad 7,0; autoklavieren	
Denaturierungspuffer (RNA)	Formamid, deionisiert	345 µl
	Formaldehyd	120 µl
	10x MOPS	35 µl
	DEPC-H ₂ O	11,5 µl
	Ethidiumbromid [5 mg/ml]	5,5 µl
vor Gebrauch frisch ansetzen		
DMSO-Schocklösung	DMSO in PBS	10 %

Protein-Storage-Puffer	EDTA · 2H ₂ O	1 mM
	Tris	100 mM
	pH ad 7,4	
	vor Gebrauch zusetzen:	
	PMSF	1 mM
	Leupeptin	10 µg/ml
	Pepstatin	10 µg/ml
Schwellpuffer	Tris/HCl	10 mM
	NaCl	10 mM
	MgCl ₂ · 6H ₂ O	1,5 mM
	NaN ₃	0,05 %
	sterilfiltrieren; Lagerung bei 4°C	
	vor Gebrauch zusetzen:	
	PMSF	100 mM
	DTT	100 mM
PAGE-Elektrodenpuffer	Tris	30 g
	Glycin	144 g
	10 % SDS	50 ml
	H ₂ O bidest.	ad 5 l
	SDS zuletzt zugeben	
Anodenpuffer I	Tris	0,3 M
	Methanol	10 %
	pH ad 10,4	
Anodenpuffer II	Tris	25 mM
	Methanol	10 %
	pH ad 10,4	
Kathodenpuffer	Tris	25 mM
	Glycin	40 mM
	Methanol	10 %
	SDS	0,05 %
	pH ad 9,4	
TBS-Puffer	NaCl	140 mM
	Tris	10 mM
	pH ad 7,4	
TBS-T-Puffer	Tween-20 in TBS	0,05 %

Lämmli-Puffer	Tris/Glycerin (1,2M; pH 6,8)	200 μ l
	SDS (10 %)	200 μ l
	Bromphenolblau (0,05 %)	40 μ l
	β -Mercaptoethanol	20 μ l
	vor Gebrauch frisch ansetzen	
Lowry-A	Na_2CO_3 (2%)	100 Teile
	K-Na-Tartrat (2,7 %)	1 Teil
	CuSO_4 (1 %)	1 Teil
Lowry-B	Folin-Ciocalteaus-Phenolreagenz	1 Teil
	H_2O bidest.	1 Teil
SSCP-Probenpuffer(DS)	Formamid	940 μ l
	Bromphenolblau	10 μ l
	Xylencyanol	10 μ l
	EDTA (0,5 M; pH 8,0)	40 μ l
	vor Gebrauch frisch ansetzen	
SSCP-Denaturierungspuffer(SS)	Formamid	920 μ l
	Bromphenolblau	10 μ l
	Xylencyanol	10 μ l
	EDTA (0,5 M; pH 8,0)	40 μ l
	NaOH (1 M)	20 μ l
	vor Gebrauch frisch ansetzen	
SSCP-Entwickler	Na_2CO_3	30 g
	Formaldehyd (37 %)	1,5 ml
	H_2O bidest.	ad 1 l
	vor Gebrauch zugeben:	
	NTS	2 mg
SSCP-Fixierer	Essigsäure	7 %
Silberfärbung	AgNO_3	1 mg
	Formaldehyd (37 %)	1,5 ml
	H_2O bidest.	ad 1 l
	frisch ansetzen	

3.4 Gele

Agarosegel (1 %)	Agarose	1 g
	1x TBE	100 ml
	in der Mikrowelle aufkochen; abkühlen auf ca. 40°C; 20 μ l Ethidiumbromid zugeben; ca. 1 h aushärten	

Formaldehyd -Agarosegel	Agarose	1,5 g
	10x MOPS	15 ml
	H ₂ O bidest.	108 ml
	in der Mikrowelle aufkochen; abkühlen auf ca. 60°C; 27 ml Formaldehyd zugeben; ca. 3 h aushärten; nach ca. 1 h mit 1x MOPS überschichten	
Trenngel (8 %)	H ₂ O bidest.	7050 µl
	Tris/HCl (1,5 M; pH 8,8)	3750 µl
	10 % SDS	150 µl
	Acrylamid:Bisacrylamid (30:0,8)	4000 µl
	10 % APS	50 µl
	TEMED	5 µl
	2-3 h polymerisieren	
Sammelgel (6 %)	H ₂ O bidest.	5300 µl
	Tris/HCl (0,5 M; pH 6,8)	2500 µl
	10 % SDS	100 µl
	Acrylamid:Bisacrylamid (30:0,8)	2000 µl
	10 % APS	100 µl
	TEMED	5 µl
30 min polymerisieren		
SSCP-Gele (2 St.)	H ₂ O bidest.	70 ml
	Acrylamid:Bisacrylamid (30:0,8)	20 ml
	10x TBE	10 ml
	TEMED	30 µl
	APS (10 %)	500 µl
	2 h polymerisieren	
Polyacrylamidgel	Acrylamid:Bisacrylamid (30:0,8)	13,3 ml
	10x TBE	5 ml
	H ₂ O bidest.	1,3 ml
	APS (10 %)	350 µl
	TEMED	18 µl
	2-3 h polymerisieren	

3.5 Chemikalien

[α ³² P]-dCTP	ICN, Eschwege
Acrylamid:Bisacrylamid (30:0,8)	Roth, Karlsruhe
Agarose	Peqlab, Erlangen
Ammoniumacetat	Merck, Darmstadt

Ammoniumperoxodisulfat	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen
Bacto-Agar	Difco, Detroit (USA)
Bacto-Trypton	Difco, Detroit (USA)
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Chloroform	Merck, Darmstadt
Diethylpyrocarbonat	Sigma, Deisenhofen
Desoxyribonucleotide	Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid	Fluka, Neu-Ulm
Dimethylformamid	Sigma, Deisenhofen
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Dithiotreitol	Sigma, Deisenhofen
DMEM-Grundmedium	Gibco BRL, Eggenstein
DNA-Molekulargewichtsstandard	Gibco BRL, Eggenstein Peqlab, Erlangen
Entwicklerlösung	Ilford, Dreieich
Essigsäure (100 %)	Merck, Darmstadt
Ethanol, p.a.	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Ethylendiamintetraacetat	Sigma, Deisenhofen
Fixierlösung	Ilford, Dreieich
Folin-Ciocalteaus-Phenolreagenz	Fluka, Neu-Ulm
Formaldehyd (37 %)	Merck, Darmstadt
Fötale Kälberserum	Gibco BRL, Eggenstein
FuGENE 6	Roche, Mannheim
Gelbeladungspuffer (DNA-Gele)	Sigma, Deisenhofen
Glucose	Merck, Darmstadt
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
Guanidiniumthiocyanat	Roth, Karlsruhe

HEPES	Roth, Karlsruhe
Isoamylalkohol	Merck-Schuchardt, Mannheim
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaleidoscope Prestained Protein Standard	BioRad, München
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kalium-Natrium-Tartrat	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Sigma, Deisenhofen
Kupfersulfat	Merck, Darmstadt
Leupeptin	Sigma, Deisenhofen
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
Methanol p.a.	Merck, Darmstadt
β -Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
MOPS	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumisocitrat	Sigma, Deisenhofen
Natriumdodecylsulfat	Serva, Heidelberg
Natriumthiosulfat	Merck, Darmstadt
PCR-Puffer	Gibco BRL, Eggenstein
PCR-Primer	MWG-Biotech, Eberstein
PCR-Wasser	Fresenius, Bad Homburg
p(dT) ₁₅ -Primer	Roche, Mannheim
Penicillin/Streptomycin	Biochrom-Seromed, Berlin
Pepstatin A	Sigma, Deisenhofen
Phenol	Roth, Karlsruhe
PMSF	Sigma, Deisenhofen

Rhodamin 123	Sigma, Deisenhofen
Silbernitrat	Merck, Darmstadt
Sucrose	Roth, Karlsruhe
TEMED	Sigma, Deisenhofen
Tris	Roth, Karlsruhe
Trypsinlösung	Biochrom-Seromed, Berlin
Tween-20	Serva, Heidelberg
Verapamil	Sigma, Deisenhofen
Xylencyanol	Sigma, Deisenhofen
Yeast-Extract	Difco, Detroit (USA)

3.6 Enzyme

AMV-Reverse Transkriptase	Amersham, Braunschweig
CIAP	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Lysozym	Sigma, Deisenhofen
Restrictionsendonucleasen	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
	Boehringer, Mannheim
RNase A	Boehringer, Mannheim
RNasin	Promega, Heidelberg
Proteinase K	Boehringer, Mannheim
<i>Pfu-Turbo</i> -Polymerase	Stratagene, Heidelberg
<i>Taq</i> -Polymerase	Gibco BRL, Eggenstein
T4-DNA-Ligase	Roche, Mannheim

3.7 Antikörper

C494, MDR1 spezifisch	Alexis, Grünberg
HRP-gekoppeltes anti-Maus IgG aus Ziege	Sigma, Deisenhofen

3.8 Kits

Blood & Cell Culture Kit	Qiagen, Hilden
Clontech Site Directed Mutagenesis Kit	Clontech, Heidelberg
Dual Luciferase Reporter Assay System™	Promega, Heidelberg
ECL ⁺ Detection Kit	Amersham, Braunschweig
Expand Long Template PCR System	Boehringer, Mannheim
Gateway™ Cloning System	Invitrogen, Karlsruhe
Qiafilter® Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Qiaprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QuikChange XL Site Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, Heidelberg
MoBio Ultra Clean Kit	Dianova, Hamburg
pCMV-Script PCR Cloning Kit	Stratagene, Heidelberg
Wizard Plus Minipreps DNA Purification Kit	Promega, Heidelberg
RNeasy Blood Mini Kit	Qiagen, Hilden

3.9 Geräte

Autoklav	
5075 EL	Systemec, Wetttenberg
Brutschrank	
Heraeus B 5060	Heraeus, Hanau
Elektrophoresekammern	
Easy Cast B1A (Agarosegel)	AGS, Heidelberg
Horizon 11-14 (Horizontalgel)	Gibco BRL, Eggenstein
Gibco BRL V 15-17 (Vertikalgel)	Gibco BRL, Eggenstein
Mini-Protean II (Western-Blot)	AGS, Heidelberg
Penguin P9 DS water-cooled (SSCP)	Owl scientific, Woburn, USA
Filmmaterial	
Hyperfilm MP	Amersham Pharmacia, Freiburg
Filterpapier	
Whatman 3 MM	Whatman, Kent, UK
Fluoreszenz-Spektrometer	
Lumineszenz-Spektrometer LS5	Perkin-Elmer, Überlingen

Fotokassetten

X-Omatic mit Verstärkerfolien

Kodak, Stuttgart

Geldokumentations-Videosystem

Eagle Eye II

Stratagene, Heidelberg

Heizblöcke

Thermostat 5320

Eppendorff, Hamburg

Multi-Blok Heater, Lab-Line

Alletric, Wien, A

Kulturschalen

Petrischalen (94 x 16 mm)

Greiner, Nürtingen

Petrischalen (60 x 15 mm)

Greiner, Nürtingen

Luminometer

Luminat LB 9507

Berthold, Wildbach

Membran

PVDF

Millipore, Schwalbach

Mikroskop

Leica DM IRB

Leica, Wetzlar

Photometer

Uvicon Spektrophotometer 930

Kontron, München

Radiodetektor

Handmonitor LB 112

Berthold, Wildbach

Schüttelinkubator

TM 30

Edmund Bühler, Tübingen

Spannungsgeräte

PS3002, ST606, ST 305

Gibco BRL, Eggenstein

LKB-GPS 200/400

Pharmacia, Freiburg

PowerPac 300

BioRad, München

Powerpack 25

Beckman, München

Sterilbank

UVF6-125

BDK, Sonnenbühl-Genkingen

Ultraschall-Sonde

Labsonic 2000

Braun, Melsungen

Waagen

BP 210s

Sartorius, Göttingen

BP 410s

Sartorius, Göttingen

BP 400

Sartorius, Göttingen

Semidry-Apparatur

SemiPhor TE 70 Series

Amersham Pharmacia, Freiburg

Thermocycler

GeneAmp PCR System 9700

Perkin Elmer, Lincoln, USA

Genius

Techne, Cambridge, UK

Cyclogene

Techne, Cambridge, UK

Zentrifugen

J2-21-Zentrifuge

Beckman, München

Kühlzentrifuge GS-6R

Beckman, München

Microfuge R Zentrifuge

Beckman, München

Optima TL Ultrazentrifuge

Beckman, München

Laborzentrifuge 1K15

Sigma, Steinheim

3.10 Zellkulturmethoden

3.10.1 Herstellung von Ratten-Kollagenlösung und Beschichtung der Kulturplatten

Die Kultivierung von Zelllinien erfolgt auf mit Kollagenlösung beschichteten Kulturschalen. Zur Herstellung dieser Lösung werden aus abgehäuteten Rattenschwänzen die Kollagenfasern mit einer Zange herausgezogen, 4 h unter einer Rotlichtlampe getrocknet und anschließend durch UV-Bestrahlung sterilisiert. Die so gewonnenen Fasern können bei -20°C gelagert werden. Für die Kollagenlösung werden jeweils 500 mg der Fasern mindestens 12 h bei 4°C in 440 ml steriler Essigsäure (0,05 %) gerührt. Um nicht gelöste Faserbestandteile abzutrennen, wird die Suspension anschließend 3 h bei $3500\text{ g}/4^{\circ}\text{C}$ (Beckman-Kühlzentrifuge, Rotor JA-14) zentrifugiert. Nach Beendigung der Zentrifugation wird die überstehende Lösung dekantiert und bei 4°C gelagert.

Zur Beschichtung der Kulturschalen werden diese mit der beschriebenen Kollagenlösung gleichmäßig benetzt, indem auf eine Platte etwas Lösung gegeben und diese dann sukzessive auf die nächste Platte abgegossen wird. Die beschichteten Kulturschalen werden über Nacht unter UV-Licht getrocknet.

3.10.2 Kultivierung

Die Kultivierung der Zellen erfolgt auf kollagenierten Petrischalen mit einem Durchmesser von 96 mm. Als Nährmedium werden jeweils 7 ml DMEM mit L-Glutamin und D-Glucose zugegeben. Das Medium enthält daneben 10 % FKS sowie einen Zusatz von 1 % Penicillin/Streptomycin, welches ein Bakterienwachstum in den Zellkulturen vermeiden soll. Die Zellkulturen werden bei 37°C in einer 5 %igen CO_2 -Atmosphäre im Brutschrank gehalten. Spätestens alle drei Tage wird ein Medienwechsel durchgeführt, um die Zellen mit frischen Nährstoffen zu versorgen. Sind die Kulturschalen konfluent mit Zellen bewachsen, werden die Zellen passagiert und auf neue Kulturschalen ausgesät.

3.10.3 Bevorratung

Einfrieren

Zur Bevorratung der Zellkulturen ist es möglich, diese in flüssigem N_2 einzufrieren und zu lagern. Der Zellrasen einer konfluenten Kulturschale wird mittels Trypsin abgelöst, in Medium aufgenommen und 5 min bei $500\text{ g}/4^{\circ}\text{C}$ (Beckman-Kühlzentrifuge) zentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wird in 1 ml Einfriermedium resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. Die so behandelten Zellen werden zunächst 24 h bei -80°C vorgefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

Auftauen

Zum Auftauen der Zellen wird das Kryoröhrchen in der Hand erwärmt und der Inhalt in ein Zentrifugenröhrchen mit 10 ml Medium überführt. Nach 3 minütiger Zentrifugation

bei 500 g/4°C wird der Überstand abgesaugt, das Pellet in 1 ml Medium resuspendiert und auf eine Kulturschale mit 6 ml Nährlösung ausplattiert. Nach 24 h erfolgt ein Medienwechsel.

3.10.4 Zellernte

Zur Zellernte wird der Zellrasen konfluent bewachsener Kulturschalen zunächst zweimal mit PBS-Puffer gespült. Auf jede Platte werden 400 bzw. 800 μl (60 bzw. 96 mm) Tris-Sucrose-Puffer gegeben. Die Zellen werden mit einem Einweg-Zellschaber abgeerntet und in Eppendorff-Cups überführt. Nach 5 minütiger Zentrifugation bei 1000 g/4°C wird der Überstand verworfen und das Zellpellet bis zu seiner weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

3.11 Proteinisolierung

3.11.1 Gewinnung von Plasmamembranproteinen aus Zellkulturen

Zur Gewinnung von Plasmamembranproteinen aus Zellkulturen werden 3-4 konfluent bewachsene Zellkulturplatten zunächst mit eiskalter Saline zweimal gewaschen. Die Zellen werden auf Eis in jeweils 800 μl Schwellpuffer abgeschabt und in Eppi-Cups überführt. Nach 5 minütiger Zentrifugation bei 4000 g/4°C wird der Überstand abgegossen und die Pellets in insgesamt 800 μl Schwellpuffer resuspendiert und vereinigt. Es werden 8 μl EDTA-Lösung zugegeben und 5 min auf Eis inkubiert, bevor die Zellen mittels einer Ultraschallsonde 20 s lang lysiert werden. Zelltrümmer, -kerne und Mitochondrien werden durch 10 minütige Zentrifugation bei 5000 g/4°C abgetrennt. Es werden jeweils 700 μl der Überstände in UZ-Eppendorffs überführt und zur Gewinnung der PM-Fraktion 30 min bei 100000 g/4°C zentrifugiert. Das Pellet wird auf Eis kurz an Luft getrocknet, in einer geeigneten Menge Schwellpuffer (mit 1 % EDTA) aufgenommen und zur Lagerung bei -80°C eingefroren.

3.11.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen wird nach einer von Lowry entwickelten Methode durchgeführt [Lowry et al., 1951]. Es handelt sich hierbei um ein colorimetrisches Messverfahren, bei dem der Proteingehalt photometrisch ermittelt werden kann. Je 5 μl Proteinprobe werden mit 95 μl H₂O und 100 μl NaOH [1 N] vermischt und mit 1 ml Lowry A Lösung versetzt. Nach 10 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur werden 100 μl frisch hergestellte Lowry B Lösung zugegeben und weitere 30 min inkubiert. Anschließend wird die Extinktion bei 720 nm im Photometer gegen H₂O gemessen. Für den Nullwert wird anstelle einer Proteinprobe H₂O bzw. Puffer verwendet. Die Proteinkonzentration wird anhand einer BSA-Eichgeraden nach folgender Formel berechnet:

$$c(\text{Protein}) = \Delta E \cdot 15 \cdot \frac{F}{0,01} \quad F = \text{Verdünnungsfaktor}$$

3.12 DNA-Isolierung

3.12.1 DNA-Isolierung aus Blut

Zur DNA-Gewinnung wird freiwilligen Probanden jeweils ca. 30 ml venöses Blut entnommen. Um eine Gerinnung des frischen Blutes zu verhindern, werden die Proben in Glasröhrchen abgefüllt, die Natriumcitrat als Gerinnungshemmer enthalten. Die Blutproben sollten sofort nach Entnahme weiterverarbeitet werden.

Um die Lymphozyten von den Leukozyten abzutrennen, werden die Blutproben zunächst 20 min in einer vorgekühlten Zentrifuge bei 1500 g/4°C zentrifugiert.

Archivierung von Lymphozyten

Unter sterilen Bedingungen werden 1760 μ l des überstehenden Serums in ein Kryoröhrchen pipettiert und mit 240 μ l DMSO versetzt (88 % Serum : 12 % DMSO). Die Lösung wird gemischt und sofort auf Eis gestellt. Zur Archivierung werden die Lymphozyten zunächst bei -80°C im Biofreezer vorgefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

Gewinnung genomischer DNA

Zur Gewinnung genomischer DNA wird das *Blood & Cell Culture Kit* von Qiagen verwendet. Das restliche, durch Zentrifugation gewonnene Serum (ca. 15 ml) wird auf zwei Falconröhrchen verteilt und auf Eis gestellt. Die weitere Aufarbeitung erfolgt nach den Angaben des Herstellers.

Nach Bestimmung von Konzentration und Reinheit wird die DNA bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

3.12.2 DNA-Isolierung aus Zellkulturen

Bei dieser Methode handelt es sich um eine nach Wörner modifizierte Phenolextraktionsmethode [[Wörner, 1997](#)].

Pro DNA-Isolierung werden jeweils 3-4 konfluent bewachsene Zellkulturschalen (ca. 20-25 Mio. Zellen) benötigt. Die Zellen werden zunächst mit einem sterilen Einmalschaber im Medium abgeerntet, in einem Falcontube vereinigt und auf Eis gestellt. Um das Medium abzutrennen wird 10 min bei 3000 g/4°C zentrifugiert und der Überstand vollständig abgesaugt. Das Zellpellet wird nun in 10 ml Extraktionspuffer resuspendiert und mit 500 μ l Proteinase K [10 mg/ml] und 100 μ l RNase A [10 mg/ml] versetzt. Zum Proteinverdau wird diese Mischung 3 h bei 37°C im Wasserbad inkubiert.

Nach Beendigung der Inkubation folgt eine Phenol-Chloroform-Extraktion. Dazu wird die Suspension mit 10 ml Phenol ausgeschüttelt und zur Phasentrennung 5 min bei 3500 g/4°C zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wird in ein neues Zentrifugenröhrchen pipettiert, in das jeweils 5 ml Phenol und SEVAG (Chloroform:Isoamylalkohol = 24:1)

vorgelegt wurden. Nach erneuter Zentrifugation bei 3500 g/4°C wird die obere Phase noch einmal mit 10 ml SEVAG ausgeschüttelt und ein letztes mal zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen, mit 500 µl NH₄OAc [7,5 M] gemischt und zur DNA-Fällung mit 20 ml kaltem (-20°C) Ethanol versetzt. Die DNA-Fällung erfolgt bei -20°C über Nacht.

Nun wird der Niederschlag 20 min bei 3500 g/4°C abzentrifugiert, die überstehende Lösung bis auf ca. 1 ml abgegossen und das Pellet in der verbleibenden Lösung resuspendiert. Nach Überführen der Suspension in ein Eppendorff-Cup wird weitere 10 min bei 15000 g/4°C zentrifugiert. Zur Reinigung kann die DNA mit EtOH (70 %) gewaschen werden. Anschließend wird der Überstand verworfen, die Restflüssigkeit mit einem Wattestäbchen entfernt und das DNA-Pellet in geeigneter Menge H₂O bidest. gelöst. Die Lagerung erfolgt bei -20°C.

Konzentrationsbestimmung von DNA-Proben

Die Konzentrationsbestimmung wässriger DNA- bzw. RNA-Lösung (siehe Kapitel 3.13) erfolgt photometrisch über Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm. Dabei entspricht eine Absorption von 1,0 einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA bzw. 40 µg/ml einzelsträngiger DNA oder RNA.

Zur Messung wird 1 µl DNA in 499 µl H₂O bidest. gelöst und die Extinktion in einer Quarzküvette ermittelt:

$$c \left[\frac{\mu\text{g}}{\mu\text{l}} \right] = E(260\text{nm}) \cdot F \cdot \frac{50}{1000} \quad F = \text{Verdünnungsfaktor (hier } F = 500)$$

Zur Überprüfung der Reinheit wird außerdem die Extinktion bei 280 nm gemessen und der Quotient aus beiden Extinktionen berechnet. Dabei sollte dieser einen Wert zwischen 1,6 und 1,8 annehmen.

3.13 RNA-Isolierung

3.13.1 RNA-Isolierung aus Gesamtblut

Die Gewinnung von RNA aus frischem Blut erfolgt mit Hilfe des *RNeasy Blood Mini Kits* der Firma Qiagen. Alle Schritte werden bei Raumtemperatur (RT) durchgeführt. Dabei sollte möglichst zügig gearbeitet werden, da die RNA sehr empfindlich ist. Die Durchführung der RNA-Isolierung erfolgt nach Angaben des Herstellers.

Die gewonnene RNA wird sofort auf Eis gestellt und zur Aufbewahrung bei -80°C eingefroren.

3.13.2 RNA-Isolierung aus Zellkulturen

Zur Isolierung von RNA aus Zellkulturen kommt eine Methode nach Chomczynski zur Anwendung [Chomczynski & Sacchi,1987]. Die konfluent bewachsenen Kulturplatten werden zunächst auf Eis gestellt und 3 min mit je 1 ml GT-Lösung inkubiert. Die Zellen

werden mit einem Einmal-Zellschaber abgeerntet, in ein Rundbodenröhrchen überführt und auf Eis gestellt. In jedes Röhrchen werden nun 3 ml Phenol, 300 μl Natriumacetat (2 M, pH 4,0) und 600 μl Chloroform : Isoamylalkohol (49 : 1) pipettiert. Die Mischung wird kräftig geschüttelt und nach 15 minütiger Inkubation auf Eis bei 3500 g/4°C für 30 min zentrifugiert. Es folgt die RNA-Fällung bei -80°C für mindestens 1 h. Anschließend wird erneut 30 min bei 3500 g/4°C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das RNA-Pellet in 300 μl GT-Puffer aufgenommen und in ein Eppendorff-Cup überführt. Nach Zugabe von 300 μl Isopropanol pro Probe wird ein weiteres Mal bei -80°C mindestens 1 h gefällt. Es folgt eine 10 minütige Zentrifugation bei 15000 g/4°C. Der Überstand wird abgegossen, das Pellet mit 100 μl Ethanol (70%) gewaschen und erneut bei 15000 g/4°C zentrifugiert. Die überstehende Lösung wird verworfen und das getrocknete Pellet in 30-50 μl DEPC-Wasser aufgenommen. Zur Lagerung wird die gewonnene RNA bei -80°C im Biofreezer aufbewahrt.

Konzentrationsbestimmung von RNA-Proben

1 μl RNA wird in 499 μl H₂O bidest. gelöst. Die Ermittlung der Konzentration erfolgt analog zur Konzentrationsbestimmung von DNA photometrisch. Zur Berechnung des Konzentrationswertes wird folgende Formel verwendet:

$$c \left[\frac{\mu\text{g}}{\mu\text{l}} \right] = E(260\text{nm}) \cdot F \cdot \frac{40}{1000} \quad F = \text{Verdünnungsfaktor (hier } F = 500)$$

Auch hier kann zur Überprüfung der Reinheit außerdem die Extinktion bei 280 nm gemessen und der Quotient aus beiden Extinktionen berechnet werden. Dieser Wert sollte für RNA-Proben bei ca. 1,8 liegen.

3.14 Polymerase Ketten Reaktion

Mit Hilfe der sogenannten PCR-Technik kann eine definierte Nucleotidsequenz selektiv in großen Mengen aus DNA repliziert werden [Saiki et al., 1985], ohne dass dabei Restriktionsenzyme, Vektoren oder Wirtszellen benötigt werden. Dazu kann jeder beliebige DNA-Bereich ausgewählt werden, unter der Voraussetzung, dass die Sequenzen an seinen Enden bekannt sind. An diese DNA-Enden müssen vor jeder Strangsynthese zwei kurze Oligonucleotide binden, an jedes Strangende der Doppelhelix eines. Diese Oligonucleotide dienen als Primer für die PCR und begrenzen den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt. Die Herstellung der benötigten Primer erfolgt auf synthetischem Weg.

Bei der PCR wird in einem ersten Schritt die DNA-Doppelhelix durch Hitzedenaturierung in Einzelstränge getrennt. Anschließend hybridisieren die beiden Primer an die komplementären Stränge. Diesen Vorgang bezeichnet man als Annealing. Ausgehend von den Primern erfolgt in beide Richtungen die DNA-Synthese komplementärer Stränge durch eine hitzebeständige DNA-Polymerase, z. B. die sogenannte *Taq*-Polymerase. Hierbei handelt es sich um eine Polymerase, die aus dem thermostabilen Bakterium *Thermophilus aquaticus* gewonnen wird. Die einzelnen Schritte der PCR werden in einem Thermocycler automatisiert wiederholt.

Für die zu amplifizierenden DNA-Fragmente müssen zunächst geeignete Primerpaare ausgewählt werden. Dazu ist es notwendig, dass die DNA-Sequenz bekannt ist. Als Primer werden zwei kurze DNA-Sequenzen (ca. 20-24 Nucleotide) mit folgenden Eigenschaften ausgesucht: Jeweils ein Primer in forward- und ein Primer in reverse-Richtung werden benötigt. Die beiden Primer müssen so beschaffen sein, dass sie möglichst einen GC-Gehalt von 40-60 % haben und sich in ihrer Schmelztemperatur um nicht mehr als 3°C unterscheiden. Außerdem muss darauf geachtet werden, dass die beiden Oligonucleotide nicht zueinander komplementär sind, da sie sich sonst gegebenenfalls bei der PCR aneinander lagern, anstatt an das DNA-Template zu binden. Entsprechend der Schmelztemperatur des Primerpaares wird nun ein geeignetes Temperaturprogramm ausgewählt.

3.14.1 Amplifizierung kleiner Fragmente

Die Amplifizierung kleiner PCR-Fragmente (bis ca. 1 kb) erfolgt nach folgendem Schema. Zunächst wird auf Eis eine Standard-Reaktionslösung für die PCR unter Verwendung von *Taq*-Polymerase zusammenpipettiert (siehe Tabelle: PCR-Zusammensetzung). Anschließend wird der Ansatz sofort in einen Thermocycler gestellt und das entsprechende Temperaturprogramm gestartet. Nach Beendigung des Temperaturprogramms folgt ein Kühlprogramm ($\rightarrow 4^\circ\text{C}$).

PCR-Reaktionsansatz			
PCR-Puffer (10x)	2,50 μl	forward-Primer [10 μM]	1,00 μl
MgCl ₂ [50 mM]	1,00 μl	reverse-Primer [10 μM]	1,00 μl
dNTP-Mix [10 mM]	0,50 μl	DNA [100ng/ μl]	1,00 μl
DMSO	1,00 μl	<i>Taq</i> -Polymerase [5U/ μl]	0,13 μl
H ₂ O bidest.	16,87 μl		

	Denaturierung	Annealing	Produktsynthese
Temperatur	95°C	X°C	72°C
Zyklus 1	5 min	2 min	1 min
Zyklen 2-34	1 min	1 min	1 min
Zyklus 35	1 min	1 min	5 min

Tabelle 3.1: Standard-PCR-Temperaturprogramm. Die Annealingtemperatur X°C wird entsprechend der Schmelztemperatur der verwendeten Primer eingestellt.

Zur Amplifizierung der 27 Exons sowie der 5'-flankierenden Region des MDR1-Gens wurden optimale Primerpaare ermittelt und das PCR-Temperaturprogramm entsprechend der jeweiligen Schmelztemperatur der Primer angepasst. Die verwendeten Primerpaare sowie die optimierten Annealingtemperaturen sind in Tabelle 3.2 aufgeführt.

Exon	Forward-Primer	Reverse-Primer	Größe	T _A [°C]
5'-FR	5'-CTA CTT GCC CTT TCT AGA GAG GTG C-3'	5'-GGA ACG GCC ACC AAG ACG TGA A-3'	329 bp	40
2	5'-CAT TTG GCT AAT GAG CTG C-3'	5'-CTC AAA TCT CGC AAC TAT G-3'	156 bp	46
3	5'-GGT CAT ACT ATT ATC ATC CTG TT-3'	5'-GTA AGG AGA TGT CAA ATT TCC G-3'	268 bp	43
4	5'-GCA AAT CTT CCA TGA AAC TGT AC-3'	5'-ACA TCA CTC TAA GTG CTT GT-3'	296 bp	43
5	5'-CAC ACA GTC AGC AGA GAA GT-3'	5'-ACT ATC AAG AGT ATT GTT CTC CT-3'	230 bp	48
6	5'-CAG AGA GCA TGT GCA GTG TTC TTG-3'	5'-GAA CGA CAC CCA AGT TCA ACA T-3'	265 bp	50
7	5'-TCT AAC ACT ATC TGT TCT TTC AG-3'	5'-TGG ATT CAC AGG GCA TTT CAT TGG C-3'	217 bp	40
8	5'-CAC ATG CAT TAA TGT ATA AGC AGC-3'	5'-CTG TCA ATC TGA AGG GCA TTT G-3'	308 bp	45
9	5'-AGC CAC TCT GTA ACT ATC ATG C-3'	5'-GCC AAC ATT ACT GGA TTT CAT TGG C-3'	295 bp	43
10+11	5'-ACT ATC TCA GTA GCC TGA TGG-3'	5'-CTT AAC TCC TTT TCG AGA TGG GTA-3'	412 bp	50
12	5'-GAA CAG TCA GTT CCT ATA TCC-3'	5'-GGG CAA CAT CAG AAA GAT GTG-3'	265 bp	50
13	5'-CAC ATC TTT CTG ATG TTG CCC T-3'	5'-CAA AGG GCA AGG ACA ACT TAC AT-3'	291 bp	50
14	5'-TGG GTT TTC TGT GGT AGA AAT-3'	5'-GTT GGT TTGAAC TAA GCC TC-3'	214 bp	50
15	5'-TCA GGT AAT TGT TAA TGT ATT C-3'	5'-ATT CTG AAG TTA AAC TAT ACC TG-3'	229 bp	50
16	5'-TTC TTA TTT ATT TTA GAC AGC AG-3'	5'-GCA TCT CCC TTC ATA CCA G-3'	199 bp	50
17	5'-GTG CGT ATG TAA GAA TTG TAC-3'	5'-CAA GTA AAT CAC ACA AAT GGG C-3'	250 bp	45
18	5'-ATG GGT TCT TCA CTG ATT GAA C-3'	5'-GCC ATG TTA ATA GAG AAG TTC-3'	290 bp	45
19	5'-CTG ACA AGG TAT GTT CCT GC-3'	5'-GCA CAG CCC TCG ATA GAC ATA C-3'	126 bp	46
20	5'-CTT GGA GCT GAG AGT CTC ATA AAC AGC-3'	5'-GAC AAA CAC CAG TAG AAA GGA GGC A-3'	174 bp	46
21	5'-AAA TAG AAC GAT GAG TTG TGA AG-3'	5'-CAA TCA TAT TTA GTT TGA CTC AC-3'	341 bp	40
22	5'-GTG CCT CTT GGT GAT CGG TGC-5'	5'-CTT CTA GCC AAA GTA ATC CCT-3'	220 bp	48
23	5'-GTG CCC TAC TGC CAA CCT ATC-3'	5'-CAT GAA GCA TGT TCA TCC CAG CTT-3'	289 bp	43
24	5'-GCT GTG CAC ATG TTT TGT GTT TGT GC-3'	5'-CAG GAG TCA GGA GTA GAT CAA ACA C-3'	236 bp	40
25	5'-TTC TTC TCA TTG CAG AAC ACA-3'	5'-TGT GAA AGT GTG CTC ACC AC-3'	230 bp	50
26	5'-GCT GGT CCT GAA GTT GAT CTG TGA AC-3'	5'-GCT CCC AGG CTG TTT ATT TGA AGA GAG-3'	279 bp	48
27	5'-AAA ACC TTA TTT ACA GAA ATA TAG C-3'	5'-TGA ACC CAA TTT AAA TTC TTA CC-3'	185 bp	50
28	5'-ATG CCC GTC CTA ATG TGG AG-3'	5'-CAT CTC ATA CAG TCA GAG TTC-3'	340 bp	43

Tabelle 3.2: Primerpaare zur Amplifizierung der 27 Exons sowie der 5'-flankierenden Region des humanen MDR1-Gens mittels PCR.

3.14.2 Amplifizierung großer Fragmente

Zur Amplifizierung großer DNA-Fragmente (ca. 5 kb) mittels PCR sind besondere Versuchsbedingungen notwendig. In dieser Arbeit kamen zwei Methoden zur Anwendung:

Expand Long Template PCR-System

Dieses System der Firma Boehringer eignet sich zur Amplifizierung von bis zu 5 kb großen DNA-Fragmenten. Bei diesem System wird ein Polymerase-Mix aus *Taq*- und *Pfu*-Polymerase verwendet, wodurch die Genauigkeit der Amplifikation stark verbessert wird. Die erhaltenen PCR-Produkte besitzen sticky-ends.

Für die Durchführung der PCR werden zunächst zwei getrennte Master-Mix angesetzt. Diese werden anschließend auf Eis zusammenpipettiert, gut gemischt und sofort in den Thermocycler gestellt. Die Zusammensetzung der Reaktionslösungen sowie das verwendete Temperaturprogramm sind in den nachfolgenden Tabellen angegeben.

Mix 1		Mix 2	
dNTP-Mix [10 mM]	1,5 μ l	Puffer 3 (10x)	5,00 μ l
forward-Primer [10 μ M]	1,5 μ l	MgCl ₂ [25 mM]	1,50 μ l
reverse-Primer [10 μ M]	1,5 μ l	Enzymmix	0,75 μ l
Template-cDNA	2-5 μ l	H ₂ O bidest.	ad 25 μ l
H ₂ O bidest.	ad 25 μ l		

	Denaturierung	Annealing	Produktsynthese
Temperatur	94°C	63°C	68°C
1 Zyklus	2 min 30 s		
10 Zyklen	15 s	30 s	4 min
15 Zyklen	15 s	30 s	4 min + 10 s pro Zyklus
1 Zyklus	15 s	30 s	7 min

Tabelle 3.3: Temperaturprogramm zur Amplifizierung der MDR1-cDNA mittels Expand Long Template PCR-System.

Verwendung von *Pfu-Turbo*-Polymerase

Geeignet zur Amplifizierung von 5-15 kb großen DNA-Fragmenten ist die Verwendung des proof-reading Enzymes *Pfu-Turbo*-Polymerase. Dabei erhält man blunt-end-Amplifikate mit einer Fehlerrate von lediglich $1,6 \cdot 10^{-6}$ Fehler/Base [Lundberg et al., 1991]. Der Reaktionsansatz, der auf Eis zusammenpipettiert wird, sowie das für die Amplifikation der MDR1-cDNA optimierte Temperaturprogramm sind in den nachfolgenden Tabellen aufgeführt.

PCR-Reaktionsansatz	
H ₂ O bidest.	39,0 μ l
10x Puffer	5,0 μ l
dNTP-Mix [10 mM]	1,0 μ l
DNA-Template [100 ng/ μ l]	1,0 μ l
forward-Primer [10 μ M]	1,5 μ l
reverse-Primer [10 μ M]	1,5 μ l
<i>Pfu-Turbo</i> -Polymerase [2,5 U/ μ l]	1,0 μ l

	Denaturierung	Annealing	Produktsynthese
Temperatur	95°C	68°C	72°C
1 Zyklus	2 min		
20 Zyklen	30 s	30 s	30 s
30 Zyklen	30 s	30 s	4 min 30 s
1 Zyklus	15 s	30 s	10 min

Tabelle 3.4: Temperaturprogramm zur Amplifizierung der full-length-MDR1-cDNA mit *Pfu-Turbo*-Polymerase.

3.15 Single Strand Conformation Polymorphism

Als Screeningverfahren zur Analyse von Konformationspolymorphismen der DNA-Einzelstränge wurde in der vorliegenden Arbeit die sogenannte SSCP-Methode angewendet [Orita et al., 1989, Abernathy et al., 1997, Jaeckel et al., 1998]. Es handelt sich dabei um eine Elektrophoresemethode, bei der die unterschiedlichen Laufeigenschaften der DNA-Einzelstränge in einem neutralen Polyacrylamidgel bei Anlegen eines elektrischen Feldes ausgenutzt werden. Verantwortlich für diese Unterschiede ist zum einen die Größe der DNA-Stränge und zum anderen auch ihre Sequenz. Unterscheiden sich die entsprechenden Einzelstränge in ihrer Sequenz um mindestens eine Base, so können unterschiedliche Sekundärstrukturen auftreten. Dies führt in einem nicht denaturierenden Gel zu einer veränderten Beweglichkeit der mutierten Stränge gegenüber den normalen Strängen. PCR-Produkte liefern in einem SSCP-Gel üblicherweise zwei Banden. Bei Auftreten einer DNA-Mutation findet zumeist eine Konformationsänderung statt, was eine Veränderung des Bandenmusters im SSCP-Gel zur Folge hat. Liegen Mutationen vor, so lassen sich diese somit durch Silberfärbung der verwendeten Gele sichtbar machen. Durch dieses einfache Verfahren wird die Detektion von ca. 80 % aller DNA-Mutationen ermöglicht [Finke, 1996].

3.15.1 Versuchsdurchführung

Vor Beginn des eigentlichen Versuches müssen die Polyacrylamidgele vorbereitet werden. Da Konformationen temperaturabhängig sind [Finke, 1996], wird zunächst die wassergekühlte Gelkammer mittels eines Kryostaten auf 4°C temperiert. Anschließend werden die Gele in die Kammer gesetzt und mit kaltem 1xTBE-Puffer geflutet. Um eventuell vorhan-

dene Acrylamid-Monomere zu entfernen, werden die Geltaschen nach Herausnehmen der Kämmen mit Puffer gespült. Dies ist notwendig, da Monomere den Gellauf stören würden. Bevor die Proben aufgetragen werden, sollte ein Gelvorlauf bei 20 mA für mindestens 15 min erfolgen.

Währenddessen werden die Proben vorbereitet. Jeweils 5 μ l der PCR-Produkte werden mit 7,5 μ l Denaturierungspuffer versetzt und bei 97°C 10 min im Thermocycler denaturiert. Dadurch wird eine Auftrennung der Einzelstränge bewirkt. Anschließend werden die Proben 5 min auf Eis inkubiert, bevor jeweils 10 μ l davon auf das Gel aufgetragen werden. Daneben wird eine Doppelstrangkontrolle mit aufgetragen. Dazu wird eine PCR-Probe (5 μ l) mit Probenpuffer (7,5 μ l) versetzt und direkt in die Geltasche pipettiert. Die Elektrophorese wird bei 40 mA durchgeführt und dauert je nach Fragmentgröße 3-4 h.

3.15.2 Silberfärbung der SSCP-Gele

Nach Beendigung der Elektrophorese werden die Gele aus der Kammer genommen und vorsichtig von den Platten gelöst. Zur Fixierung der Banden werden die Gele nun in 500 ml 7,5 %ige HOAc überführt und mindestens 20 min lang sanft geschüttelt. Anschließend werden die Gele 3x2 min mit H₂O bidest. gewaschen und schließlich 30 min in 500 ml Imprägnierlösung inkubiert. Um die Banden sichtbar zu machen, werden die Polyacrylamidgele nun kurz mit H₂O bidest. abgespült und in 500 ml eisgekühlten, frisch angesetzten Entwickler überführt. Sobald die ersten Banden zu erkennen sind, wird die Entwicklerlösung durch frische ersetzt. Haben die Banden die gewünschte Intensität erreicht, so wird zum Abstoppen der Färbereaktion 500 ml eiskalte Fixierlösung zugegeben. Nach 5 min Inkubation ist die Neutralisationsreaktion beendet und die Gele können nun fotografiert und ausgewertet werden.

3.16 Plasmidisolierung aus Bakterienkulturen

3.16.1 QIAprep Spin Miniprep Plasmidisolierung

Diese Methode eignet sich zur Isolierung von bis zu 20 μ g Plasmid-DNA aus 5 ml Übernacht-Bakterienkulturen. Die Bakterienkulturen werden zunächst in Zentrifugenröhrchen überführt und zur Zellernte 5 min bei 3000 g/RT zentrifugiert. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgt anhand der Vorgaben im Handbuch [Qiagen, *QIAprep Spin Miniprep*].

Nach Bestimmung der Konzentration wird die Plasmid-DNA bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.16.2 Wizard Miniprep Plasmidisolierung

Die Übernacht-Bakterienkultur wird in ein Zentrifugenröhrchen überführt und die Zellen werden durch 3-minütige Zentrifugation bei 3000 g gesammelt. Auch hier wird zur Isolierung die Beschreibung im Handbuch des Herstellers angewendet [Promega, *Wizard Miniprep Kit*].

3.16.3 Plasmidisolierung nach der Kochmethode

Die Kochmethode dient im Gegensatz zu den bereits genannten Methoden nicht zur Isolierung hochreiner Plasmide, sondern stellt eine Möglichkeit zur schnellen Aufarbeitung vieler Plasmide aus unterschiedlichen Klonen dar. So kann man aus einer Vielzahl von Bakterienklonen schnell denjenigen mit dem gewünschten Plasmid ausfindig machen und danach wie oben beschrieben weiterverarbeiten.

Zur Plasmidisolierung mittels der Kochmethode werden 8-12 Bakterienklone mit einer abgeflamten Impföse oder einem sterilen Zahnstocher auf eine antibiotikahaltige Agarplatte ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank bei 37°C zum Wachstum inkubiert. Der gewachsene Bakterienrasen wird mit einer abgeflamten Impföse vorsichtig vom Nährboden abgeschabt und in jeweils 300 µl STET-Puffer aufgenommen. Die Zellen werden resuspendiert und auf Eis mit je 15 µl Lysozym-Lösung [10 mg/ml] versetzt. Nach 10-minütiger Inkubation auf Eis wird die Mischung 2 min bei 95°C denaturiert. Anschließend wird 10 min bei 15000 g/4°C zentrifugiert, um die Zellbestandteile abzutrennen. In frische Eppendorff-Cups werden pro Probe 200 µl Isopropanol vorgelegt und jeweils 280 µl des Überstandes zugegeben. Zur DNA-Fällung wird der Ansatz mindestens 15 min bei -20°C stehengelassen, bevor 10 min bei 15000 g/4°C zentrifugiert wird. Der Überstand wird verworfen, das Pellet kurz an Luft getrocknet und in einer geeigneten Menge H₂O bidest. aufgenommen. Das Plasmid kann direkt weiterverwendet oder bei -20°C zur Lagerung eingefroren werden.

3.17 Restriktionsverdau

Restriktionsenzyme spalten DNA an spezifischen Stellen. In den Bakterien, aus denen sie isoliert werden, fungieren sie als Teil eines Schutzmechanismus, des sogenannten Restriktions-Modifikations-Systems, indem sie jede Fremd-DNA, die von außen in die Zelle eindringt, zerstören. Man unterscheidet drei Arten von Restriktionsenzymen (I, II, III). In der Gentechnik werden Typ-II-Restriktionsendonukleasen eingesetzt, welche die DNA spezifisch innerhalb einer Erkennungssequenz schneiden. Auf welche Länge ein Enzym ein DNA-Fragment zurechtschneidet, ist zum einen von der Erkennungssequenz und zum anderen von der Position der Schnittstelle in der Sequenz abhängig.

Die meisten Enzyme liefern bei der DNA-Spaltung kurze, kohäsive Einzelstrangenden (sticky ends), deren überstehende Basen sich wieder mit komplementären Sequenzen, die vom selben Enzym geschnitten wurden, zusammenlagern können. Bei Verwendung mancher Enzyme erhält man aber auch glatte Enden (blunt ends).

Zur Durchführung eines Restriktionsverdaus werden die in nachfolgender Tabelle angegebenen Komponenten zusammenpipettiert und für 3 h bis ÜN bei 37°C inkubiert. Anschließend wird zur Inaktivierung des Enzyms 5 min auf 65°C erhitzt. Die Vollständigkeit des Restriktionsansatzes kann nachfolgend auf einem Agarosegel überprüft werden.

Restriktionsverdau	
DNA-Templat	1 μ g
10xPuffer	1 μ l
Enzym	1 U
H ₂ O	ad 10 μ l

Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP

Wird durch Mutation der DNA eine Base in der Erkennungssequenz eines Restriktionsenzym verändert, so kann das Enzym an dieser Stelle nicht mehr schneiden und die Schnittstelle entfällt. Umgekehrt können durch Mutation auch neue Restriktionsschnittstellen durch Entstehen neuer Erkennungssequenzen gebildet werden. Aufgrund dessen können entsprechende DNA-Abschnitte zweier verschiedener, genetisch nicht ganz identischer Individuen bei einem Restriktionsverdau häufig Fragmente unterschiedlicher Länge ergeben. Diesen Effekt bezeichnet man als Restriction Fragment Length Polymorphism.

3.18 Expressionsuntersuchungen

3.18.1 Untersuchung der RNA-Expression

Die Bestimmung der mRNA-Expression erfolgt mit Hilfe radioaktiver RT-PCR. Zu diesem Zweck wird zunächst die RNA mittels einer RT-Reaktion in cDNA revers transkribiert. Anschließend wird in einer Standard-PCR-Reaktion ein Fragment amplifiziert, wobei radioaktives α^{32} dCTP zur Strangsynthese eingesetzt wird. Zur Überprüfung einer gleichmäßigen Amplifikation wird zusätzlich zu dem gewünschten PCR-Produkt ein Kontrollfragment amplifiziert. In diesem Fall handelt es sich um ein 110 bp großes Fragment der humanen GAPDH-cDNA (EMBL GeneBank Accession Number M33197) [Bordow et al., 1994]. Die verwendeten Primerpaare sind in Tabelle 3.5 angegeben.

Nach Auftrennung der RT-PCR-Produkte auf einem Polyacrylamidgel kann diese radioaktive Markierung anschließend auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht werden. Zur Bestimmung der mRNA-Expression wird die Schwärzung des Röntgenfilms densitometrisch mittels der Software TINA (Version 2.0, Raytest) ausgewertet. Die Hintergrundschwärzung des Röntgenfilms wird als Nullwert gesetzt.

MDR1-Fragment		157 bp
RT-MDR1-for	5'-CCC ATC ATT GCA ATA GCA GG-3'	bp 3020-3039
RT-MDR1-rev	5'-GTT CAA ACT TCT GCT CCT GA-3'	bp 3176-3157
GAPDH-Fragment		110 bp
GAPDH-for	5'-TGG GGA AGG TGA AGG TCG A-3'	bp 62-81
GAPDH-rev	5'-GAA GGG GTC ATT GAT GGC AA-3'	bp 171-152

Tabelle 3.5: Primerpaare zur Untersuchung der MDR1-mRNA-Expression.

RT-Reaktionsansatz	
H ₂ O bidest.	6,6 μ l
5x RT-Puffer	3,0 μ l
dNTP-Mix [10 mM]	1,5 μ l
poly(dT) ₁₅ [10 μ M]	1,5 μ l
RNA-Templat [100 ng/ μ l]	2,0 μ l
AMV-RT [39 U/ μ l]	0,2 μ l
RNAsin [30 U/ μ l]	0,2 μ l

	Annealing	reverse Transkription	Enzymdenaturierung
Temperatur	23°C	42°C	95°C
Zeit	10 min	60 min	5 min

Tabelle 3.6: Temperaturprogramm für eine Reverse-Transkriptions-Reaktion.

Die Zusammensetzungen für die Reaktionslösungen sowie die optimierten Temperaturprogramme für die RT-Reaktion bzw. die radioaktive PCR sind den angegebenen Tabellen zu entnehmen.

Detektion der PCR-Produkte auf einem Polyacrylamidgel

Während der PCR wird das Polyacrylamidgel vorbereitet. Nach Beendigung der PCR werden die gesamten PCR-Proben mit je 5 μ l Gel-Loading-Solution versetzt und nach kurzer Zentrifugation vollständig in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgt bei 200 V während ca. 1,5 h. Das Gel wird vorsichtig aus der Kammer gelöst und auf ein Whatman-Filterpapier aufgebracht. Mit Hilfe einer Vakuumpumpe wird das Gel bei gleichzeitiger Erwärmung auf ca. 60°C getrocknet. Nach 1-2 h wird auf das getrocknete Gel unter Rotlicht in einer Filmkassette ein Röntgenfilm aufgebracht. Nach 3-6 h Inkubation wird der Röntgenfilm bei Rotlicht solange in Entwicklerlösung geschwenkt, bis eindeutige Banden zu erkennen sind. Danach wird der Röntgenfilm kurz in H₂O bidest. gespült und schließlich 10 min in Fixierlösung gelegt. Nach Trocknen des Films an Luft können die Banden densitometrisch ausgewertet und somit die relative RNA-Expression bestimmt werden.

3.18.2 Untersuchung der Proteinexpression

Zur Ermittlung der Expression von Proteinen wird das sogenannte Western-Blotting-Verfahren angewendet. Die Western-Blot-Methode dient zur Analyse bestimmter Proteine eines Proteingemisches, welches über eine diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt wird [Lämmli, 1970]. Mittels Elektroblob werden anschließend die im elektrischen Feld aufgetrennten Proteine positionsgenau auf eine spezielle Membran übertragen. Diese Membran besitzt zwar eine hohe Bindungskapazität für Proteine, jedoch werden diese nicht kovalent an die Membran assoziiert, so dass sie weiter untersucht werden können [Towbin et al., 1979]. Die unbesetzten Membranbindungsstellen

radioaktive PCR	
PCR-Puffer (10x)	2,5 μ l
dNTP-Mix [10 mM]	0,125 μ l
MgCl ₂ [50 mM]	1,25 μ l
DMSO	1,0 μ l
for-Primer [10 μ M]	1,0 μ l
rev-Primer [10 μ M]	1,0 μ l
GAPDH-for [10 μ M]	1,0 μ l
GAPDH-rev [10 μ M]	1,0 μ l
Taq-Polymerase [5 U/ μ l]	0,125 μ l
α^{32} P-dCTP	1,0 μ l
RT-Ansatz	2,0 μ l
H ₂ O bidest.	13,0 μ l

	Denaturierung	Annealing	Produktsynthese
Temperatur	95°C	50°C	72°C
Zyklus 1	5 min	2 min	1 min
Zyklen 2-34	1 min	1 min	1 min
Zyklus 35	1 min	1 min	5 min

Tabelle 3.7: Temperaturprogramm für eine radioaktive PCR.

werden durch Magermilchpulver blockiert. Anschließend wird die Membran mit speziellen, gegen die zu bestimmenden Proteine gerichteten Antikörpern inkubiert. Mit einem enzymgekoppelten zweiten AK, der gegen den ersten AK gerichtet ist, werden die Proteinbanden im sogenannten Immunoblot sichtbar gemacht.

Diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese

Das bei der diskontinuierlichen SDS-Gelelektrophorese eingesetzte Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) führt zu einer "Eliminierung" von Form und Ladung der Proteine. Durch Zugabe von β -Mercaptoethanol werden sämtliche Disulfidbrücken der Proteine gespalten, und durch Binden von SDS an die Proteine in einem konstanten Verhältnis von 1,4 g SDS/g Protein werden diese in eine stabähnliche Form gezwungen. Durch Übertragung einer großen negativen Ladung von SDS auf das gebundene Protein wird dessen ursprüngliche Ladung maskiert und somit weisen SDS-beladene Proteine nahezu identische Ladungs-Masse-Verhältnisse auf. Aus diesem Grund können Proteine entsprechend ihrer molaren Massen in einer diskontinuierlichen SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt werden [Shapiro et al., 1987]. Zu diesem Zweck werden die Proteine zunächst auf ein grobporiges Sammelgel aufgetragen, um sie vor Eintritt in das engporige Trenngel zu fokussieren. Im Trenngel werden die Proteine dann mit guter Auflösung und hoher Bandenschärfe nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.

Gellauf

Von jeder Probe werden 40-60 μg Protein mit H_2O bidest. auf 12 μl aufgefüllt und mit jeweils 8 μl frisch hergestelltem Lämmli-Puffer versetzt. Nach kurzer Zentrifugation wird das Gel mit den gesamten Probenansätzen sowie 5 μl Molekulargewichtsstandard beladen. Die Elektrophorese erfolgt bei 120 V in ca. 2 h oder bei 8 mA ÜN.

Elektroblot

In dieser Arbeit wurde der sogenannte Semi-Dry-Blot, modifiziert nach Mansfield, für den Transfer der Proteine auf die Membran durchgeführt [Mansfield, 1994]. Dazu wird zunächst die PVDF-Membran auf Gelgröße zurechtgeschnitten und ca. 10 s in Methanol p.a. geschwenkt. Nach dreimaligem Spülen in H_2O bidest. wird die Membran für mindestens 10 min in Anodenpuffer II eingeweicht, während das Gel 10 min in Kathodenpuffer gelegt wird. Die Anode des Elektroblot-Gerätes wird nun mit Anodenpuffer I benetzt und ein im gleichen Puffer getränktes Filterpapier aufgelegt. Es folgen zwei in Anodenpuffer II eingeweichte Filterpapiere sowie die Membran. Um ein Austrocknen der Membran zu vermeiden, wird diese mit etwas Anodenpuffer II befeuchtet, bevor das Gel vorsichtig aufgebracht wird. Zuletzt werden drei in Kathodenpuffer getränkte Filterpapiere aufgelegt. Beim Aufbau der Schichten müssen jegliche Luftblasen sorgfältig entfernt werden, da diese einen gleichmäßigen Transfer verhindern würden. Schließlich wird bei konstanter Stromstärke von 100 mA 1-2 h geblottet.

Immunoblot

Nach Beendigung des Transfers werden die Markerbanden auf der Membran vorsichtig mit einem weichen Bleistift gekennzeichnet, die Membran in TBS-T-Puffer geschwenkt und anschließend mindestens 1 h lang in Magermilchlösung blockiert. Es folgen zwei Waschschriffe zum Entfernen der Blockierlösung, bei denen jeweils dreimal kurz mit TBS-T gespült und danach 10 min in TBS-T geschüttelt wird. Nun wird der erste Antikörper (C494 in TBS mit 5 % Magermilchpulver, Verdünnung 1:1000) zugegeben und 2-3 h unter Schütteln inkubiert. Wie zuvor wird zweimal mit TBS-T-Puffer gewaschen, bevor mit dem zweiten Antikörper (IgG Anti-Maus aus Ziege in TBS-T, Verdünnung 1:10000) 1 h lang inkubiert wird. Zum Schluss folgen zwei weitere Waschschriffe mit TBS-T.

ECL⁺-Detektion

Zur Detektion werden unter Rotlicht 2 ml ECL⁺-Mix auf die mit Küchenpapier vorsichtig abgetupfte Membran pipettiert. Nach 5 minütiger Inkubation bei RT wird der Mix abgetropft, die Membran in eine Filmkassette gelegt und ein Röntgenfilm aufgebracht. Die in Abbildung 3.2 beschriebene Lumineszenzreaktion dient zum Sichtbarmachen der Proteinbanden auf dem Röntgenfilm. Die Entwicklung des Röntgenfilms erfolgt nach 10-30 min Inkubation wie unter Kapitel 3.18.1 beschrieben.

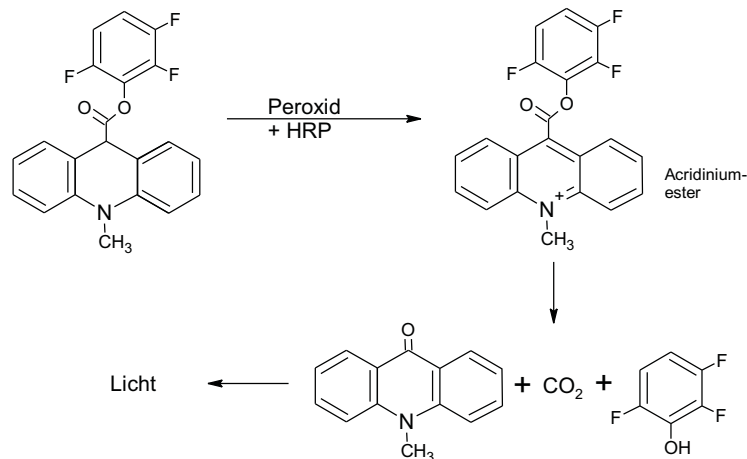


Abbildung 3.2: Chemolumineszenz-Reaktion von Lumigen PS-3 mit Meerrettich-Peroxidase.

3.19 Transportassay mit Rhodamin

Rhodamin 123 (R123) ist ein kationischer Fluoreszenzfarbstoff, der aufgrund seiner starken Lipophilie leicht membrangängig ist und sich in den Mitochondrien der Zellen einlagert. Da R123 zu den Substraten von P-glycoprotein zählt, lässt es sich sehr gut für Untersuchungen der Pgp-Transporteigenschaften einsetzen [Ludescher et al., 1991, Twentyman et al., 1994]. Abbildung 3.3 zeigt die Molekülstruktur von Rhodamin 123. Je höher die Transportaktivität von Pgp ist, desto stärker wird R123 aus den Zellen herausgepumpt und umso geringer sind die verbleibenden R123-Gehalte in den Zellen nach einer festen Inkubationszeit. Pgp-Inhibitoren, die mit Rhodamin 123 um die Pgp-Bindung konkurrieren, wie z. B. Verapamil und andere lipophile Transportsubstrate, sollten zu einer Akkumulation von R123 in den Zellen führen.

Nach Extraktion des intrazellulär verbleibenden Rhodamins mittels n-BuOH wird die relative R123-Menge durch Messung von Fluoreszenzeinheiten (FE) bestimmt. Um den Einfluss unterschiedlicher Zellzahlen einzelner Platten zu korrigieren, wird von jeder Platte der Proteingehalt als Maß für die Zellmenge bestimmt. Somit erhält man als endgültige Messgröße FE/mg Protein.

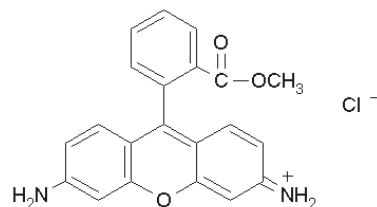


Abbildung 3.3: Struktur von Rhodamin 123 (= 2-(6-Amino-3-imino-3H-xanthen-9-yl)benzoic acid methyl ester).

Versuchsdurchführung

Zur Durchführung dieses Assays werden zunächst semikonfluent bewachsene Zellkulturschalen (60 mm) mit den wie in Kapitel 4.2 beschrieben hergestellten Expressionsvektoren transient transfiziert. Die Transfektion erfolgt hierbei nach der FuGENE 6-Methode (siehe Kapitel 3.22.2).

Nach 46-stündiger Inkubation werden die Zellen wie folgt behandelt: Als Negativkontrolle werden drei nichttransfizierte Zellkulturplatten mit jeweils 10 μl DMSO versetzt. Die mit den Expressionsvektor-Konstrukten transfizierten Zellen werden ebenfalls mit 10 μl DMSO behandelt. Daneben werden jeweils drei nichttransfizierte Zellkulturschalen mit 10 μM Verapamil versetzt. Sie dienen später als Positivkontrolle.

Nun werden sämtlichen Zellschalen jeweils 4,8 μl (= 6 μM) R123-Lösung [5 mM] zugesetzt und weitere 2 h im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Zur Ernte werden die Zellen zunächst zweimal mit Saline gespült und anschließend in 500 μl eisgekühltem Tris-Sucrose-Puffer abgeschabt. Die Zellsuspension wird in Eppendorff-Cups überführt und auf Eis gestellt. Die Homogenisierung erfolgt über Ultraschallbehandlung mit einer Sonde.

Für die Proteinbestimmung sowie Western-Blotting werden 200 μl des Homogenates abgenommen und wie zuvor beschrieben weiterverarbeitet. Die verbleibenden 300 μl Homogenat werden mit jeweils 1 ml n-Butanol versetzt, 2 s gevortext und zur Extraktion 5 min bei RT inkubiert. Zur Phasentrennung folgt eine 2 minütige Zentrifugation bei 15000 g/RT. Von der überstehenden Butanolphase werden 800 μl abgenommen und in einem frischen Eppendorff-Cup mit weiteren 700 μl n-Butanol vermischt. Die Messung am Fluoreszenzspektrometer erfolgt in Quarzküvetten. Für die Nullwerteneinstellung wird das als Extraktionsmittel verwendete n-Butanol eingesetzt. Gemessen wird die relative intrazelluläre R123-Menge in Fluoreszenzeinheiten (FE). Die erhaltenen Werte werden später auf die Proteinmenge bezogen. Am Fluoreszenzspektrometer werden für die Messung folgende Einstellungen vorgenommen:

Excitation	505 nm
Emission	534 nm
Fix Scale	1
Response	3
Bandbreite	beidseitig 2,5

3.20 Klonierung eines DNA-Fragmentes in ein Vektorkonstrukt

Zur Klonierung eines DNA-Fragmentes in ein Plasmid werden zunächst geeignete Restriktionsschnittstellen ausgewählt, die es ermöglichen, die DNA in Leserichtung in den Vektor einzuklonieren. Sowohl das DNA-Fragment als auch das Plasmid werden nun einem vollständigen Restriktionsverdau (siehe Kapitel 3.17) unterworfen. Nach Beendigung des Verdau wird das DNA-Fragment auf einem Agarosegel überprüft und gegebenenfalls gereinigt. Um einer Selbstligation vorzubeugen wird der verdaute, linearisierte Vektor dephosphoryliert. Die Dephosphorylierung erfolgt mit Hilfe von calf intestinal alkaline Phosphatase (CIAP). Die Reaktionslösung wird wie unten angegeben zusammen pipetiert. Nach 40 minütiger Inkubation bei 37°C folgt eine Enzyminaktivierung für 30 min bei 56°C.

Dephosphorylierungsansatz	
linearisierter Vektor	10 µg
Puffer (10x)	10 µl
CIAP [20 U/µl]	4 µl
H ₂ O bidest.	ad 100 µl

Inaktivierungsansatz	
Reaktionsansatz	100 µl
SDS (10 %)	5,3 µl
EDTA (0,5 M; pH 8,0)	1,1 µl
Proteinase K [20 mg/ml]	0,5 µl

Nach vollständiger Dephosphorylierung des Plasmids folgt eine Reinigung mittels Phenol-Chloroform-Extraktion. Dazu wird zunächst der gesamte CIAP-Ansatz mit 100 µl Rhenol:Chloroform (1:1) versetzt, kräftig geschüttelt und 5 min bei 3500 g/RT zentrifugiert. Die obere Phase wird abgenommen und mit 10 µl NaOAc (3 M; pH 5,4) und 200 µl Ethanol p.a. gemischt. Nach mindestens zweistündiger Fällung bei -80°C wird bei 15000 g/4°C für 10 min zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wird kurz an Luft getrocknet und in einer geeigneten Menge H₂O bidest. aufgenommen. Anschließend erfolgt die Ligation, d.h. das Einfügen des DNA-Inserts in den Vektor. Diese Reaktion wird üblicherweise durch das Enzym T4-DNA-Ligase vermittelt. Die Zusammensetzung der Reaktionslösung ist dabei abhängig von der Größe des Vektors sowie von der Größe des zu insertierenden DNA-Stücks (siehe Tabelle).

Abhängig davon, ob die zu ligierenden DNA-Stränge sticky oder blunt ends besitzen, werden Dauer und Temperatur der Ligation entsprechend angepasst. Besitzen beide DNA-Stränge sticky ends, so empfiehlt sich eine ca. dreistündige Ligation bei 37°C. Besitzen beide Enden dagegen blunt ends, ist eine Ligation bei 4°C über Nacht ratsam. Danach wird die Größe des entstandenen Produktes auf einem Agarosegel überprüft. Anschließende Sequenzanalyse gibt Aufschluss über die Richtung des Einbaus.

Ligationsansatz	
linearisierter Vektor	100 ng
DNA-Insert	0,05-1 μg
Ligase-Puffer (10x)	1,5 μl
T4-DNA-Ligase	1,0 U
H ₂ O bidest.	ad 15 μl

3.21 Ortsgerichtete Mutagenese

Die ortsgerechte Mutagenese stellt eine bedeutende Technik zum Studium von Protein-Struktur-Funktions-Beziehungen und Genexpression *in vitro* dar. In dieser Arbeit kamen zwei unterschiedliche Methoden zum Einbau von Punktmutationen in cDNA zur Anwendung.

Transformer Site Directed Mutagenesis Kit (Clontech)

Diese Methode nach Deng und Nickoloff dient zur Einführung spezifischer Basenaustausche in doppelsträngige Plasmide [Deng & Nickoloff, 1992]. Bei dieser Methode werden gleichzeitig zwei Oligonucleotidprimer an einen Strang eines denaturierten doppelsträngigen Plasmids angelagert. Der erste Primer (Mutationsprimer) dient zur Einführung der gewünschten Mutation. Der zweite Primer (Selektionsprimer) soll eine vorhandene Restriktionsschnittstelle so verändern, dass eine andere, im Plasmid einzigartige Schnittstelle entsteht, über welche dann eine gezielte Selektion stattfinden kann.

Nach Standard-DNA-Verlängerung, Ligation und einer ersten Selektion durch Restriktionsverdau wird die Mischung aus Ursprungsplasmid und mutiertem Plasmid in einen reparaturdefizienten *mutS E. coli*-Stamm (BMH 71-18) transformiert, über Nacht inkubiert und anschließend die Plasmid-DNA aus der gemischten Bakterienkultur isoliert. Bei einem nun folgenden, zweiten Restriktionsverdau wird selektiv das Ursprungsplasmid linearisiert und ist somit für eine Transformation in Bakterien ca. 100x weniger effizient [Cohen et al., 1972, Conly & Sanders, 1984]. Aus diesem Grund wird bei einer Endtransformation der verdauten Plasmid-DNA-Mischung hauptsächlich das unverdaute, mutationstragende Plasmid transformiert.

Versuchsdurchführung

Die Einführung der Mutationen in das Plasmid wird in 7 Schritten ausgeführt, welche in Abbildung 3.4 zur Veranschaulichung schematisch dargestellt sind.

Die genaue Versuchsdurchführung erfolgt nach Angaben des Herstellers [Clontech, Manual].

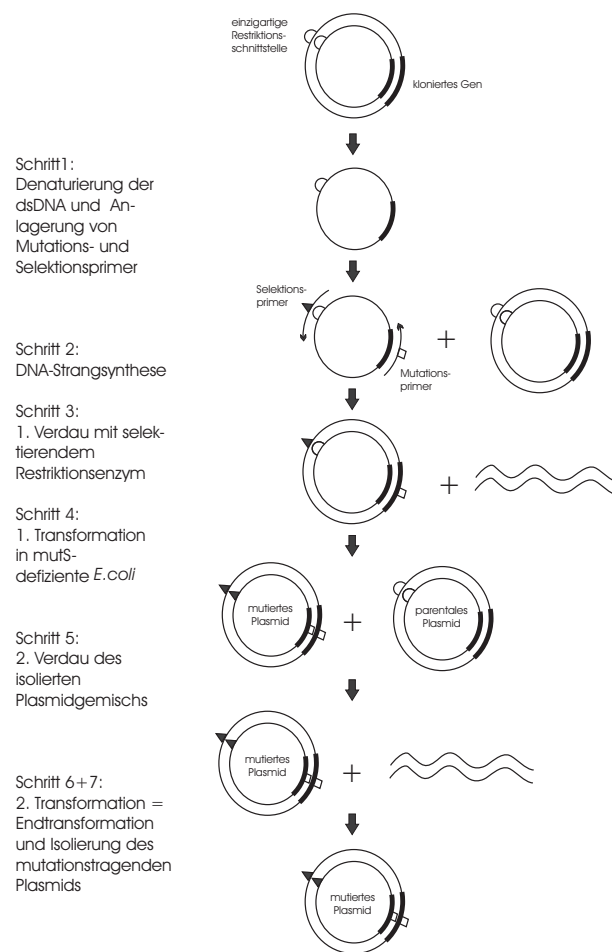


Abbildung 3.4: Schematische Abbildung des Mutationseinbaus mit Hilfe des Transformer Site Directed Mutagenesis Kits von Clontech.

QuikChange XL Site Directed Mutagenesis Kit (Stratagene)

Das *QuikChange XL-Kit* der Firma Stratagene ermöglicht ebenfalls den Einbau site-spezifischer Mutationen in nahezu jedes doppelsträngige Plasmid [Papworth et al., 1996] mit einer Effizienz von > 80 %. Punktmutationen, AS-Austausche und Deletionen bzw. Insertionen werden durch Einsatz spezieller Oligonucleotid-Primer, die die gewünschte Mutation tragen, in die entsprechende DNA-Sequenz kloniert. Die Primer sind komplementär zu den gegenüberliegenden Vektorsequenzen im Bereich der Mutation und werden in einer PCR unter Verwendung der High-Fidelity Polymerase *Pfu-Turbo* verlängert. Durch Einbeziehen der Primer wird ein Plasmid mit sogenannten “staggered nicks” generiert (siehe Abbildung 3.5). Ein anschließender Verdau des PCR-Produktes mit dem Restriktionsenzym DpnI ermöglicht eine Selektion des mutierten synthetisierten Plasmids durch spezifische Linearisierung des Ursprungsplasmids [Nelson & McClelland, 1992].

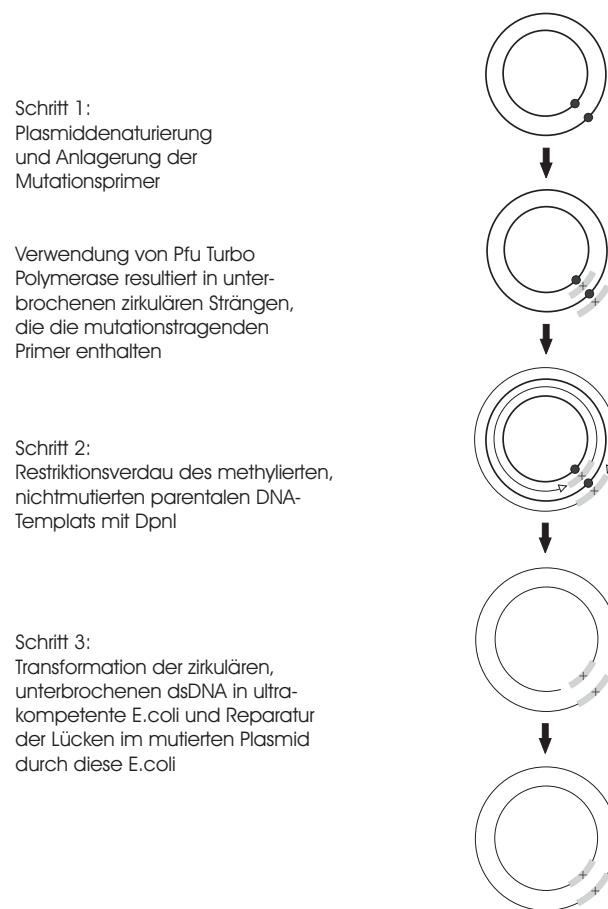


Abbildung 3.5: Schematische Darstellung des Mutationseinbaus mittels QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit von Stratagene.

Zunächst wird der angegebene Reaktionsansatz auf Eis zusammen pipettiert. Zuletzt wird $1 \mu\text{l}$ *Pfu-Turbo*-Polymerase zugegeben und sofort das entsprechende Temperaturprogramm (siehe Tabelle 3.8) gestartet. Nach Beendigung des Temperaturprogrammes wird jeder Ansatz mit $1 \mu\text{l}$ DpnI [$10 \text{ U}/\mu\text{l}$] versetzt und zum Verdau 1 h bei 37°C inkubiert. Die Produkte werden nun nach der üblichen Methode in ultrakompetente *E. coli* des Stammes XL-10 Gold Cam transformiert und schließlich auf ampicillinhaltige LB-Agarplatten ausgestrichen. Die nach 16 stündiger Inkubation gewachsenen Klone werden wie üblich weiterverarbeitet. Die nachfolgende Plasmidisolierung liefert die gewünschte mutationstragende Vektorsequenz, was durch Sequenzanalyse überprüft wird. Abbildung 3.5 zeigt eine vereinfachte Darstellung des Vorgehens.

Reaktionsansatz	
10x Puffer	5 μ l
DNA-Template	20 ng
for-Primer	125 ng
rev-Primer	125 ng
dNTP-Mix	1 μ l
Quik-Solution	3 μ l
H ₂ O bidest.	ad 50 μ l
<i>Pfu-Turbo</i> [2,5 U/ μ l]	1 μ l

Temperatur	Denaturierung	Annealing	Strangsynthese
	95°C	60°C	68°C
1	1 min		
18x	30 s	50 s	18 min 54 s *
1			7 min

Tabelle 3.8: Temperaturprogramm für die QuikChange-Reaktion. Die Zeit * wird entsprechend der Plasmidgröße angepasst (12s/100bp), hier: 9641bp.

3.22 Transfektion

3.22.1 Calciumphosphat Copräzipitationsmethode

Zur Transfektion von Zellkulturen mit Plasmiden kommt hier hauptsächlich eine Standard-Calciumphosphat Copräzipitationsmethode [Doyle, 1996] zum Einsatz. Bei diesem Verfahren werden pro Ansatz auf jeweils 3 Kulturschalen (60 mm) ca. 1 Mio. Zellen ausgestreut. Nach 24 h Inkubation im Brutschrank bei 37°C wird ein Medienwechsel durchgeführt. Zur Transfektion werden für jeden Ansatz gleiche Volumina (300 μ l) 2xHBS-Puffer und Plasmidlösung in sterilen Falcontubes vorgelegt. Die Plasmidlösung setzt sich wie folgt zusammen:

Transfektionsansatz 1	
CaCl ₂ [2M]	37 μ l
Vektorkonstrukt	6 μ g
ggfs. Kontrollplasmid	1,2 μ g
H ₂ O bidest.	ad 300 μ l

Die vorbereitete Plasmidlösung wird langsam unter sterilen Bedingungen und unter stetigem Vortexen zum HBS-Puffer zugetropft. Bei diesem Vorgang bildet sich feinverteiltes Copräzipitat. Nach 30 minütiger Inkubation bei RT wird diese Lösung kurz aufgeschüttelt und tropfenweise je 600 μ l auf jede Kulturplatte gegeben. Die Zellen werden nun 4 h im Brutschrank bei 37°C inkubiert und anschließend einer DMSO-Schockbehandlung unterworfen. Dazu wird das Medium von jeder Platte abgesaugt, 2 min mit einer 10 %igen DMSO-Schocklösung inkubiert (1 ml / Platte) und wieder frisches Medium auf

die Zellen gegeben. Nach weiteren 48 h Inkubation werden die Zellen nach den üblichen Methoden geerntet und weiterverarbeitet.

3.22.2 Transfektion mittels FuGENE 6

Bei Verwendung dieser Methode kann eine zwei- bis dreimal höhere Transfektionseffizienz erreicht werden als bei der Calciumphosphat-Methode. Für jede Zellkulturschale (60 mm) werden jeweils 2 μg Plasmid mit 6 μl FuGENE 6 in 100 μl Medium pipettiert, kurz gemischt und ca. 15 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach dem Auftropfen der Transfektionslösung wird für weitere 48 h inkubiert, bevor die Zellen nach den gängigen Methoden weiterverarbeitet werden.

Transfektionsansatz 2	
Vektorkonstrukt	2 μg
FuGENE 6	6 μl
Kulturmedium	ad 100 μl

3.23 Reporteragenassay

Zur Untersuchung der spezifischen Aktivität eines Promotors in Zellen, die das zugehörige Gen normalerweise exprimieren, wird ein heterologes Gen in einem geeigneten Vektor unter die Kontrolle des betreffenden Promotors gesetzt. Auf diese Weise lässt sich die Expression des endogenen Gens von der des fremden Gens unterscheiden. Das heterologe Gen wird als Reporteragen bezeichnet. Bevorzugt werden solche Gene als Reporteragene eingesetzt, die leicht nachweisbare Enzyme, wie beispielsweise die firefly-Luciferase, codieren. Dabei ist es wichtig, dass sich die vom Reporteragen codierte Enzymaktivität eindeutig von allen anderen Aktivitäten einer Säugerzelle unterscheidet und auch keine Wechselwirkung bzw. Beeinflussung durch andere Zellaktivitäten stattfindet.

Zur Messung der Reporteragenaktivität wird der *Luciferase-Assay Dual LuciferaseTM Reporter Assay* (Promega) verwendet. Bei diesem Assay wird das Reporteragen (firefly-Luciferase) mittels ATP, Mg^{2+} und O_2 oxidiert und somit zur Lichtemission bei $\lambda = 560$ nm angeregt, welche mit Hilfe eines Luminometers gemessen werden kann (siehe Abbildung 3.6). Die firefly-Luciferase-abhängige Reaktion wird nachfolgend blockiert und gleichzeitig das Kontrollgen (renilla-Luciferase) zur Lichtemission angeregt. Hierbei dient Coelenterazin als Substrat (siehe Abbildung 3.7).

Zur Bestimmung der Reporteragen-Aktivität werden jeweils 20 μl der Zellysate in Luminometerröhrchen vorgelegt, mit 100 μl Luciferase Assay Reagent II versetzt und die Lichtemission 10 s lang mit einer Verzögerungszeit von 2 s im Luminometer gemessen. Anschließend werden 100 μl Stop & GloTM Lösung zugegeben und zur Bestimmung der Kontrollgen-Aktivität die Lichtemission erneut gemessen.

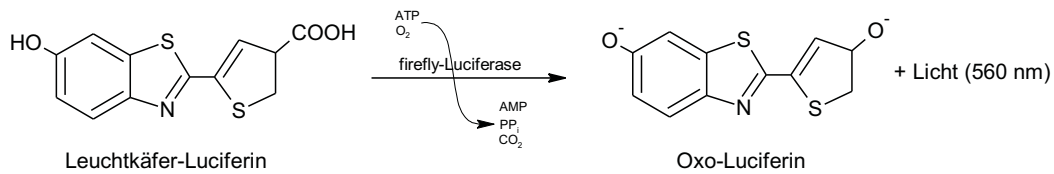


Abbildung 3.6: firefly-Luciferase-katalysierte Oxidation von Luciferin unter Freisetzung eines Photons.

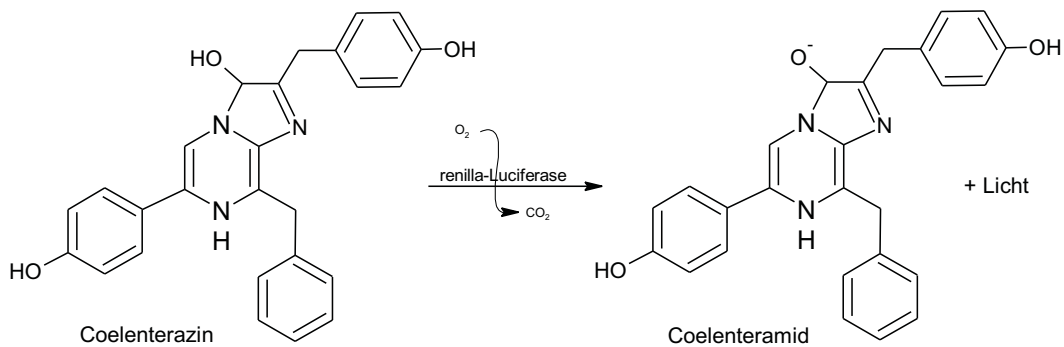


Abbildung 3.7: renilla-Luciferase-katalysierte Oxidation von Coelenterazin zu Coelenteramid.

Zur Auswertung werden die Reporter-gen-Aktivitäten (RA) durch Quotientenbildung auf die Kontrollgen-Aktivitäten (KA) normiert. Die erhaltenen Werte werden als relative Reporter-gen-Aktivitäten (rel. RA) bezeichnet.

$$\text{rel. RA} = \frac{\text{RA}}{\text{KA}} \quad [\%]$$

In dieser Arbeit wurde der pGL2-basic-Vektor (Promega) verwendet. Der pGL2-Vektor erlaubt die quantitative Analyse von Faktoren, die potentiell die Genexpression in Säugerzellen regulieren. Er trägt die codierende Sequenz der firefly-Luciferase, welche die transkriptionelle Aktivierung der Aktivität in transfizierten eukaryotischen Zellen überwacht. Eine Abbildung des pGL2-basic-Vektors befindet sich im Anhang (Abbildung C.1).

Kapitel 4

Ergebnisse

Im Hinblick auf die große individuelle Variabilität in der Expression von P-glycoprotein soll in dieser Arbeit geklärt werden, inwieweit genetische Faktoren für die variable Expression dieses ABC-Transporters verantwortlich sind. Der erste Teil der vorliegenden Arbeit befasste sich mit dem Screening nach natürlich auftretenden Polymorphismen des MDR1-Gens, welche im zweiten Teil funktionell charakterisiert wurden.

4.1 Identifizierung natürlich auftretender Polymorphismen des humanen MDR1 Gens

Zum Screening nach potentiellen natürlichen Mutationen des MDR1-Gens wurden zunächst sämtliche Exons sowie die proximale Promotorregion des Gens aus DNA-Proben (bzw. RNA-Proben) freiwilliger Probanden amplifiziert und nachfolgend einer SSCP-Analyse unterworfen. Exons einzelner Individuen, die in der SSCP-Analyse auffällig waren, wurden durch anschließende Sequenzanalyse hinsichtlich vorhandener Mutationen charakterisiert.

Die Auswahl der Primer für die PCR erfolgte anhand der bekannten MDR1-Gensequenzen AC002457 für die Promotorregion sowie die Exons 2-7 und AC005068 für die Exons 8-28 (EMBL GeneBank). Dabei wurden die Primer so konstruiert, dass neben den vollständigen Exonsequenzen auch die für das Spleißen der mRNA relevanten Exon-Intron-Grenzen mit erfasst wurden. Verwendete Primerpaare, optimierte Annealingtemperaturen, sowie das Temperaturprogramm sind in den Tabellen 3.1 und 3.2 angegeben.

4.1.1 MDR1-Polymorphismen in humanen peripheren Lymphozyten in Kaukasiern

Zur Gewinnung der genomischen DNA aus peripheren Lymphozyten wurde 91 freiwilligen Probanden (41 w, 50 m) jeweils 20 ml venöses Blut entnommen (Dr. J. Fischer, Betriebsarzt Universität Kaiserslautern) und mittels des Qiagen *Blood & Cell Culture Kits* aufgearbeitet.

Um Aufschluss über möglicherweise vorhandene Konformationspolymorphismen zu erhalten, wurden für ein erstes Screening-Verfahren zunächst 36 der 91 DNA-Proben ausgewählt. Die Auswahl erfolgte anhand der zur Verfügung stehenden DNA-Mengen. Von diesen 36 Proben wurden alle 27 codierenden Exons sowie die Promotorregion des MDR1-Gens amplifiziert. Nachfolgend wurden die so erhaltenen PCR-Produkte mittels SSCP-Analyse untersucht. PCR-Produkte, die nach Anfärben der Polyacrylamidgele auffällig vom Wildtyp abweichende Bandenmuster aufwiesen, wie z. B. veränderte Bandenanzahl oder Verschiebung der Banden, wurden zur Analyse der Basenfolge sequenziert (Fa. SEQLAB, Göttingen). In Abbildung 4.1 sind am Beispiel von Exon 12 derartige Bandenverschiebungen dargestellt.

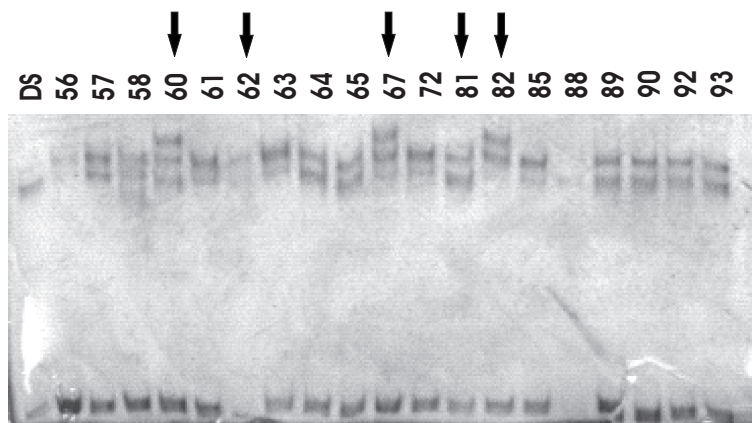


Abbildung 4.1: Durch verschiedene Konformationspolymorphismen hervorgerufene Bandenveränderungen nach SSCP-Analyse am Beispiel von Exon 12.

Natürliche Polymorphismen des MDR1-Gens

Mittels der oben genannten Verfahren konnten 15 verschiedene Polymorphismen des humanen MDR1-Gens detektiert werden, von denen einige zum Zeitpunkt der Entdeckung noch nicht in der Literatur beschrieben wurden. Um eventuelle Sequenzierfehler oder Fehler der *Taq*-Polymerase auszuschließen, wurden sämtliche mutationstragenden Proben mehrfach untersucht. Position, Sequenz und Art dieser MDR1-Polymorphismen sind in Tabelle 4.1 aufgeführt. Die von Chen et al. 1990 veröffentlichte Sequenz wurde als "Wildtyp" definiert und zur Nummerierung der Basenpositionen der detektierten SNPs herangezogen [Chen et al., 1990] (EMBL GeneBank M14758).

Aufgrund ihrer Lokalisation haben 12 der 15 gefundenen Mutationen keine Auswirkungen auf die Aminosäuresequenz des Proteins. Bei vier dieser nicht codierenden Polymorphismen handelt es sich um sogenannte stille oder "Wobble"-Mutationen, die zwar im codierenden Bereich der MDR1-Gensequenz lokalisiert sind, aber keinen Einfluss auf die Translation und damit auf die Aminosäuresequenz des entstehenden P-glycoproteins haben.

Typ	Position	Sequenz	Art der Mutation
1	5'-FR	-320 Δ A	Deletion, nicht codierend
2	5'-FR	-318 Δ C	Deletion, nicht codierend
3	Exon 7	T617C	Val206Ala
4	Exon 7	T662C	Ile221Thr
5	Intron 9	A999 + 19G	intronisch
6	Intron 11	AA1225 - 48CC	intronisch
7	Intron 11	A1225 - 27C	intronisch
8	Intron 11	1225 - 18 Δ T	intron. Deletion
9	Intron 11	A1225 - 2G	intronisch
10	Exon 12	C1236T	still*
11	Exon 12	G1296A	still
12	Exon 12	G1326C	still
13	Intron 12	C1350 + 44T	intronisch*
14	Exon 21	G2677T	Ala893Ser*
15	Exon 26	C3435T	still*

Tabelle 4.1: Position, Sequenz und Auswirkung von 15 verschiedenen Polymorphismen des humanen MDR1-Gens, die in einer Probandenstudie in peripheren Lymphozyten detektiert wurden. Die mit * gekennzeichneten Polymorphismen wurden schon in früheren Studien beschrieben [Mickley et al., 1998, Hoffmeyer et al., 2000, Cascorbi et al., 2001].

Sechs SNPs befinden sich in den Intronbereichen 9, 11 und 12 nahe der Exon-Intron-Grenzen. Aufgrund ihrer Lage im Erkennungsbereich von Exon 12 war die A1225-2G Variation (Typ 9) als einzige der intronischen Sequenzveränderungen von Interesse, da sie zu Spleißvarianten führen könnte. Durch diesen SNP wird die hochkonservierte 3'-Spleißstelle in Intron 11 von AG zu GG verändert. Es wäre denkbar, dass dieser Polymorphismus eine Auswirkung auf das RNA-Spleißen hat. Aufgrund der mutierten Erkennungssequenz könnte beim Spleißvorgang neben den Introns auch das komplette Exon 12 entfernt werden, welches die erste Nucleotidbindungsstelle des resultierenden P-glycoproteins darstellt.

Zwei weitere nicht codierende Polymorphismen konnten in der MDR1-Promotorregion detektiert werden. Bei beiden Variationen in der 5'-flankierenden Region handelt es sich um Deletionen einzelner Basen (-318 Δ A und -320 Δ C), die am Anfang von Exon 1a ca. 50 bp upstream der CAAT-Box lokalisiert sind (vergleiche Abbildung 1.5).

Die übrigen drei Polymorphismen in den Exons 7 und 21 führen zu einem Aminosäureaustausch im MDR1-Genprodukt P-glycoprotein. Der in Exon 7 detektierte und bisher nicht bekannte T617C Polymorphismus hat eine Änderung der Aminosäuresequenz in Position 206 (Val \rightarrow Ala) zur Folge. Eine weitere neue Mutation in Exon 7, T662C, führt zum Austausch von Ile \rightarrow Thr in Codon 221 der Aminosäuresequenz. Exon 7 codiert für den Teil der Proteinsequenz, der die dritte und vierte Transmembrandomäne bildet. Die Exon-Intron-Struktur von P-glycoprotein ist im Anhang zu finden.

Neben diesen beiden Polymorphismen in Exon 7 konnte eine weitere Mutation detektiert werden, die in einer Aminosäure-Substitution resultiert. Es handelt sich dabei um die bereits mehrfach in der Literatur beschriebene Variation G2677T in Exon 21 (Ala893Ser) [Mickley et al., 1998, Cascorbi et al., 2001, Tanabe et al., 2001, Calado et al., 2002].

Die übrigen Exons zeigten keinerlei Auffälligkeiten in der SSCP-Analyse, was darauf hindeutet, dass die 36 Probanden dort keine Mutationen aufweisen.

Häufigkeitsverteilung

Aufgrund der Tatsache, dass in Exon 12 außergewöhnlich viele verschiedene Variationen auftraten, wurde die Studie bzgl. Exon 12 von 36 auf 91 Probanden ausgeweitet. Für die zusätzlichen 55 Proben wurde das gleiche Untersuchungsverfahren angewendet wie zuvor beschrieben. Nach Sequenzanalyse der im SSCP-Gel auffälligen PCR-Produkte konnte die in der Tabelle 4.2 dargestellte Häufigkeitsverteilung festgestellt werden. Für die unterschiedlichen Polymorphismen werden allelische Frequenzen von 0,5 bis 31,9 % gefunden. Diese errechnen sich aus der Anzahl homozygoter und heterozygoter Genotypen. Im Anhang wird tabellarisch dargestellt, welche Mutationen bei welchen Probanden detektiert werden konnten (siehe Tabelle B.1). Bei einigen Probanden wurde das gleichzeitige Auftreten von zwei verschiedenen SNPs festgestellt.

Typ	Mutation	Anzahl n		allelische Frequenz [%]	Literatur*
		homozygot	heterozygot		
1	-320ΔA	0	1	1,4	-
2	-318ΔC	1	2	5,5	-
3	T617C	0	3	4,2	-
4	T662C	0	1	1,4	-
5	A999+19G	0	1	1,4	-
6	AA1225-48CC	0	1	0,5	-
7	A1225-27C	1	6	4,4	-
8	1225-18ΔT	0	2	1,1	-
9	A1225-2G	0	1	0,5	-
10	C1236T	1	4	3,3	38,0 - 41,0
11	G1296A	0	1	0,5	-
12	G1326C	0	20	11,0	-
13	C1350+44T	0	3	1,6	4,9 - 5,9
14	G2677T	1	2	5,6	10,6 - 41,6
15	C3435T	9	5	31,9	31,8 - 48,1

Tabelle 4.2: Häufigkeitsverteilung der detektierten MDR1-Polymorphismen nach Untersuchungen an 36 (Typ 1-5, 14, 15) bzw. 91 kaukasischen Probanden (Typ 6-13). n ist die Anzahl der Probanden, die die betreffende Mutation trägt.
*[Hoffmeyer et al., 2000, Cascorbi et al., 2001, Calado et al., 2002].

Cascorbi et al. beschrieben einen Link zwischen dem codierenden Polymorphismus G2677T in Exon 21 und der Wobble-Mutation C3435T in Exon 26 [Cascorbi et al., 2001]. Ein solcher Zusammenhang konnte anhand der vorliegenden Daten nicht bestätigt werden, da der G2677T SNP in dieser Probandenstudie lediglich dreimal detektiert wurde. Eine Kopplung zwischen den übrigen Mutationen konnte nicht nachgewiesen werden.

4.1.2 MDR1-Polymorphismen in humanem Lebergewebe (Kaukasier)

Neben den humanen peripheren Lymphozyten standen insgesamt 74 DNA- bzw. RNA-Proben aus humanem Lebergewebe als Untersuchungsmaterial zur Verfügung. Die Biopsien waren Patienten kaukasischer Herkunft entnommen worden, von denen die meisten an Lebertumoren erkrankt waren. Genaue Angaben über die Erkrankung lagen nicht vor. Zur Verfügung gestellt wurden diese Proben freundlicherweise vom Dr. Margarete-Fischer-Bosch Institut für Klinische Pharmakologie Stuttgart (Studie IKP 148).

Aufgrund sehr geringer Probenmengen wurde die Untersuchung auf die Exons 7, 12 und 21 sowie 26 beschränkt. Obwohl es sich bei C3435T in Exon 26 um eine stille Mutation handelt, wurde diese zusätzlich untersucht, da in zahlreichen Publikationen [Hoffmeyer et al., 2000, Hitzl et al., 2001, Tanabe et al., 2001, Nakamura et al., 2002] ein Zusammenhang zwischen diesem Polymorphismus und der Funktionalität von Pgp postuliert wurde.

Die von den meisten Probanden (50) zur Verfügung stehende DNA war nur ausreichend für eine einzige PCR. Da bei Exon 12 die meisten Variationen aufgetreten waren und sich auch einige Polymorphismen in den intronischen Bereichen befanden, wurde dieses limitierte DNA-Material zur Amplifizierung von Exon 12 verwendet. Für weitere Untersuchungen stand lediglich RNA zur Verfügung, welche zunächst mittels RT-PCR in cDNA transkribiert wurde. Eine Betrachtung der Exon-Intron-Grenzen war deshalb bei diesen Proben nicht möglich. Die für die RT-PCR verwendeten Primerpaare sind in Tabelle 4.3 angegeben.

Exon	Primer	T_A [°C]
7	5'-GAGCTTAACACCCGACTTACAG-3' 5'-GACCTCTTCAGCTACTGCTCC-3'	50
12	5'-GTATTGACAGCTATTTCGAAGAGTG-3' 5'-GCATTGGCTTCCTTGACAGCT-3'	48
21	5'-GAGCATTGACTACCAGGCTCG-3' 5'-GCATTGGCTTCCTTGACAGCT-3'	50
26	5'-CATCCTGTTTGACTGCAGC-3' 5'-CACCAGAGAGCTGAGTTC-3'	50

Tabelle 4.3: Primer für die Amplifizierung der Exons 7, 12, 21 und 26 mittels RT-PCR.

Häufigkeitsverteilung

Beim Screening der 74 Leberbankproben konnten vier der zuvor beschriebenen Polymorphismen detektiert werden. Bei insgesamt 26 der 74 Probanden wurde die Variation C1236T (Typ 10) nachgewiesen. Dabei wurden 10 homozygote und 16 heterozygote Fälle detektiert, was einer allelischen Frequenz von 24,3 % entspricht. Der C1350+44T Polymorphismus (Typ 13) wurde lediglich bei 2 von 50 Probanden detektiert. Damit ergibt sich eine allelische Häufigkeit von 4,0 % für diesen SNP. Die bekannte Variation C2677T (Ala893Ser) in Exon 21 (Typ 14) findet sich in 33,1 % der Untersuchten. Besonders interessant ist die Häufigkeitsverteilung der Wobble-Mutation C3435T in Exon 26. Die Genotypisierung von 70 der insgesamt 74 Probanden lieferte jeweils 33 TT- und CT-Träger (47,1 %), aber lediglich 4 CC-Träger (Wildtyp, 5,7%). Damit erhält man eine allelische Frequenz von 68,5 %. Zur Übersicht sind alle Werte in Tabelle 4.4 aufgeführt.

Typ	Mutation	Anzahl n	allelische Frequenz [%]	Literatur*
10	C1236T	26	24,3	38,0 - 41,0
13	C1350+44T	2**	4,0	4,9 - 5,9
14	G2677T	33	33,1	10,6 - 41,6
15	C3435T	66	68,5	31,8 - 48,1

Tabelle 4.4: Häufigkeitsverteilung der MDR1-Polymorphismen nach Untersuchung an 74 bzw. 50** humanen Lebergeweben (Kaukasier). n ist die Anzahl der Probanden, die die betreffende Mutation trägt. *[Hoffmeyer et al., 2000, Cascorbi et al., 2001, Calado et al., 2002].

4.1.3 MDR1-Polymorphismen in humanen peripheren Lymphozyten (Chilenen)

Neben den bereits in den Kapiteln 4.1.1 und 4.1.2 beschriebenen kaukasischen Proben wurde ein Mutationsscreening einer chilenischen Population durchgeführt. Die von J. F. Miquel (Santiago, Chile) zur Verfügung gestellten DNA-Proben waren aus humanen peripheren Lymphozyten isoliert worden [Miquel et al., 1998]. Alle 62 Probanden waren chilenischer Herkunft, gehörten jedoch drei unterschiedlichen ethnischen Gruppen an: Maoris, Mapuches und Amerindians. Die Zugehörigkeit der einzelnen Probanden zu den unterschiedlichen ethnischen Gruppen war jedoch nicht bekannt.

Desweiteren war die Hälfte dieser Probanden an einem Gallenleiden (Cholelithiasis, Gallensteine) erkrankt, die übrigen 31 Probanden waren gesund. Interessanterweise war auch der kaukasische Proband mit dem bislang einzigartigen A1225-2G SNP (siehe Kapitel 4.1.1) an Gallensteinen erkrankt. Da diese Erkrankung für das Alter des Probanden von 22 Jahren eher ungewöhnlich ist, wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen der Krankheit und der MDR1-Variation nicht ausgeschlossen. Das Screening der 62 chilenischen Probanden sollte Aufschluss darüber geben.

Mittels der zuvor beschriebenen Verfahren (PCR und anschließende SSCP-Analyse) wurde gezielt nach der A1225-2G Mutation (Typ 9) gescreent. Dabei wurden lediglich solche PCR-Produkte mittels Sequenzierung analysiert, die im SSCP-Gel eine ähnliche Bandenveränderung aufwiesen, wie diese mutationstragende Probe.

Neben dem Screening nach der A1225-2G Mutation wurde eine Genotypisierung in Bezug auf die Variationen -318 Δ C, T662C und C3435T (Typ 2, 4 und 15) durchgeführt. Da mangels DNA-Menge keine vollständige Exonanalyse durchgeführt werden konnte, wurden zum gezielten Screening nach den drei genannten Polymorphismen folgende zwei Methoden angewendet:

- Die Genotypisierung bezüglich der Mutation C3435T in Exon 26 erfolgte mittels RFLP-Analyse (RFLP = Restriction Fragment Length Polymorphism). Dies ist möglich, da durch diesen Polymorphismus die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym MboI bzw. für das Isoschizomer NdeII wie folgt verändert wird: GATC \rightarrow GATT. Verdau mit diesen Enzymen liefert bei Verwendung der in Tabelle 3.2 angegebenen Primer zwei Fragmente der Größen 191 bp und 88 bp, sofern es sich um die Wildtypsequenz handelt. Bei Vorhandensein eines T-Allels erhält man 3 Banden (heterozygot), bei zwei 3435T-Allelen nur eine Bande (homozygot).
- Die Mutationen -318 Δ C, T662C und C3435T wurden mittels allelspezifischer PCR ermittelt. Dazu wurden Primer konstruiert, von denen jeweils einer genau an der Mutationsstelle endet. Trägt der Primer die WT-Sequenz, so werden nur von WT-Templaten Produkte erhalten. Trägt der Primer die gesuchte Mutation, so werden nur mutierte Template amplifiziert. Erhält man in beiden Fällen ein Produkt, so ist die Mutation nur auf einem Allel (heterozygot) vorhanden.

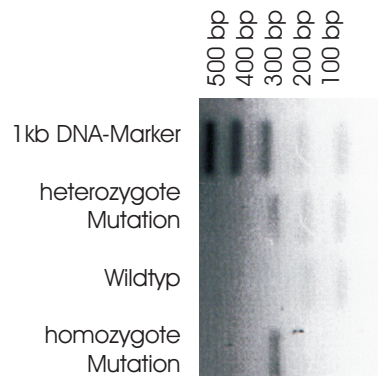


Abbildung 4.2: Bandenmuster der PCR-Produkte (Exon 26) verschiedener Probanden nach Restriktionsverdau mit NdeII.

Häufigkeitsverteilung

Die Ergebnisse des Screenings sind in Tabelle 4.5 wiedergegeben. Die Mutation an der 3'-Spleißstelle in Exon 11 (A1225-2G) konnte bei keinem der 62 chilenischen Probanden detektiert werden. Eine mögliche Korrelation zwischen dieser Mutation und der Erkrankung an Cholelithiasis wurde somit weitgehend ausgeschlossen.

Interessanterweise wurde die Deletion -318 Δ C im Promotorbereich des MDR1-Gens mit einer allelischen Frequenz von 24,2 % detektiert. Im Vergleich zu den kaukasischen Proben tritt diese genetische Variation bei den chilenischen Probanden also um das Fünffache häufiger auf. Die Verteilung bei an Gallensteinen erkrankten und bei gesunden Probanden ist etwa gleich groß, so dass auch hier ein Zusammenhang ausgeschlossen werden kann. Dies ist auch der Fall bei dem Aminosäure-substituierenden SNP T662C, der bei den 62 untersuchten chilenischen Proben mit einer Allelfrequenz von 33,9 % gefunden wurde. Das ist mehr als acht mal so häufig wie bei den kaukasischen Proben. Dagegen trat der C3435T Polymorphismus in Exon 26 mit einer etwas niedrigeren Häufigkeit von 27,4 % auf, während er bei 33,1 % der kaukasischen Proben gefunden wurde. Hier zeigten die an Gallensteinen leidenden Probanden eine leichte Tendenz zu höherer allelischer Frequenz als die gesunden Probanden (siehe Tabelle 4.5).

Diese teilweise starken Unterschiede in der allelischen Frequenz im Vergleich zu den kaukasischen Probanden sind vermutlich auf die ethnische Zugehörigkeit zurückzuführen. In der Literatur wurde schon mehrfach über solche Differenzen bei der Häufigkeitsverteilung natürlich auftretender Polymorphismen in Bezug auf ethnische Gruppen berichtet [Ameyaw et al., 2001, Sakaeda et al., 2002, Tang et al., 2002].

Typ	Mutation	Anzahl n	allelische Frequenz [%]				
			he	ho	ges	krank	gesund
2	-318 Δ C	30	24,2	0	24,2	27,4	21,0
4	T662C	34	76,5	23,5	33,9	35,4	32,2
9	A1225-2G	0	0	0	0	0	0
15	C3435T	24	14,5	12,9	27,4	32,2	22,5

Tabelle 4.5: Häufigkeitsverteilung der detektierten MDR1-Polymorphismen in humanen peripheren Lymphozyten nach Untersuchungen an 62 Probanden (Chilenen). he: heterozygot; ho: homozygot; ges: gesamt.

4.2 Funktionelle Charakterisierung genetischer Variationen

Nach Abschluss des Mutationsscreenings an DNA-Proben unterschiedlicher Herkunft wurden Untersuchungen zur Funktionalität verschiedener, interessant erscheinender genetischer Variationen angestellt.

4.2.1 Bestimmung der *MDR1*-mRNA-Expression

Um festzustellen, ob eine Korrelation zwischen den gefundenen Polymorphismen und der *MDR1*-mRNA-Expression besteht, wurde mittels radioaktiver RT-PCR eine Bestimmung der relativen mRNA-Expressionen vorgenommen. Ein mitgeführtes GAPDH-Fragment diente der Normierung. Die Auswertung der mRNA-Expressionswerte erfolgte densitometrisch mit Hilfe der Software TINA 2.0.

Untersuchung der RNA-Expression in humanen periphären Lymphozyten (Kaukasier)

Mit Hilfe des *RNeasy-Kits* (Qiagen) wurde aus den periphären Lymphozyten die RNA der 91 zuvor nach natürlich auftretenden Polymorphismen gescreenten kaukasischen Probanden (siehe Kapitel 4.1.1) gewonnen. Die semiquantitative Bestimmung der *MDR1*-mRNA-Gehalte erfolgte wie in Kapitel 3.18.1 beschrieben. Abbildung 4.3 zeigt beispielhaft einen für die Auswertung herangezogenen Röntgenfilm mit 19 der 91 Proben.



Abbildung 4.3: Röntgenfilm zur Bestimmung der *MDR1*-mRNA von 19 der insgesamt 91 kaukasischen Probanden (periphere Lymphozyten).

In den Abbildungen 4.4 (Probanden 5-50) bzw. 4.5 (Probanden 51-95) ist die densitometrische Auswertung der relativen mRNA-Gehalte grafisch dargestellt. Aufgetragen wurden die relativen densitometrischen Einheiten (DE) in Prozent. Diese werden durch Quotientenbildung aus den densitometrischen Werten für das *MDR1*-Fragment und das GAPDH-Fragment erhalten. Proben, für die keine GAPDH-Expression detektiert wurde, wurden nicht zur Auswertung herangezogen. Der Mittelwert über alle Probanden wurde als 100 % gesetzt und die Werte für die einzelnen Probanden danach errechnet.

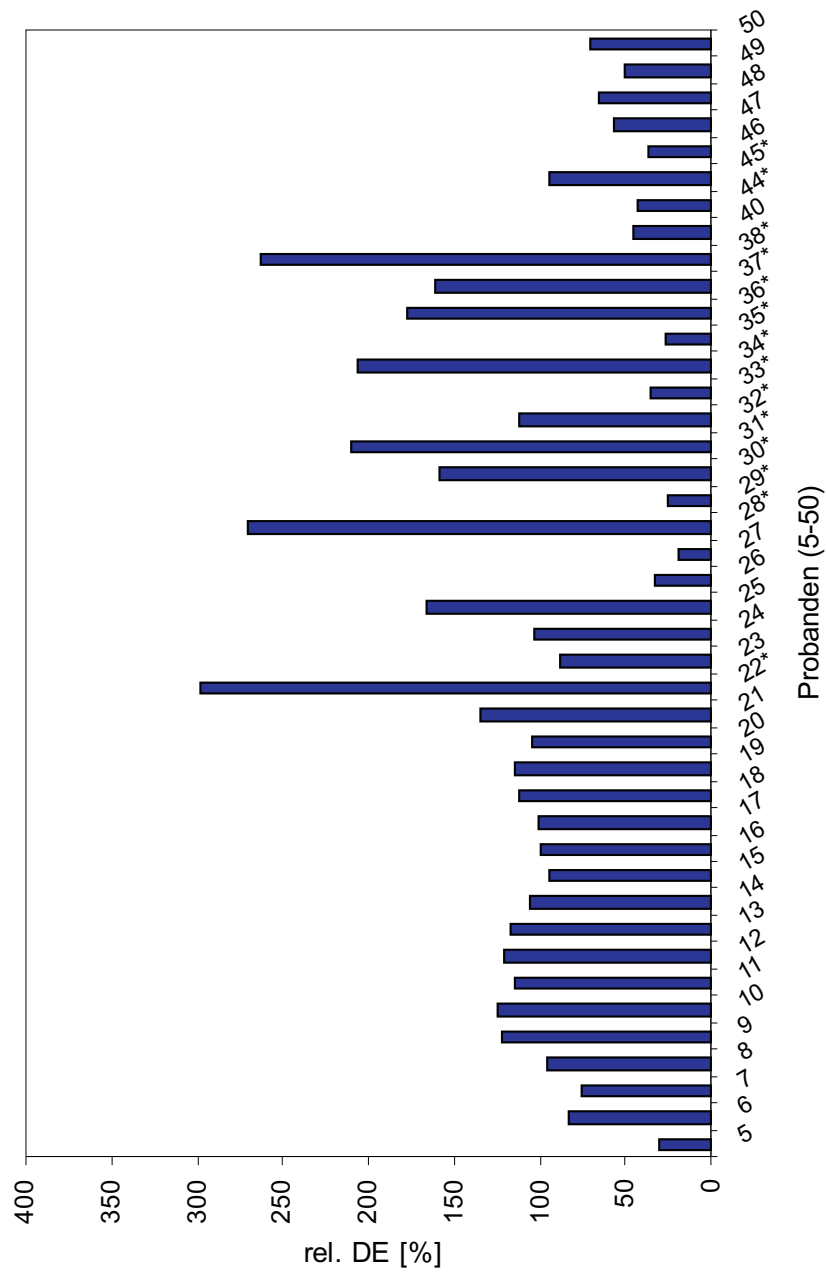


Abbildung 4.4: Densitometrische Auswertung der *MDR1*-mRNA-Expression in humanen peripheren Lymphozyten (Probanden 5-50). * = 36 Probanden, an denen sämtliche Exons untersucht wurden.

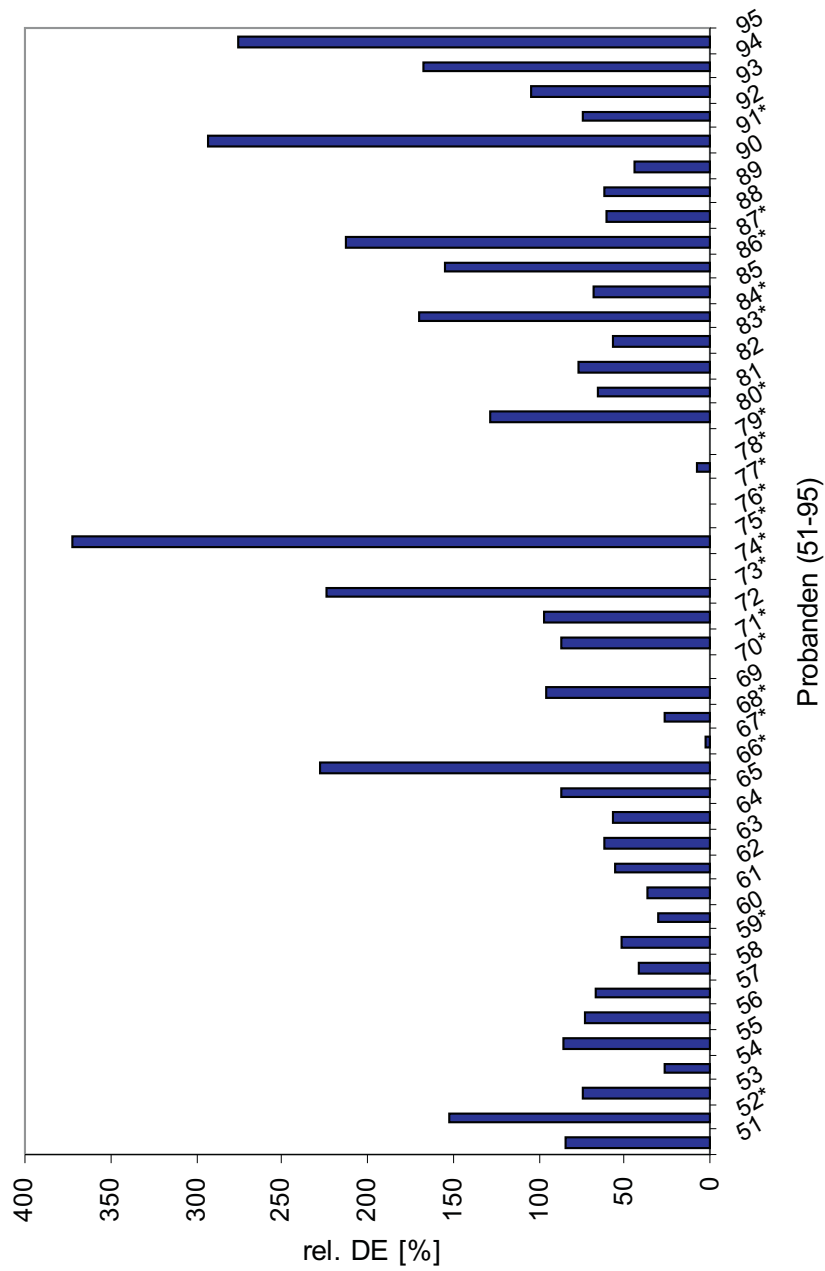


Abbildung 4.5: Densitometrische Auswertung der *MDR1*-mRNA-Expression in humanen peripheren Lymphozyten (Probanden 51-95). * = 36 Probanden, an denen sämtliche Exons untersucht wurden.

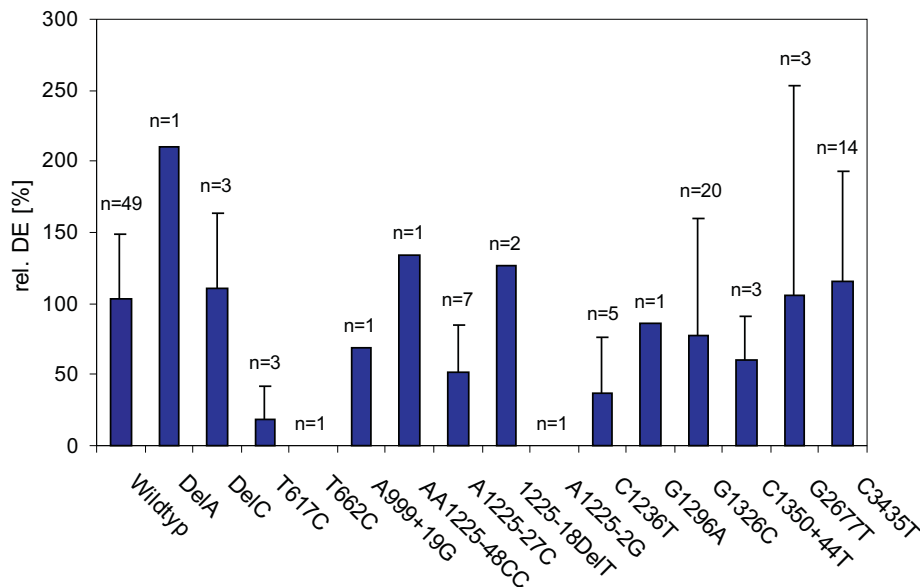


Abbildung 4.6: Densitometrische Auswertung der *MDR1*-mRNA-Expression in humanen peripheren Lymphozyten (Kaukasier) in Abhängigkeit der detektierten *MDR1*-Polymorphismen. n = Anzahl der mutationstragenden Probanden.

Die einzelnen Probanden wiesen deutliche Unterschiede in der RNA-Expressionshöhe auf. Um festzustellen, ob diese Schwankungen auf die unterschiedlichen genetischen Variationen zurückzuführen sind, wurden die relativen mRNA-Gehalte bezüglich der verschiedenen Mutationen berechnet. Die Mittelwerte \pm Standardabweichungen sind als Diagramm in Abbildung 4.6 dargestellt und zur besseren Übersicht in Tabelle 4.6 wiedergegeben.

Bei Vergleich mit der Wildtyp-Expression ($102,7 \pm 46,6$) sind für einige Polymorphismen deutliche Unterschiede in der RNA-Expression zu erkennen. Für die Deletion -320 Δ A wird beispielsweise ein um das Zweifache erhöhter *MDR1*-mRNA-Gehalt gefunden, während für die nur zwei Basen entfernt liegende Deletion -318 Δ C kaum ein Unterschied zur WT-Expression besteht. Der SNP T617C dagegen scheint eine Erniedrigung der RNA-Expression zur Folge zu haben. Bei Probanden, die die Mutation T662C bzw. A1225-2G tragen, wurde sogar ein völliger Expressionsverlust festgestellt.

Eine eindeutige Korrelation zwischen dem Auftreten bestimmter Mutationen und der Expressionshöhe der *MDR1*-mRNA lässt sich aus diesen Daten jedoch nicht ableiten, da eine statistische Aussage aufgrund der teilweise sehr geringen mutationstragenden Probandenzahlen unmöglich ist. Ein Signifikanztest war lediglich für diejenigen Polymorphismen möglich, die bei mindestens drei Probanden detektiert wurden (T617C, A1225-27C, C1236T, G1326C, C1350+44T, G2677T, C3435T). Obwohl einige Tendenzen zu erhöhter oder erniedrigter RNA-Expression in Relation zu den auftretenden Polymorphismen

Typ	Mutation	Anzahl n	allelische Frequenz [%]	rel. DE [%]
WT	Wildtyp			102,7 ± 46,6
1	-320ΔA	1	1,4	210,3
2	-318ΔC	3	5,5	110,7 ± 52,2
3	T617C	3	4,2	18,6 ± 22,8
4	T662C	1	1,4	0
5	A999+19G	1	1,4	69,0
6	A1225-48CC	1	0,5	134,4
7	A1225-27C	7	4,4	52,2 ± 32,3
8	1225-18ΔT	2	1,1	126,9
9	A1225-2G	1	0,5	0
10	C1236T	5	3,3	37,2 ± 39,3
11	G1296A	1	0,5	86,2
12	G1326C	20	11,0	77,2 ± 82,1
13	C1350+44T	3	1,6	59,7 ± 31,0
14	G2677T	3	5,6	105,2 ± 88,1
15	C3435T	14	31,9	115,9 ± 76,8

Tabelle 4.6: Mittelwerte \pm SD der *MDR1*-mRNA-Expression in humanen peripheren Lymphozyten in Abhängigkeit der detektierten *MDR1*-Polymorphismen (Kaukasier, $n_{\text{ges}}=36$ (Typ 1-5, 14, 15) bzw. $n_{\text{ges}}=91$ (Typ 6-13)).

vorhanden sind, liefert der Dunnett's Test für die relativen RNA-Gehalte dieser SNPs im Vergleich zum Wildtyp aufgrund der hohen Standardabweichungen p-Werte $> 0,05$. Dies legt nahe, dass keine dieser genetischen Veränderungen einen Einfluss auf die RNA-Expression von *MDR1* ausübt.

Wie bereits erwähnt, wiesen die Träger der Mutationen T662C und A1225-2G keine detektierbare mRNA-Expression auf. Spätere Untersuchungen zeigen jedoch, dass T662C keine verringerte Expression verursacht (siehe Kapitel 4.2.6). A1225-2G wurde leider in keiner weiteren Population gefunden, so dass ein möglicher Einfluss auf die *MDR1*-mRNA-Expression nicht weiter untersucht bzw. verifiziert werden konnte. Möglicherweise liegen den niedrigen *MDR1*-mRNA-Gehalten dieser beiden Probanden andere Ursachen zugrunde, wie beispielsweise Polymorphismen in regulierenden Transkriptionsfaktoren. In Kapitel 5 wird auf die möglichen Gründe für die interindividuellen Schwankungen in der *MDR1*-mRNA näher eingegangen.

Untersuchung der RNA-Expression in Leberproben (Kaukasier)

Die *MDR1*-mRNA-Expression der 74 Leberbankproben wurde nach den gleichen Verfahren bestimmt, wie zuvor beschrieben. Abbildung 4.7 zeigt die relativen *MDR1*-RNA-Gehalte der 74 einzelnen Probanden. Auch bei dieser Studie wurde die mRNA-Expression in Bezug auf die unterschiedlichen genetischen Variationen gesetzt. Die relativen densi-

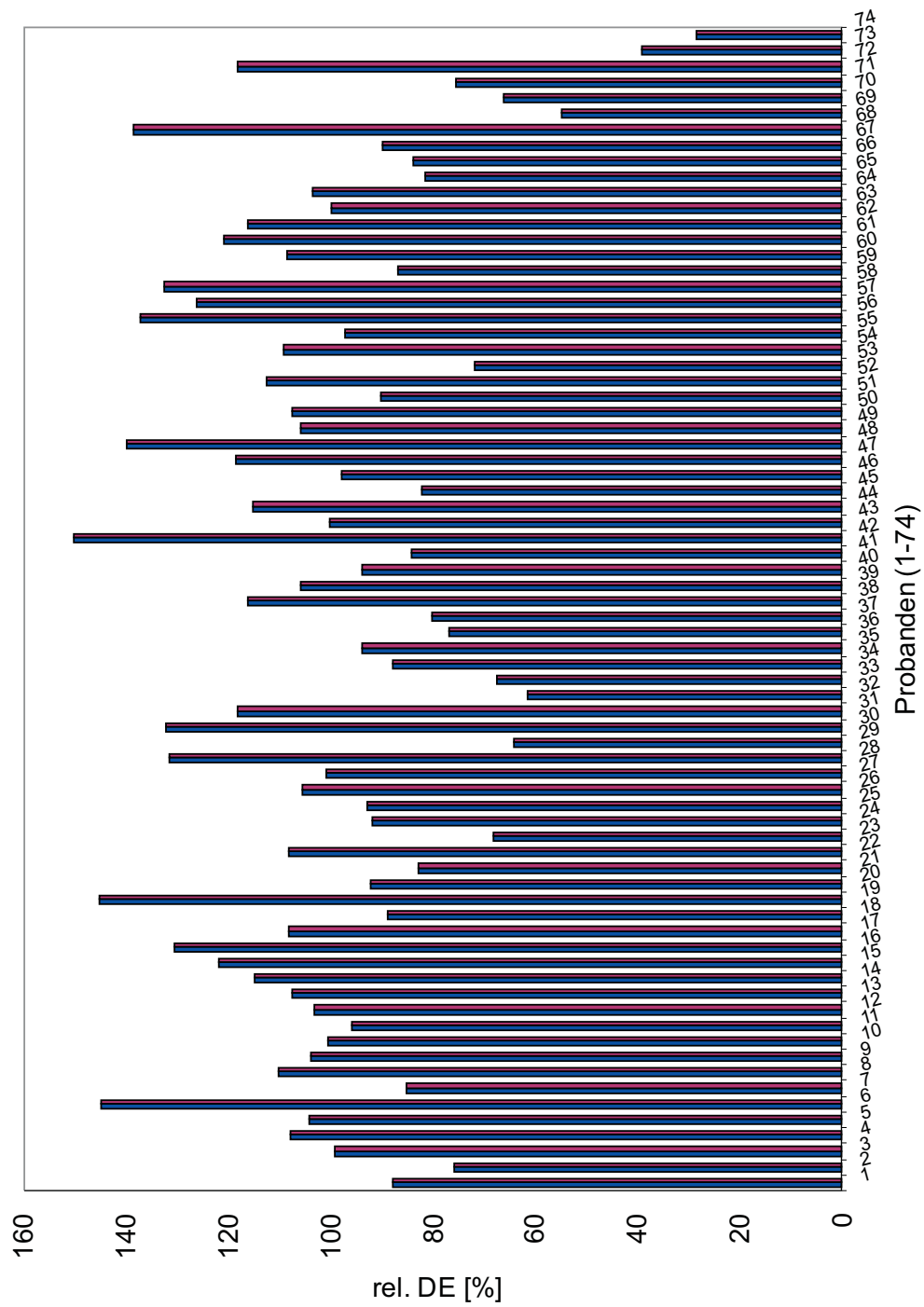


Abbildung 4.7: Densitometrische Auswertung der *MDR1*-mRNA-Expression in humanen Leberproben (Kaukasier, n=74).

Typ	Mutation	Anzahl		allelische	
		n	Frequenz [%]	rel. DE [%]	
WT	Wildtyp	4		110,6	± 21,1
10	C1236T	26	24,3	93,6	± 26,1
13	C1350+44T	2*	4,0*	113,9	
14	G2677T	33	33,1	97,5	± 25,4
15	C3435T	66	68,5	99,6	± 24,6

Tabelle 4.7: Mittelwerte \pm SD der mRNA-Expression in humanen Leberproben (Kaukasier) in Abhängigkeit der detektierten *MDR1*-Polymorphismen ($n_{\text{ges}}=74$ bzw. $n_{\text{ges}}^*=50$).

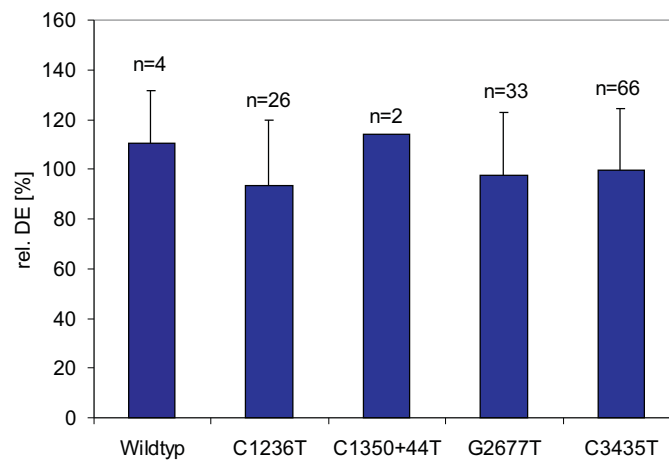


Abbildung 4.8: Densitometrische Auswertung der *MDR1*-mRNA-Expression in humanen Leberproben (Kaukasier) in Abhängigkeit der detektierten *MDR1*-Polymorphismen. n = Anzahl der mutationstragenden Probanden.

tometrischen Einheiten (DE) \pm Standardabweichungen sind in Tabelle 4.7 aufgelistet. Abbildung 4.8 zeigt anschaulich die Expressionshöhen im Vergleich zum Wildtyp. Wie anhand der Daten eindeutig zu erkennen ist, liegen die mittleren RNA-Expressionen der mutationstragenden Proben im Bereich der Expression für die Wildtyp-RNA. Dies wird im Dunnett's Test mit $p > 0,05$ bestätigt.

Auch bei dieser Studie wurde die mRNA-Expression in Bezug gesetzt auf das Vorhandensein der unterschiedlichen Mutationen. In Tabelle 4.7 sind die mittels densitometrischer Auswertung bestimmten Werte \pm SD für die *MDR1*-mRNA-Expression in Abhängigkeit der aufgetretenen Mutationen angegeben.

Mutationsprimer	
Mut- ΔA	5'-CTA GAG AGG TGC ACG GAA GCC AG-3'
Mut- ΔC	5'-CTA GAG AGG TGC ACG GAA GCC AGA AC-3'
Selektionsprimer	
Sel-Sca	5'-GTG ACT GGT GAG GCC TCA ACC AAG TC-3'

Tabelle 4.8: Primer für den Einbau der Deletionsmutationen -320 ΔA bzw. -318 ΔC in das Vektorkonstrukt pGL2/MDR1. **Rot:** Einführung einer einzigartigen ScaI-Restriktionsschnittstelle in den pGL2-Vektor.

4.2.2 Regulation der MDR1-Genexpression

Zur Untersuchung des Einflusses von genetischen Variationen in der Promotorregion auf die Aktivierbarkeit der MDR1-Genexpression wurden Reportergenkonstrukte mit den beiden in Kapitel 4.1.1 beschriebenen Deletionen ΔA bzw. ΔC hergestellt und in einem Luciferase-Assay getestet.

Für die Untersuchungen wurde freundlicherweise von T. Gant [Gant, 2000] ein Reportergenkonstrukt (pGL2/MDR1) zur Verfügung gestellt, das ein 980 bp großes Insert der 5'-flankierenden Region des MDR1-Gens enthält. Bei diesem Insert handelt es sich um ein PstI-Fragment der genomischen Sequenz, welches die Haupt-Downstream-Transkriptionsstartstelle trägt. Isoliert wurde es aus einem Klon einer Cosmid-Library, die aus humanen KB-V1 vinblastinresistenten Zellen erstellt worden war. Nach Subklonieren in den Vektor pGEM3 wurde das Konstrukt pMDR-P2 erhalten [Ueda et al., 1987b]. Über die PstI-Schnittstellen wurde das 980 bp-Fragment von Gant zunächst in den Vektor pGEMZ4 subkloniert und nach erneutem Ausschneiden mit PstI und KpnI in den Vektor pGL2-basic (Fa. Promega, siehe Abbildung C.1) inseriert. Das fertige Reportergenkonstrukt pGL2/MDR1 erwies sich nach funktionellen Tests als aktiv [Gant, 2000].

Mit Hilfe des *Transformer-Site-Directed Mutagenesis Kits* (Fa. Clontech) wurden in den MDR1-Promotor des pGL2/MDR1-Vektors die beiden detektierten Deletionen ΔA bzw. ΔC eingebaut (siehe Kapitel 3.21). Beide Deletionen sind am Beginn von Exon 1a ca. 50 bp downstream der CAAT-box lokalisiert (siehe Abbildung 1.5).

Zur Einführung der Deletionen -320 ΔA bzw. -318 ΔC in das Vektorkonstrukt wurden die in Tabelle 4.8 aufgelisteten Mutationsprimer sowie ein Selektionsprimer konstruiert. Der gelungene Einbau der Deletionsmutationen in den Vektor pGL2/MDR1 wurde anhand von Sequenzanalysen verifiziert.

Die so hergestellten Reportergenkonstrukte pGL2/MDR1- ΔA bzw. pGL2/MDR1- ΔC sowie das Ursprungskonstrukt pGL2/MDR1 wurden mittels Calciumphosphat-Coprecipitationsmethode (Kapitel 3.22.1) transient in die humane Hepatoblastom-Zelllinie HepG2 transfiziert. Die Reportergenaktivität nicht transfizierter HepG2-Zellen wurde als Basalwert von den übrigen Messwerten subtrahiert. Die Ergebnisse des Reportergenassays

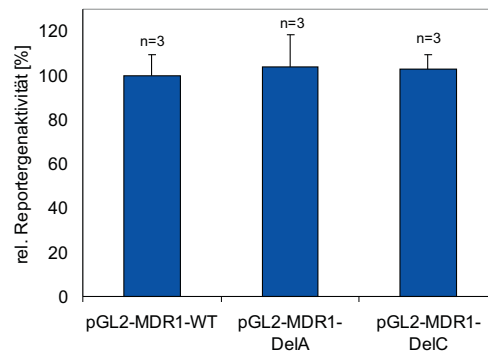


Abbildung 4.9: Relative Reporterogenaktivitäten \pm SD von HepG2-Zellen 48h nach Transfektion mit den Reportergenkonstrukten pGL2/MDR1, pGL2/MDR1- Δ A bzw. pGL2/MDR1- Δ C; n=3: Zahl der unabhängigen Transfektionen.

sind in Abbildung 4.9 dargestellt. Angegeben sind die relativen Reporterogenaktivitäten in Prozent, die durch Quotientenbildung von Reporterogenaktivität und Kontrollgenaktivität erhalten werden.

Weder die Deletion -320 Δ A noch die Deletion -318 Δ C in der 5'-flankierenden Region des MDR1-Gens führte zu einer signifikanten Veränderung der relativen Reporterogenaktivität im Vergleich zur Aktivierung durch den Wildtyp-Promotor. Die Ergebnisse des Luciferase-Assays zeigen deutlich, dass keine der beiden untersuchten SNPs in der Promotorregion des MDR1-Gens einen Einfluss auf die Basalaktivität ausübt. Der Dunnett's Signifikanztest bestätigt dies mit $p > 0,05$.

4.2.3 Strategien zur Herstellung eines MDR1-Expressionssystems zur Untersuchung der Expression und Aktivität von P-glycoprotein

Zur Untersuchung der Funktionalität der genetischen Variationen des MDR1-Gens, welche in einer Aminosäuresubstitution von P-glycoprotein resultieren (T617C, T662C, G2677T), war zunächst die Etablierung eines entsprechenden Expressionssystems erforderlich. Dabei handelte es sich um einen Expressionsvektor mit einem geeigneten Promotor, unter dessen Kontrolle die gesamte codierende Sequenz, d. h. die vollständige MDR1-cDNA inkloniert werden sollte (siehe Abbildung 4.10). Nach Transfektion dieses Expressionssystems in low-MDR1-exprimierende COS-7 Zellen wurde die P-glycoprotein Expression mittels Western-Blotting bestimmt (siehe Kapitel 3.18.2). Zur Ermittlung der Transportaktivität von Pgp wurde der Rhodamin123-Transportassay angewendet (siehe Kapitel 3.19).

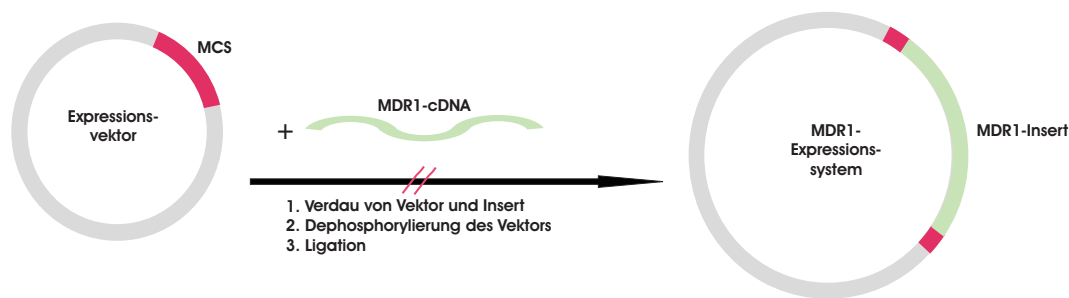


Abbildung 4.10: Schematische Darstellung der Klonierung eines Expressionssystems für MDR1 mittels Ligation.

Herstellung des Expressionssystem durch Ligation

Die Herstellung des Expressionssystems sollte zunächst mit den gängigen Klonierungsstrategien (Restriktion + Ligation, siehe Kapitel 3.20) realisiert werden. Im Folgenden wird kurz auf die verschiedenen getesteten Verfahren eingegangen. Die Vektoren pCI-neo (Promega) sowie pCMV-Script (Stratagene) wurden als geeignete Expressionsvektoren ausgewählt und für die Klonierungsversuche eingesetzt. Schematische Abbildungen beider Expressionsvektoren finden sich im Anhang (Abbildungen C.4 bzw. C.5).

Gewinnung der full-length MDR1-cDNA

Die Gewinnung der full length MDR1-cDNA erfolgte mittels PCR. Als Template für die Amplifizierung diente das MDR1 enthaltende Plasmid pHAMDR1 [Kane et al., 1989, Kane et al., 1990, Metz et al., 1995], das freundlicherweise von S. E. Kane, Beckman Research Institute (Duarte, Kanada) zur Verfügung gestellt worden war [Kane, 2002]. Durch Einsatz des Proofreading-Enzyms *Pfu*-Turbo-Polymerase (Stratagene) wurde ein ca. 4,2 kb großes MDR1-Fragment mit zwei adhäsiven Strangenden (blunt ends) erhalten. Die Verwendung modifizierter forward-Primer (siehe Tabelle 4.9) ermöglichte das Einführen von für die Ligation geeigneten Restriktionsschnittstellen. Durch den eingesetzten reverse-Primer war die Verwendung einer in der Sequenz enthaltenen XhoI-Schnittstelle möglich. Die Basenfolge des MDR1-PCR-Produktes wurde durch Sequenzieren in beide Richtungen verifiziert (Fa. Seqlab, Göttingen).

Zur Ligation in den pCMV-Script-Vektor wurde das MDR1-Amplifikat ohne vorherigen Restriktionsverdau eingesetzt. Für die Klonierung in den pCI-neo-Vektor wurde das MDR1-Insert zunächst mit den entsprechenden, in Tabelle 4.9 angegebenen Restriktionsenzymen, wie in Kapitel 3.17 beschrieben verdaut.

Klonierungsstrategien

- Der pCI-neo-Vektor wurde entsprechend der für die cDNA-Amplifizierung verwendeten Primerpaare mit den gleichen Restriktionsenzymen verdaut, wie zuvor das MDR1-PCR-Produkt. Nach Dephosphorylierung des linearen Vektors mit CIAP

	Sequenz	Enzym
forward-Primer		
1	5'-CGG TGG CAC TCG AGT AGC GGC TCT TC-3'	XhoI
2	5'-CTG TGC TTA TGC CCG CAG CTC GAG CCG-3'	XhoI
3	5'-GCT CTT GCC TAG CTA GCG CAA GGC CCT-3'	NheI
4	5'-CAG TGA TAG AGC TCT TGC CTA GCT AGC GCA AG-3'	NheI
reverse-Primer		
1	5'-GCA TCC GGC ACC TCC TCG TCC TGA G-3'	XhoI

Tabelle 4.9: Primer, die zur Amplifizierung der MDR1-cDNA eingesetzt wurden, **Rot:** Restriktionsschnittstelle.

erfolgte die Ligation mit Hilfe von T4-DNA-Ligase. Dabei wurden verschiedene Reaktionszusammensetzungen (Vektor:Insert = 1:1 - 1:50) sowie unterschiedliche Reaktionsbedingungen (T = 4°C - 37°C; t = 3h - ÜN) getestet.

- Die Verwendung des Expressionsvektors pCMV-Script erfordert ein Insert mit zwei adhäsiven Enden. Da der Vektor in linearisierter Form vorliegt, wird dem Reaktionsansatz das Restriktionsenzym SrfI zugegeben, um eine Selbstligation zu vermeiden. Die Ligation wurde gemäß der Herstellervorschrift durchgeführt (siehe Kapitel 3.20). Wie auch bei Verwendung des pCI-neo-Vektors wurden verschiedene Reaktionsbedingungen getestet.

Trotz Verwendung zahlreicher unterschiedlicher Reaktionsbedingungen und Ligationsansätze war es nicht möglich, mittels der oben genannten Verfahren das gewünschte MDR1-Expressionssystem herzustellen. Aufgrund dessen wurde nach einer alternativen Klonierungsstrategie gesucht.

Herstellung des Expressionsplamids mit Hilfe von Rekombinase

Eine Alternative zur Ligation stellt eine auf dem Prinzip der Rekombination basierende Methode dar [Hartley et al., 2000]. In der vorliegenden Arbeit wurde die rekombinatorische Klonierung der MDR1-cDNA mittels GatewayTM-Cloning-Technology (Invitrogen) realisiert. Diese Technologie wird im Wesentlichen durch zwei Reaktionen bestimmt:

1. In einer ersten Reaktion wird ein *attB*-flankiertes PCR-Produkt der Gensequenz in einen Donorvektor eingebracht, um einen sogenannten Eingangsklon zu erhalten.
2. In einer zweiten Reaktion wird durch Rekombination des zuvor gewonnenen Eingangsklons mit dem Zielvektor der Expressionsvektor kreiert. Diese Reaktion wird durch einen Mix aus verschiedenen Rekombinationsproteinen vermittelt.

Beide Reaktionen sind zur Veranschaulichung in Abbildung 4.11 schematisch dargestellt.

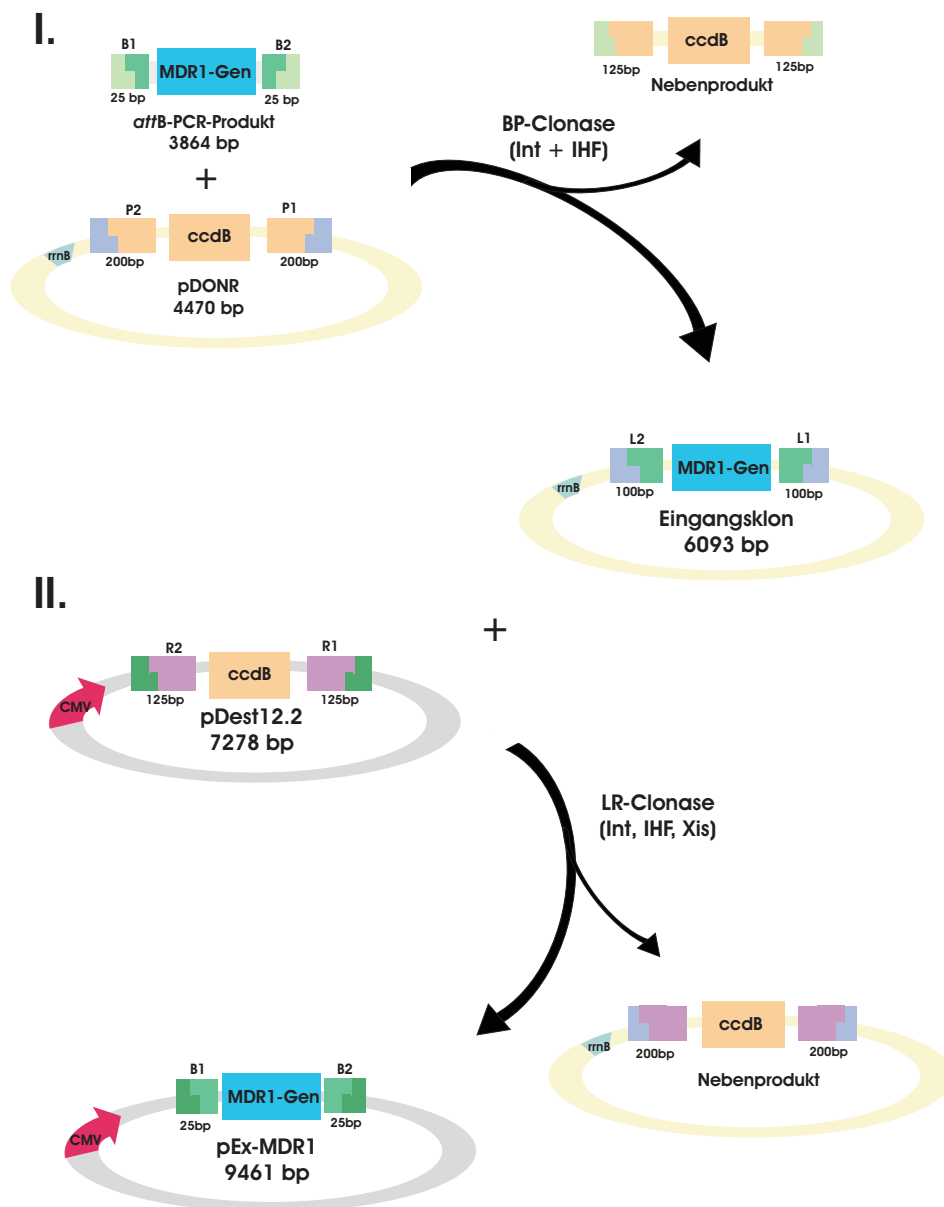


Abbildung 4.11: Die Klonierung des Expressionsvektors pEx-MDR1 mittels Clonase erfolgt in zwei Schritten: **I.** In der sogenannten BP-Reaktion wird der Eingangsklon aus dem entsprechenden MDR1-PCR-Produkt synthetisiert. Vermittelt wird diese Reaktion durch einen Enzym-Mix, der neben dem λ -Rekombinationsprotein Int das *E.coli* Protein IHF enthält. Die Verwendung von Primern mit terminalen, 25 bp langen attB-Adaptersequenzen ermöglicht directionale Klonierung des PCR-Produktes. **II.** Die sogenannte LR-Reaktion dient zur Herstellung des Expressionsplasmids pEx-MDR1 aus dem Eingangsklon mittels LR-Clonase. Die Rekombinationsproteine schneiden links und rechts des Gens im Eingangsklon und klonieren das so gewonnene Insert in die korrespondierenden attR-Stellen des Zielvektors. Zur Vermittlung dieser Reaktion dienen die λ -Rekombinationsproteine Int und Xis sowie das *E.coli* Protein IHF. Abbildung modifiziert nach der Herstellervorschrift (Invitrogen).

forward5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCGAGCGCGAGGTCGGG**ATGG**-3'**reverse**5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCAGAGT**TCA**CTGGCGCTTTG-3'**Tabelle 4.10:** Primerpaar zur Herstellung des Eingangsklons aus MDR1-cDNA; *Kursiv:* attB-Sites. **Rot:** Start-bzw. Stop-Codon. Fragmentgröße: 3864 bp.

Als Donorvektor wurde der Vektor pDONRTM der Fa. Invitrogen verwendet (siehe Abbildung C.2, Anhang). Für die Herstellung des MDR1-Eingangsklons wurden die in Tabelle 4.10 wiedergegebenen Primer konstruiert. Die Amplifizierung der full-length MDR1-cDNA mit diesen Primern unter den in Kapitel 3.14.2 angegebenen Bedingungen liefert ein Fragment von 3864 bp.

Als Zielvektor für die Herstellung eines MDR1-Expressionssystems wurde der Vektor pDest12.2 ausgewählt (Abbildung C.3, Anhang). Dieser Vektor ist geeignet zur Expression nativer Proteine in Säugerzellen. Aus diesem Grund muss das aus dem Eingangsklon in den Vektor transferierte DNA-Fragment ein ATG-Translationsstart-Codon enthalten (s.o.). Das erhaltene Konstrukt pEx-MDR1 hat eine Größe von 9461 bp.

Um selektiv den gewünschten Expressionsvektor zu gewinnen, enthalten sowohl der Donor- als auch der Zielvektor in der MCS zwischen den *att*-Adaptersequenzen die Sequenz des *ccdB*-Proteins. Dieses interferiert mit der *E.coli* DNA-Gyrase und verhindert so das Wachstum der meisten *E.coli*-Stämme. Auf diese Weise wird die ausschließliche Vermehrung des entstandenen Vektors gewährleistet, während das gleichzeitig entstandene *ccdB*-Nebenprodukt zum Absterben der *E.coli*-Bakterien führt.

In der nachfolgenden Tabelle sind die optimierten Reaktionslösungen für beide Reaktionen angegeben. Die Durchführung der einzelnen Schritte erfolgte analog zur Vorschrift des Herstellers.

Reaktion 1		Reaktion 2	
MDR1-Amplifikat	500 ng	Eingangsklon	250 ng
pDONR2.01	2,0 μ l	pDest12.2	300 ng
BP-Puffer (5x)	4,0 μ l	LR-Puffer (5x)	4,0 μ l
TE-Puffer	ad 16 μ l	TE-Puffer	ad 16 μ l

Mit Hilfe dieses Rekombinationsprinzips konnte das gewünschte MDR1-Expressionssystem pEx-MDR1, das die gesamte MDR1-cDNA enthält, kloniert werden. Zur *in vitro* Untersuchung der drei in Kapitel 4.1.1 genannten codierenden MDR1-Polymorphismen wurden diese in das erhaltene Expressions-Vektorkonstrukt, wie nachfolgend beschrieben, eingebaut.

4.2.4 Ortsgerichtete Mutagenese zur Einführung der zu untersuchenden Polymorphismen in den Expressionsvektor

Der Einbau der Aminosäure-substituierenden Mutationen T617C (Typ 3), T662C (Typ 4) und G2677T (Typ 14) erfolgte, wie in Kapitel 3.21 beschrieben, mit Hilfe des *QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis Kits* (Stratagene). Die für den Einbau der gewünschten Basenaustausche in das MDR1-Gen konstruierten Primerpaare sind in Tabelle 4.11 angegeben.

Die erfolgreiche Klonierung der drei zu untersuchenden Mutationen wurde durch Sequenzanalyse der verschiedenen Vektorkonstrukte verifiziert (siehe Abbildung 4.12).

Mutation	Sequenz
T617C (Exon 7)	
forward	5'-CACTGGGTTTATAG C AGGATTTACACGTGG-3'
reverse	5'-CCACGTGTAAATCCT G CTATAAACCCAGTG-3'
T662C (Exon 7)	
forward	5'-CCTTGTGATTTTGGCCA C CAGTCCTGTTCTTGG-3'
reverse	5'-CCAAGAACAGGACT G GTGGCCAAAATCACAAGG-3'
G2677T (Exon 21)	
forward	5'-GAACTAGAAGGT T CTGGGAAGATCGCTACTG-3'
reverse	5'-CAGTAGCGATCTTCC A ACCTTCTAGTTC-3'

Tabelle 4.11: Primerpaare zur Einführung der Mutationen T617C, T662C und G2677T in den Expressionsvektor pEx-MDR1. **Rot:** Basenaustausche.

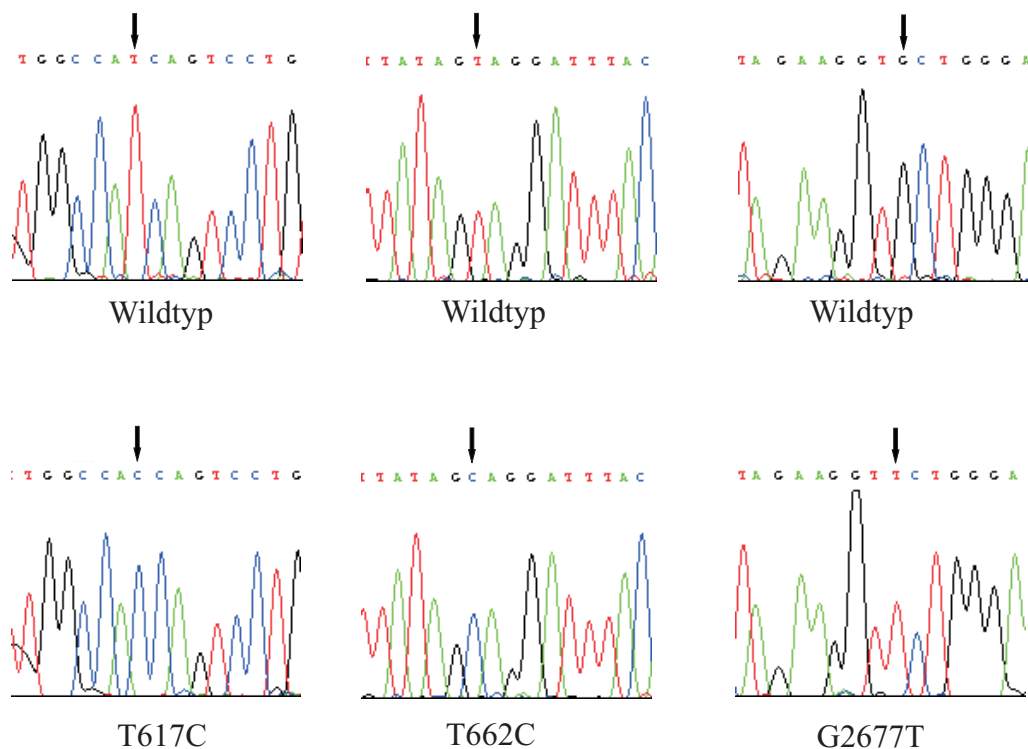


Abbildung 4.12: Sequenzen der WT-DNA im Vergleich zu den mutierten Sequenzen. Links: T617C. Mitte: T662C. Rechts: G2677T.

4.2.5 Transfektion in low-MDR1 exprimierende COS7-Zellen

Die wie in Kapitel 4.2.3 beschrieben hergestellten Expressions-Vektorstrukture wurden transient in low-MDR1-exprimierende COS-7-Zellen transfiziert. Für diese Untersuchungen erfolgte die Transfektion mittels der FuGENE 6-Methode (siehe Kapitel 3.22.2). Um eine erfolgreiche und gleichmäßige Transfektion nachzuweisen, wurde für jedes Plasmid aus einem Teil der transfizierten Zellen die DNA gewonnen und eine PCR durchgeführt. Dabei erfolgte die Primerwahl derart, dass ein Primer im Vektor und der andere in der MDR1-Gensequenz angreift (forward: 5'-CATCAGCAGCTGCTGGCACAGA-3', reverse: 5'-CTATGACGTCGCATGCACGCG-3').

In Abbildung 4.13 ist der Transfektionsnachweis durch Auftrag der erhaltenen PCR-Produkte auf ein Agarosegel dargestellt. Mittels TINA 2.0 wurde eine densitometrische Messung der Banden vorgenommen. Der Wert für die stärkste Transfektion (pEX-MDR-T662C) wurde als 100 % gesetzt, die übrigen Werte danach errechnet (siehe Abbildung 4.14). Die folgenden Transportuntersuchungen sowie Expressionsstudien beziehen sich auf diese Werte. Wie man aus den Abbildungen entnehmen kann, ergeben sich keine großen Unterschiede in der Transfektionseffizienz.

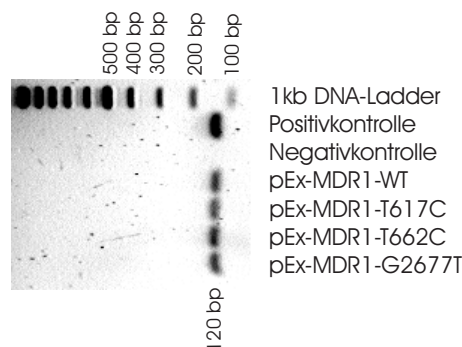


Abbildung 4.13: Amplifikation eines ca. 120 bp großen MDR1-Fragments zur Überprüfung der Transfektion.

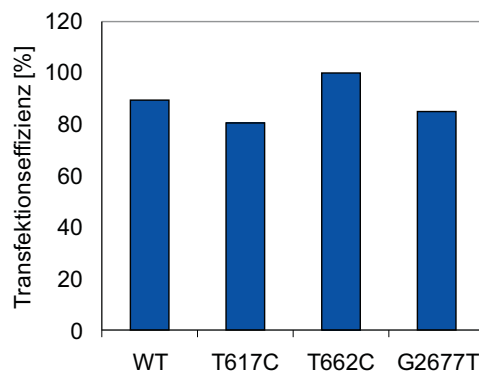


Abbildung 4.14: Bestimmung der Transfektionseffizienz mittels densitometrischer Auswertung.

4.2.6 Nachweis der P-glycoprotein Expression mittels Western-Blot

Die Expression von P-glycoprotein in Abhängigkeit vom Genotyp wurde mittels Western-Blot quantifiziert. Dazu wurde zunächst die Plasmamembranprotein-Fraktion mittels der in Kapitel 3.18.2 beschriebenen Methode aus den COS-7 Zellen isoliert, die mit den verschiedenen Expressionsvektor-Konstrukten transfiziert worden waren. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wurden jeweils 60 μg für einen Western-Blot vorbereitet. Visualisierung der Proteinbanden mittels Lumineszenzreaktion lieferte das in Abbildung 4.15 gezeigte Ergebnis. Diese Abbildung steht repräsentativ für $n=3$ durchgeführte Versuche, welche alle für die densitometrische Auswertung (Abbildung 4.16) herangezogen wurden.

Wie eindeutig zu erkennen ist, zeigen die als Kontrolle mitgeführten, nicht transfizierten COS-7 Zellen bei gleicher eingesetzter Gesamtproteinmenge eine deutlich geringere Expression an P-glycoprotein, als die mit den Vektorkonstrukten transfizierten COS-7 Zellen. Um eine Aussage über die relative Pgp-Expression zu ermöglichen, wurden die erhaltenen Banden mittels TINA 2.0 densitometrisch ausgewertet. Anschließend wurden diese Densitometrie-Werte mit der Transfektionseffizienz (siehe Kapitel 4.2.5) verrechnet.

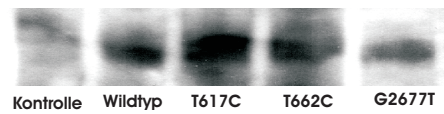


Abbildung 4.15: Ergebnisse des Western-Blots zur Untersuchung der Wirkung verschiedener Mutationen des MDR1-Gens auf die Expression von P-glycoprotein. Kontrolle = nicht transfizierte COS-7 Zellen.

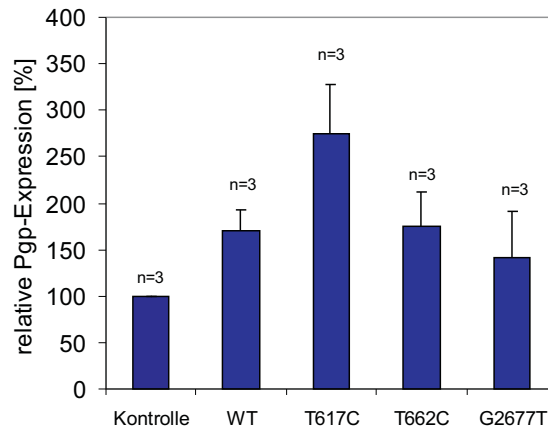


Abbildung 4.16: Densitometrische Auswertung \pm SD der in Abbildung 4.15 dargestellten Proteinexpression. $n=3$ unabhängige Western-Blots, Kontrolle = nicht transfizierte COS-7 Zellen.

Die densitometrische Auswertung liefert unter Einbeziehung der Transfektionseffizienz die in Abbildung 4.16 als Diagramm dargestellten Ergebnisse. Bei Vergleich der Pgp-Expression nicht transfizierter COS-7 Zellen mit COS-7 Zellen, die mit dem Expressionsplasmid pEx-MDR1-WT transfiziert wurden, kann man eine Steigerung um etwa das Doppelte erkennen. Damit erweist sich das klonierte Vektorsystem als geeignet für die Expression von Pgp in Zellkulturen.

Für den Aminosäure-substituierenden Polymorphismus T662C (Ile221Thr, Exon 7) bzw. G2677T (Ala893Thr, Exon 21) liefert die densitometrische Auswertung des Western-Blots keine Veränderung der Expression des MDR1-Genproduktes P-glycoprotein im Vergleich zum Wildtyp. In Gegenwart des G2677T SNPs ist die Expressionshöhe gegenüber der Wildtyp-Expression geringfügig vermindert. Betrachtung der Ergebnisse des Dunnett's Signifikanztests ergibt, dass keine dieser beiden codierenden genetischen Variationen einen Einfluss auf die P-glycoprotein-Expression ausübt. Die p-Werte ergeben sich jeweils zu $p > 0,05$. Für die Variation T617C (Val206Ala, Exon 7) dagegen wird im Western-Blot eine deutlich höhere Pgp-Expression gefunden als für den Wildtyp. Der Dunnett's Test zeigt, dass es sich hierbei um eine signifikante Steigerung ($p < 0,05$) handelt. Demnach scheint dieser codierende MDR1-Polymorphismus für die P-glycoprotein-

Expression von Bedeutung zu sein. Allerdings wiesen die betroffenen Probanden eine sehr geringe mRNA-Expression auf, was dazu im Widerspruch steht.

4.2.7 Bestimmung der Transportaktivität von P-glycoprotein

Zur Bestimmung der Transportaktivität von P-glycoprotein in Abhängigkeit von genetischen Variationen des MDR1-Gens wird ein Vergleich des Transports bei Wildtyp und mutiertem Pgp vorgenommen. Der hier angewandte Rhodamin123-Assay soll Aufschluss über mögliche Einflüsse der Aminosäure-Substitutionen in der Proteinsequenz auf die Transporteigenschaften geben.

Zur Bestimmung der Transportaktivität wurden ebenfalls wieder die mit den Expressionsvektor-Konstrukten transient transfizierten COS-7 Zellen herangezogen. Die wie oben beschrieben transfizierten Zellen wurden nach 46-stündiger Inkubation, wie in Kapitel 3.19 beschrieben, für die Transportstudie weiter behandelt.

Als Negativkontrolle wurden nicht transfizierte Zellen mitgeführt. Als Positivkontrolle dienten nicht transfizierte Zellen, die mit 10 μM Verapamil beimpft wurden. Transfizierte Zellen wurden zum Vergleich ebenfalls mit 10 μM Verapamil behandelt. Verapamil dient nachweislich als Inhibitor von P-glycoprotein, welches kompetitiv mit anderen Substraten von Pgp um dessen Bindungsstellen konkurriert. Die im R123-Assay detektierte Menge an Rhodamin sollte somit in den Zellen bei gleichzeitiger Verapamil-Behandlung ansteigen. In Tabelle 4.12 sind die Ergebnisse des R123-Transportassays aufgeführt und in Abbildung 4.17 als Diagramm dargestellt. Auch hier wurden die erhaltenen Messwerte auf die Transfektionseffizienz bezogen (Kapitel 4.2.5).

Mutation	R123-Fluoreszenz [%]	R123-Fluoreszenz [%] (+ 10 μM Verapamil)
Wildtyp	58,3 \pm 12,0	108,0 \pm 8,7
T617C	73,0 \pm 11,3	127,5 \pm 3,7
T662C	48,2 \pm 4,3	102,1 \pm 3,3
G2677T	64,8 \pm 6,2	117,3 \pm 2,0

Tabelle 4.12: Mittelwerte und Standardabweichungen des Rhodamin-123-Assays.

Die blauen Balken entsprechen den Werten für die R123-Messung ohne Verapamilzugabe. Bei der Transfektion mit dem WT-Plasmid bzw. mit dem Expressionsvektor für die Mutation T662C ist zu erkennen, dass im Vergleich zu den nicht transfizierten Zellen ein stärkerer Auswärtstransport von Rhodamin stattfindet. Dieses Ergebnis ist konsistent mit der stärkeren Expression von Pgp, die im Western-Blot festgestellt werden konnte.

Der Rhodamin123-Efflux-Assay liefert keine signifikanten Unterschiede in der R123-Fluoreszenz zwischen den verschiedenen genetischen Variationen und dem Wildtyp-Pgp. Dies bedeutet, dass das Vorhandensein der drei eingebauten Mutationen T617C, T662C oder G2677T keine Auswirkung auf die Transportaktivität von P-glycoprotein hat. Betrachtet man auch die Werte für die gleichzeitige Behandlung mit dem Pgp-Inhibitor

Verapamil (rot), so sind auch hier geringe Schwankungen vorhanden, die sich aber im Dunnett's-Test als nicht signifikant erweisen ($P > 0,05$).

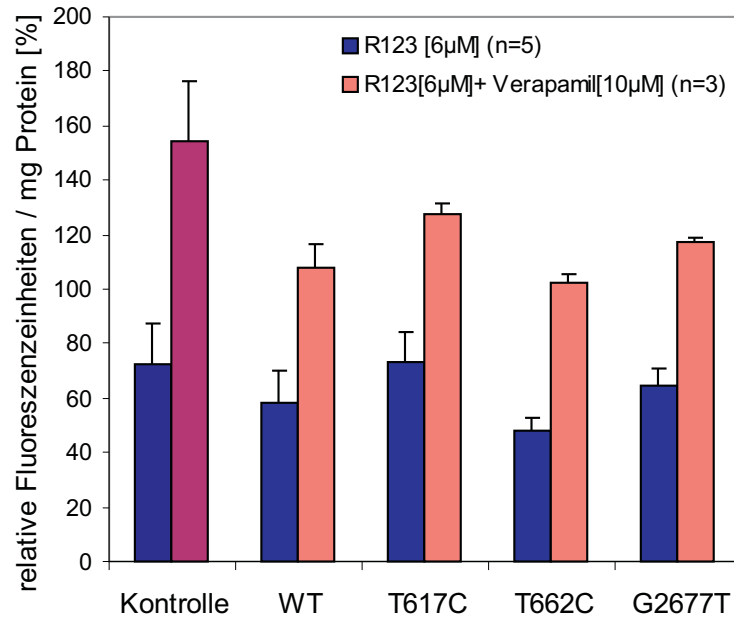


Abbildung 4.17: Ergebnisse des Rhodamin-123-Assays zur Untersuchung der Wirkung verschiedener Mutationen des MDR1-Gens auf die Pgp-Transporteigenschaften.

Kapitel 5

Diskussion

5.1 Identifizierung natürlich auftretender Polymorphismen des humanen MDR1-Gens

5.1.1 Genetische Variationen

In den vergangenen Jahren wurden insgesamt 28 unterschiedliche natürliche Polymorphismen des humanen MDR1-Gens in 27 verschiedenen Positionen detektiert und zum Teil charakterisiert [Yoshimoto et al., 1988, Ramachandra et al., 1996, Taguchi et al., 1997, Mickley et al., 1998, Decleves et al., 2000, Hoffmeyer et al., 2000, Schaeffeler et al., 2001, Kerb et al., 2001, Tanabe et al., 2001, Ito et al., 2001, Hitzl et al., 2001, Kim et al., 2001, Cascorbi et al., 2001, Ameyaw et al., 2001, Goto et al., 2002, Kimchi-Sarfaty et al., 2002, Kim, 2002, Sakaeda et al., 2002, Calado et al., 2002]. Aufgrund dieser zahlreichen Publikationen ist zu vermuten, dass genetische Variationen im MDR1-Gen keine ungewöhnlichen Erscheinungen sind, zumal einige der detektierten SNPs sogar mit recht hoher Häufigkeit auftreten. So wird beispielsweise der C3435T Polymorphismus in Exon 26 mit einer allelischen Frequenz von bis zu 0,52 gefunden [Ameyaw et al., 2001]. Andere Mutationen des humanen MDR1-Gens werden dagegen nur sehr selten detektiert.

In der vorliegenden Arbeit konnten in einem Mutationsscreening mittels PCR-SSCP-Methode 15 verschiedene natürliche genetische Variationen des humanen MDR1-Gens detektiert werden. Diese sind im Kapitel Ergebnisse in Tabelle 4.1 dargestellt. Lediglich vier dieser hier identifizierten Polymorphismen waren bis dato bekannt und wurden schon in früheren Publikationen beschrieben. Weitere 11 SNPs wurden in dieser Arbeit zum ersten Mal in einem Screening an Probanden detektiert. Bei diesen erstmalig identifizierten Polymorphismen handelt es sich um zwei Aminosäure-substituierende Variationen in Exon 7, sowie um drei stille Exonmutationen, fünf intronische Sequenzveränderungen und zwei Deletionen im Promotorbereich des Gens.

Neben dem Mutationsscreening an verschiedenen Populationen wurden einige der gefundenen MDR1-Polymorphismen funktionell charakterisiert. In Tabelle 5.1 sind alle 28 bisher in der Literatur beschriebenen, natürlich auftretenden Polymorphismen des MDR1-Gens sowie sämtliche in dieser Studie detektierten SNPs zusammengestellt.

Position	Effekt	Position	Effekt
Intron 1	A-329-41G	Intron 11	1225-18ΔT
Exon 1a	-320ΔA	Intron 11	intrinonisch
Exon 1a	-318ΔC	Exon 12*	A1225-2G
Exon 1a	C-145G		C1236T
Exon 1b	T-129C	Exon 12	still
Exon 2	C-4T	Exon 12	still
Exon 2	G-1A	Intron 12*	G1296A
Exon 2	A61G		G1326C
Intron 4	G118-35C	Exon 13	C1350+44T
Intron 4	G118-25T	Intron16	C1474T
Exon 5	T307C		T1888-76A
Intron 6	C338+139T	Intron 17	A2065+137G
Exon 7	A548G	Exon 21	C2650T
Exon 7	T617C	Exon 21*	still
Exon 7	T662C		G2677T/A
Intron 9	A999+19G	Exon 24	Ala893Ser/Thr
Exon 11	G1199A	Exon 24	Met968Val
Intron 11	AA1225-48CC	Exon 24	Ala999Thr
Intron 11	A1225-27C	Exon 26	Gln1107Pro
		Exon 26	still
		Exon 26	T3421A
		Exon 26*	Ser1141Thr
		Exon 28	still
		Exon 28	still
		Exon 28	still
		Exon 28	A4036G

Tabelle 5.1: Natürliche Polymorphismen des humanen MDR1-Gens; Literaturdaten entnommen aus [Sakaeda et al., 2002]. *: in der Literatur beschriebene SNPs, die auch in dieser Arbeit detektiert wurden. **Fett:** in dieser Arbeit erstmalig detektierte MDR1-Polymorphismen.

Einige der bereits bekannten Mutationen konnten in der Probandenstudie an peripheren Lymphozyten nicht detektiert werden. Als möglicher Grund hierfür kommt zum einen eine teilweise sehr geringe Allelfrequenz einiger SNPs in Frage (z. B. T307C: 1,2 %; C3396T: 0,53 %; A3320C: 0,2 %; G2677A: 1,9 %; G1199A: 5,5 %; [Hoffmeyer et al., 2000, Cascorbi et al., 2001]). Daneben sind einige Polymorphismen in Intronbereichen lokalisiert, die in dem durchgeführten Screening nicht erfasst wurden (A-329-41G; C338+139T und A2065+137G). Als weiterer Punkt ist zu berücksichtigen, dass nur solche PCR-Proben sequenziert wurden, die bei der SSCP-Analyse ein auffälliges Bandenmuster zeigten (siehe Kapitel 4.1.1). Da DNA-Stränge trotz vorhandener Basenaustausche unter Umständen die gleiche Konformation haben können, ist es möglich, dass diese bei einer SSCP-Analyse nicht sichtbar werden. Aus diesem Grund werden mittels der SSCP-Methode nur ca. 80 % aller SNPs detektiert [Finke, 1996]. Es wäre somit denkbar, dass nicht alle bei den Probanden vorkommenden SNPs auch tatsächlich gefunden wurden. Dazu wäre eine Sequenzanalyse sämtlicher Exons aller Probanden notwendig.

5.1.2 Verteilung natürlicher MDR1-Polymorphismen in unterschiedlichen Populationen

Die in Kapitel 4.1.1 dargestellten 15 genetischen Variationen des humanen MDR1-Gens wurden in einem Mutationsscreening an 36 bzw. 91 DNA-Proben aus peripheren Lymphozyten kaukasischer Herkunft detektiert (siehe Tabelle 4.1). Neben dieser Probandenstudie wurden zwei weitere Populationen bezüglich Polymorphismen gescreent. Dabei wurde aufgrund der sehr geringen Probenmengen jeweils nur nach bestimmten Mutationen gesucht. Bei einer dieser beiden Kohorten handelte es sich um 74 weitere kaukasische Probanden, von denen DNA- und RNA-Proben, die aus Leberbiopsien gewonnen worden waren, zur Verfügung standen. Die meisten dieser Probanden waren an Lebertumoren erkrankt. Genauere Angaben über die jeweiligen Erkrankungen lagen jedoch nicht vor. Bei der anderen Kohorte handelte es sich um Probanden chilenischer Herkunft, von denen DNA aus peripheren Lymphozyten erhalten worden war. Exakt die Hälfte der chilenischen Probanden litt an Gallensteinen (siehe Kapitel 4.1.3). Die drei untersuchten Kohorten wiesen für die gefundenen SNPs teilweise sehr unterschiedliche allelische Frequenzen auf.

Bei den Proben aus Lebergewebe ist vor allem das ungewöhnlich häufige Auftreten der C3435T-Mutation in Exon 26 interessant. Bei den insgesamt 74 untersuchten Probanden wurde lediglich viermal der Wildtyp (CC) gefunden. Der CT-Genotyp und der TT-Genotyp waren jeweils 33 mal vertreten. Damit ergab sich für diese Probandenstudie eine allelische Frequenz von 68,5 % für den C3435T SNP. Vor dem Hintergrund, dass die meisten Probanden dieser Kohorte an Lebertumoren erkrankt waren, stellt sich die Frage, ob Träger dieser Mutation möglicherweise anfälliger für bestimmte Krankheiten wie beispielsweise Lebertumoren sind. Da aber keine genauen Angaben über die Erkrankungen der Probanden vorlagen, ist eine Interpretation diesbezüglich schwierig.

Auch bei den chilenischen Probanden wurde für den C3435T-Polymorphismus bei den an Gallensteinen leidenden Probanden eine etwas höhere allelische Frequenz ge-

Polymorphismus	Kaukasier	Chilenen
-318 Δ C	5,5	24,2
T662C	4,2	33,9
C3435T	31,9	24,0

Tabelle 5.2: Ethnische Unterschiede in der Verteilung natürlicher SNPs. Angegeben sind jeweils die allelischen Frequenzen in % der in peripheren Lymphozyten detektierten Polymorphismen.

funden, als bei den gesunden Probanden. Dieser Unterschied jedoch ist vergleichsweise gering. Dennoch könnte auch dieser Befund einen Hinweis darauf geben, dass Träger der C3435T-Variation eher von bestimmten Krankheiten betroffen werden, als Personen, die den CC-Genotyp aufweisen. Eine Korrelation zwischen den übrigen untersuchten Polymorphismen und der Cholelithiasis der chilenischen Probanden wurde nicht festgestellt, da die Verteilung dieser Polymorphismen bei gesunden und kranken Probanden gleich war.

Es stellt sich die Frage, ob es bezüglich des ethnischen Hintergrundes Unterschiede in der Verteilung der Variationen gibt. Tatsächlich ergaben sich bei dem in dieser Arbeit vorgenommenen Mutationsscreening unterschiedliche Häufigkeitsverteilungen für die jeweils untersuchten Populationen. Tabelle 5.2 zeigt die allelischen Frequenzen der bei beiden ethnischen Gruppen detektierten Polymorphismen im Vergleich.

Während die C-Deletion in der Promotorregion der kaukasischen Probanden lediglich mit einer Frequenz von 5,5 % detektiert wurde, zeigte sich für diesen SNP bei den chilenischen Probanden eine ca. fünffache Häufigkeit. Für die T617C-Variation in Exon 7 ist das gleiche Phänomen zu beobachten. Dieser Polymorphismus wird in der chilenischen Bevölkerung ca. acht mal so häufig gefunden. Dagegen ist der bei der kaukasischen Bevölkerung mit über 30% vertretene C3435T-Polymorphismus in Exon 26 bei den chilenischen Probanden etwas seltener zu finden. Diese zum Teil deutlichen Unterschiede der allelischen Frequenz sind vermutlich auf den ethnischen Hintergrund der untersuchten Probanden zurückzuführen.

In früheren Studien waren schon mehrfach ethnische Unterschiede in der Häufigkeit verschiedener Polymorphismen beschrieben worden. So berichteten z. B. Ameyaw et al. von bemerkenswerten Differenzen in den allelischen Frequenzen des C3435T-Polymorphismus (Exon 26) zwischen afrikanischer (17-27 %) und asiatischer (45-52 %) Bevölkerung [Ameyaw et al., 2001]. Ähnliches wurde auch in einer japanischen Studie festgestellt [Tang et al., 2002]. Diese unterschiedlichen Häufigkeiten der SNPs bei verschiedenen ethnischen Populationen sind vermutlich auf evolutionäre Prozesse zurückzuführen. Nakamura et al. berichteten von ethnischen Unterschieden verschiedener Populationen in der MDR1-Prozessierung, angefangen bei der transkriptionellen Initiation bis hin zur RNA-Reifung [Nakamura et al., 2002].

5.2 Funktionelle Charakterisierung natürlich auftretender Polymorphismen des humanen MDR1-Gens

Da genetische Variationen des humanen ABC-Transportergens MDR1 relativ häufig auftreten und der ethnische Hintergrund einen starken Einfluss auf die allelische Frequenz einiger dieser Polymorphismen hat, ist die funktionelle Charakterisierung von großem Interesse. Es stellt sich die Frage, ob polymorphe Varianten in Verbindung mit einer veränderten Pharmakokinetik und/oder Pharmakodynamik stehen und ob allgemein verbreitete codierende Polymorphismen die Funktion des MDR1-Genproduktes P-glycoprotein beeinflussen. Dies ist besonders im Hinblick auf die große interindividuelle Variabilität von P-glycoprotein von Interesse.

Zahlreiche Studien zur funktionellen Charakterisierung einiger der bislang identifizierten Polymorphismen sind in der Literatur beschrieben (siehe dazu Tabelle 5.4). Tatsächlich zeigt die Mehrheit der in der Vergangenheit untersuchten, natürlich auftretenden Polymorphismen keine klinische Relevanz, da die meisten der gefundenen Mutationen weder auf die Transportaktivität noch auf die Expression des MDR1-Genproduktes einen Einfluss ausüben. Lediglich zwei der bislang charakterisierten Polymorphismen scheinen für die Funktionalität von P-glycoprotein von Bedeutung zu sein. Dabei handelt es sich zum einen um die von Hoffmeyer et al. beschriebene stille Mutation C3435T in Exon 26 [Hoffmeyer et al., 2000] und zum anderen um die codierende Mutation G2677T(A) in Exon 21, welche zu einer Aminosäuresubstitution (Ala893Ser(Thr)) in der Proteinsequenz führt [Mickley et al., 1998, Cascorbi et al., 2001]. Auf diese beiden Variationen wird in Kapitel 5.3 genauer eingegangen.

5.2.1 Analyse der *MDR1*-mRNA-Expression

Um eine mögliche Korrelation zwischen den detektierten Polymorphismen des MDR1-Gens und der mRNA-Expression feststellen zu können, wurde diese zunächst semiquantitativ mittels RT-PCR bestimmt (siehe Kapitel 4.2.1). Es wurden RNA-Proben aus peripheren Lymphozyten und aus Lebergewebe kaukasischer Probanden untersucht. Die aus diesen Untersuchungen erhaltenen Ergebnisse liefern für keine der 15 detektierten MDR1-Polymorphismen einen eindeutigen Zusammenhang mit der mRNA-Expression.

Bei Betrachtung der densitometrischen Auswertungen der *MDR1*-mRNA-Expressionen in den zunächst untersuchten peripheren Lymphozyten sind für die SNPs T662C und A1225-2G völlige Expressionsverluste zu beobachten (siehe Abbildung 4.6). Bisher wurde in der Literatur keine natürliche genetische Variation des humanen MDR1-Gens beschrieben, die zu einem völligen Expressionsverlust führt. Da die hier vorgestellten Ergebnisse für beide Polymorphismen jedoch nur auf der Untersuchung von jeweils einem einzigen mutationstragenden Probanden beruhen, ist eine eindeutige Aussage nicht möglich. Der Expressionsverlust könnte möglicherweise in anderen Faktoren begründet liegen (s. u.). Auch bei der Deletion -320 Δ A im Promotorbereich des Gens, deren Träger eine im Vergleich zum Wildtyp um das Zweifache erhöhte RNA-Expression aufweist,

ist keine statistische Aussage möglich. Eine Tendenz zu verminderter *MDR1*-mRNA-Expression ist hingegen bei der Aminosäure-substituierenden Variation T617C in Exon 7 zu erkennen, die bei insgesamt drei Probanden der Studie detektiert wurde. Für diesen Polymorphismus, sowie für sämtliche anderen SNPs, die bei mindestens drei Probanden detektiert wurden, wurde der Dunnett's Signifikanztest durchgeführt. Aufgrund hoher Standardabweichungen der Expressionswerte für die einzelnen Polymorphismen ergab diese statistische Untersuchung, dass keine der betreffenden Mutationen mit einer signifikant veränderten Expression der *MDR1*-mRNA korreliert ($p > 0,05$) (siehe auch Kapitel 4.2.1).

Neben den bereits genannten, teilweise sehr geringen mutationstragenden Probandenzahlen sind für die erhaltenen Ergebnisse die starken individuellen Schwankungen in der *MDR1*-mRNA-Expression der einzelnen Probanden verantwortlich (siehe Abbildung 4.5). Diese große individuelle Variabilität in der *MDR1*-mRNA-Expression der untersuchten Probanden könnte möglicherweise auf den Einfluss anderer Mechanismen zurückzuführen sein. Neben den genetischen Variationen des *MDR1*-Gens selbst könnten auch Veränderungen in anderen Genen die Regulation der *MDR1*-Basalexpression beeinflussen. In der Literatur wird beispielsweise eine Korrelation zwischen der Expression von *MDR1* und *Cyp3A4* beschrieben [Nakamura et al., 2002, Goto et al., 2002]. Ebenso könnte sich eine Mutation des *p53*-Gens, welches in humanen Tumoren häufig genetische Veränderungen aufweist und die *MDR1*-Promotor-Transaktivierung induziert [Friedlander et al., 1996], auf die *MDR1*-Expression auswirken. Auch *Sp1* ist an der Regulation der Basalexpression von *MDR1* beteiligt [Cornwell & Smith, 1993]. Demnach könnte eine genetische Veränderung des *Sp1* ebenso einen Einfluss auf die *MDR1*-Expression haben, wie auch eine Mutation anderer Transkriptionsfaktoren (z. B. *EGR1* [McCoy et al., 1995]), welche in die *MDR1*-Expression involviert sind.

Auch Mutationen in der *MDR1*-Sequenz selbst, welche möglicherweise bei dem Screening mittels PCR-SSCP nicht erfasst wurden, kommen in Frage. Obgleich dieses angewandte Screeningverfahren aufgrund der Sequenzlänge von etwa 200 bis 400 bp optimal zur Untersuchung der gescreenten Exons geeignet ist, liegt die Wahrscheinlichkeit für das Auffinden von genetischen Polymorphismen mittels dieser Methode dennoch bei nur ca. 80 % [Finke, 1996].

Aufgrund der geringen Probenmengen konnten lediglich vier der 15 verschiedenen, an peripheren Lymphozyten detektierten *MDR1*-Polymorphismen auch in den Lebergewebeproben geprüft werden. Wie in Kapitel 4.2.1 beschrieben, wurde auch für diese Proben eine RNA-Analyse durchgeführt. Es wird auch bei diesen Proben keine Korrelation eines der Polymorphismen mit der Expression an *MDR1*-mRNA gefunden. Dieses Ergebnis ist konsistent mit dem Befund bei den peripheren Lymphozyten.

Im Vergleich zu den untersuchten peripheren Lymphozyten sind die individuellen Schwankungen der mRNA-Expression zwischen den einzelnen Probanden hier jedoch wesentlich geringer. Ein möglicher Grund dafür könnte eine gleichmäßigere Expression von *MDR1* in der Leber im Vergleich zu den Lymphozyten sein. Es ist bekannt, dass in den verschiedenen Lymphozytenunterarten unterschiedliche Mengen an Pgp expri-

miert werden [Chaudhary et al., 1992 , Klimecki et al., 1995]. Für die hier durchgeführte Probandenstudie wurde jeweils die gesamte Lymphozytenpopulation verwendet. Es wäre möglich, dass die MDR1-Expression in dieser Gesamt-Lymphozytenpopulation aufgrund variierender Mengen an den verschiedenen Unterarten (CD56+, CD8+, CD14+, etc.) nicht so konstant ist, wie in festen Geweben wie der Leber [Meaden et al., 2002]. In früheren Studien wurde angenommen, dass die Expression der ABC-Transporter in B- und T-Zellen etwa gleich stark ist [Abbaszadegan et al., 1994 , Conrad, 2002].

5.2.2 Einfluss zweier Deletionen in der MDR1-Promotorregion auf die Regulation der Genexpression

In vitro Experimente sollten darüber Aufschluss geben, ob die Aktivierbarkeit der MDR1-Genexpression durch die in der Promotorregion detektierten Deletionen -320 Δ A bzw. -318 Δ C beeinflusst wird. Die Untersuchungen an zu diesem Zweck mit Reportergenkonstrukten transfizierten HepG2-Zellen lieferten im Luciferase-Assay folgendes Ergebnis: Weder die Deletion Δ A in Position -320 noch die zwei Basen entfernt lokalisierte Deletion Δ C zeigten eine veränderte Reportergenaktivität im Vergleich zum Wildtyp. Aufgrund der Lokalisation der beiden Mutationen am Beginn von Exon 1a ist das Ergebnis nachvollziehbar. In der Probandenstudie an peripheren Lymphozyten wurde für den Träger des homozygoten Δ C-SNPs ein Wert für die MDR1-mRNA-Expression gefunden, der im Bereich der Expression der beiden Probanden mit heterozygotem SNP liegt. Auch dies war ein Hinweis darauf, dass diese Mutation keine funktionelle Relevanz besitzt. Beide Deletionen liegen ca. 50 bp upstream der CAAT-Box und sind somit vermutlich zu weit von wichtigen funktionellen Elementen des Promotors entfernt, um einen entscheidenden Einfluss ausüben zu können.

5.2.3 Klonierung eines Expressionssystems für MDR1

In vitro Studien stellen eine geeignete Methode dar, um genetische Variationen näher zu charakterisieren. Die funktionelle Charakterisierung der codierenden MDR1-Polymorphismen in *in vitro* Experimenten erforderte daher die Herstellung eines geeigneten Expressionssystems für MDR1. Die übliche Klonierungsmethode mittels Ligation erwies sich zur Herstellung eines MDR1-Expressionssystems als nicht geeignet. Neben einer Insertlänge von ca. 4 kb kommen als mögliche Gründe für die Probleme bei den Klonierungsversuchen mit Hilfe von Ligase vermutlich sterische Probleme aufgrund der Sekundärstruktur in Frage. Aus diesem Grund kam eine Klonierungsstrategie zum Einsatz, bei der sogenannte Rekombinationsproteine verwendet werden (siehe Kapitel 4.2.3). Mit Hilfe dieser Strategie gelang es, das Expressions-Vektor-konstrukt pEx-MDR1 herzustellen, das die gesamte MDR1-cDNA enthält. Dieses klonierte Expressionssystem zeigte sich als funktionell aktiv und konnte somit zur Transfektion in eine geeignete Zellkultur verwendet werden.

5.2.4 Einfluss verschiedener codierender MDR1-Polymorphismen auf die P-glycoprotein-Expression

Aufgrund ihrer niedrigen MDR1-Basalexpression erwiesen sich COS-7-Zellen für eine Pgp-Expressionsanalyse als geeignet. Mittels Western-Blotting wurde der relative P-glycoprotein-Gehalt der mit den klonierten Expressions-Vektorkonstrukten transfizierten COS-7-Zellen bestimmt, um so eine Aussage über den Einfluss der verschiedenen codierenden MDR1-Polymorphismen machen zu können. Wie in den Abbildungen 4.15 und 4.16 deutlich zu sehen ist, zeigen die als Kontrolle mitgeführten, nicht transfizierten COS-7-Zellen eine wesentlich schwächere Pgp-Expression, als die mit den Expressionsvektorkonstrukten transfizierten Zellen. Eine Verstärkung dieses Effekts könnte eventuell durch den Einbau einer vollständigen Kozak-Sequenz in das Expressionssystem erzielt werden, welche im MDR1-Gen selbst nicht enthalten ist. Mittels Western-Blot sollte untersucht werden, ob die durch die Polymorphismen des MDR1-Gens hervorgerufenen Veränderungen der Aminosäuresequenz eine Auswirkung auf die Expression von P-glycoprotein haben. Untersucht wurden die drei Aminosäureaustausche Val206Ala (T167C), Ile221Thr (T662C) und Ala893Ser (G2677T). Aufgrund ihrer Lokalisation in der Gensequenz wäre jedoch für keinen dieser drei Polymorphismen eine funktionelle Bedeutung zu erwarten.

Erwartungsgemäß sollte die Aminosäure-Substitution Valin gegen Alanin in Position 206 der Proteinsequenz keinen starken Einfluss auf die Pgp-Expression ausüben, da beide Aminosäuren unpolar (lipophil) und strukturell neutral sind. Das Polypeptidgerüst wird somit durch diesen Austausch nicht wesentlich verändert. Bemerkenswert ist jedoch, dass gerade diese Variation mit einer leichten, aber signifikanten Expressionssteigerung im Vergleich zum Wildtyp einhergeht. Die Ursache für diesen starken Effekt ist unklar. Interessant ist daneben auch, dass in der Probandenstudie an peripheren Lymphozyten eine tendenzielle, wenn auch nicht signifikante Verringerung der RNA-Expression bei Trägern dieser Mutation gefunden wurde. Diese Erniedrigung der RNA-Expression lässt sich möglicherweise auf Veränderungen anderer Gene zurückführen, die die Regulation des MDR1-Gens beeinflussen (siehe Kapitel 5.2.1). Zu erwähnen ist an dieser Stelle auch, dass bei allen drei Probanden der T617C-SNP heterozygot vorliegt, während er in das verwendete Expressionsplasmid homozygot kloniert wurde. Somit wäre es auch möglich, dass der TC-Genotyp im Gegensatz zum CC-Genotyp eventuell keine Auswirkung auf die Expression hat. Zur Klärung der Ursache für die starken Unterschiede zwischen RNA- und Proteinexpression wäre eine Untersuchung der P-glycoprotein-Expression an Gewebeproben betroffener Probanden mittels Western-Blot notwendig, da genaugenommen ein direkter Vergleich zwischen *in vivo* RNA-Expression und *in vitro* Proteinexpression nicht vorgenommen werden sollte.

Sowohl die Mutation T662C (Exon 7) als auch die Variante G2677T (Exon21) resultieren in einem Austausch eines lipophilen Restes (Ile bzw. Ala) gegen einen hydrophilen Rest (Thr bzw. Ser). Die Veränderung der Polarität durch Substitution einer unpolaren Alkylgruppe gegen eine polare Hydroxygruppe könnte möglicherweise einen Einfluss auf die Sekundärstruktur des Proteins ausüben. Beide Aminosäure-Substitutionen zeigten jedoch im Western-Blot keine veränderte Pgp-Expression im Vergleich zum Wild-

typ. Im Falle der G2677T-Mutation ist dieses Ergebnis konsistent mit den gefundenen RNA-Gehalten in den Probandenstudien (siehe Kapitel 4.2.1). Auch hier wurden keine Veränderungen im Vergleich zur Wildtyp-RNA sichtbar. Vergleicht man die Ergebnisse der Analysen für die Proteinexpression und die RNA-Expression unter dem Einfluss der Variation T662C, so wird im Western-Blot keine Änderung des Proteingehaltes im Vergleich zum Wildtyp gefunden. Dagegen wurde bei der RNA-Analyse ein vollständiger Expressionsverlust detektiert. Dieser ist jedoch aufgrund der Tatsache, dass lediglich ein einziger Proband für diese Untersuchung zur Verfügung stand, nicht aussagekräftig. Die Untersuchung weiterer Probanden mit einem T662C-Polymorphismus wäre notwendig, um eine statistische Aussage zu ermöglichen.

5.2.5 Einfluss verschiedener codierender MDR1-Polymorphismen auf die Transportaktivität von P-glycoprotein

Da Veränderungen der codierenden Sequenz des MDR1-Gens nicht nur eine Auswirkung auf die Gesamtstruktur und die Stabilität und damit auch auf die Expression haben können, sondern vor allem auch auf die Affinität bestimmter Substrate sowie deren Transporteffizienz, wurde abschließend ein Rhodamin123-Transportassay durchgeführt. Dieser Transportassay dient zur Messung der Pgp-Substrat-Anreicherung in den Zellen und kann somit Aufschluss über die Funktionsfähigkeit des Proteins geben.

Im R123-Assay wurden mit den unterschiedlichen Expressionskonstrukten transfizierte COS-7-Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin123 (siehe Abbildung 3.3), welcher Substrat von Pgp ist, behandelt. Im Vergleich wurden ebenso behandelte Zellen zusätzlich mit Verapamil versetzt. Verapamil, das ebenfalls ein Substrat von Pgp ist, wirkt als kompetitiver Inhibitor. In Abbildung 4.17 sind die Ergebnisse des Rhodamin123-Assays dargestellt. Deutlich ist die Hemmung des R123-Transports bei gleichzeitiger Behandlung mit Verapamil zu sehen.

Wie anhand der Ergebnisse des Western-Blots zu erwarten, führen die beiden SNPs T662C in Exon 7 sowie G2677T in Exon 21 zu keiner signifikant veränderten Transportaktivität von P-glycoprotein. Die erhaltenen Werte liegen im Bereich der Wildtyp-Aktivität. Somit haben diese beiden MDR1-Polymorphismen keinen Effekt auf die Pgp-Transportaktivität.

Die im Western-Blot ermittelte Expressionssteigerung von Pgp bei Vorliegen der T617C-Mutation ließe im R123-Assay eine deutliche Steigerung des Transportes erwarten. Dies würde an einer wesentlich niedrigeren Akkumulation von R123 in den Zellen im Vergleich zum Wildtyp sichtbar. Tatsächlich zeigte sich im Rhodamin123-Assay kein merklicher Unterschied in der Transportaktivität von mit pEx-MDR1-T617C transfizierten Zellen im Vergleich zu den mit dem WT-Plasmid behandelten Zellen. Anstelle der zu erwartenden deutlichen Abnahme der R123-Menge in den Zellen ist ein leichter, jedoch im Bereich der Fehlertoleranz liegender Anstieg zu beobachten. Dieses Ergebnis zeigt, dass auch der T617C-Polymorphismus des humanen MDR1-Gens keine Aktivierung der Transporteffizienz bewirkt. Es stellt sich nun die Frage, wie es möglich ist, dass zwar mehr

SNP	RNA-Expression <i>in vivo</i>	Pgp-Expression <i>in vitro</i>	Transportaktivität <i>in vitro</i>
T617C	↘ (n=3)	↑	=
T662C	* (n=1)	=	=
G2677T	= (n=3)	=	=

Tabelle 5.3: Effekte der drei codierenden Polymorphismen T617C, T662C und G2677T im Vergleich zum Wildtyp-MDR1-Gen. * nicht valide bestimmbar aufgrund der geringen Allelfrequenz.

P-glycoprotein vorhanden ist, aber nicht mehr Substrat transportiert wird. Ein möglicher Grund wäre, dass das verstärkt exprimierte Protein nicht an die äußere Plasmamembran transportiert wird. Um dieser Frage nachzugehen, wären immunohistochemische Untersuchungen notwendig.

Schlussfolgerungen

Betrachtung aller durchgeführten Untersuchungen zur funktionellen Charakterisierung der Aminosäure-substituierenden MDR1-Polymorphismen liefert die folgenden Erkenntnisse:

- Die bei insgesamt drei Proben der Studie an peripheren Lymphozyten kaukasischer Probanden detektierte MDR1-Variation T617C in Exon 7 zeigte keine eindeutige funktionelle Relevanz. Einer Expressionserhöhung im Western-Blot steht eine unveränderte Transportaktivität im Vergleich zum Wildtyp gegenüber. Auch die Ergebnisse der mRNA-Analyse der drei Probanden lässt sich mit der Pgp-Expression *in vitro* nicht in Übereinstimmung bringen. Um eine eindeutige Aussage machen zu können, sind weitere Untersuchungen zu diesem MDR1-Polymorphismus erforderlich.
- Im Gegensatz dazu sind sowohl für den T662C-Polymorphismus als auch für die Variation G2677T die Ergebnisse der Untersuchungen konsistent. Beide SNPs üben weder auf die Expression noch auf die Transportaktivität von P-glycoprotein einen Einfluss aus.

Zur Veranschaulichung sind die Ergebnisse in Tabelle 5.3 zusammengestellt. An dieser Stelle soll nochmals daraufhin gedeutet werden, dass eine Untersuchung von sowohl RNA- als auch Proteinexpression *in vivo* notwendig wäre, um eine eindeutige Aussage über den Zusammenhang zwischen den detektierten Polymorphismen und dem Gehalt an MDR1-mRNA und P-glycoprotein machen zu können.

5.3 Vergleich der Ergebnisse mit in der Literatur beschriebenen Studien

5.3.1 C3435T

Im Jahr 2000 machten Hoffmeyer et al. die Entdeckung, dass die weit verbreitete genetische Variation C3435T des humanen MDR1 Gens (allelische Frequenz 0,481) einen Einfluss auf die duodenale Expression von P-glycoprotein ausübt [Hoffmeyer et al., 2000]. Bei dieser Mutation in Exon 26 handelt es sich erstaunlicherweise um eine sogenannte stille oder “Wobble“-Mutation, die eigentlich keinen Effekt mit sich bringen sollte. Mittels quantitativer Immunohistochemie und Western-Blotting wurde in der Studie festgestellt, dass bei Trägern des TT-Allels die Expression von Pgp in duodenalen Enterozyten um das Zweifache niedriger liegt als beim Wildtyp (CC). Begründet wurde diese verminderte Expression mit der Hypothese eines potentiellen Links zu einem Polymorphismus in der Promotorregion des MDR1-Gens. Bislang wurde ein solcher Polymorphismus jedoch noch nicht veröffentlicht.

Seither wurden zahlreiche Untersuchungen zu diesem Phänomen angestellt. Interessanterweise sind die Ergebnisse dieser Studien sehr divergent, teilweise sogar kontrovers. Einige Studien berichten von ähnlichen Ergebnissen wie Hoffmeyer et al., während andere keinerlei Effekte des C3435T-SNPs auf die Expression bzw. auf die Transporteigenschaften von Pgp feststellen konnten. In Tabelle 5.4 sind einige Ergebnisse der in der Literatur beschriebenen Studien aufgeführt.

Die von Hoffmeyer et al. beschriebene Korrelation zwischen dem TT-Genotyp und einer stark verminderten MDR1-Expression konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Die Untersuchung der mRNA-Expression an zwei verschiedenen Populationen (periphere Lymphozyten / Lebergewebe) ergab bei Vorliegen des 3435T-Allels im Vergleich zum Wildtyp (CC) keinen Unterschied. Die Bestimmung der *MDR1*-mRNA-Expression in peripheren Lymphozyten mag aufgrund der starken interindividuellen Schwankungen kritisch zu betrachten sein, jedoch wurde an den untersuchten Lebergeweben das gleiche Ergebnis erhalten. Dieses Ergebnis ist konsistent mit einigen in der Literatur beschriebenen Studien [Calado et al., 2002, Goto et al., 2002, Tanabe et al., 2001], welche ebenfalls in Tabelle 5.4 aufgelistet sind.

5.3.2 G2677T

Cascorbi et al. machten die Feststellung, dass in der überwiegenden Zahl der Fälle ein Link zwischen dem synonymen C3435T-Polymorphismus in Exon 26 und dem codierenden G2677T SNP in Exon 21 besteht [Cascorbi et al., 2001]. Diese Tatsache könnte möglicherweise einen Ansatzpunkt zur Erklärung der gefundenen Unterschiede in der MDR1-Expression und der Aktivität bei Auftreten des C3435T-Polymorphismus liefern. Da jedoch die Ergebnisse verschiedener Untersuchungen zum Einfluss der G2677T-Variation auf die Pgp-Aktivität bzw. Expression ebenso divergent und kontrovers sind, ist auch diese Erklärung nicht ausreichend. In Tabelle 5.4 sind neben der Studien zum

Autor	n	Zellen / Gewebe	MDR1- Aktivität/ Expression	getestete Substanz (Humanstudie)	Effekt
C3435T					
Hoffmeyer et al., 2000	8	Duodenum	TT < CC	Digoxin	Plasmagehalt höher für TT
Sakaeda et al., 2001				Digoxin	Plasmagehalt niedriger für TT
Kim et al., 2001				Fexofenadin	Plasmagehalt niedriger für TT
Drescher et al., 2002				Fexofenadin	kein Unterschied
Hitzl et al., 2001	31	CD56+ Zellen	TT < CC		R123-Anreicherung in CD56+ Zellen von TT-Trägern höher
Tanabe et al., 2001	148	Plazenta	TT = CC		
Goto et al., 2002		oberer Jejunum	TT = CC	Tacrolimus	TT-Genotyp steht in Zusammen- hang mit verminderter Cyp3A4 mRNA-Expression
Calado et al., 2002	33	CD34+ Zellen	TT = CC		
Moriya et al., 2002	13	Duodenum	TT > CC	Digoxin, Fexofenadin	Plasmagehalte niedriger für TT
Nakamura et al., 2002	13	Duodenum		Digoxin	Plasmagehalt niedriger für TT
Siegmund et al., 2002	39	Duodenum	TT = CC	Talinolol	kein Unterschied
G2677T					
Drescher et al., 2002				Fexofenadin	kein Unterschied
Tanabe et al., 2001	148	Plazenta	TT < GG *		
Kimchi-Sarfaty et al., 2002		HeLa-Zellen	TT = GG	mehrere Substanzen <i>in vitro</i> getestet	kein Unterschied in Expression oder Aktivität
Kim et al., 2001		NIH-3T3 Zellen	TT > GG	Fexofenadin	Plasmagehalt niedriger bei TT
Calado et al., 2002	33	CD34+ Zellen	TT = GG		
Moriya et al., 2002	13	Duodenum	TT > GG *		
Siegmund et al., 2002	39	Duodenum	TT = GG	Talinolol	Plasmagehalt höher bei TT

Tabelle 5.4: Publierte Untersuchungen zur Auswirkung der Polymorphismen C3435T bzw. G2677T des humanen MDR1-Gens auf die Expression bzw. Aktivität von P-glycoprotein. n = Anzahl der Probanden. * nicht statistisch signifikant.

C3435T-Polymorphismus auch einige der in der Literatur beschriebenen Ergebnisse zur funktionellen Charakterisierung des G2677T-SNPs zusammengestellt.

Der von Cascorbi et al. beschriebene Link zwischen den beiden genannten Polymorphismen [Cascorbi et al., 2001] konnte in der Probandenstudie an peripheren Lymphozyten nicht festgestellt werden, da lediglich drei Probanden den G2677T-SNP aufwiesen. Lediglich bei einem dieser drei Probanden wurde gleichzeitig der C3435T SNP detektiert (heterozygot). Die Untersuchungen an Lebergeweben dagegen bestätigen diesen Link: 13 von 18 TT-Genotypen in Position 2677 wiesen auch den TT-Genotyp in Position 3435 des MDR1-Gens auf. Weitere 10 von 15 GT-Genotypen in Position 2677 waren auch Träger eines T-Allels in Position 3435.

Abgesehen von dieser offensichtlichen Verbindung zwischen den beiden genetischen Variationen in den Exons 21 und 26 wurden für den G2677T-SNP keine Effekte gefunden. Weder die Expression noch die Transportaktivität von P-glycoprotein wurden durch diesen codierenden Polymorphismus des MDR1-Gens beeinflusst. Diese Ergebnisse widersprechen auch der Hypothese, dass der gefundene Link zwischen den beiden Polymorphismen eine Rolle für die funktionelle Bedeutung spielen könnte. Ähnliche Ergebnisse wurden in der Literatur beispielsweise auch von Kimchi-Sarfaty et al. sowie Calado et al. beschrieben [Kimchi-Sarfaty et al., 2002, Calado et al., 2002].

Durch Betrachtung der vorliegenden Ergebnisse und der bereits veröffentlichten Daten wird die hohe Variabilität und Komplexität der Auswirkungen der beschriebenen MDR1-Polymorphismen ersichtlich.

Kapitel 6

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Screening auf natürlich auftretende Polymorphismen des humanen MDR1-Gens in drei verschiedenen Probandenstudien durchgeführt. Es wurden 15 verschiedene genetische Variationen des ABC-Transportergens identifiziert. Zwei Variationen sind in der Promotorregion des Gens lokalisiert, sechs befinden sich in Intronbereichen und sieben liegen in der codierenden Sequenz des MDR1-Gens. Lediglich drei Polymorphismen bewirken eine Aminosäuresubstitution im resultierenden P-glycoprotein. Von den 15 detektierten Polymorphismen wurden 11 in dieser Arbeit erstmalig beschrieben.

Bei dem Screening nach MDR1-Polymorphismen an verschiedenen Populationen wurden starke Unterschiede in der Häufigkeitsverteilung festgestellt, die auf den ethnischen Hintergrund der Probanden zurückzuführen sind.

Mittels Reportergensassay wurden zwei in der 5'-flankierenden Region des humanen MDR1-Gens lokalisierte Deletionen untersucht. Beide Deletionen zeigen keinen Einfluss auf die MDR1-Basalexpression.

Um die *in vitro* Untersuchung codierender Polymorphismen des humanen MDR1-Gens zu ermöglichen, wurde ein Expressionssystem für MDR1 konstruiert. Als geeignet für die Klonierung erwies sich hierbei die Verwendung eines Rekombinationssystems.

Mit Hilfe des in dieser Arbeit hergestellten Expressionssystems wurden die drei codierenden SNPs T617C (Val206Ala), T662C (Ile221Thr) und G2677T (Ala893Ser) funktionell charakterisiert. Im Western-Blot sowie mittels Rhodamin123-Transportassay wurde festgestellt, dass zwei der drei untersuchten, Aminosäure-substituierenden MDR1-Polymorphismen (T662C und G2677T) weder auf die Expression, noch auf die Transportaktivität von P-glycoprotein einen Einfluss ausüben. Für den dritten codierenden SNP hingegen (T617C) wurden im Western-Blot und im R123-Assay leicht kontroverse Effekte gefunden, die keine eindeutige Aussage zulassen. Zur Charakterisierung dieser genetischen Variation sind weitere Untersuchungen notwendig. Es wurde somit eine Reihe von Polymorphismen bzw. Mutationen des MDR1-Gens entdeckt, die die Funktion des Proteins jedoch nicht maßgeblich beeinflussen und somit vermutlich für die Träger der Mutationen nicht von Bedeutung sind.

Literaturverzeichnis

- [Abbaszadegan et al., 1994] Abbaszadegan, MR; Futscher, BW; Klimecki, WT; List, A; Dalton, WS; Analysis of multidrug resistance-associated protein (MRP) messenger RNA in normal and malignant hemotopoietic cells; *Cancer Res* **54** (1994) 4676-4679
- [Abernathy et al., 1997] Abernathy, CR; Rasmussen, SA; Stalker, HJ; Zori, R; Driscoll, DJ; Williams, CA; Kousseff, CG; Wallace, MR; NF1 mutation analysis using a combined heteroduplex/SSCP approach; *Human Mutation* **9** (1997) 548-554
- [Abulrob & Gumbleton, 1999] Abulrob, AG; Gumbleton, M; Transport of Phosphatidylcholine in MDR3-negative Epithelial Cell Lines via Drug-induced MDR1 P-glycoprotein; *Biochem Biophys Res Comm* **262** (1999) 121-126
- [Alberts et al., 1998] Alberts, B; Bray, D; Johnson, A; Lewis, L; Raff, M; Roberts, K; Walter, P; Lehrbuch der molekularen Zellbiologie; WILEY-VCH Verlag, Weinheim (1998)
- [Allikmets et al., 1996] Allikmets, R; Gerrard, B; Hutchinson, A; Dean, M; Characterization of the human ABC superfamily: isolation and mapping of 21 new genes using the Expressed Sequence Tags Database; *Hum Mol Gen* **5** (1996) 1649-1655
- [Allikmets et al., 1998] Allikmets, R; Schriml, LM; Hutchinson, A; Romano-Spica, V; Dean, M; A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance; *Cancer Res* **58** (1998) 5337-5339
- [Ambudkar et al., 1992] Ambudkar, SV; Lelong, IH; Zhang, J; Cardarelli, CO; Gottesman, MM; Pastan, I; Partial purification and reconstitution of the human multidrug-resistance pump: characterization of the drug-stimulatable ATP hydrolysis; *Proc Natl Acad Sci* **89** (1992) 8472-8476
- [Ambudkar et al., 1999] Ambudkar, SV; Dey, S; Hrycyna, CA; Ramachandra, M; Pastan, I; Gottesman, MM; Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter; *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **39** (1999) 361-98
- [Ameyaw et al., 2001] Ameyaw, MM; Regateiro, F; Li, T; Liu, X; Tariq, M; Mobarek, A; Thornton, N; Folayan, GO; Githang'a, J; Indalo, A; Ofori-Adjei, D; Price-Evans,

- DA; McLeod, HL; MDR1 pharmacogenetics: frequency of the C3435T mutation in exon 26 is significantly influenced by ethnicity; *Pharmacogenetics* **11** (2001) 217-221
- [Arceci et al., 1988] Arceci, RJ; Croop, JM; Horwitz, SB; Housman, D; The gene encoding multidrug resistance is induced and expressed at high levels during pregnancy in the secretory epithelium of the uterus; *Proc Natl Acad Sci USA* **85** (1988) 4350-4354
- [ATCC] American Type Culture Collection, <http://www.atcc.org/SearchCatalogs/>
- [Ayesh et al., 1996] Ayesh, S; Shao, YM; Stein, WD; Co-operative, competitive and non-competitive interactions between modulators of P-glycoprotein; *Biochim Biophys Acta* **1316** (1996) 8-18
- [Azzaria et al., 1989] Azzaria, M; Schurr, E; Gros, P; Discrete mutations introduced in the predicted nucleotide-binding site of the *mdr1* gene abolishes its ability to confer multidrug resistance; *Mol Cell Biol* **9** (1989) 5289-5297
- [Bailey-Dell et al., 2001] Bailey-Dell, KJ; Hassel, B; Doyle, LA; Ross, DD; Promotor characterization and genomic organization of the human breast cancer resistance protein (ATP-binding cassette Transporter ABCG2) gene; *Biochim Biophys Acta* **1520** (2001) 234-241
- [Beck et al., 1993] Beck, TW; Danks, MK; Wolverson, JS; Kim R; Chen, M; Drug resistance associated with altered DNA topoisomerase II; *Adv Enzyme Regul* **33** (1993) 113
- [Bellamy & Dalton, 1994] Bellamy, WT; Dalton, WS; Multidrug Resistance in the Laboratory and Clinic; *Adv Clin Chem* **31** (1994) 1-63
- [Biedler & Riehm, 1970] Biedler, JL; Riehm, H; Cellular resistance to actinomycin D in Chinese hamster cells in vitro: cross-resistance, radioautographic, and cytogenetic studies; *Cancer Res* **30** (1970) 1174-1184
- [Bordow et al., 1994] Bordow, SB; Haber, M; Madafiglio, J; Cheung, B; Marshall, GM; Norris, MD; Expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) gene correlates with amplification and overexpression of the N-myc oncogene in childhood neuroblastoma; *Cancer Res* **54** (1994) 5036-5040
- [Borst, 1991] Borst, P; Genetic Mechanisms of Drug Resistance; *Rev Oncol* **4** (1991) 87-105
- [Borst et al., 1999] Borst, P; Evers, R; Kool, M; Wijnholds, J; The multidrug resistance protein family; *Biochim Biophys Acta* **1461** (1999) 377-394
- [Borst et al., 2000] Borst, P; Evers, R; Kool, M; Wijnholds, J; A Family of Drug Transporters: the Multidrug Resistance Associated Proteins; *J Natl Canc Inst* **92** (2000) 1295-1302

- [Borst & Oude Elferink, 2002] Borst, P; Oude Elferink, R; Mammalian ABC Transporters in Health and Disease; *Annu Rev Biochem* **71** (2002) 537-592
- [Calado et al., 2002] Calado, RT; Falcao, RP; Garcia, AB; Gabellini, SM; Zago, MA; Franco, RF; Influence of functional MDR1 gene polymorphisms on P-glycoprotein Activity in CD34⁺ haematopoietic stem cells; *Haematologica* **87** (2002) 564-568
- [Callen et al., 1987] Callen, DF; Baker, E; Simmers, RN; Seshadri, R; Roninson, IB; Localization of the human multiple drug resistance gene, MDR1, to chromosome 7q21.1; *Hum Genet* **77** (1987) 142-144
- [Cascorbi et al., 2001] Cascorbi, I; Gerloff, T; Johne, A; Meisel, C; Hoffmeyer, S; Schwab, M; Schaeffer, E; Eichelbaum, M; Brinkmann, U; Frequency of single nucleotide polymorphisms in the P-Glycoprotein drug transporter MDR1 gene in white subjects; *Clin Pharmacol Ther* **69** (2001) 169-174
- [Chaudhary et al., 1992] Chaudhary, PM; Mechetner, EB; Roninson, IB; Expression and Activity of the Multidrug Resistance P-Glycoprotein in Human Peripheral Blood Lymphocytes; *Blood* **80** (1992) 2735-2739
- [Chen et al., 1986] Chen, C; Chin, JE; Ueda, K; Clark, DP; Pastan, I; Gottesman, MM; Roninson, IB; Internal Duplication and Homology with Bacterial Transport Proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) Gene from Multidrug-Resistant Human Cells; *Cell* **47** (1986) 381-389
- [Chen et al., 1990] Chen, C; Clark, D; Ueda, K; Pastan, I; Gottesman, MM; Roninson, IB; Genomic Organization of the Human Multidrug Resistance (MDR1) Gene and Origin of P-glycoproteins *J Biol Chem* **265** (1990) 506-514
- [Chin et al., 1990] Chin, KV; Tanaka, S; Darlington, G; Pastan, I; Gottesman, MM; Heat shock and arsenite increase expression of multidrug resistance (MDR1) gene in human renal carcinoma cells; *J Biol Chem* **265** (1990) 221-226
- [Chin et al., 1993] Chin, KV; Pastan, I; Gottesman, MM; Function and regulation of the human multidrug resistance gene; *Adv Cancer Res* **60** (1993) 157-180
- [Choi et al., 1988] Choi, K; Chen, CJ; Kriegler, M; Roninson, IB; An altered pattern of cross resistance in multidrug resistant human cells results from spontaneous mutations in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene; *Cell* **53** (1988) 519-529
- [Chomzynski & Sacchi, 1987] Chomczynski, P; Sacchi, N; Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction; *Anal Biochem* **162** (1987) 156-159
- [Cianfriglia et al., 1994] Cianfriglia, M; Willingham, MC; Tombesi, M; Scagliotti, GV; Frasca, G; Chersi, A; P-glycoprotein epitope mapping II. The murine monoclonal antibody MM6.15 to human multidrug resistant cells binds with three distinct loops in the MDR1-P-glycoprotein extracellular domain; *Int J Canc* **56** (1994) 153-160

- [Cohen et al., 1972] Cohen, SN; Chang, ACY; Hsu, L; Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA; *Proc Natl Acad Sci USA* **69** (1972) 2110
- [Cole et al., 1992] Cole, SPC; Bhardwaj, G; Gerlach, JH; Macie, JE; Grant, CE; Almquist, KC; Stewart, AJ; Kurz, EU; Duncan, AMV; Deeley, R; Overexpression of a Transporter Gene in a Multidrug-Resistant Human Lung Cancer Cell Line; *Science* **258** (1992) 1650-1654
- [Conly & Sunders, 1984] Conly, EC; Sunders, JR; Recombination-dependent recircularization of linearized pBR322 plasmid DNA following transformation of *Escherichia coli*; *Mol Gen Genet* **194** (1984) 211
- [Conrad, 2002] Conrad, S; Aufklärung genetischer Faktoren für die Variabilität von Expression und Funktion der humanen ABCC-Transporter MPR1 und MRP2; Dissertation; Universität Kaiserslautern (2002)
- [Cordon-Cardo et al., 1989] Cordon-Cardo, C; O'Brien, JP; Casals, D; Rittman-Grauer, L; Biedler, JL; Melamed, MR; Bertino, JR; Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites; *Proc Natl Acad Sci USA* **86** (1989) 695-698
- [Cordon-Cardo et al., 1990] Cordon-Cardo, C; O'Brian, JP; BocciaJ; Casals, D; Bertino, JR; Melamed, MR; Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human and tumor tissues; *J Histochem, Cytochem* **38** (1990) 1277-1287
- [Cornwell & Smith, 1993] Cornwell, MM; Smith, DE; Sp1 activates the MDR1 Promotor through one of two distinct G-rich regions that modulate promotor activity; *J Biol Chem* **268** (1993) 19505-19511
- [Currier et al., 1989] Currier, SJ; Ueda, K; Willinham, MC; Pastan, I; Gottesman, MM; Deletion and Insertion Mutants of the Multidrug Transporter; *J Biol Chem* **264** (1989) 14376-14381
- [Dean & Allikmets, 2001] Dean, M; Allikmets, R; Complete Characterization of the Human ABC Gene Family; *J Bioenerg Biomembr* **33** (2001) 457-478
- [Dean et al., 2001] Dean, M; Rzhetsky, A; Allikmets, R; The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily *Genome Res* **11** (2001) 1156-1166
- [Decleves et al., 2000] Decleves, X; Chevillard, S; Charpentier, C; Vielh, P; Laplanche, JL; A new polymorphism (N21D) in the exon 2 of the human MDR1 gene encoding the P-glycoprotein; *Hum Mutat* **15** (2000) 486
- [Deng & Nickoloff, 1992] Deng, WP; Nickoloff, JA; Site directed mutagenesis of virtually any plasmid by eliminating a unique site; *Anal Biochem* **200** (1992) 81

- [Doige & Ames, 1993] Doige, CA; Ames, GF-L; ATP-dependent transportsystems in bacteria and humans, relevance to cystic fibrosis and multidrug resistance; *Annu Rev Microbiol* **47** (1993) 291-319
- [Doyle, 1996] Doyle, K (Editor); Protocols and application guide; The source for discovery, 3rd ed.; *Promega Corp USA* (1996) 240-245
- [Doyle et al., 1998] Doyle, LA; Yang, W; Abruzzo, LV; Krogmann, T; Gao, Y; Rishi, AK; Ross, DD; A multidrug resistance transporter from human breast cancer cells; *Proc Natl Acad Sci USA* **95** (1998) 15665-15670
- [Drescher et al., 2002] Drescher, S; Schaeffeler, E; Hitzl, M; Hofmann, U; Schwab, M; Eichelbaum, M; Fromm, MF; MDR1-gene polymorphisms and disposition of the P-glycoprotein substrate fexofenadine; *J Clin Pharmacol* **53** (2002) 526-534
- [Dresser, 2002] Dresser, MJ; The MDR1 C3435T Polymorphism: Effects on P-glycoprotein expression/function and clinical significance; *AAPS Pharm Sci* **3** (2002) 3
- [Eichelbaum & Evert, 1996] Eichelbaum, M; Evert, B; Influence of pharmacogenetics on drug disposition and response; *Clin Exp Pharmacol Physiol* **23** (1996) 983-985
- [Endicott & Ling, 1989] Endicott, JA; Ling, V; The Biochemistry of P-glycoprotein-mediated Multidrug Resistance; *Annu Rev Biochem* **58** (1989) 137-171
- [Endicott et al., 1991] Endicott, JA, Sarangi, F; Ling, V; Complete cDNA sequences encoding the Chinese hamster P-glycoprotein gene family; *DNA Seq* **2** (1991) 89-101
- [Fairchild et al., 1990] Fairchild, CR; Moscow, JA ; O'Brien, EE; Cowan, KH; Multidrug Resistance in cells transfected with human genes encoding variant P-glycoprotein and Gluthathione S-Transferase- π ; *Mol Pharmacol* **37** (1990) 801-809
- [Ferry et al., 1996] Ferry, DR; Traunecker, H; Kerr, DJ; Clinical trials of P-glycoprotein reversal in solid tumors; *Europ J Cancer* **32A** (1996) 1070-1081
- [Finke, 1996] Finke, R; Theoretical basis and application of molecular diagnostics; *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **104** (1996) 92-97
- [Fojo et al., 1986] Fojo, A; Lebo, R; Shimizu, N; Chin, JE; Roninson, IB; Merlino, GT; Gottesman, MM; Pastan, I; Localization of multidrug associated DNA sequences to human chromosome 7; *Somat Cell Mol Genet* **12** (1986) 415-420
- [Ford & Haith, 1990] Ford, JM; Hait, WN; Pharmacology of drugs that alter multidrug resistance in cancer; *Pharmacol Rev* **42** (1990) 155-199
- [Ford, 1996] Ford, JM; Experimental Reversal of P-glycoprotein mediated Multidrug Resistance by pharmacological chemosensitizers; *Europ J Cancer* **32A** (1996) 991-1001

- [Friedlander et al., 1996] Friedlander, P; Legros, Y; Soussi, T; Prives, C; Regulation of Mutant p53 Temperature-sensitive DNA Binding; *J Biol Chem* **271** (1996) 25468-25478
- [Fromm, 2000] Fromm, MF; Die Bedeutung von P-glycoprotein als intestinale Absorptionsbarriere und als Bestandteil der Blut-Hirn-Schranke für Pharmakokinetik und Gewebekonzentrationen von Arzneimitteln; Internet: <http://pharmakologie.pharmacol.uni-mainz.de/Heft24/P-GLYK.htm>
- [Gant, 2000] Persönliche Mitteilung
- [George et al., 1990] Georges, E; Bradley, G; Garipey, J; Ling, V; Detection of P-glycoprotein isoforms by gene specific monoclonal antibodies; *Proc Natl Acad Sci USA* **87** (1990) 152-156
- [Gerlach et al., 1986a] Gerlach, JH; Kartner, N; Bell, DR; Ling, V; Multidrug Resistance; *Cancer Surv* **5** (1986) 25-46
- [Gerlach et al., 1986] Gerlach, JH; Endicott, JA; Juranka, PF; Henderson, G; Sarangi, F; Deuchars, KL; Ling V; Homology between P-glycoprotein and a bacterial haemolysin transport protein suggests a model for multidrug resistance; *Nature* **324** (1986) 485-489
- [Germann, 1996] Germann, UA; P-glycoprotein - A mediator of Multidrug Resistance in tumor cells; *Europ J Cancer* **32A** (1996) 927-944
- [Germann et al., 1996] Germann, UA; Chambers, TC; Ambudkar, SV; Licht, T; Cardarelli, CO; Pastan, I; Gottesman, MM; Characterization of Phosphorylation-defective Mutants of Human P-glycoproteins Expressed in Mammalian Cells; *J Biol Chem* **271** (1996) 1708-1716
- [Gluzman, 1981] Gluzman, Y; SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants; *Cell* **23** (1981) 175-182
- [Goto et al., 2002] Goto, M; Masuda, S; Saito, H; Uemoto, S; Kiuchi, T; Tanaka, K; Inui, K; C3435T Polymorphism in the *MDR1* gene affects the enterocyte expression level of CYP3A4 rather than Pgp in recipients of living-donor liver transplantation; *Pharmacogenetics* **12** (2002) 451-457
- [Gottesman & Pastan, 1993] Gottesman, MM; Pastan, I; Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter; *Annu Rev Biochem* **62** (1993) 385-427
- [Gottesman et al., 1995] Gottesman, MM; Hrycyna, CA; Schoenlein, PV; Germann, UA; Pastan, I; Genetic analysis of the multidrug transporter; *Annu Rev Genet* **29** (1995) 607-649

- [Gottesman & Ambudkar, 2001] Gottesman, MM; Ambudkar, SV; Overview: ABC Transporters and Human Disease; *J Bioenerg Biomembr* **33** (2001) 453-458
- [Grant et al., 1997] Grant, CE; Kurz, EU; Cole, SPC; Deeley, RG; Analysis of the intron-exon organization of the human multidrug resistance protein gene (MRP) and alternative splicing of its mRNA; *Genomics* **45** (1997) 368-378
- [Gros et al., 1986] Gros, P; Croop, J; Housman, D; Mammalian multidrug resistance gene: complete cDNA sequence indicates strong homology to bacterial transport proteins; *Cell* **47** (1986) 371-380
- [Gros et al., 1986a] Gros, P; Croop, J; Roninson, I; Varshavsky, A; Housman, DE; Isolation and characterization of DNA sequences amplified in multidrug-resistant hamster cells; *Proc Natl Acad Sci USA* **83** (1986) 337-41
- [Gros et al., 1988] Gros, P; Raymond, M; Bell, J; Housman, D; Cloning and characterization of a second member of the mouse *mdr* gene family; *Mol Cell Biol* **8** (1988) 2770-2778
- [Hafkemeyer et al., 1998] Hafkemeyer, P; Dey, S; Ambudkar, SV; Hrycyna, CA; Pastan, I; Gottesman, MM; Contribution to Substrate Specificity and Transport of Nonconserved Residues in Transmembrane Domain 12 of Human P-glycoprotein; *Biochemistry* **37** (1998) 16400-16409
- [Hartley et al., 2000] Hartley JL; Temple, GF; Brasch, MA; DNA-Cloning using In Vitro Site-Specific Recombination; *Genome Research* **10** (2000) 1788-1795
- [Hasegawa et al., 1995] Hasegawa, S; Hasegawa, S; Abe, T; Naito, S; Kotoh, S; Kumazawa, J; Hipfner, DR; Deeley, RG; Cole, SP; Kuwano, M; Expression of multidrug resistance-associated protein (MRP), MDR and DNA topoisomerase II in human multidrug-resistant bladder cell lines; *Brit J Cancer* **71** (1995) 907-913
- [Higgins et al., 1986] Higgins, CF; Hiles, ID; Salmong, GPD; Gill, DR; Downie, JA; Evans, IJ; Holland, B; Gray, L; Buckel, SD; Bell, AW; Hermodson, MA; A family of related ATP-binding subunits coupled to many distinct biological processes in bacteria; *Nature* **323** (1986) 448-450
- [Higgins, 1992] Higgins, CF; ABC Transporters: From Microorganisms to Man; *Annu Rev Cell Biol* **8** (1992) 67-113
- [Higgins & Gottesman, 1992] Higgins, CF; Gottesman, MM; Is the multidrug transporter a flippase?; *Trends in Biochem Science* **17** (1992) 18-21
- [Higgins et al., 1997] Higgins, CF; Callaghan, R; Linton, KJ; Rosenberg, MF; Ford, RC; Structure of the multidrug resistance P-Glycoprotein; *Semin Cancer Biol* **8** (1997) 135-142

- [Hitzl et al., 2001] Hitzl, M; Drescher, S; van der Kuip, H; Schaffeler, E; Fischer, J; Schwab, M; Eichelbaum, M; Fromm, MF; 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** (2001) 293-298
- [Hoffmeyer et al., 2000] Hoffmeyer, S; Burk, O; v. Richter, O; Arnold, HP; Brockmüller, J; Johne, A; Cascorbi, I; Gerloff, T; Roots, I; Eichelbaum, M; Brinkmann, U; 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 USA* **97** (2000) 3473-3478
- [Hyde et al., 1990] Hyde, SC; Emsley, P; Hartshorn, MJ; Mimmack, MM; Gileadi, U; Pearce, SR; Gallagher, MP; Gill, DR; Hubbard, RE; Higgins, CF; Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport; *Nature* **346** (1990) 362-365
- [Ingelmann-Sundberg et al., 2001] Ingelmann-Sundberg, M; Daly, AK; Nebert, DM; Homepage of the human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Committee; <http://www.imm.ki.se/CYPalleles/cyp2d6.htm> (2001)
- [Ito et al., 2001] Ito, S; Ieiri, I; Tanabe, M; Suzuki, A; Higuchi, S; Otsubo, K; Polymorphism of the ABC transporter genes, MDR1, MRP1 and MRP2/cMOAT, in healthy Japanese subjects; *Pharmacogenetics* **11** (2001) 175-184
- [Jaeckel et al., 1998] Jaeckel, S; Epplen, JT; Kauth, M; Mitterski, B; Tschentscher, F; Epplen, C; Polymerase Chain Reaction -Single Strand Conformation Polymorphism or how to detect reliably and efficiently each sequence variation in many samples and many genes; *Electrophoresis* **19** (1998) 3055-3061
- [Jedlitschki et al., 1994] Jedlitschki, G; Leier, I; Buchholz, U; Center, M; Keppler, D; ATP-dependent transport of glutathione S-conjugates by the multidrug resistance-associated protein; *Cancer Res* **54** (1994) 4833-4836
- [Johnstone et al., 2000] Johnstone, RW; Ruefli, AA; Smyth, MJ; Multiple physiological functions for multidrug transporter P-glycoprotein; *TIBS* **25** (2000) 1-6
- [Juliano & Ling, 1976] Juliano, RL; Ling, V; A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants; *Biochim Biophys Acta* **455** (1976) 152-162
- [Kajiji et al., 1994] Kajiji, S; Dreslin, JA; Grizzuti, K; Gros, P; Structurally distinct MDR Modulators show specific patterns of reversal against P-glycoproteins bearing unique mutations at serine 939/941; *Biochemistry* **33** (1994) 504-508
- [Kane et al., 1989] Kane, SE; Reinhard, DH; Fordis, CM; Pastan, I; Gottesman, MM; A new vector using the multidrug resistance gene as a selectable marker enables overexpression of foreign genes in eukaryotic cells; *Gene* **84** (1989) 439-446

- [Kane et al., 1990] Kane, SE; Gottesman, MM; Pastan, I; Genetic Basis of multidrug resistance of tumor cells; *J Bioenerg Biomembr* **4** (1990) 593-618
- [Kane, 2002] Persönliche Mitteilung
- [Kartner et al., 1983] Kartner, N; Riordan, JR; Ling, V; Cell surface P-glycoprotein associated with multidrug resistance in mammalian cell lines; *Science* **221** (1983) 1285-1288
- [Kartner & Ling, 1989] Kartner, N; Ling, V; Vielfachresistenz von Krebszellen; *Spektrum der Wissenschaft* **5** (1989) 64-71
- [Kast et al., 1995] Kast, C; Canfield, V; Levenson, R; Gros, P; Membrane topology of P-glycoprotein as determined by epitope insertion, transmembrane organisation of the N-terminal domain of *mdr3*; *Biochemistry* **34** (1995) 4402-4411
- [Kauffmann et al., 1997] Kauffmann, HM; Keppler, D; Kartenbeck, J; Schrenk, D; Induction of cMrp/cMoat gene expression by cisplatin, 2-acetylaminofluorene, or cycloheximide in rat hepatocytes; *Hepatology* **26** (1997) 980-985.
- [Kaye, 1998] Kaye, SB; Multidrug Resistance: Clinical relevance in solid tumors and strategies for circumvention; *Curr Opin Oncol* **10** (1998) 15-19
- [Kerb et al., 2001] Kerb, R; Hoffmeyer, S; Brinkmann, U; ABC drug transporters: hereditary polymorphisms and pharmacological impact in MDR1, MRP1 and MRP2; *Pharmacogenomics* **2** (2001) 51-64
- [Kim et al., 2001] Kim, RB; Leake, BF; Choo, EF; Dresser, GK; Kubba, SV; Schwarz, UI; Taylor, A; Xie, HG; McKinsey, J; Zhou, S; Lan, LB; Schuetz, JD; Schuetz, EG; Wilkinson, GR; Identification of functionally variant MDR1 alleles among European Americans and African Americans; *Clin Pharmacol Ther* **70** (2001) 189-199
- [Kim, 2002] Kim, RB; MDR1 single nucleotide polymorphisms: multiplicity of haplotypes and functional consequences; *Pharmacogenetics* **12** (2002) 425-427
- [Kimchi-Sarfaty et al., 2002] Kimchi-Sarfaty, C; Gribar, JJ; Gottesman, MM; Functional Characterization of Coding Polymorphisms in the human MDR1 Gene using a vaccinia Virus Expressions System; *Mol Pharmacol* (2002) **62** 1-6
- [Klimecki et al., 1995] Klimecki, WT; Taylor, CW; Daton, WS; Inhibition of cell-mediated cytotoxicity and P-glycoprotein function in natural killer cells by verapamil isomers and cyclosporine A analogs; *J Clin Immunol* **15** (1995) 152-158
- [Knowles & Aden, 1983] Knowles, BB; Aden, DP; Human hepatoma derived cell line, process for preparation thereof, and uses therefor; *U.S. Patent* **4393133** (1983)

- [Krishna & Mayer, 2000] Krishna, R; Mayer, LD; Multidrug resistance (MDR) in cancer: Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs; *Eur J Pharmaceut Sci* **11** (2000) 265-283
- [Lämmlli, 1970] Lämmlli, UK; Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4; *Nature* **227** (1970) 680-685
- [Lange et al., 2000] Lange, C; Walther, W; Schwabe, H; Stein, U; Cloning and initial analysis of the human multidrug resistance-related MVP/LRP gene promotor; *Biochim Biophys Res Commun* **278** (2000) 125-133
- [Lee et al., 1993] Lee, CH; Bradley, G; Zhang, JT; Ling, V; Differential expression of P-glycoprotein genes in primary rat hepatocyte culture; *J Cell Physiol* **157** (1993) 392-402
- [Lehnert, 1996] Lehnert, M; Clinical Multidrug Resistance in cancer: a multifactorial problem; *Europ J Cancer* **32A** (1996) 912-920
- [Leveille-Webster & Arias, 1995] Leveille-Webster, CR; Arias, IM; The Biology of the P-glycoproteins; *J Membrane Biol* **143** (1995) 89-102
- [Lincke et al., 1991] Lincke, CR; Smit, JJM; van der Velde-Korst, T; Borst, P; Structure of the Human MDR3 Gene and Physical Mapping of the Human MDR Locus; *J Biol Chem* **266** (1991) 5303-5310
- [Ling, 1992] Ling, V; P-glycoprotein and Resistance to Anticancer Drugs; *Cancer* **69** (1992) 2603-2609
- [Loo & Clarke, 1995] Loo, TW; Clarke, DM; Membrane topology of a cysteine-less mutant of human P-glycoprotein; *J Biol Chem* **270** (1995) 843-848
- [Loo & Clarke, 1996] Loo, TW; Clarke, DM; Mutational analysis of the Predicted First Transmembrane Segment of each Homologous Half of Human P-glycoprotein Suggests That They Are Symmetrically Arranged in the Membrane; *J Biol Chem* **271** (1996) 15414-15419
- [Loo & Clarke, 1996a] Loo, TW; Clarke, DM; Inhibition of oxidative cross-linking between engineered cysteine residues at positions 332 in predicted transmembrane segments (TM) 6 and 975 in predicted TM12 of human P-glycoprotein by drug substrates; *J Biol Chem* **271** (1996) 27482-27487
- [Lowry et al., 1951] Lowry, OH; Rosebrough, NJ; Farr, AL; Randall, RJ; Protein measurement with the folin phenol reagent; *J Biol Chem* **193** (1951) 265-275
- [Ludescher et al., 1991] Ludescher, C; Gattringer, M; Drach, J; Hofmann, J; Grunick, H; Rapid functional assay for the detection of multidrug-resistant cells using the fluorescent dye rhodamine 123; *Blood* **78** (1991) 1385-1387

- [Lundberg et al., 1991] Lundberg, KS; Shoemaker, DD; Adams, MW; Short, JM; Sorge, JA; Mathur, ED; High fidelity amplification using a thermostable DNA-Polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*; *Gene* **108** (1991) 1-6
- [Mansfield, 1994] Mansfield, MA; Protein Blotting, A practical approach, Editor Dunbar, BS; Oxford University Press (1994) 33-52
- [Marez et al., 1997] Marez, D; Legrand, M; Sabbagh, N; Guidice, JM; Spire, C; Lafitte, JJ; Meyer, UA; Broly F; Polymorphism of the cytochrome P450 CYP2D6 gene in a European population: characterization of 48 mutations and 53 alleles, their frequencies and evolution; *Pharmacogenetics* **3** (1997) 193-202
- [McClellan et al., 1993] McClellan, S; Whelan, RDH; Hosking, LK; Hodges, GM; Thompson, FH; Meyers, MB; Schuurhuis, JG; Hill, BT; Characterization of the P-glycoprotein over-expressing drug resistance phenotype exhibited by Chinese hamster ovary cells following their *in-vivo* exposure to fractionated X-irradiation; *Biochim Biophys Acta* **1177** (1993) 117-126
- [McCoy et al., 1995] McCoy, C; Smith, DE; Cornwell, MM; 12-*O*-Tetradecanoylphorbol-13-Acetate Activation of the *MDR1* Promotor Is Mediated by EGR1; *Mol Cell Biol* **15** (1995) 6100-6108
- [Metz et al., 1995] Metz, M; Best, DM; Kane, SE; Harvey Murine Sarcoma Virus/*MDR1* Retroviral Vectors: Efficient Virus Production and Foreign Gene Transduction Using *MDR1* as a selectable Marker; *Virology* **206** (1995) 634-643
- [Meaden et al., 2002] Meaden, ER; Hoggard, PG; Khoo, SH; Back, DJ; Determination of Pgp and MRP1 expression and function in peripheral blood mononuclear cells *in vivo*; *J Immunol Methods* **262** (2002) 159-165
- [Mickley et al., 1998] Mickley, LA; Lee, JS; Weng, Z; Zhan, Z; Alvarez, M; Wilson, W; Bates, SE; Fojo, T; Genetic Polymorphism in *MDR1*: A Tool for Examining Allelic Expression in Normal Cells, Unselected and Drug -Selected Cell-Lines and Human Tumors; *Blood* **91** (1998) 1749-1756
- [Miquel et al., 1998] Miquel, JF; Covarrubias, C; Villaroel, L; Mingrone, G; Greco, AV; Puglielli, L; Carvallo, P; Marshall, G; del Pino, G; Nervi, F; Genetic epidemiology of cholesterol cholelithiasis among Chilean Hispanics, Americans and Maoris; *Gastroenterology* **115** (1998) 937-946
- [Moriya et al., 2002] Moriya, Y; Nakamura, T; Horinouchi, M; Sakaeda, T; Tamura, T; Asyama, N; Shirakawa, T; Gotoh, A; Fujimoto, S; Matsuo, M; Kasuga, M; Okumura, K; Effects of Polymorphisms of *MDR1*, *MRP1*, and *MRP2* Genes on Their mRNA Expression Levels in Duodenal Enterocytes of Healthy Japanese Subjects; *Biol Pharm Bull* **25** (2002) 1356-1359
- [Morrow & Cowan, 1990] Morrow, CS; Cowan, KH; Glutathion-S-Transferases and drug resistance; *Cancer Cells* **2** (1990) 15-22

- [Moscow & Cowan, 1990] Moscow, JA; Cowan, KH; Multidrug Resistance; *J Natl Cancer Inst* **80** (1990) 14-20
- [Müller, 2001] Müller, M; 48 Human ATP-Binding Cassette Transporters; <http://www.nutrigenet.at.com/humanabc.htm> (2001)
- [Mutschler, 1991] Mutschler, E (Editor); Chemotherapie maligner Tumoren; *Arzneimittelwirkungen Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*; 6te Auflage; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart (1991) 663-682
- [Nakamura et al., 2002] Nakamura, T; Sakaeda, T; Horinouchi, M; Tamura, T; Asyama, N; Shirakawa, T; Matsuo, M; Kasuga, M; Okumura, K; Effect of the mutation (C3435T) at exon 26 of the MDR1 gene on expression level of MDR1 messenger ribonucleic acid in duodenal enterocytes of healthy subjects; *Clin Pharmacol Ther* **71** (2002) 297-303
- [Nelson & McClelland, 1992] Nelson, M; McClelland, M; Use of DNA methyltransferase/endonuclease enzyme combinations for megabase mapping of chromosomes; *Methods Enzymol* **216** (1992) 279-303
- [Orita et al., 1989] Orita, M; Hiroyuki, I; Hiroshi, K; Kenshi, H; Takao, S; Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoreses as single-strand conformation polymorphisms; *Proc Natl Acad Sci USA* **86** (1989) 2766-2770
- [Passarge, 1994] Passarge, E; Taschenatlas der Genetik, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York (1994)
- [Papworth et al., 1996] Papworth, C; Bauer, JC; Braman, J; Wright, DA; Site-directed mutagenesis in one day with 80% efficiency; *Strategies* **9** (1996) 3-4
- [Piekarz, et al., 1993] Piekarz, R; Cohen, D; Horwitz, SB; Progesterone regulates the murine multidrug resistance *mdr1b* gene; *J Biol Chem* **268** (1993) 7613-7616
- [Ramachandra et al., 1996] Ramachandra, M; Ambudkar, SV; Gottesman, MM; Pastan, I; Hrycyna, C; Functional Characterization of a Glycine 185 to Valine Substitution in human P-glycoprotein by using a vaccinia-based transient expression system; *Mol Biol Cell* **7** (1996) 1485-1498
- [Ramachandra & Melnick, 1999] Ramachandra, C; Melnick, SJ; Multidrug Resistance in Human Tumors - Molecular Diagnosis and Clinical Significance; *Mol Diagnosis* **4** (1999) 81-94
- [Reed, 1995] Reed, JC; BCL-2: prevention of apoptosis as a mechanism of drug resistance; *Haematol Oncol Clin North* **9** (1995) 451
- [Rosenberg et al., 1997] Rosenberg, MF; Callaghan, R; Ford, RC; Higgins, CF; Structure of the Multidrug Resistance P-glycoprotein to 2.5 nm Resolution Determined by Electron Microscopy and Image Analysis; *J Biol Chem* **272** (1997) 10685-10694

- [Ross et al., 2000] Ross, DD, Karp, J; Chen, TT; Doyle, LA; Expression of breast cancer resistance protein (BCRP) in blast cells from patients with acute myeloid leukemia (AML); *Blood* **96** (2000) 365-368
- [Safa et al., 1994] Safa, AR; Roberts, S; Agresti, M; Fine, RL; Tamoxifen aziridine, a novel affinity probe for P-glycoprotein in multidrug resistant cells; *Biochem Biophys Res Commun* **202** (1994) 606-612
- [Saiki et al., 1985] Saiki, RK; Scharf, S; Faloona, F; Mullis, KB; Horn, GT; Erlich, HA; Arnheim, N; Enzymatic Amplification of β -Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia; *Science* **230** (1985) 1350-1354
- [Sakaeda et al., 2001] Sakaeda, T; Nakamura, T; Horinouchi, M; Kakumoto, M; Ohmoto, N; Sakai, T; Morita, Y; Tamura, T; Aoyama, N; Hirai, M; Kasuga, M; Okumura, K; MDR1 genotype related pharmacokinetics of digoxin after single oral administration in healthy Japanese subjects; *Pharm Res* **18** (2001) 1400-1408
- [Sakaeda et al., 2002] Sakaeda, T; Nakamura, T; Okumura, K; MDR1 Genotype-Related Pharmacokinetics and Pharmacodynamics; *Biol Pharm Bull* **25** (2002) 1391-1400
- [Sarkadi et al., 1992] Sarkadi, B; Price, M; Boucher, RC; Germann, UA; Scarborough, GA; Expression of the human multidrug resistance cDNA in insect cells generates a high activity drug-stimulated membrane ATPase; *J Biol Chem* **267** (1992) 4854-8
- [Schaeffeler et al., 2001] Schaeffeler, E; Eichelbaum, M; Brinkmann, U; Penger, A; Asante-Poku, S; Zanger, UM; Schwab, M; Frequency of C3435T polymorphism of MDR1 gene in African people; *Lancet* **87** (2001) 383-384
- [Scheffer et al., 1995] Scheffer, GL; Wijngaard, PLJ; Fleurs, MJ et al.; The drug resistance protein LRP is the human major vault protein; *Nature Med* **1** (1995) 578-582
- [Scheper et al., 1993] Scheper, RJ; Broxterman, HJ; Scheffer, GL; Kaaijk, P; Dalton, WS; van Heijningen, TH; van Kalken, CK; Slovak, ML; de Vries, EG; van der Valk, P; Overexpression of a M(r) 110 000 vesicular protein in non-P-glycoprotein-mediated multidrug-resistance; *Cancer Res* **53** (1993) 1475-1479
- [Schinkel et al., 1991] Schinkel, AH; Roelofs, EM; Borst, P; Characterization of the human MDR3 P-glycoprotein and its recognition by P-glycoprotein-specific monoclonal antibodies; *Cancer Res* **51** (1991) 2628-2635
- [Schinkel et al., 1993] Schinkel, AH; Kemp, S; Dolle, M; Rudenko, G; Wagenaar, E; N-Glycosylation and deletion mutants of the human MDR1-P-glycoprotein; *J Biol Chem* **268** (1993) 7474-7481
- [Schinkel et al., 1994] Schinkel, AH; Smit, JJM; van Tellingen, O; Beijnen, JH; Wagenaar, E; van Deemter, L; Mol, CAAM; van der Valk, MA; Robanus-Maandag, EC;

- te Riele, HPJ; Berns, AJM; Borst, P; 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** (1994) 491-502
- [Schinkel et al., 1996] Schinkel, AH; Wagenaar, E; Mol CAAM; van Deemter, L; P-glycoprotein in the Blood-Brain-Barrier of Mice influences the Brain Penetration and Pharmacological Activity of many Drugs; *J Clin Invest* **97** (1996) 2517-2524
- [Schinkel et al., 1997] Schinkel, AH; Mayer U, Wagenaar E, Mol CA, van Deemter L, Smit JJ, van der Valk MA, Voordouw AC, Spits H, van Tellingen O, Zijlmans JM, Fibbe WE, Borst P.; Normal viability and altered pharmacokinetics in mice lacking *mdr1*-type (drug transporting) P-glycoproteins; *Proc Natl Acad Sci USA* **94** (1997) 4028-4033
- [Schuetz et al., 1995] Schuetz, EG; Furuya, KN; Schuetz, JD; Interindividual variation in expression of P-glycoprotein in normal human liver and secondary hepatic neoplasms; *J Pharmacol Exp Ther* **275** (1995) 1011-1018
- [Seelig, 1998] Seelig, A; A general Pattern for substrate recognition by P-glycoprotein; *Eur J Biochem* **251** (1998) 252-261
- [Seelig, 1998a] Seelig, A; How does P-glycoprotein recognize its substrates?; *Int J Clin Pharmacol Ther* **36** (1998) 50-54
- [Shapiro et al., 1987] Shapiro, MB; Senapathy, P; RNA splice junctions of different classes of eucaryotes: sequence statistics and functional implications in gene expression; *Nucl Acids Res* **15** (1987) 7155
- [Sharom, 1997] Sharom, FJ; The P-glycoprotein Efflux Pump: How does it Transport Drugs? *J Membrane Biol* **160** (1997) 161-175
- [Siegmond et al., 2002] Siegmond, W; Ludwig, K; Giessmann, T; Dazert, P; Schroeder, E; Sperker, B; Warzok, R; Kroemer, HK; Cascorbi, I; The effects of the human MDR1 genotype on the expression of duodenal P-glycoprotein and disposition of the probe drug talinolol; *Clin Pharmacol Ther* **72** (2002) 572-583
- [Slapak et al., 1994] Slapak, C; Mizunuma, N; Kufe, DW; Expression of the Multidrug Resistance Associated Protein and P-glycoprotein in Doxorubicin-selected Human Myeloid Leukemia Cells; *Blood* **84** (1994) 3113-3121
- [Smit et al., 1993] Smit, JJ; Schinkel, AH; Oude Elferink, RPJ; Groen, AK; Wagenaar, E; van Deemter, L, Mol, CA; Ottenhoff, R; van der Lugt, NMT; van Room, MA; van der Walk, MA; Offerhaus, GJA; Berns AJM; Borst, P; Homozygous disruption of the murine *mdr 2* P-glycoprotein leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease; *Cell* **75** (1993) 451-462

- [Smith et al., 2000] Smith, AJ; van Helvoort, A; van Meer, G; Szabo, K; Welker, E; Szakás, G; Váradi, A; Sarkadi, B; Borst, P; MDR3 P-glycoprotein, a Phosphatidylcholine Translocase, Transports several Cytotoxic Drugs and Directly Interacts with Drugs as Judged by Interference with Nucleotide Trapping; *J Biol Chem* **275** (2000) 23530-23539
- [Sonveaux et al., 1996] Sonveaux, N; Shapiro, AB; Goormaghtigh, E; Ling, V; Ruyschaert, JM; Secondary and tertiary structure changes of reconstituted P-glycoprotein. A Fourier transform attenuated total reflection infrared spectroscopy analysis; *J Biol Chem* **271** (1996) 24617-24624
- [Sparreboom et al., 1997] Sparreboom, A; van Asperen, J; Mayer, U; Schinkel, AH; Smit, JW; Meijer, DKF; Borst, P; Nooijen, WJ; Beijnen, JH; van Tellingen, O; Limited oral bioavailability and active epithelial excretion of Paclitaxel (Taxol) caused by P-glycoprotein in the intestine; *Proc Natl Acad Sci USA* **94** (1997) 2031-2035
- [Sugawara et al., 1988] Sugawara, I; Nakahama, M; Hamada, H; Tsuruo, T; Mori, S; Apparent stronger expression in the human adrenal cortex than in the human adrenal medulla of Mr 170,000-180,000 P-glycoprotein; *Cancer Res* **48** (1988) 4611-4614
- [Sundseth et al., 1997] Sundseth, R; McDonald, G; Ting, J; King, CA; DNA-Elements recognizing NF-Y and SP1 regulate the human Multidrug Resistance Gene Promoter; *Mol Pharmacol* **51** (1997) 963-971
- [Taguchi et al., 1997] Taguchi, Y; Kino, K; Morishima, M; Komano, T; Kane, SE; Ueda, K; Alteration of Substrate Specificity by Mutations at the His61 Position in Predicted Transmembrane Domain 1 of Human MDR1/P-glycoprotein; *Biochemistry* **36** (1997) 8883-8889
- [Takada et al., 1998] Takada, Y; Yamada, K; Tagouchi, Y; Kino, K; Matsuo, M; Trucker, SJ; Komano, T; Amachi, T; Ueda, K; Non equivalent cooperation between the two nucleotide binding folds of P-glycoprotein; *Biochim Biophys Acta* **1373** (1998) 131-136
- [Tanabe et al., 2001] Tanabe, M; Ieiri, I; Nagata, N; Inoue, K; Ito, S; Kamamouri, Y; Takahashi, M; Kurata, Y; Kigawa, J; Higuchi, S; Terakawa, N; Otsubo, K; Expression of P-glycoprotein in Human Placenta: Relation to genetic Polymorphism of the Multidrug Resistance (MDR)-1 Gene; *J Pharmacol Exp Therapeut* **297** (2001) 1137-1143
- [Tang et al., 2002] Tang, K; Ngoi, SM; Gwee, PC; Chua, JMZ; Lee, JDE; Chong, SS; Lee, CGL; Distinct haplotype profiles and strong linkage disequilibrium at the MDR1 multidrug transporter gene locus in three ethnic Asian populations; *Pharmacogenetics* **12** (2002) 437-450

- [Thiebaut et al., 1987] Thiebaut, F; Tsuruo, T; Hamada, H; Gottesman, MM; Pastan, I; Willingham, MC; Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues; *Proc Natl Acad Sci USA* **84** (1987) 7735-7738
- [Thiebaut et al., 1989] Thiebaut, F; Tsuruo, T; Hamada, H; Gottesman, MM; Pastan, I; Willingham, MC; Immunohistochemical localization in normal tissues for different epitopes in the multidrug transport protein P-170, evidence for localisation in brain capillaries and cross reactivity of one antibody with a muscle protein; *J Histochem Cytochem* **37** (1989) 159-164
- [Towbin et al., 1979] Towbin, H; Staehelin, T; Gordon, J; Electrophoresis transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications; *Proc Natl Acad Sci USA* **76** (1979) 4350-4354
- [Tsuruo et al., 1981] Tsuruo, T; Iida, H; Tsukagosi, S; Sakurai, Y; Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia *in vivo* and *in vitro* through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil; *Cancer Research* **41** (1981) 1967
- [Twentyman et al., 1994] Twentyman, PR; Rhodes, T; Rayner, S; A comparison of rhodamine 123 accumulation and efflux in cells with P-glycoprotein-mediated and MRP-associated multidrug resistance phenotypes; *Eur J Cancer* **30A** (1994) 1360-1369
- [Uchiumi et al., 1993] Uchiumi, T; Kohno, K; Tanimura, H; Matuso, K; Sato, S; Uchida, Y; Kuwano, M; Enhanced expression of the human multidrug resistance 1 gene in response to UV light irradiation; *Cell Growth Differ* **4** (1993) 147-157
- [Ueda et al., 1986] Ueda, K; Cornwell, MM; Gottesman, MM; Pastan, I; Roninson, IB; Ling, V; Riordan, JR; The *mdr1* gene, responsible for multidrug resistance, codes for P-glycoprotein; *Biochem Biophys Res Commun* **141** (1986) 956-962
- [Ueda et al., 1987] Ueda, R; Castarelli, C; Gottesman, MM; Pastan, I; Expression of a full-length cDNA for the human MDR1-Gene confers resistance to colchicine, doxorubicine and vinblastin; *Proc Natl Acad Sci USA* **84** (1987) 3004-3008
- [Ueda et al., 1987a] Ueda, K; Clark, DP; Chen, C; Roninson, IB; Gottesman, MM; Pastan, I; The multidrug resistance (*mdr1*) gene: cDNA cloning and transcription initiation; *J Biol Chem* **262** (1987) 505-508
- [Ueda et al., 1987b] Ueda, K; Pastan, I; Gottesman, MM; Isolation and Sequence of the Promotor Region of the human Multidrug-resistance (P-glycoprotein) Gene; *J Biol Chem* **262** (1987) 17432-17436
- [Ueda et al., 1999] Ueda, K; Yoshida, A; Amachi, T; Recent progress in P-glycoprotein research; *Anticancer Drug Design* **14** (1999) 115-121

- [Urbatsch et al., 1995] Urbatsch, IL; Sankaran, B; Weber, J; Senior, AE; P-glycoprotein is stably inhibited by vanadate induced trapping of nucleotide at a single catalytic site; *J Biol Chem* **270** (1995) 19383-19390
- [van Helvoort et al., 1996] van Helvoort, A; Smith, AJ; Sprong, H; Fritzsche, I; Schinkel, AH; Borst, P; van Meer, G; MDR1 P-glycoprotein is a lipid translocase of broad specificity, while MDR3 P-glycoprotein specifically translocates phosphatidylcholine; *Cell* **87** (1996) 507-517
- [Walker, 1982] Walker, JE; Sarasate, M; Runswick, MJ; Gay, NJ; Distantly related sequences in the a- and b-subunits of ATP synthase, myosin kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold; *EMBO J* **1** (1982) 945-951
- [WHO, 2001] World Health Organization, Health Report 2001, S. 144-149; <http://www.who.int/whr/en/>
- [Wörner, 1997] Wörner, M; Einfluß von tumorpromovierenden Xenobiotika auf den programmierten Zelltod (Apoptose) in kultivierten Primärhepatocyten der Ratte; Dissertation, Eberhard-Karls-Universität Tübingen (1997)
- [Yoshimoto et al., 1988] Yoshimoto, K; Yokogoshi, Y; Saito, S; Shiraishi, M; Sekiya, T; Gottesman, MM; Pastan, I; A polymorphic HindIII site within the human multi-drug resistance gene 1 (MDR1); *Nucl Acids Res* **16** (1988) 11850
- [Zhang et al., 1995] Zhang, X; Collins, KI; Greenberger, KM; Functional evidence that transmembrane 12 and the loop between transmembrane 11 and 12 form part of the drug-binding domain in P-glycoprotein encoded by MDR1; *J Biol Chem* **270** (1995) 5441-5448

Anhang A

Angaben zum MDR1-Gen

A.1 Sequenz des MDR1-Gens

- Die Sequenz der **MDR1-RNA** ist in der EMBL GeneBank zu finden unter der Zugangsnummer M14758.
- Die Sequenz der **genomischen DNA** ist in der EMBL GeneBank zu finden unter den Zugangsnummern AC002457 sowie AC005068.

A.2 Exon-Intron-Struktur des MDR1-Gens

Region	Start	Ende	Basen	mRNA-Start	mRNA-Stop	Basen	Protein-Charakteristika
Exon 1	140636	140959	324	96	424	329	keine
Intron 1	140960	141529	570				
Exon 2	141530	141597	68	425	492	68	1-23 innen
Intron 2	141598	145899	4302				
Exon 3	145900	145948	49	493	541	49	23-39 innen
Intron 3	145949	156033	10085				
Exon 4	156034	156202	169	542	710	169	40-97 TM1 + außen
Intron 4	156203	171490	15288				
Exon 5	171491	171542	52	711	762	52	97-114 außen
Intron 5	171543	174737	3195				
Exon 6	174738	174929	192	763	954	192	114-178 TM2 + innen
Intron 6	174930	175472	543				
Exon 7	175437	175644	172	955	1126	172	178-235 TM 3+4
Intron 7	95207	99888	4682				
Exon 8	95082	95206	125	1127	1251	125	236-277 innen
Intron 8	87752	95081	7730				

Exon 9	87580	87751	172	1252	1423	172	277-334 TM 5+6
Intron 9	84658	87579	2922				
Exon 10	84544	84657	114	1424	1537	114	335-373 TM 6 + innen
Intron 10	84398	84543	146				
Exon 11	84287	84397	111	1538	1648	111	374-410 innen
Intron 11	84116	84286	171				
Exon 12	83990	84115	126	1649	1774	126	411-452 ATP 1
Intron 12	83874	83989	116				
Exon 13	83670	83873	204	1775	1978	204	453-520 innen
Intron 13	83338	83669	332				
Exon 14	83167	83337	171	1979	2149	171	521-577 innen
Intron 14	79844	83166	3323				
Exon 15	79682	79843	162	2150	2311	162	578-631 innen
Intron 15	78819	79681	863				
Exon 16	78642	78818	177	2312	2488	177	632-690 innen
Intron 16	78095	78641	547				
Exon 17	77948	78094	147	2489	2635	147	690-739 TM 7
Intron 17	75248	77947	2664				
Exon 18	75176	75283	108	2636	2743	108	740-775 TM 8
Intron 18	73165	75175	2011				
Exon 19	73087	73164	78	2744	2821	78	776-801 innen
Intron 19	70361	73086	2726				
Exon 20	70277	70360	84	2822	2905	84	802-829 innen
Intron 20	65317	70276	4960				
Exon 21	65113	65316	204	2906	3109	204	830-897 TM 9+10
Intron 21	54696	65112	10417				
Exon 22	54595	54695	101	3110	3210	101	898-931 innen
Intron 22	53286	54594	1309				
Exon 23	53145	53285	141	3211	3351	141	931-978 TM 11 + außen
Intron 23	50485	53144	2660				
Exon 24	50328	50484	157	3352	3508	157	979-1030 TM 12 + innen
Intron 24	49248	50327	1080				
Exon 25	49050	49247	198	3509	3706	198	1031-1100 ATP 2
Intron 25	43301	49049	5749				
Exon 26	43094	43300	207	3707	3913	207	1101-1165 innen
Intron 26	39863	43093	3231				
Exon 27	39716	39862	147	3914	4060	147	1166-1214 innen
Intron 27	38269	39715	1447				
Exon 28	38065	38268	204	4061	4264	204	1215-1282 innen

Exon-Intron-Struktur des humanen P-glycoproteins. Die Angaben für die Promotorregion sowie Exon 1 - 7 beziehen sich auf die EMBL Acc. Nr. AC002457, für die Exons 8 - 28 auf die Acc. Nr. AC005068. Die Angaben für die mRNA sind der Sequenz aus der EMBL-Datenbank mit Acc. Nr. M14758 entnommen.

Anhang B

Probandenstudien

B.1 Periphere Lymphozyten (Studie I)

Typ	SNP	Proband
1	-320 Δ A	38
2	-318 Δ C	52, 59, 80
3	T617C	43, 44, 67
4	T662C	76
5	A999+19G	71
6	AA1225-48CC	21
7	A1225-27C	15, 40, 42, 43, 46, 50, 78, 89
8	1225-18 Δ T	31, 89
9	A1225-2G	74
10	C1236T	39, 59, 67, 71, 78
11	G1296A	71
12	G1326C	5, 6, 7, 13, 21, 23, 26, 39, 40, 43, 46, 60, 62, 66, 70, 75, 79, 81, 82, 83
13	C1350+44T	35, 66, 81
14	G2677T	38, 41, 74
15	C3435T	22, 28, 29, 30, 31, 38, 41, 43, 44, 45, 52, 70, 72, 73

Tabelle B.1: Verteilung der detektierten Polymorphismen bei den einzelnen Probanden der Studie (I) in peripheren Lymphozyten.

B.2 Lebergewebe (Studie II)

Typ	SNP	Proband
10	C1236T	4, 6, 7, 8, 12, 15, 22, 23, 24, 31, 33, 35, 37, 41, 52, 53, 55, 57, 59, 60, 63, 67, 68, 69, 70, 74
13	C1350+44T	19, 45
14	G2677T	1, 2, 6, 7, 8, 9, 12, 15, 18, 24, 28, 29, 31, 33, 35, 37, 38, 41, 48, 49, 51, 52, 53, 57, 59, 60, 63, 67, 68, 69, 70, 72, 73
15	C3435T	alle außer 27, 34, 56, 62

Tabelle B.2: Verteilung der detektierten Polymorphismen bei den einzelnen Probanden der Studie (II) in Lebergewebe.

Anhang C

Vektoren

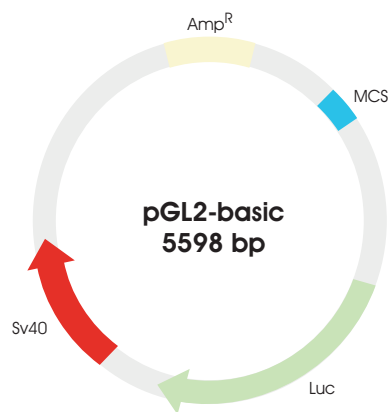


Abbildung C.1: Schematische Darstellung des Reportervektors pGL2-basic (Promega).

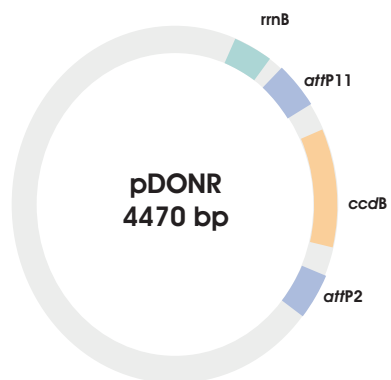


Abbildung C.2: Schematische Darstellung des Donorvektors pDONR (Invitrogen).

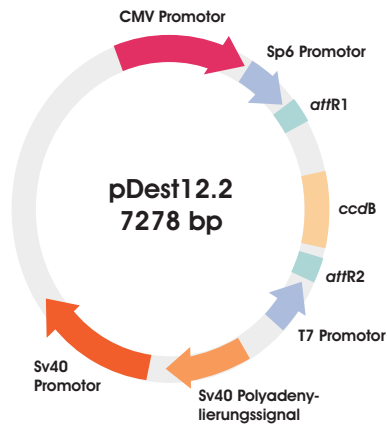


Abbildung C.3: Schematische Darstellung des Zielvektors pDest12.2 (Invitrogen). Der Vektor enthält einen CMV-Promotor upstream der *attR1*-Stelle. Downstream der *attR2*-Stelle befindet sich das SV40-Polyadenylierungssignal.

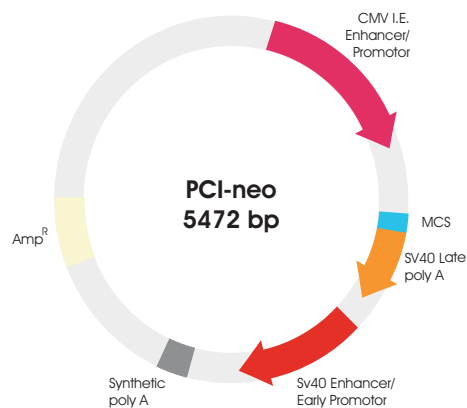


Abbildung C.4: Schematische Darstellung des Expressionsvektors pCI-neo (Promega). Der Vektor enthält einen CMV-Promotor upstream der MCS, sowie einen SV40-Promotor downstream der MCS. Der pCI-neo-Vektor vermittelt Ampicillin-Resistenz.

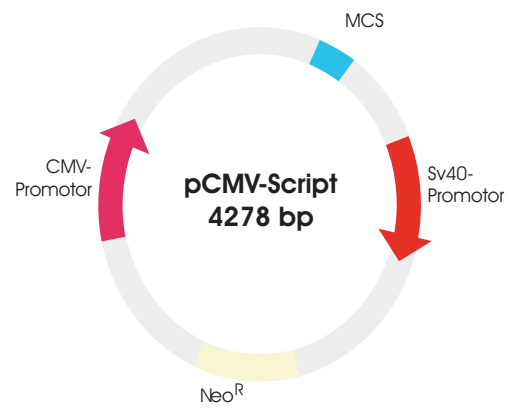


Abbildung C.5: Schematische Darstellung des Expressionsvektors pCMV-Script (Stratagene). Der Vektor enthält einen CMV-Promotor upstream der MCS, sowie einen SV40-Promotor downstream der MCS. Der pCI-neo-Vektor vermittelt Neomycin-Resistenz.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Dr. D. Schrenk für die Überlassung des sehr interessanten Themas, für den mir gewährten Freiraum bei der Gestaltung und Durchführung dieser Arbeit sowie für seine Unterstützung während meiner Promotionszeit bedanken.

Besonders danke ich auch Herrn Dr. H.-M. Kauffmann für seine stete Hilfsbereitschaft, viele interessante Diskussionen und für die Durchsicht des Manuskripts.

Herrn Dr. H. Schmitz danke ich für viele fachliche wie auch allgemeine Diskussionen und für seine stete Hilfsbereitschaft trotz immerwährenden Zeitmangels.

Frau A. Strothauer sei an dieser Stelle gedankt für all ihre Arbeit und Mühen, die stets im Verborgenen bleiben, und für ihre herzliche Fröhlichkeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir auf diesem langen und manchmal steinigen Weg immer mit Verständnis und Unterstützung zur Seite gestanden haben, sowie Jochen, der mir nicht nur seelischen und moralischen Beistand leistete, sondern auch stets geduldig meine Launen ertrug.

Außerdem möchte ich mich bedanken bei

- den Physikern, vor allem Dirk, Sascha, Marc und Bernhard, für den täglichen Gang zur Mensa und die vielen lustigen und appetitanregenden Gespräche,
- den Maschinenbauern, besonders bei Michael und Jörg, für immer gute Laune, literweise Kaffee und durchgelaufene Joggingsschuhe,
- meinen "Schützlingen" Alex, Barbara und Silke sowie bei Frank für 6 Monate gute Zusammenarbeit, viel Spaß und gute Laune sowie für kiloweise Gummibärchen,
- meinen ehemaligen Bürokollegen Barbara, "Lopez" und Carolin für eine lustige Arbeitsatmosphäre,
- Susi und Stefan für die Theorien über das unglückliche Liebesleben von Giraffen,
- und nicht zuletzt dem gesamten AK Schrenk für die jahrelange Zusammenarbeit.

Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name Ragna Hussong
Adresse Sophienstr. 1
D-67655 Kaiserslautern
Tel.: 0631 / 14072
Email: rhussong@rhrk.uni-kl.de
Geburtsdatum 26. April 1973
Geburtsort St. Ingbert
Familienstand ledig
Staatsangehörigkeit deutsch

SCHULBILDUNG

08-1979 bis 06-1983 Grundschule Kohlhof
08-1983 bis 06-1992 Gymnasium am Krebsberg, Neunkirchen / Saar
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

HOCHSCHULBILDUNG

10-1992 bis 03-1998 Studium der Fachrichtung Chemie an der Universität Kaiserslautern
04-1996 Diplomvorprüfung
01 bis 12-1998 angestellt als wissenschaftliche Hilfskraft, Tätigkeit: Untersuchung des Coffein-Metabolismus mittels HPLC-Technik
09-1998 Diplomprüfung
10-1998 bis 03-1999 Anfertigung der Diplomarbeit im Fachbereich Chemie mit Schwerpunkt in Lebensmittelchemie & Umwelttoxikologie, Thema der Arbeit: Charakterisierung von Agonisten des Dioxinrezeptors aus dem Tryptophanmetabolismus der intestinalen Mikroflora
04-1999 bis 02-2003 wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Universität Kaiserslautern, Promotion im Bereich Umwelttoxikologie mit dem Thema: Aufklärung genetischer Faktoren für die Variabilität von Expression und Funktion des membranständigen ABC-Transporters P-glycoprotein (Pgp)