

**Funktionelle Bedeutung genetischer Polymorphismen  
der Membrantransporter ABCB1 und ABCC2  
im Nierenzellkarzinomgewebe**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Christian Albrechts Universität  
zu Kiel

vorgelegt von

**Sierk Haenisch**

aus Offenburg

Kiel  
im November 2006

Referent/in:

Koreferent/in:

Tag der mündlichen Prüfung:

Zum Druck genehmigt: Kiel,

Der Dekan

## Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VIII
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Stoffwechselweg von Xenobiotika	1
1.2 Intrazelluläre Regulation der am Metabolismus und Transport beteiligten Gene	5
1.3 Die ABC-Transportproteine ABCB1 und ABCC2	8
1.3.1 Der ABC-Transporter ABCB1	8
1.3.2 Der ABC-Transporter ABCC2	11
1.3.3 Die Regulation von ABCB1 und ABCC2 durch Nukleäre Rezeptoren	14
1.4 Polymorphismen auf dem ABCB1- und ABCC2-Gen und deren funktionelle Bedeutung	16
1.4.1 Polymorphismen auf dem ABCB1-Gen	16
1.4.2 Polymorphismen auf dem ABCC2-Gen	18
1.5 Das Nierenzellkarzinom	20
1.6 Ziele	22
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>23</b>
2.1 Patienten	23
2.2 Probanden	23
2.3 Genotypisierung	23
2.3.1 DNA-Isolation	24
2.3.2 Alleldiskriminierung mittels Restriktions-Fragment-Längen- Polymorphismus (RFLP)	24
2.4 mRNA-Quantifizierung	29
2.4.1 RNA-Isolation	29
2.4.2 Reverse Transkriptase-Reaktion	30
2.4.3 Quantifizierung von cDNA mittels Real-time PCR	30

2.5	Bestimmung des Proteingehaltes mittels Immunhistochemie	34
2.6	Reportergen-Assay	36
2.6.1	Herstellung von Vektorkonstrukten	36
2.6.2	Hitzeschock-Transformation von kompetenten E. coli Bakterien	39
2.6.3	Aufreinigung von Plasmid-DNA aus E. coli Bakterien	40
2.6.4	Glycerin-Kultur	40
2.6.5	Kontroll-Restriktion	40
2.6.6	Kontroll-Sequenzierung von Plasmid-DNA	41
2.6.7	Zellkultur	41
2.6.7.1	Kultivierung von HepG2-Zellen	41
2.6.7.2	Bestimmung der Zellzahl	42
2.6.7.3	Kryokonservierung von HepG2-Zellen	42
2.6.8	Transiente Transfektion	43
2.6.9	Bestimmung der Luciferase-Aktivität	44
2.7	Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)	45
2.7.1	Isolierung von Kernproteinen	45
2.7.1.1	Bestimmung des Proteingehaltes	46
2.7.2	Sonden-Annealing	46
2.7.3	Sonden-Markierung	47
2.7.4	Inkubation der DNA-Sonden mit dem HepG2-Kernextrakt	48
2.7.5	Polyacrylamidgel-Elektrophorese	49
2.7.6	Auswertung des Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)	50
2.8	Berechnung von mRNA-Sekundärstrukturen	50
2.9	Statistische Methoden	50
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>52</b>
3.1	Genotypisierung	52
3.1.1	Verteilung der ABCB1- und ABCC2-Genotypen in Nierenzellkarzinompatienten und in gesunden Probanden	52
3.1.2	Verteilung der ABCB1- und ABCC2-Haplotypen in Nierenzellkarzinompatienten und in gesunden Probanden	54

3.2	Bestimmung der ABCB1- und ABCC2-Gen-Expression	55
3.2.1	Vergleich des nicht-tumorösen und des tumorösen kortikalen Nierengewebes hinsichtlich der ABCB1- und ABCC2-mRNA und Proteinexpressionen	56
3.2.2	Untersuchung des Einflusses der ABCB1- und ABCC2-Polymorphismen auf die Transporterexpression	58
3.2.3	Untersuchung des Einflusses des Tumorstadiums und der Chemotherapie auf die Transporterexpression	62
3.3	Untersuchung des funktionellen Einflusses des ABCC2 -24C>T Polymorphismus mittels Reportergen-Assay	63
3.3.1	Herstellung von Reportergen-Vektorkonstrukten	63
3.3.2	Luciferaseaktivität in Abhängigkeit vom ABCC2 -24C>T Polymorphismus	64
3.4	Untersuchung des Einflusses des ABCC2 -24C>T Polymorphismus auf DNA-Protein-Interaktionen mittels Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)	66
3.5	Berechnung der mRNA-Sekundärstruktur der ABCC2-Haplotypen	68
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>70</b>
4.1	Genotypen- und Haplotypenverteilung	72
4.2	Expression des ABCB1- und des ABCC2-Transporters	74
4.3	Der Einfluss der ABCB1- und ABCC2-Polymorphismen auf die Transporterexpression	77
4.4	<i>In vitro</i> und <i>in silico</i> Untersuchungen zum funktionellen Einfluss des ABCC2 -24C>T Polymorphismus	82
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>84</b>
	Literaturverzeichnis	88

## Abbildungsverzeichnis

<b>1</b>	Ausgewählte, am Stoffwechselweg beteiligte Transportproteine	4
<b>2</b>	Intrazelluläre Steuerung der Koexpression der an Metabolismus und Elimination beteiligten Gene	7
<b>3</b>	Promoterregionen des humanen ABCB1-Gens mit Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren	10
<b>4</b>	Promoterregionen des humanen ABCC2-Gens mit Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren	14
<b>5</b>	Schematische Darstellung der Struktur eines nukleären Rezeptors	15
<b>6</b>	Strukturelle Organisation des ABCB1-Gens und des ABCB1-Proteins, sowie die Lokalisierung der untersuchten SNPs	18
<b>7</b>	Strukturelle Organisation des ABCC2-Gens und des ABCC2-Proteins, sowie die Lokalisierung der untersuchten SNPs	19
<b>8</b>	Bandenmuster der Restriktionsfragmente des ABCB1 26677G>T-Polymorphismus nach Agarosegel-Elektrophorese	29
<b>9</b>	Amplifikationskurven einer Real-time PCR am TaqMan™	34
<b>10</b>	Mikroskopische Aufnahme von histologischen Schnitten nicht-tumorösen, sowie tumorösen kortikalen Nierengewebes, angefärbt mit gegen ABCB1 bzw. ABCC2 gerichteten Antikörpern	35
<b>11</b>	Lokalisation der Varianten der ABCC2-5'-UTR im pGL3-basic-Vektor	39
<b>12</b>	Relative ABCB1-mRNA-Expression und ABCB1-Proteingehalt in nicht-tumorösen und im Tumorgewebe, unterteilt in klarzelliges und nicht-klarzelliges Nierenzellkarzinomgewebe	57
<b>13</b>	Relative ABCC2-mRNA-Expression und ABCC2-Proteingehalt in nicht-tumorösen und im Tumorgewebe, unterteilt in klarzelliges und nicht-klarzelliges Nierenzellkarzinomgewebe	58
<b>14</b>	Relative ABCB1-mRNA-Expression in Abhängigkeit von den Genotypen 2677G>T/A und 3435C>T	59
<b>15</b>	Relative ABCB1-mRNA-Expression und ABCB1-Protein-Gehalt in Abhängigkeit von den ABCB1-Diplotypen im nicht-tumorösen kortikalen Nierengewebe	60

<b>16</b> Relative ABCC2-mRNA-Expression in Abhängigkeit vom Genotyp -24C>T im nicht-tumorösen und im Tumorgewebe	61
<b>17</b> Korrelation der relativen ABCB1-mRNA-Expression und des ABCB1-Protein-Gehalts, sowie der relativen ABCC2-mRNA-Expression und des ABCC2-Protein-Gehaltes im nicht-tumorösen kortikalen Nierengewebe	62
<b>18</b> Relative ABCB1-mRNA-Expression und relative ABCC2-mRNA-Expression in Abhängigkeit zum Tumorstadium im nicht-tumorösen kortikalen Nierengewebe	63
<b>19</b> Kontrollsequenzen der Plasmid-DNA der Reporter-gen-Vektorkonstrukte pGL3-ABCC2-C und pGL3-ABCC2-T	64
<b>20</b> Relative Luciferase-Aktivitäten des pGL3-basic Vektors, des pGL3-control Vektors und der Vektorkonstrukte pGL3-ABCC2-C, sowie pGL3-ABCC2-T in HepG2-Zellen	65
<b>21</b> Relative Luciferaseaktivitäten der Vektorkonstrukte pGL3-ABCC2-C und pGL3-ABCC2-T, bezogen auf die Aktivität des pGL3-control-Vektors in HepG2-Zellen	66
<b>22+23</b> Autoradiogramme der Electrophoretic Mobility Shift Assays	67 + 68
<b>24</b> Ausschnitte der mRNA-Sekundärstrukturen der Haplotypen H1 und H2	69

## Tabellenverzeichnis

1	Nukleäre Rezeptoren, Liganden und Transportproteine, die durch diese induziert werden	6
2	Der ABCB1- Transporter, seine Lokalisation, einige Substrate, sowie Inhibitoren und Induktoren	9
3	Der ABCC2- Transporter, seine Lokalisation, einige Substrate, sowie Inhibitoren und Induktoren	12
4	Primernamen, Primersequenzen, Restriktionsenzyme, sowie Länge der nach Verdau entstandenen DNA-Fragmente zur Identifizierung der ABCB1-und ABCC2-SNPs	25
5	PCR-Reaktionsansätze zur Amplifikation der DNA-Fragmente der ABCB1-SNPs	26
6	Thermocyclerbedingungen zur Amplifikation der DNA-Fragmente für die Detektion der ABCB1-SNPs	27
7	PCR-Reaktionsansätze zur Amplifikation der DNA-Fragmente der ABCC2-SNPs	27
8	Thermocyclerbedingungen zur Amplifikation der DNA-Fragmente für die Detektion der ABCC2-SNPs	27
9	Allgemeiner Restriktionsansatz für die Restriktionsreaktionen zur Identifizierung der Genotypen	28
10	Reaktionsansatz für die Reverse Transkription	30
11	Thermocycler-Temperaturprotokoll der Reversen Transkriptionsreaktion	30
12	Sequenz der Primer und Sonden zur Quantifizierung der cDNA der Zielgene ABCB1 und ABCC2	33
13	TaqMan-PCR-Ansatz zur Quantifizierung der ABCB1- und ABCC2-cDNA	33
14	TaqMan-PCR-Ansatz zur Quantifizierung der cDNA der endogenen Referenzgene 18S rRNA, $\beta$ -Actin, RPLP0	33
15	Standardisiertes Temperaturprotokoll für die Quantifizierung von cDNA mittels TaqMan™	33
16	Vektor, Namen und Sequenzen der Klonierungsprimer, sowie Restriktionsenzyme und deren Schnittstellen	37
17	PCR-Reaktionsansätze zur Amplifikation der Insert-Fragmente	37
18	Thermocycler-Protokoll zur Amplifikation der Insert-Fragmente	38
19	Restriktionsansätze für die Insert-Fragmente und den pGL3-basic Vektor	38
20	Namen und Sequenzen der Sequenzierprimer zur Kontrolle der Vektorkonstrukte	41



<b>21</b>	Name und Sequenz der DNA-Sonden	47
<b>22</b>	Reaktionsansatz für die Markierung der DNA-Sonden	48
<b>23</b>	Inkubationsansätze der DNA-Sonden mit dem HepG2-Zellkernextrakt	49
<b>24</b>	Allel- und Genotypenfrequenzen in den Nierenzellkarzinompatienten und den gesunden Probanden	53
<b>25</b>	Frequenzen der ABCB1- und ABCC2-Haplotypen in den Nierenzellkarzinom- patienten und den gesunden Probanden	55

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung	dNTPs	Desoxynukleotidtriphosphate
ABC	<i>ATP-binding-cassette</i>	DR	<i>direct repeat</i>
Acc.No.	<i>Accession number</i>	DTT	Dithiothreitol
Anneal.	<i>Annealing</i>	E.coli	<i>Escherichia coli</i>
AP	Aktivatorprotein	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
APS	Ammoniumpersulfat	Elong.	Elongation
ARE	<i>Antioxidant-response element</i>	EMSA	<i>Electrophoretic mobility shift assay</i>
ASBT	<i>Apical sodium-dependent bile salt transporter</i>	et al.	<i>et alteri</i>
ATP	Adenosintriphosphat	ER	<i>everted repeat</i>
bp	Basenpaare	FABP	<i>Fatty acid binding protein</i>
BRN2	<i>Brain-specific factor</i>	FCS	Fetales Kälberserum
BSA	Rinderserumalbumin	FET	Fluoreszenz-Energietransfer
BSEP	<i>Bile salt export pump</i>	FXR	<i>Farnesoid X receptor</i>
bzw.	beziehungsweise	GR	<i>Glucocorticoid receptor</i>
°C	Grad Celsius	GRE	<i>Glucocorticoid response element</i>
CAR	<i>Constitutive androstane receptor</i>	GST	Glutathion-S-Transferase
CD	<i>cluster of differentiation</i>	H	Haplotyp
cDNA	komplementäre DNA	HIF	<i>Hypoxia-inducible factor</i>
C/EBP	CCAAT-enhancer binding protein	HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>
C.I.	Konfidenzintervall	HNF	<i>Hepatic nuclear factor</i>
cpm	<i>counts per minute</i>	HSE	<i>Heat-shock element</i>
C <sub>T</sub>	<i>Threshold Cycle</i>	HSF	<i>Heat shock factor</i>
CYP450	Cytochrom P 450 Enzyme	I-BABP	<i>Ileal bile acid binding protein</i>
Denatur.	Denaturierung	Inr	<i>Initiator region</i>
df	Freiheitsgrad	IR	<i>inverted repeat</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid	IRF	<i>Interferon regulatory factor</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure		

## Abkürzungsverzeichnis

---

ISRE	<i>Interferon stimulatory response element</i>	PMSF	Phenylmethylsulphonyl-fluorid
kb	Kilobasenpaare	PPAR	<i>Peroxisome proliferator activated receptor</i>
kDa	Kilodalton	PXR	<i>Pregnan X Receptor</i>
Kontr.	Kontrollen	RAR	<i>Retinoic acid receptor</i>
LXR	<i>Liver X receptor</i>	RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
M	Molarität	Rn	Fluoreszenzemission
MDR	<i>Multidrug resistance</i>	RNA	Ribonukleinsäure
MD	Membrandomäne	RPLP0	ribosomales Protein LP 0
MEM	<i>Minimal Essential Medium</i>	Rpm	<i>rounds per minute</i>
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure	rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
MRP	<i>multidrug resistance-associated protein</i>	RT	Reverse Transkription
mut	Mutante	rs	<i>reference SNP</i>
n	Anzahl	RXR	<i>Retinoid X receptor</i>
NBD	Nucleotidbindende Domäne	SLC	<i>Solute carrier</i>
NEB	New England Biolabs <sup>TM</sup>	SLCO	<i>Solute carrier organic anion transporter</i>
NF-κB	<i>Nuclear factor κB</i>	SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
NF-Y	<i>Nuclear factor Y</i>	SP	<i>Specifity protein</i>
NRf2	<i>Nuclear factor-erythroid 2 p45-related factor 2</i>	Tab.	Tabelle
NTCP	<i>Na<sup>+</sup>-taurocholate cotransporting polypeptide</i>	Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
OAT	<i>Organic anion transporter</i>	TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
OATP	<i>Organic anion transporting polypeptid</i>	TBP	<i>TATA-binding protein</i>
OCT	<i>Organic cation transporter</i>	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
OD	optische Dichte	TMD	Transmembranäre Domäne
p	Signifikanzniveau	Tris	Tris-hydroxymethylaminomethan
Pat.	Patienten	U	<i>unit</i> (Einheit der Enzymaktivität)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung		
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>		
PhIP	2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridin		

UGT	Uridindiphosphat- Glucuronosyltransferase	VHL	von-Hippel-Lindau
		VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
U/min	Umdrehungen pro Minute		
USF	<i>Upstream stimulatory factor</i>	wt	Wildtype
UTR	untranslatierte Region	YB	<i>Y-Box binding protein</i>
UV	Ultraviolett	Y-Box	<i>CCAAT-box</i>

### Nukleinbasen

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
I	Inosin
T	Thymin
U	Uracil

### Aminosäuren

Ala (A)	Alanin	Leu (L)	Leucin
Arg (R)	Arginin	Lys (K)	Lysin
Asn (N)	Asparagin	Met (M)	Methionin
Asp (D)	Asparaginsäure	Phe (F)	Phenylalanin
Cys (C)	Cystein	Pro (P)	Prolin
Glu (Q)	Glutamin	Ser (S)	Serin
Glu (E)	Glutaminsäure	Thr (T)	Threonin
Gly (G)	Glycin	Trp (W)	Tryptophan
His (H)	Histidin	Tyr (Y)	Tyrosin
Ile (I)	Isoleucin	Val(V)	Valin

### 1 Einleitung

Der Organismus ist ständig einer großen Anzahl exogener Substanzen ausgesetzt. Dabei handelt es sich um Fremdstoffe aus Nahrung und Umwelt, sowie um Arzneistoffe. Die Bioverfügbarkeit, aber auch die Toxizität dieser Substanzen ist abhängig vom Ausmaß ihrer Absorption, Verteilung, Metabolisierung und Elimination. Diese Substanzen müssen dabei nach Eintritt in den Körper eine Vielzahl von Barrieren, die mit Transportsystemen ausgestattet sind, überwinden, unterliegen dann der Verstoffwechslung durch die metabolisierenden Enzyme der Phase I und Phase II, bevor sie dann durch Transportproteine in die Exkretionsorgane eliminiert werden. Von diesen Stoffwechsel- und Transportprozessen sind auch endogene Substanzen betroffen. Interindividuell verschiedene Bioverfügbarkeiten von Arzneistoffen, die zu unterschiedlichem Erfolg oder auch zu Nebenwirkungen einer Arzneimitteltherapie führen, konnten teilweise durch genetische Varianten der am Metabolismus beteiligten Enzyme erklärt werden [1]. Neben diesen Enzymsystemen weisen aber auch die Transportsysteme eine hohe interindividuelle Variabilität in ihren Expressionen auf [2], was zu unterschiedlichen Transportaktivitäten führen und somit zusätzlich zur Klärung des Phänomens unterschiedlicher Bioverfügbarkeiten, aber auch Toxizitäten von Xenobiotika beitragen könnte. Eine besondere Bedeutung kommt dabei den ABC (ATP-binding cassette)-Auswärtstransportern ABCB1, auch bekannt als MDR1 (Multidrug resistance protein 1) oder P-Glycoprotein (P-gP), und ABCC2 (MRP2, Multidrug resistance-associated protein 2) zu, da sie in vielen Organen exprimiert werden und dort auf Grund ihres breiten Substratspektrums zur Elimination einer großen Anzahl von Substraten beitragen.

Es wurden in den letzten Jahren eine Vielzahl von Studien durchgeführt, die untersuchten, ob genetische Varianten, insbesondere des ABCB1-Transporters, die Expression, die Bioverfügbarkeit von Arzneistoffen, das unterschiedliche Ansprechen auf eine Arzneimitteltherapie, aber auch das Risiko für die Entstehung von Krankheiten beeinflussen. Durch Hoffmeyer et al. wurde erstmals ein funktioneller Einfluss des ABCB1 3435C>T Polymorphismus auf die duodenale ABCB1-Protein-Expression, sowie die Bioverfügbarkeit von Digoxin gezeigt, wobei das 3435T-Allel mit einer schwächeren Transportaktivität in Verbindung gebracht wurde [3]. Dieser Polymorphismus zeigte in einer weiteren Studie eine ausgesprochen starke Assoziation zur Entstehung eines Nierenzellkarzinoms, was die protektive Funktion dieses Transporters gegenüber karzinogenen Fremdstoffen untermauern würde [4]. Auf Grund dieses Befundes sollte in dieser Arbeit untersucht werden, wie die Transportproteine ABCB1 und ABCC2 im Gewebe von Nierenzellkarzinomen im Vergleich

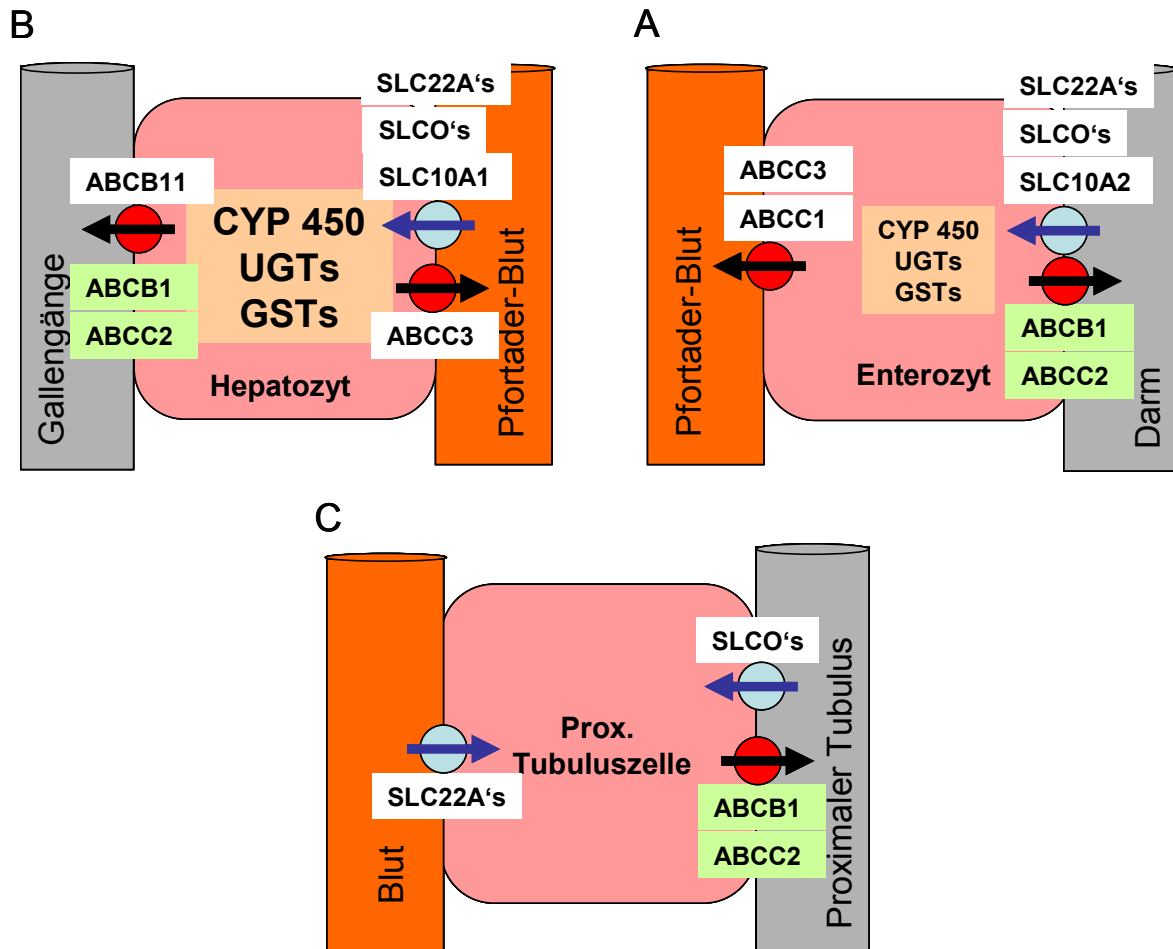
zu dem entsprechenden, gesunden Gewebe exprimiert werden. welchen Einfluss dabei genetische Polymorphismen haben und ob diese dadurch das Risiko für die Entstehung des Nierenzellkarzinoms modulieren.

### **1.1 Stoffwechselweg von Xenobiotika**

Neben der Diffusion, die man früher als den maßgeblichen Weg durch Biomembranen angesehen hat und die u.a. von der Lipophilie der Substanz abhängig ist, weiß man heute, dass dieser Membranübertritt für die meisten Stoffe durch aktive Transportprozesse bewerkstelligt wird. In den Darm gelangte Stoffe werden dabei zunächst von Aufnahmetransportern, z.B. durch die SLCOs (Solute carrier organic anion transporter, auch OATPs, organic anion transporting polypeptide), durch die SLC22As (Solute carrier der Familie 22A, auch OATs, organic anion transporter, OCTs, organic cation transporter) oder durch SLC10A2 (ASBT, Apical sodium-dependent bile salt transporter) in die Enterozyten aufgenommen (Phase 0). Hier kann bereits eine prähepatische Metabolisierung durch die Enzyme der Phase I und II, z.B. CYP450 (Cytochrom P 450)-Enzyme, UGTs (Uridindiphosphat-Glucuronosyltransferasen), GSTs (Glutathion-S-Transferasen) stattfinden. Die Muttersubstanz bzw. ihre Metaboliten werden dann durch basolateral exprimierte Auswärtstransporter, z.B. ABCC1 und ABCC3 (MRP1 und 3) in das Pfortaderblut befördert (Phase III). Apikal luminal befindliche Auswärtstransporter pumpen allerdings einen Teil der in die Zelle gelangten Substanzen sofort wieder in das Lumen des Darms zurück und können somit die intestinale Absorption limitieren (Phase IIIb). Hier sind vor allem die apikal auswärts gerichteten ABC-Transporter ABCB1 und ABCC2 zu nennen (Abb. 1 A). Aus dem Pfortaderblut werden diese Substanzen dann durch wiederum basolateral exprimierte Aufnahmetransporter, z.B. Vertreter der Familie SLCO und 22A, in die Hepatozyten geschleust, die den Hauptmetabolisierungsort des Körpers darstellen. In der Leber werden die Fremdstoffe von Enzymsystemen der Phase I und Phase II metabolisiert, um dann durch apikal, kanikulär exprimierte Auswärtstransporter z.B. ABCB1, ABCC2, ABCB11 (BSEP, Bile salt export pump) in die Gallengänge eliminiert zu werden (Phase III). Hepatozellulär basolateral exprimierte Transporter, z.B. ABCC3, können aber bestimmte Substrate wieder zurück ins Blut befördern, die dann später renal eliminiert werden (Abb.1 B). In der Niere können diese Substanzen, sowie deren Metabolite, aus dem Blutstrom durch Aufnahmetransporter (z.B. SLC22As) in die Epithelzellen des proximalen Tubulus aufgenommen und durch Auswärtstransporter (z.B. ABCB1 und ABCC2) in das

Tubuluslumen exkretiert werden. Denkbar ist aber auch, dass die Wiederaufnahme von auf luminaler Seite heranströmender, bereits glomerulär filtrierter Substanzen in die tubulären Epithelzellen durch Aufnahmetransporter der SLCO-Subfamilie durch diese Auswärtstransporter limitiert wird (Abb. 1 C). Ähnliche Prozesse finden auch in der Placenta und an der Blut-Hirn-Schranke statt, wo ebenfalls derartige Transportproteine lokalisiert sind. Das Phänomen interindividuell häufig stark variierender Bioverfügbarkeiten und damit im Falle eines Arzneistoffes das unterschiedliche Ansprechen auf eine Therapie, beziehungsweise das unterschiedliche Auftreten unerwünschter oder toxischer Wirkungen, ist bis heute immer noch nicht vollständig geklärt. Neben Ursachen wie bestehender Grunderkrankungen, Alter, Gewicht, Geschlecht oder Komedikation, werden auch genetische Unterschiede diskutiert. Die beschriebenen, am Stoffwechsel einer Substanz beteiligten Proteine weisen genetische Polymorphismen auf, die zu unterschiedlichen Enzym- bzw. Transportaktivitäten führen und somit zur Klärung dieses Phänomens beitragen können. Diskutiert wird auch, in wie weit solche genetischen Varianten auf Grund einer veränderten Metabolisierungs- und Eliminationsleistung die Suszeptibilität für eine Erkrankung oder auch die Kanzerogenität einer Substanz und damit das Risiko für das Auftreten eines Tumors beeinflussen können [5-9].

Entscheidend für den Umgang mit einem Arzneistoff ist also neben der Pharmakodynamik auch die Kenntnis dessen Stoffwechselweges und der Faktoren, die diesen beeinflussen, um eine möglichst optimale Wirkung bei möglichst geringen Nebenwirkungen zu erreichen [10, 11].



**Abb. 1:** Ausgewählte Transportproteine, die am Stoffwechselweg von Substanzen beteiligt und **A** in den Enterozyten, **B** in den Hepatozyten und **C** in den proximalen Tubuluszellen lokalisiert sind. **ABCB1:** ATP-binding cassette protein B1, auch Multidrug resistance protein 1 (MDR1), P-Glycoprotein (P-gP); **ABCC1, 2, 3:** ATP-binding cassette protein C1, 2, 3, auch Multidrug resistance-associated protein (MRP)1, 2, 3; **SLCOs:** Solute carrier organic anion transporter Familie, zu denen die OATPs (organic anion transporting polypeptide) gehören **SLC22As:** Solute carrier Familie 22A, zu denen die OCTs (organic cation transporter) und OATs (organic anion transporter) gehören; **ABCB11:** BSEP (Bile salt export pump), **SLC10A2:** ASBT (Apical sodium-dependent bile salt transporter) **CYP450:** Cytochrom P 450 Enzyme, **UGTs:** Uridindiphosphat-Glucuronosyltransferasen, **GSTs:** Glutathion-S-Transferasen



### 1.2 Intrazelluläre Regulation der am Metabolismus und Transport beteiligten Gene

Um möglichst optimal auf die Aufnahme eines Fremdstoffes reagieren zu können, ist ein koordiniertes Zusammenspiel der an den komplexen Metabolisierungs- und Transportschritten beteiligten Proteine notwendig [8, 12, 13].

Die koordinierte Regulation der für diese Proteine kodierenden Gene auf intrazellulärer Ebene wird durch das Zusammenspiel von cytosolischen Transportern, von nukleären Rezeptoren und von nukleären Importproteinen gesteuert. Besonders deutlich wird dieses Zusammenspiel, wenn die zu eliminierende Substanz sowohl Substrat der metabolisierenden und transportierenden Proteine, als auch Ligand der diese aktivierenden Faktoren ist.

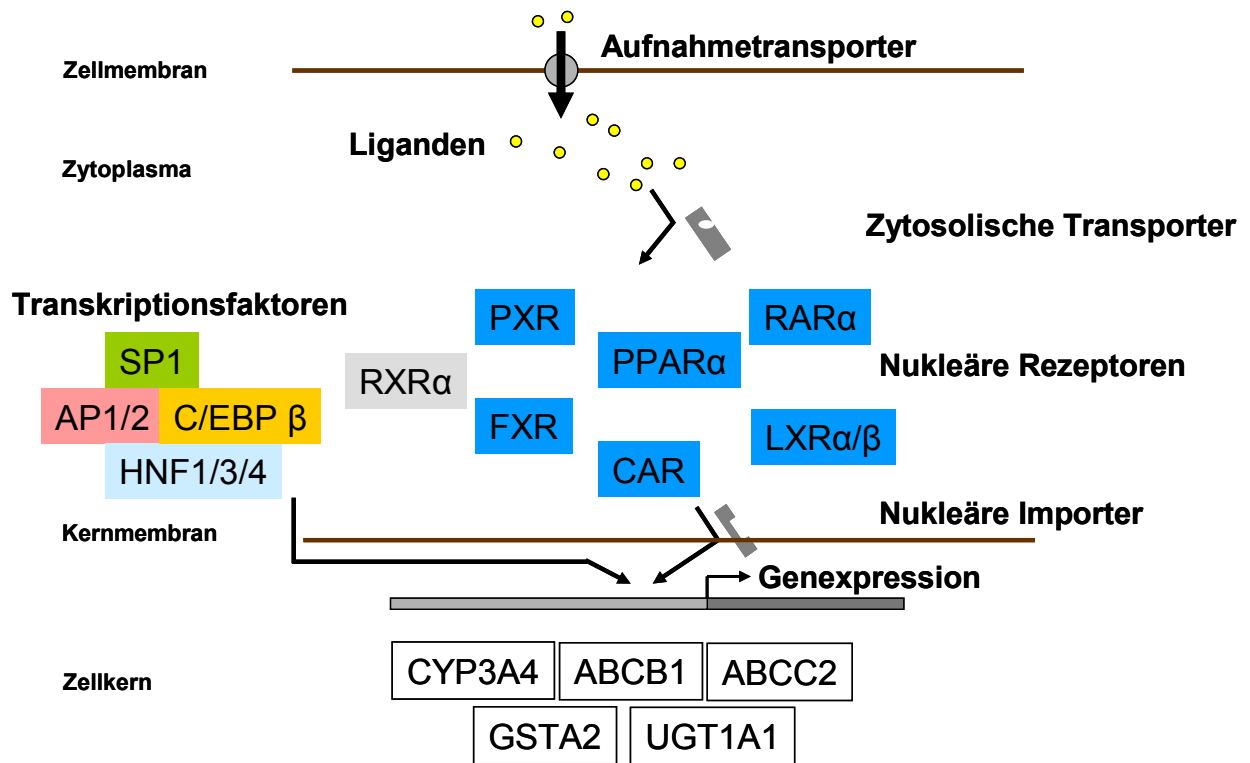
Nach Aufnahme der Substanz in die Zelle, meist über einen Aufnahmetransporter, gelangt diese zu ihrem im Zytoplasma befindlichen nukleären Rezeptor. Im Falle einer sehr lipophilen Substanz wird dies durch einen cytosolischen Transporter bewerkstelligt, z.B. werden Fettsäuren durch das Fatty acid binding protein, FABP, Gallensäuren durch das Ileal bile acid binding protein, I-BABP, cytosolisch transportiert. Die Substanz bindet dann als Ligand an seinen nukleären Rezeptor, der sich mit RXR $\alpha$  (Retinoid X receptor  $\alpha$ ) als Heterodimer zu einem Rezeptor-Liganden-Komplex zusammenlagert. Dieser Komplex wird schließlich mit Hilfe weitere Transportproteine, sogenannter Karyopherine, durch die Kernmembran in den Zellkern überführt. Dort binden diese Rezeptor-Heterodimere zusammen mit weiteren Transkriptionsfaktoren in Form eines Multiprotein-Komplexes an die entsprechenden Gene, die für die Metabolisierung und Elimination dieser Substanz benötigt werden, und aktivieren deren Transkription. Somit stellen die nukleären Rezeptoren wichtige Regulatoren nicht nur für den körpereigenen Stoffwechsel, sondern auch für die Entgiftung von Xenobiotika dar. Tabelle 1 zeigt die nukleären Rezeptoren, ihre Liganden, sowie die Transportproteine, die durch die Bindung des RXR $\alpha$ -Heterodimers induziert werden.

**Tab. 1:** Nukleäre Rezeptoren, Liganden und Transportproteine, die durch diese induziert werden

Nukleärer Rezeptor	Ligand	Transportprotein	Effekt
PXR / SXR (Pregnan X receptor / Steroid X receptor)	Xenobiotika: Rifampicin	ABCB1	Efflux von Xenobiotika aus Darmepithelzellen, Hepatozyten, Tubuluszellen (apikal)
	RU486		
	Dexamethason Hyperforin Phenobarbital	ABCC2	Efflux von anionischen Konjugaten und Xenobiotika aus Darmepithelzellen, Hepatozyten, Tubuluszellen (apikal)
CAR (Constitutive androstane receptor)	Xenobiotika:	ABCB1	s.o.
	Phenobarbital	ABCC2	s.o.
		ABCC3	Efflux von anionischen Konjugaten und Xenobiotika aus Darm, Hepatozyten, (basolateral)
FXR (Farnesoid X receptor)	Gallensäuren	I-BABP	Zytosolisches Gallensäuren- Bindeprotein in illealen Enterozyten
		ABCB11 (BSEP)	Biliäre Ausscheidung von Gallensäuren
		SLCO1B3 (OATP8)	Hepatozelluläre Aufnahme von organischen Anionen und Xenobiotika
		ABCC2	s.o.
PPAR $\alpha$ (Peroxisome proliferator activated receptor $\alpha$ )	Fettsäuren	SLC10A2 (ASBT)	Ilealer Na <sup>+</sup> -abhängiger Gallensäuren-Aufnahmetransport
RAR $\alpha$ (Retinoic acid receptor $\alpha$ )	Retinoide	SLC10A1 (NTCP)	Heptozelluläre, Na <sup>+</sup> -abhängiger Gallensäure-Aufnahmetransport
LXR $\alpha/\beta$ (Liver X receptor $\alpha/\beta$ )	Oxysterole	ABCG5/ABCG8	Cholesterintransport

Da die Promoterregionen dieser Zielgene häufig ähnliche Binde-Sequenzen für diese nukleären Rezeptoren aufweisen, kann dadurch eine Koregulation dieser Gene im Sinne einer optimierten Elimination des Substrates erklärt werden [11, 13-15] (Abb. 2). So kann diese Substanz seine eigene Elimination beschleunigen, aber auch Interaktionen lassen sich durch diesen Mechanismus erklären. Substanzen, die als Liganden über diese nukleären Rezeptoren Gene des Metabolismus und der Elimination aktivieren, können die Ausscheidung anderer Substanzen, die Substrate dieser dann aktivierten Gene sind, beschleunigen und damit deren Bioverfügbarkeit beeinflussen. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass Paclitaxel seine

eigene Elimination über die PXR-vermittelte Induktion von CYP3A4 und ABCB1 induziert [16, 17], während der im Johanniskraut enthaltene Inhaltsstoff Hyperforin als Ligand des nukleären Rezeptors PXR die Bioverfügbarkeit von Ciclosporin, einem ABCB1- und CYP3A4-Substrat, klinisch relevant verringerte [18-20]. Ähnliche Beobachtungen wurden für Rifampicin, einen weiteren PXR-Liganden, und die ABCB1-Substrate Digoxin und Ezetimib gemacht [21-23].



**Abb. 2:** Intrazelluläre Steuerung der Koexpression wichtiger, an der Metabolisierung und an der Elimination von Substanzen beteiligter Gene. Modifiziert nach [11].

### **1.3 Die ABC-Transportproteine ABCB1 und ABCC2**

Die transmembranären ABC- (ATP-binding Cassette) Transporter gehören zu einer der größten Protein-Familien, der ABC-Familie, die in sieben Subfamilien unterteilt werden kann. Unter der Internetadresse <http://www.med.rug.nl/mdl/humanabc.htm> ist eine ständig aktualisierte Liste der humanen ABC-Proteine aufgeführt. Derzeit sind 49 Vertreter bekannt. Zu ihnen gehören MDR1 (P-gP) und MRP2, nach der neuen Human Gene Nomenclature (HUGO) ABCB1 und ABCC2. Im Folgenden sollen der Vereinheitlichung wegen die Gene als ABCB1 bzw. ABCC2, die Proteine als ABCB1-Protein und ABCC2-Protein bezeichnet werden.

Beide Transporter weisen zwei transmembranäre Domänen (TMD1 und TMD2), bestehend aus jeweils sechs Helices, und zwei cytosolische, ATP-bindende Domänen (NBD1 und NBD2) auf. Das ABCC2-Protein besitzt gegenüber dem ABCB1-Protein zusätzlich am N-terminalen Ende eine weitere transmembranäre, aus fünf Helices bestehende Domäne (TMD0) [24] (Abb. 5 A und B). Man geht davon aus, dass TMD1 und TMD2 winkelförmig zu einander angeordnete, konkave Schenkel darstellen und bei ATP-Hydrolyse eine Konformationsänderung erfahren, so dass ein aus der cytosolischen Lipidschicht der Zellmembran aufgenommenes Substrat in die äußere Lipidschicht gepumpt und somit wie durch eine aktivierte Pore aus der Zelle befördert wird [25, 26].

ABCB1 und ABCC2 sind glykosilierte Proteine, die in apikal, luminalen Zellmembranen verschiedener Gewebe wie der Leber, des Darmes, der Niere, der Blut-Hirn-Schranke und der Plazenta lokalisiert sind [8, 27-32]. Sie transportieren dort aktiv unter ATP-Verbrauch endogene wie exogene Substrate und deren Konjugate aus der Zelle in die Exkretionsorgane.

#### **1.3.1 Der ABC-Transporter ABCB1**

Das ABCB1-Gen ist auf Chromosom 7q21 lokalisiert und umfasst 28 Exons. Nach Translation weist das Protein eine Länge von 1280 Aminosäuren und ein Molekulargewicht von circa 170 kDa auf. Erstmals wurde es in Cholchicin-resistenten Hamster-Ovarialzellen nachgewiesen [33] und später auf Grund seiner Überexpression in weiteren Tumorzellen als Ursache für die Kreuzresistenz gegenüber mehreren Zytostatika identifiziert [34, 35]. Diese Beobachtung wurde als ‚Multidrug resistance (MDR)‘ bezeichnet und verlieh dem Transportprotein seinen Namen. Da ABCB1 einerseits auch in vielen gesunden Geweben exprimiert wird und eine große Anzahl von vor allem amphiphilen, neutralen und

kationischen Substanzen transportiert, andererseits aber Untersuchungen an *mdr1*-knock-out Mäusen gezeigt haben, dass diese unter physiologischen Bedingungen keinerlei Besonderheiten gegenüber Wildtyp-Mäusen aufweisen [36], scheint die Aufgabe dieses Transporters weniger im Transport endogener Stoffwechselprodukte, sondern hauptsächlich in der körpereigenen Fremdstoff-Abwehr zu liegen [9, 37] (Tab. 2).

**Tab. 2:** Der ABC-Transporter ABCB1, seine Lokalisation, einige Substrate, sowie Inhibitoren und Induktoren.

---

ABCB1	
Lokalisation:	Leber, Darm, Niere, Blut-Hirnschranke, Placenta; apikal luminal
Substrate	Digoxin, Ciclosporin, Tacrolimus, Paclitaxel, Vincristine, Vinblastin, Doxorubicin, Daunorubicin, Etoposid, Dexamethason, Erythromycin, HIV-Protease Inhibitoren
Inhibitoren	Verapamil, PSC 833 (Valspodar®), GF 120918
Induktoren via nukleäre Rezeptoren	Rifampicin, Hyperforin, RU486, Dexamethason, Clotrimazol (PXR) Phenobarbital (CAR, PXR)

---

zusammengestellt nach [9, 13, 32, 38-42]

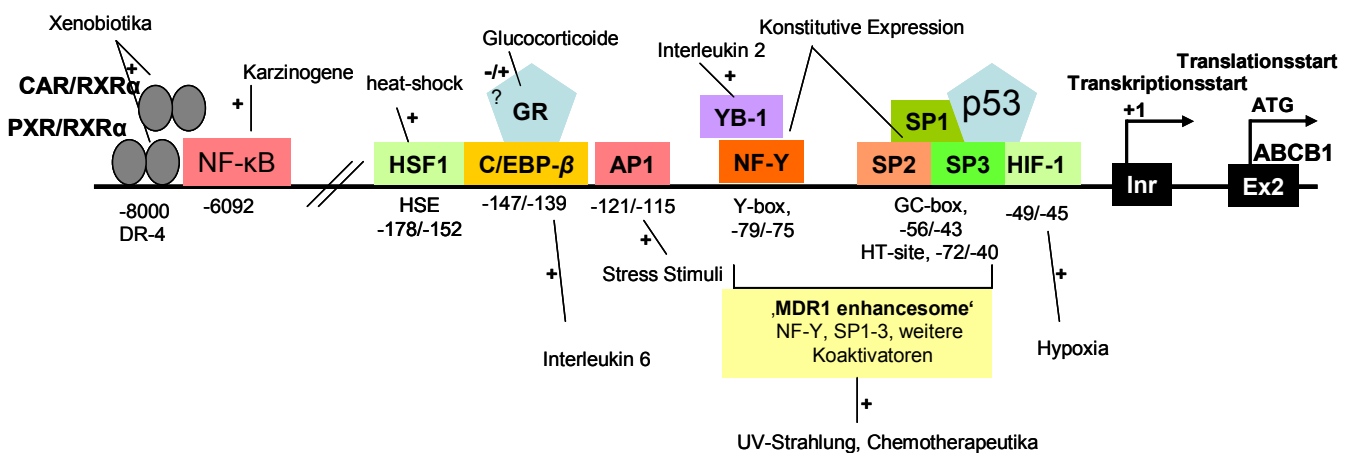
An der konstitutiven Transkription des ABCB1-Gens, das einen TATA-Box-losen Promoter besitzt und dessen Transkription statt dessen durch ein Initiator-Element (Inr) gestartet wird, sind u.a. das Y-Box (CCAAT-box)-bindende Protein NF-Y (Nuclear factor-Y), sowie die GC-Box bindenden Proteine SP1, 2 und 3 (specificity protein 1, 2, 3) beteiligt. Unter Einwirkung von UV-Strahlung oder Chemotherapeutika können diese durch Anlagerung weiterer Transkriptionsfaktoren in dieser Region einen Multi-Protein-Komplex ausbilden, das so genannte ‚MDR1-enhancesome‘, wodurch eine Induktion der Transkription angestoßen wird. Die Bindung der für die konstitutive Expression notwendigen Faktoren SP1 und SP3 kann durch den Tumor-Suppressor p53, der an einer überlappenden ‚HT-site‘ (head-to-tail site) bindet, gestört werden, wodurch es zu einer Herabregulierung der ABCB1-Genaktivität kommt. Allerdings induzieren p53-Mutanten, die vermutlich in Tumorzellen überexprimiert werden, über diese Erkennungssequenz die ABCB1-Expression, wodurch es in solchen Zelllinien zu Chemotherapieresistenz kommen kann. Unter hypoxischen Bedingungen wird HIF-1 (Hypoxia-inducible factor-1) vom Zytoplasma in den Zellkern transportiert und aktiviert die ABCB1-Expression. Bei inflammatorischen Prozessen induziert C/EBP $\beta$  (CAAT-enhancer-binding protein) nach Aktivierung durch Interleukin 6 ebenfalls die ABCB1-Expression. Auch YB-1 (Y-Box binding protein-1) scheint nach Aktivierung durch

Interleukin 2 und einer Translokation in den Zellkern eine Induktion der ABCB1-Expression zu bewirken [43].

Ein möglicher, entgegengesetzt regulatorischer Einfluss von Glucocorticoiden, oder auch ‚cross-talk‘, über den Glukokortikoid-Rezeptor (GR), der eine überlappende Bindesequenz mit C/EBP $\beta$  aufweist (GRE, Glucocorticoid response element) wird derzeit diskutiert. Unter Einfluss von bestimmten Karzinogenen wird über die Bindung von NF- $\kappa$ B (Nuclear factor  $\kappa$ B) die ABCB1-Expression hochreguliert. Auch ein Hitze-Schock führt über die Bindung des HSF-1 (Heat shock factor 1) an sein cis-Element HSE (Heat-shock element) zu einer gesteigerten Transkription von ABCB1. Die unter Stress Stimuli hervorgerufene Bindung von AP-1 (Activator protein 1), ein Komplex, der sich aus Faktoren der c-Fos- und c-Jun-Familie zusammensetzt und wahrscheinlich durch JNK (c-Jun NH2-terminal protein kinase) aktiviert wird, führt ebenfalls zu einer Steigerung der Transkription [44, 45].

Die Hochregulation der ABCB1-Expression nach Einwirkung von einer Vielzahl von toxischen Stimuli, wie beispielsweise Chemotherapeutika, Ultravioletter Strahlung und Hitze Schock, unterstreicht die Bedeutung dieses Transporters bei der Fremdstoffabwehr und der Reaktion auf genotoxische Reize, macht aber auch seine Rolle bei der sich häufig rasch entwickelnden Chemotherapieresistenz vieler Krebszellen deutlich.

Abbildung 3 zeigt die bisher auf dem humanen ABCB1 Promoter identifizierten Transkriptionsfaktoren, sowie die positiv bzw. negativ regulatorischen Einflüsse verschiedener Stimuli.



**Abb. 3:** Promoterregion des humanen ABCB1-Gens mit Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren, zusammengestellt aus [43-45]. Liganden, sowie weitere Stimuli sind mit ihrem jeweiligen positiv- (+) bzw. negativ- (-) regulatorischen Einflüssen auf die Transkription gekennzeichnet.

### 1.3.2 Der ABC-Transporter ABCC2

Das ABCC2-Gen ist auf Chromosom 10q24 lokalisiert und umfasst 32 Exons. Das Protein weist ein Molekulargewicht von circa 190 kDa und eine Länge von 1545 Aminosäuren auf. Die physiologische Aufgabe von ABCC2 in gesunden Geweben besteht vor allem im Transport von organischen, anionischen Gluthation-, Sulfat- und Glucuronidkonjugaten endogener Herkunft, beispielsweise Bilirubin-mono und diglucuronid [46, 47], Hormonglucuronide, Leukotriencysteinyne [48, 49] und Gallensalzglucuronide- und sulfate [42, 50-52]. Aber auch ein breites Spektrum exogener, konjugierter sowie unkonjugierter Substanzen wird durch ABCC2 transportiert [42, 53] (Tab. 3). Beispielsweise wird 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridin (PhIP), ein bei der Zubereitung von Nahrung durch Erhitzen entstehendes Toxin, und dessen Phase-II-Metaboliten biliär, ABCC2-vermittelt eliminiert, aber auch initial durch intestinal exprimiertes ABCC2 in den Darm zurückgepumpt und somit in seiner systemisch aufgenommene Menge beeinflusst [54, 55]. Pravastatin, ein HMG-CoA (3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A)-Reduktase-Hemmer, wird zunächst durch SLCO1B1 (OATP1B1), einen an der basolateralen Seite des Hepatozyten exprimierten Aufnahmetransporter, aus dem Blut in den Hepatozyten, der auch dessen Wirkort darstellt, aufgenommen und dann unmetabolisiert durch ABCC2 biliär exkretiert. Pharmakologisch interessant ist dabei, dass ABCC2 nicht nur für die effiziente Elimination von Pravastatin, sondern auf Grund des enterohepatischen Kreislaufes dieser Substanz auch eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung des therapeutischen Plasmaspiegels spielt [56-58]. Aber auch bestimmte Metalle, wie beispielsweise Arsen, werden nach Glutathionkopplung durch ABCC2 eliminiert [42, 59]. Durch den Auswärtstransport von reduziertem und oxidiertem Glutathion [60-62] und Gallensalzkonjugaten bzw. durch den Kotransport von Substanzen, die wahrscheinlich auf Grund ihres fehlenden anionischen Charakters eines Kotransportes mit Glutathion bedürfen (z.B. Vinca-Alkaloiden, Epipodophyllotoxinen, Anthracyclinen, PhIP [48, 54, 63, 64]), scheint ABCC2 neben der Elimination von Fremdstoffen bzw. Fremdstoffkonjugaten auch eine entscheidende Aufgabe bei der Bildung des Gallensaftes und durch die Bereitstellung von Glutathion bei der Antwort auf oxidativen Stress zu übernehmen [62, 65-69]. ABCC2, dessen Existenz 1996 zuerst in *Abcc2* defizienten Ratten [70] und dann im Menschen [71] beschrieben wurde, weist eine hohe Substrat- und Strukturhomologie zu ABCB1(MRP1) auf, welches basolateral lokalisiert ist und als erster Vertreter der MRP-Subfamilie (multidrug resistance-associated protein) identifiziert und für eine ABCB1-unabhängige ‚multidrug resistance‘ verantwortlich gemacht werden konnte [72, 73]. ABCC2 wurde ebenfalls in vielen Karzinomzellen gefunden [74], außerdem ist es in Cisplatin-

resistenten Tumorzelllinien überexprimiert [71, 75, 76]. Umgekehrt konnte in mit antisense ABCC2-cDNA transfizierten HepG2 Zellen einerseits ein erhöhter Gluthationspiegel, andererseits eine erhöhte Sensitivität gegenüber den Zytostatika Cisplatin, Vincristin, Doxorubicin und dem Camptothecin SN38 beobachtet werden [77]. Auch transfizierte HEK293 Zellen wiesen eine erhöhte Sensibilität für Cisplatin, Doxorubicin, Etoposid und Epirubicin auf, während transfizierte MDCKII Zellen empfindlicher gegenüber Etoposid und Vincristin wurden [48]. Auch vermittelte die Expression von ABCC2 nach Transfektion von ABCC2-cDNA humanen Ovarialkarzinom-Zellen Resistenz gegenüber Methotrexat [78].

**Tab. 3:** Der ABC-Transporter ABCC2, seine Lokalisation, einige Substrate, sowie Inhibitoren und Induktoren.

ABCC2	
Lokalisation:	Leber, Darm, Niere, Blut-Hirnschranke, Placenta; apikal luminal
Substrate	
endogene:	oxidiertes und reduziertes Glutathion, Bilirubin-mono-und diglucuronid, Leukotrien C4, 17 $\beta$ - Estradiolglucuronid, Chenodeoxycholat-3-O-glucuronid
exogene:	Arsenlutathion, PhIP Irinotecan, SN-38 Vinblastin, Vincristin, Cisplatin, Doxorubicin, Etoposid, Epirubicin, Methotrexat Pravastatin, Ampicillin, Ceftriaxon
Inhibitoren	Probenecid
Induktoren via nukleäre Rezeptoren	Rifampicin, Dexamethason (PXR), Phenobarbital (CAR, PXR), Gallensäuren (FXR), Oltipraz (Nrf2)

zusammengestellt nach [9, 13, 32, 38-42]

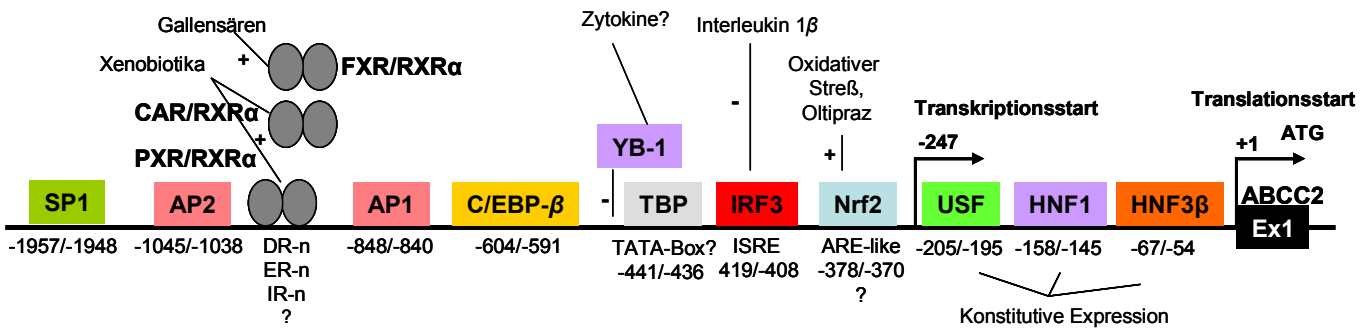
Der ABCC2-Promoter weist zwar eine von Stöckel et al. beschriebene TATA-Box auf, es wird aber auf Grund der weiten Entfernung zum Transkriptionsstart (ca. 200 bp) diskutiert, ob diese tatsächlich eine funktionelle Relevanz besitzt und ob die Transkription von ABCC2 möglicherweise eher durch ein Inr-Element, ähnlich dem des ABCB1-Gens, gestartet wird. Für die für die konstitutive Expression des ABCC2-Gens wichtigen Transkriptionsfaktoren wurden mehrere putative Konsensus-Binde-Sequenzen beschrieben, u.a. für HNF1 (Hepatic



nuclear factor 1), HNF3 $\beta$  (hepatic nuclear factor 3  $\beta$ ), USF (Upstream stimulatory factor), SP1 (Specificity protein 1), AP1 (Activator protein 1), AP2 (Activator protein 2), sowie für C/EBP  $\beta$  (CAAT-enhancer binding protein  $\beta$ ) [69, 79-81]. Tanaka et al. konnten dabei zeigen, dass die Bindesequenz für C/EBP $\beta$  - dieses Protein wird im Gegensatz zu anderen Geweben besonders stark in der Leber exprimiert - positiv regulatorische Eigenschaften auf die Promoterregion des ABCC2-Gens hat. In der Region von der Position -1906 bis -738 postulierte diese Arbeitsgruppe des Weiteren „silencer“- Elemente, da Reporter-Gen Konstrukte, verkürzt um diese Sequenz, einen Aktivitätsanstieg zeigten. Interessant bei diesen Untersuchungen war außerdem, dass unter basalen Bedingungen eine Promoter-Aktivität nur in HepG2 Zellen, nicht aber in ovariellen und epidermalen Krebszelllinien zu beobachten war [81].

Es konnte auch gezeigt werden, dass Interleukin 1 $\beta$  die ABCC2-Transkription durch die Hemmung der Bindung von IRF3 (Interferon regulatory factor 3) an sein cis-Element ISRE (Interferon stimulatory response element) gehemmt wird, vermutlich durch die ERK- (Extracellular signal-regulated kinase) vermittelte Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors [79]. Auf dem Promoter des Abcc2-Gens der Ratte konnten zusätzlich eine DR5-Bindungsstelle (s.unten) für das nukleäre Rezeptor-Heterodimer RXR $\alpha$ /RAR $\alpha$  gefunden werden, wobei die Aktivität dieser DNA-Protein-Bindung durch Interleukin 1 $\beta$  ebenfalls verringert wurde [82]. Da eine Nrf2-(Nuclear factor-erythroid 2 p45-related factor 2) vermittelte Induktion des murinen abcc2-Gens gezeigt werden konnte, außerdem auch ARE (Antioxidant-response element)-like-Sequenzen auf dem humanen ABCC2-Promoter gefunden wurden [69, 80] und die Transkription des humanen ABCC2 durch Oltipraz, einen Nrf2-Liganden, induziert wird [41, 83], ist auch eine Gen-Aktivierung durch den humanen Transkriptionsfaktor Nrf2 wahrscheinlich. Ebenfalls auf dem Abcc2 Promoter der Ratte konnte eine YRE-1 (YB-1 response element)-Bindesequenz für YB-1 (Y-Box binding protein-1) identifiziert werden. YB-1 vermittelte hier eine verringerte Transkriptionsaktivität [84]. Eine derartige Bindung von YB-1 auf dem Promoter des humanen ABC-Transporters ABCB1, wo es allerdings eine Gen-Aktivierung vermittelte, wurde ebenfalls beschrieben [85].

Abbildung 4 zeigt die bisher auf dem humanen ABCC2 Promoter identifizierten Transkriptionsfaktoren, sowie der positiv bzw. negativ regulatorische Einfluss verschiedener Stimuli.



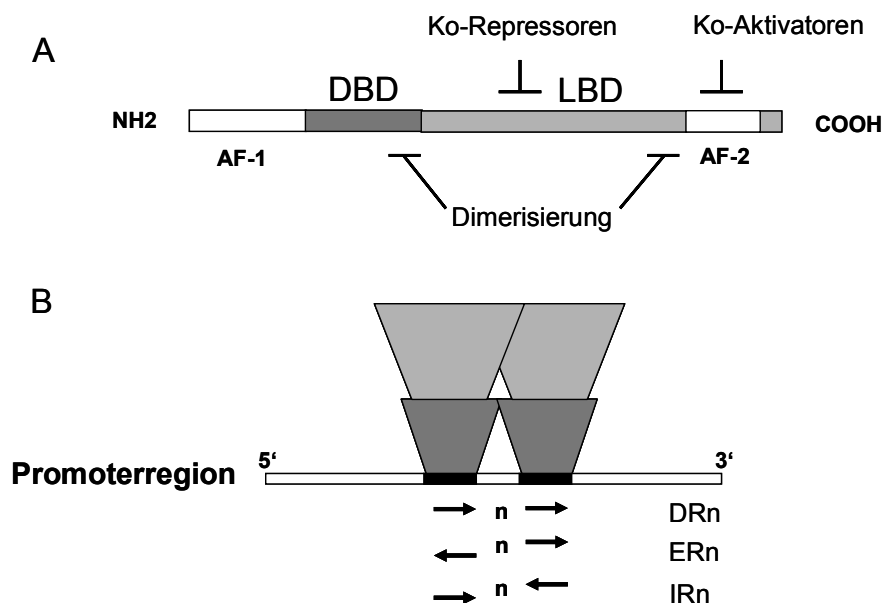
**Abb. 4:** Promoterregion des humanen ABCC2-Gens mit Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren, zusammengestellt aus [43, 69, 79-81]. Ein Tandem-Repeat der Nukleotidsequenz „AGGTCA“, das der auf der Promoterregion des Abcc2-Gens der Ratte gefundenen ER-8 Sequenz ähnlich und für die Bindung der nukleären Rezeptor-Heterodimere PXR/RXR $\alpha$ , FXR/RXR $\alpha$  und CAR/RXR $\alpha$  essentiell ist [86], ist auch für den humanen ABCC2 Promoter wahrscheinlich. Liganden, sowie weitere Stimuli sind mit ihrem jeweiligen positiv- (+) bzw. negativ- (-) regulatorischen Einflüssen auf die Transkription gekennzeichnet.

Beide Transporter spielen also eine wichtige Rolle bei der Elimination eines breiten, sich teilweise überlappenden Substratspektrums. Der Schwerpunkt dabei liegt für ABCB1 bei amphiphilen, neutralen und kationischen Substanzen und der von ABCC2 bei anionischen Glutathion-, Glucuronid- und Sulfatkonjugaten, wobei auch neutrale, unkonjugierte Substanzen, dann meist im Kotransport mit Glutathion, durch ABCC2 transportiert werden können. Diese Transporter, auch wenn man zusätzlich berücksichtigt, dass sie in vielen Geweben koexprimiert sind, sind somit entscheidende Parameter für die Bioverfügbarkeit, aber auch für die Toxizität zahlreicher endogener wie exogener Stoffe. Andererseits können sie den Erfolg einer Zytostatikatherapie limitieren, da sie in vielen Tumorzellen überexprimiert werden und neben weiteren Auswärtstransportern (z.B. ABCG2, ABCC1 und 3) den neoplastischen Zellen eine erhöhte Resistenz gegenüber den Krebstherapeutika vermitteln.

### 1.3.3 Die Regulation von ABCB1 und ABCC2 durch Nukleäre Rezeptoren

Untersuchungen an den bei der Xenobiotika-Response beteiligten und häufig koregulierten Proteinen ABCB1 und CYP3A4 haben so genannte DR-3, DR-4 und ER-6 Response-Elemente auf den Promoterregionen der kodierenden Gene ergeben, an denen die nukleären Rezeptoren PXR (Pregnan X receptor) und CAR (Constitutive androstane receptor) als Heterodimere mit RXR $\alpha$  (Retinoid X receptor  $\alpha$ ) binden [87-90]. Auf dem ABCB1-Promoter wurde eine DR-4 Bindungsstelle ca. 8000 bp ‚upstream‘ vom Transkriptionsstart identifiziert

[89] (Abb. 3). Auch auf weiteren CYP-Enzymen konnten ähnliche Sequenzen nachgewiesen werden [91-93]. Hierbei handelt es sich um hexamerische Tandem-Wiederholungen der Nukleotidsequenz „AGGTCA“ oder geringfügigen Varianten davon, unterbrochen von 0-8 beliebigen Nukleotiden. Diese Tandems können direkte (direct repeats, DR), spiegelbildliche (inverted repeats, IR) oder gegenläufig spiegelbildliche (everted repeats, ER) Wiederholungen dieses Hexamers darstellen [13, 90, 93] (Abb. 5). Auf der Promoterregion des *Abcc2*-Gens der Ratte wurde 440 bp vor dem Transkriptionsstart ein ER-8-cis-Element des Hexamers AGTTCA identifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass diese Sequenz eine gemeinsame Bindungsstelle für die Heterodimere PXR/RXR $\alpha$ , FXR/RXR $\alpha$  und CAR/RXR $\alpha$  darstellt und essentiell für die ligandenabhängige, aber auch im Falle des CAR/RXR $\alpha$ -Heterodimers für die ligandenunabhängige, basale Genaktivierung ist [86]. Da die Transkription des humanen *ABCC2*-Gens ebenfalls durch Liganden der nukleären Rezeptoren PXR, FXR und CAR aktiviert wird [23, 41, 94], ist auch hier eine entsprechende Binde-Sequenz auf der Promoterregion wahrscheinlich.



**Abb. 5:** Schematische Darstellung der Struktur eines nukleären Rezeptors mit der DNA-bindenden Domäne (DBD), der Liganden-bindenden Domäne (LBD), der liganden-abhängigen AF-2 (activation function 2)-Region, die nach Bindung eines Liganden mit Ko-Aktivatoren interagiert, und der liganden-unabhängigen AF-1 (activation function 1) Region, die mit der AF-2 interagieren kann. **B** die Bindung der DBD eines nukleären Rezeptor-Dimers auf der Promoterregion, einer hexamerische Tandem-Wiederholung der Nukleotidsequenz „AGGTCA“ oder einer geringfügigen Variante davon. Diese wird von 0-8 (n) beliebigen Nukleotiden unterbrochen und kann einen direct repeat (DR), ein inverted repeat (IR) oder einen everted repeat (ER) darstellen, modifiziert nach Honkakoski et al. [90].

## 1.4 Polymorphismen auf dem ABCB1- und ABCC2-Gen und deren funktionelle Bedeutung

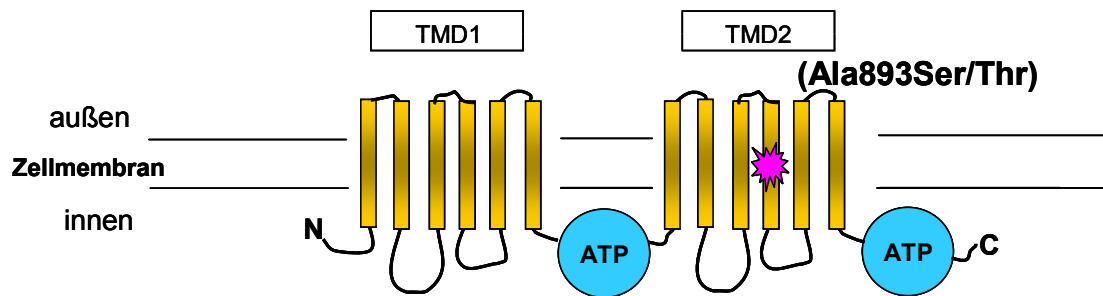
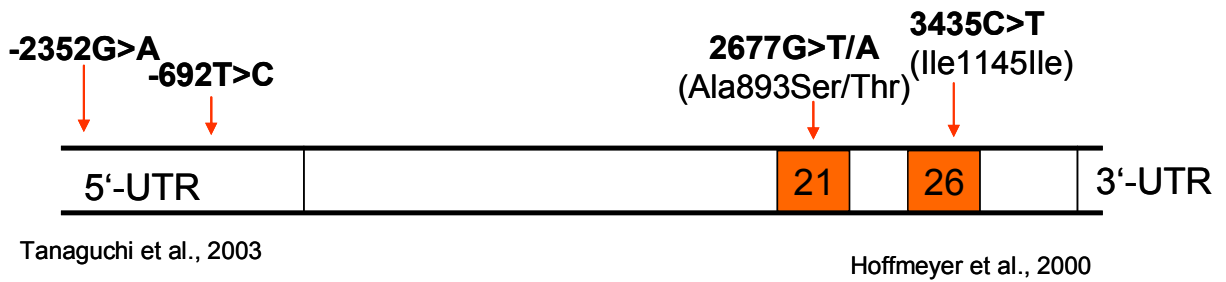
### 1.4.1 Polymorphismen auf dem ABCB1-Gen

Sowohl auf dem ABCB1-, als auch auf dem ABCC2-Gen konnten zahlreiche genetische Polymorphismen identifiziert werden. (siehe unter [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp\\_ref.cgi?locusId=5243&chooseRs=all](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?locusId=5243&chooseRs=all) (ABCB1) sowie unter [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp\\_ref.cgi?locusId=1244&chooseRs=all](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?locusId=1244&chooseRs=all) (ABCC2)). Zahlreiche Arbeitsgruppen haben in verschiedenen ethnischen Populationen vor allem die kodierenden Bereiche, sowie die Exon-Intron-Übergänge des ABCB1-Gens nach SNPs (single nucleotide polymorphisms) überprüft, wobei im ABCB1-Gen insgesamt 19 exonische SNPs, von denen 11 zu einem Aminosäureaustausch führen, identifiziert wurden [9]. Auf dem ABCB1 Gen haben besonderes Interesse die beiden SNPs 2677G>T/A, der zu einem Aminosäureaustausch von Alanin zu Serin bzw. Threonin an der Position 893 des Proteins führt, und 3435C>T (Ile1145Ile), der keinen Aminosäureaustausch auf Proteinebene nach sich zieht, aber möglicherweise funktionelle Bedeutung hat, erlangt. Beide SNPs sind genetisch gekoppelt, d.h. sie werden häufig gemeinsam vererbt, wodurch bestimmte Haplotypen in einer Population gehäuft anzutreffen sind [95-101]. Interessant ist auch, dass die Allelfrequenzen stark von der ethnischen Herkunft abhängig sind. Beispielsweise liegt die Frequenz für das T-Allel des 3435C>T Polymorphismus unter Kaukasiern zwischen 48 und 54 % [3, 102-106], während sie unter Afrikanern und Amerikanern afrikanischer Herkunft lediglich zwischen 10 und 27 % beträgt [104, 105, 107]. Beide Polymorphismen wurden in zahlreichen Studien auf ihre funktionelle Bedeutung hin untersucht, wobei sich zum Teil widersprüchliche Ergebnisse ergaben [108].

Der 3435C>T Polymorphismus zeigte eine signifikante Assoziation mit erniedrigten duodendalen ABCB1-Expressionen und einer erhöhten Bioverfügbarkeit von Digoxin [3]. Andere Studien zeigten ähnliche Einflüsse dieses SNPs auf die Bioverfügbarkeit von Digoxin, insbesondere dann, wenn zusätzlich die Haplotypenbildung mit dem verlinkten SNP an Position 2677 berücksichtigt wurde [98, 99, 109]. Auch zeigten HIV-Patienten mit einem 3435T-Allel nach 6-monatiger Gabe von Nelfinavir höhere CD4(+)-Zellzahlen als homozygote C-Allelträger [110]. Untersuchungen an herz- bzw. nierentransplantierten Patienten ergaben für Varianten-Allelträger, sowohl der Position 2677 als auch 3435 höhere Ciclosporin- bzw. Tacrolimus-Bioverfügbarkeiten [111, 112]. Efflux-Transportversuche, sowie mRNA-Bestimmungen an CD56(+)-Zellen ergaben für das 3435T-Allel sowohl einen

niedrigeren Rhodaminefflux, als auch niedrigere ABCB1-mRNA-Expressionswerte [113]. All diese Ergebnisse lassen auf eine verminderte ABCB1-Aktivität bei Varianten-Allelträger schließen. Im Widerspruch dazu stehen Untersuchungen, die entgegengesetzte Befunde lieferten. Sowohl für Digoxin [96, 114], als auch für Fexofenadin [104] wurden bei Varianten-Allelträgern niedrigere Plasmaspiegel gefunden. Des Weiteren zeigten mRNA-Messungen an Duodenalgeweben japanischer, gesunder Probanden für die Varianten-Allele höhere Expressionswerte [115, 116]. Darüber hinaus wurden viele Studien durchgeführt, die keinen funktionellen Einfluss des Genotyps, weder für 2677G>T/A noch für 3435C>T, nachweisen konnten [103, 117-121]. Kürzlich wurden von einer Japanischen Arbeitsgruppe weitere SNPs in der Promoterregion beschrieben, die einen Einfluss auf die ABCB1-mRNA-Expression im kolorektalen Mukosa-Gewebe zeigten. Es handelt sich dabei um die Varianten -2352G>A und -692T>C, welche schwächere Bindungsaktivitäten mit Kernproteinen aus HepG2-Zellen aufwiesen [122] (Abb. 6).

Einige Arbeitsgruppen fanden für 3435T-Allelträger ein erhöhtes Krankheitsrisiko, beispielsweise für das Auftreten von Colitis ulcerosa [123] und die Entwicklung von Parkinsonismus nach Pestizid-Kontakt [124]. Eine sehr starke Assoziation zwischen der Entstehung eines nicht-klarzelligen Nierenzellkarzinoms und dem 3435T-Allel wurde kürzlich ebenfalls beschrieben [4]. Diese Befunde deuten auf einen protektiven Effekt des Wildtyp-Allels hin. Umgekehrt zeigen einige Studien einen Zusammenhang zwischen einem besseren Therapieansprechen und dem Varianten-Allel [97, 110, 125, 126], was wiederum die These der geringeren Transportaktivität bei T-Allelträgern und einer damit erhöhten Bioverfügbarkeit des Arzneistoffs am Wirkort stützt. Es existieren aber auch hier Studien, die diese Effekte nicht verifizieren konnten.



**Abb. 6:** Strukturelle Organisation des ABCB1-Gens und die in dieser Arbeit untersuchten SNPs, sowie die Struktur des Proteins.

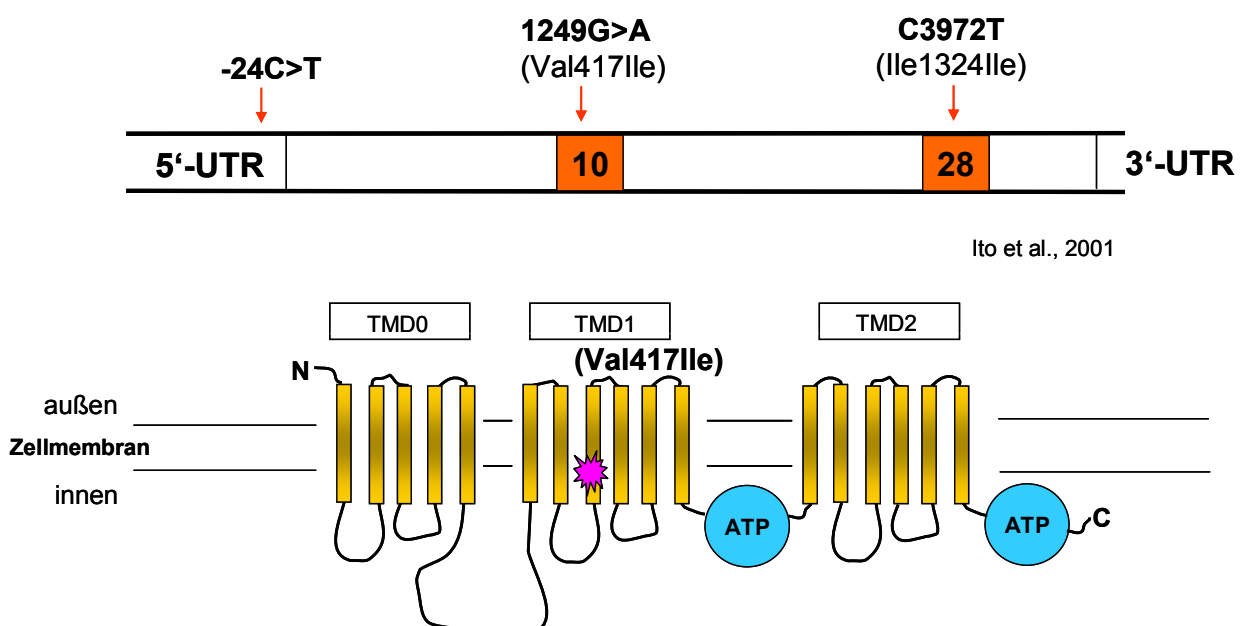
#### 1.4.2 Polymorphismen auf dem ABCC2-Gen

Untersuchungen an Patienten, die das Dubin-Johnson-Syndrom [127] aufwiesen, ergaben eine Reihe von Mutationen und Deletionen auf dem ABCC2-Gen, die zu dessen Funktionseinschränkung bzw. Funktionsverlust führten [42, 128-134]. Diese Patienten weisen eine konjugierte Hyperbilirubinurie, sowie eine Pigmentierung der Leber auf. Diese Erkrankung wird rezessiv autosomal vererbt und hat einen benignen, meist asymptomatischen Verlauf. Beispielsweise führt der Basenaustausch an der Position 2302 C>T im Exon 18 zu einem Arginin / Tryptophan Austausch an der Position 768 des Proteins. Dieser befindet sich in der N-terminal-seitigen, ATP-bindenden Region, in einer für die Transporterfunktion essentiellen Sequenz, dem so genannten ‚Walker C motif‘. Auch wurden Mutationen gefunden, die zu einem abnormen Splicing führten. Die Basenaustausche 2439+2 T>C und 1815+2 T>A, jeweils 2 Basenpaare nach dem 3'-Ende des Exon 18 bzw. 13 verursachten nach Transkription einen Verlust von 168 bp bzw. 147 bp, wobei bei der 168 bp-Deletionsvariante ein Teil der ATP-bindenden Region verloren ging. Die Mutation 4145A>G im Exon 29 führte zu einem Glutamin / Arginin-Austausch an der Position 1382 in der carboxyl-terminalen ATP-bindenden Region [132, 134]. Des Weiteren wurde eine Deletion von 6 Basenpaaren identifiziert, die zum Verlust des Arginins und Methionins an den Positionen 1392 und 1393 des Proteins führte. Vermutlich auf Grund von proteosomaler Degradation konnte in diesen

Patienten keine ABCC2-Protein Expression gemessen werden [128]. Einige Patienten mit dem Dubin-Johnson-Syndrom zeigten durch die in der C-terminalen, transmembranären Region liegenden Aminosäureaustausche Arg1150His und Ile1173Phe einen fast völligen Funktionsverlust des Transporters [130]. Diese Analysen unterstreichen einerseits den Zusammenhang zwischen Mutationen auf dem ABCC2-Gen und dem Dubin-Johnson-Syndrom, andererseits die Aufgabe des ABCC2-Transporters bei der Exkretion anionischer, konjugierte Substanzen endogener wie exogener Herkunft.

Auch Gesunde weisen eine Reihe von Polymorphismen auf, die erstmals durch systematische Sequenzierung der kodierenden Bereiche des Gens in einer gesunden japanischen Population identifiziert wurden [135]. Auch in der deutschen Bevölkerung konnte ein Teil dieser in der Japanischen Bevölkerung gefundenen SNPs nachgewiesen werden. Es handelt sich dabei um die Polymorphismen -24C>T auf der 5'-UTR, 1249G>A im Exon 10, der zu einem Aminosäureaustausch an der Position 417 des Proteins von Valin zu Isoleucin führt und 3972C>T (Ile1324Ile), der einen synonymen Basenaustausch darstellt (Abb. 7). Die zusätzlich in der japanischen Bevölkerung gefundenen SNPs 2302C>T (Arg768Trp), 2366C>T (Ser789Phe), beide im Exon 18, und 4348G>A (Ala1450Thr), der sich im Exon 31 befindet [135], konnten in der deutschen Bevölkerung bisher nicht nachgewiesen werden [136] und wurden aus diesem Grund in dieser Studie nicht mit berücksichtigt.

Im Gegensatz zu den beschriebenen Polymorphismen 3435C>T und 2677G>T/A auf dem ABCB1-Gen wurden für diese SNPs erst wenige Untersuchungen hinsichtlich ihrer funktionellen Bedeutung für das ABCC2-Gen durchgeführt [100, 137-139].



**Abb. 7:** Strukturelle Organisation des ABCC2-Gens und die in dieser Arbeit untersuchten SNPs, sowie die Struktur des Proteins.

### 1.5 Das Nierenzellkarzinom

Drei Prozent aller malignen Tumorerkrankungen beruhen auf einem Nierenkarzinom, wobei 85% davon auf das Nierenzellkarzinom entfallen. Histologisch werden vom Nierenzellkarzinom fünf Tumorzellsubtypen unterschieden: Das klarzellige Nierenzellkarzinom, das ca. 75% aller Nierenzellkarzinome ausmacht, das papilläre (chromophile) (ca. 10%) und das chromophobe (ca. 5%), während Sammelrohrkarzinome und die selten metastasierenden Onkozytome den Rest ausmachen. Ursprung eines Nierenzellkarzinoms sind entartete Epithelzellen des proximalen Nephrons [140]. Davon abzutrennen sind Tumore des Nierenbeckens und Urothelkarzinome, die einen schnelleren Verlauf zeigen, aber auch auf Chemotherapeutika ansprechen. Die Morbidität des Nierenzellkarzinoms beträgt für Männer in Deutschland ca. 14 und für Frauen ca. 7 je 100 000/Jahr; die Mortalität ca. 7 bzw. 3 je 100 000/Jahr. Beide steigen mit zunehmendem Alter mit einem Maximum bei 80 Jahren [141, 142] (Robert Koch-Institut, ICD 189). Die Gesamt-Morbidität und Mortalität steigen vor allem in den westlichen Industriestaaten stetig an, was man nur zum Teil auf verbesserte bildgebende Verfahren zurückführen kann [143, 144]. Eine Prognose hinsichtlich einer 5-Jahres-Überlebensrate kann durch die Einteilung der Tumore in verschiedene Stadien erfolgen, wobei diese im Stadium I >90%, im Stadium IV <20% beträgt. Hier kommen sowohl die Stadieneinteilung nach Robsen, Stadium I-IV, als auch die TNM (T= Tumorgröße, N= Lymphknotenbefall, M= Metastasen)-Klassifikation zur Anwendung. Auf Grund von häufig fehlenden Frühsymptomen wird das Nierenzellkarzinom meist erst spät diagnostiziert. Bei Diagnose beträgt die durchschnittliche Tumorgröße etwa 7 cm. Häufig führen erst Symptome, die durch Metastasenbildung hervorgerufen werden, zur Erkennung des Tumors. Metastasen treten vor allem in den Lungen, aber auch in Weichteilen, Knochen, Leber und dem zentralen Nervensystem auf.

Die Therapie besteht im Wesentlichen in der radikalen Nephrektomie, sofern eine funktionierende gegenseitige Niere vorhanden ist. Bei bilateralem Befall oder fehlender Funktion der Gegenniere ist eine Teilresektion indiziert [145]. Eine Bestrahlungstherapie ist ineffektiv [146]. Ebenso enttäuschend sind die Ansprechraten auf eine Chemotherapie. Lediglich eine Ansprechraten von 17% unter einer 3-4 wöchigen Dauerinfusion von 5-Fluorouracil (150 mg/m<sup>2</sup>/Tag), kombiniert mit Gemcitabin (600 mg an den Tagen 1, 8, 15), bzw. einer Ansprechraten von 7% unter Tamoxifen-Gabe konnte gezeigt werden [147]. Deshalb sollte, auch unter Berücksichtigung einer nicht gesicherten Verbesserung der Lebensqualität, die Indikation für eine Chemotherapie nur zurückhaltend gestellt werden.



Eine Interferon-alpha-Gabe führt in ca. 10-15% der Fälle zu einem Ansprechen und einer Lebensverlängerung von im Mittel um 3 Monate, bei allerdings häufig schlechter Verträglichkeit, insbesondere bei älteren Patienten [148-151]. Für die Interleukin-2- Mono-, sowie Kombinationstherapie mit Chemotherapeutika und Interferon konnten sporadische, langjährige Komplettremissionen erreicht werden. Aufgrund der hohen Toxizität und der Tatsache, dass weder eine benötigte Dosis, noch ein optimales Applikationsschema gefunden werden konnten, hat sich die Gabe im Klinischen Alltag nicht bewährt [152]. Die Wirksamkeit von Angiogenesehemmern, sowie der Tumorkvakzination wird derzeit überprüft [153-155].

Zu den Risikofaktoren sind vor allem Rauchen, Übergewicht und Belastung durch arbeitsplatzbedingte Schadstoffe zu zählen [156]. 10% der Nierenzellkarzinome werden durch familiär vererbte Gendefekte verursacht. Das VHL (von-Hippel-Lindau)-Syndrom ist die häufigste genetische Ursache eines Nierenzellkarzinoms, wobei es neben bilateralen, multifokalen Nierenzellkarzinomen auch zu Tumoren in der Retina, im Innenohr, im Pankreas und den Nebennieren kommen kann. Das VHL-Gen, lokalisiert auf dem Chromosom 3p26, kann bei diesem Syndrom multiple Mutationen aufweisen. Es hat die Funktion eines Tumorsuppressor Gens und steuert die proteosomale Degradation des Hypoxia-inducible factor (HIF) 1, der u.a. VEGF (Vascular endothelial growth factor) induziert. Bei Verlust der VHL-Funktion kommt es dann u.a. zu einer Akkumulation von HIF-1, wodurch sich die Hypervaskularisierung dieses Tumors erklären lässt [157]. Auch scheinen Patienten mit Mutationen auf dem VHL-Gen besser auf eine Therapie mit einem VEGF-Inhibitor anzusprechen [158]. Auch bei sporadisch auftretenden Nierenzellkarzinomen konnten Mutationen, sowie Hypermethylierungen des VHL-Gens identifiziert werden [157, 159]. Trichlorethylen, ein in der metallverarbeitenden Industrie verwendetes Lösungsmittel, konnte ebenfalls mit dem gehäuften Auftreten von Mutationen auf dem VHL-Gen bei Arbeitern, die mit dieser Substanz in Kontakt kamen, in Verbindung gebracht werden [160]. Mutationen bestimmter Gene, seien sie vererbt oder durch exogene Schadstoffe verursacht, können mit dem Nierenzellkarzinom assoziiert sein, wobei sich im Falle der exogenen Schadstoffe die Frage stellt, in welchem Ausmaß diese in den Körper gelangen müssen, bis es zu einer Tumorenstehung kommt und in wieweit die beiden wichtigen Auswärtstransporter ABCB1 und ABCC2 diesen Zutritt an Karzinogenen in ihrer Funktion als so genannte ‚Torwächter‘ beeinflussen können.

### 1.6 Ziele

Den Untersuchungen dieser Arbeit lag die Arbeitshypothese zu Grunde, dass einerseits die Auswärtstransporter ABCB1 und ABCC2 eine wichtige Rolle bei der Elimination von Schadstoffen spielen und somit eine zellprotektive Funktion u.a. für die Epithelzellen des proximalen Tubulus haben könnten und dass andererseits eine Überexprimierung dieser Transporter in den Tumorzellen zum Phänomen der ausgeprägten Chemotherapieresistenz des Nierenzellkarzinoms beitragen könnte. Deswegen sollte in dieser Arbeit in einem Kollektiv von Patienten, die auf Grund eines Nierenzellkarzinoms nephrektomiert wurden, die Genotypenverteilung der Polymorphismen ABCB1 -2352G>A, -692T>C, 2677G>T/A (Ala893Ser/Thr), 3435C>T sowie ABCC2 -24C>T, 1249G>A (Val417Ile) und 3972C>T ermittelt werden. Außerdem sollte untersucht werden, wie die beiden Transporter ABCB1 und ABCC2, sowohl auf mRNA-, als auch auf Proteinebene, im Tumorgewebe und im entsprechenden, nicht vom Tumor befallenen, kortikalen Nierengewebe exprimiert werden, sowie, ob diese Expression durch den Genotyp beeinflusst wird und ob dadurch bestimmte Genotypen auf Grund von interindividuell unterschiedlichen Transporteraktivitäten ein erhöhtes Risikos, an einem Nierenzellkarzinom zu erkranken, aufweisen.

Ein weiteres Ziel bestand darin, Untersuchungen, die zu einem bessern Verständnis möglicher funktioneller Einflüsse von Polymorphismen auf molekularer Ebene führen sollten, durchzuführen. Daher wurde in dieser Arbeit unter Anwendung von zell- und molekularbiologische Methoden insbesondere der ABCC2 -24C>T Polymorphismus hinsichtlich seiner Bedeutung für die Regulation und die Aktivität des ABCC2-Gens beleuchtet.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen zur Erweiterung des Wissens um die Geschehnisse beim Nierenzellkarzinom beitragen und klären, inwieweit genetische Polymorphismen prädiktive Faktoren für die Entstehung dieser Tumorerkrankung darstellen. Die gewonnen Erkenntnisse könnten so vielleicht in künftige Therapieansätze mit einfließen und dabei helfen, beispielsweise eine Zytostatikatherapie unter Berücksichtigung des Genotyps zu optimieren oder den Erfolg einer solchen Therapie besser voraussagen zu können. Auch können die Untersuchungen dieser Arbeit über die Regulation der Transportproteine ABCB1 und ABCC2 im normalen kortikalen Nierengewebe Grundlage für künftige pharmakokinetische Studien, insbesondere bei Betrachtung der renalen Elimination von Arzneistoffen, sein.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Patienten**

In Zusammenarbeit mit OA Dr. med. Zimmermann wurden aus der Urologischen Klinik des Universitätsklinikums Greifswald (Leitung Prof. Dr. med. Klebingat) aus der dortigen Gewebebank Gewebeproben von 82 nephrektomierten Patienten (45 Männer, 37 Frauen, Durchschnittsalter 61,8 Jahre) erhalten. Es handelte sich hierbei um histologisch verifizierte tumoröse als auch angrenzende nicht-tumoröse kortikale Nierengewebe. Alle Patienten waren kaukasischer Herkunft und stammten aus dem Einzugsgebiet des Universitätsklinikums Greifswald. 17 von ihnen waren Raucher, fünf von ihnen hatten sechs Monate vor der Nephrektomie eine Zytostatikatherapie erhalten.

Die histologische Begutachtung erfolgte durch das Institut für Pathologie (Prof. Dr. Warzok). Die Tumore unterteilten sich in 63 klarzellige und 19 nicht-klarzellige Nierenzellkarzinome, die sich wiederum aus 7 chromophilen (papillären), 11 gemischten und einem chromophoben zusammensetzten. 35 Nierenzellkarzinome wurden dem Stadium I, 29 dem Stadium II, sechs dem Stadium III und neun dem Stadium IV zugeordnet (Stadieneinteilung nach Robsen).

### **2.2 Probanden**

Für den Vergleich von Genotyphäufigkeiten wurden die Nierenzellkarzinom-Patienten mit einer Kontrollgruppe 1:2 dem Geschlecht nach gemacht. Dieses 164 (90 Männer und 74 Frauen, Durchschnittsalter 26,0 Jahre) Personen umfassende Kontrollkollektiv bestand aus freiwilligen, gesunden, kaukasischen Probanden der Abteilung Klinische Pharmakologie der Universität Greifswald (Leitung Prof. Dr. med. Siegmund).

### **2.3 Genotypisierung**

Nach Isolierung der genomischen DNA aus den Gewebeproben bzw. aus dem venösen Blut wurde mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und anschließendem enzymatischen Verdau (Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus, RFLP) der Genotyp der einzelnen

Patienten bzw. Probanden ermittelt. Es wurden auf dem ABCB1-Gen die Polymorphismen -2352G>A (rs12720464), -692T>C (rs 3213619), 2677G>T/A (Ala893Ser/Thr) (rs 2032582), 3435C>T (rs 1045642), sowie auf dem ABCC2-Gen die Polymorphismen -24C>T (rs 717620), 1249G>A (Val417Ile) (rs 2273697) und 3972C>T (rs 3740066) untersucht.

### **2.3.1 DNA-Isolation**

Das bei -80 °C gelagerte Nierengewebe wurde zunächst mit Hilfe eines Gewebemhomogenisators (Mikro-Dismembrator U, Satorius, Göttingen, Deutschland) für 1 min. bei 2500 U/min. geschreddert. Entsprechend dem Herstellerprotokoll wurde dann mittels des DNAesy Tissue Kits und der QIAshredder™ Säulen von der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) die DNA sowohl aus dem Tumorgewebe, als auch aus dem morphologisch entsprechenden, nicht-tumorbefallenen Gewebe isoliert und bei 4 °C gelagert.

Die DNA der gesunden Probanden wurde aus venösem Blut mittels des QIAmp®DNA Blood Mini Kits (Quiagen) isoliert und ebenfalls bei 4 °C gelagert.

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm mit einem Photometer (Biophotometer, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) gemessen. Eine  $OD_{260}=1$  entsprach einem Gehalt doppelsträngiger DNA von 50 µg/ml. Zusätzlich wurde bei einer Wellenlänge von 280 nm die Absorption gemessen, um aus dem Quotienten  $OD_{260/280}$  den Kontaminationsgrad mit Proteinen zu ermitteln.

### **2.3.2 Alleldiskriminierung mittels Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP)**

Zur Identifizierung der bereits beschriebener Basenaustausche (SNPs, single nucleotide polymorphisms) auf dem ABCB1- und ABCC2-Gen wurden zunächst mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung der rekombinanten Taq-DNA-Polymerase (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), von Desoxyribonukleotidtriphosphaten (Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland), sowie zweier flankierender Primer DNA-Fragmente, die den entsprechenden Polymorphismus enthielten, amplifiziert und anschließend mit Restriktionsenzymen verdaut. Sämtliche Oligonukleotid-Primer wurden von der Firma TIB Molbiol, Berlin, Deutschland, die Restriktionsenzyme von der Firma New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland bezogen. Die mit dieser Methode (PCR-RFLP-Methode)

erhaltenen Restriktionsfragmente wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt. Das dabei entstandene, charakteristische Bandenmuster ermöglichte die Bestimmung der Genotypen.

Die Primersequenzen für die SNPs ABCB1 -2352G>A und ABCB1 -692T>C wurden unter Berücksichtigung der Referenzsequenz mit der Acc. No. *AC 002457* erstellt.

Die Primersequenzen für die SNPs ABCB1 2677G>T/A und ABCB1 3435C>T wurden von Cascorbi et al.[102], die Primersequenzen für ABCC2 -24C>T, 1249G>A, 3972C>T wurden aus der vorangegangenen Diplomarbeit [136] übernommen.

Tabelle 4 zeigt für die Detektion der untersuchten SNPs die Primersequenzen, die verwendeten Restriktionsenzyme, und die Länge der nach Verdau entstandenen Restriktionsfragmente. Die PCR-Reaktionsansätze und die Thermocycler-Bedingungen (9700 GeneAmp, Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) sind in den Tabellen 5 und 6 bzw. in den Tabellen 7 und 8 zusammengefasst. Tabelle 9 zeigt den allgemeinen Restriktionsansatz, nachdem die amplifizierte DNA-Fragmente unter Verwendung der in Tabelle 4 angegebenen Enzyme verdaut wurden. Sämtliche Reaktionen wurden in Thermofast®96 PCR Plates (PeqLab, Erlangen, Deutschland) durchgeführt.

**Tab. 4:** Primernamen, Primersequenzen, Restriktionsenzyme, sowie Länge der nach Verdau entstandenen DNA-Fragmente zur Identifizierung der ABCB1- und ABCC2-SNPs.

Gen	SNP	Primernamen	Primersequenz (5'-3')	Enzym	Fragmentlänge (bp) mut / wt
ABCB1	G-2352A	MDR1-2352f	5'-TTTACCTGATGCTCAAGA TTGTAG	Mbo I	179
		MDR1 -2352r*	5'-TCACTTTTGTGTTTGCTTTG TTGCTTGAT		144 35
ABCB1	T-692C	MDR1-692f	5'-CTAGAGAGGTGCAACGG AAAG	MspA1 I	32 117 208
		MDR1-692r	5'-TAGTAGCTCCCAGCTTT GCG		117 240
ABCB1	G2677A	MDR-9	5'-TGCAGGCTATAGGTTCC AGG	Bsr I	206 14
		MDR-10	5'- GTTTACTCACCTTCCCAG		220
ABCB1	G2677T	MDR-9	5'-TGCAGGCTATAGGTTCC AGG	Ban I	224
		MDR-10A*	5'-TTTAGTTTACTCACCTT CCCGG		198 26

## 2 Material und Methoden

ABCB1 C3435T	MDR-11	5'-TGTTTTTCAGCTGCTTGA TGG	Mbo I	197
	MDR-12	5'-AAGGACTGTATGTTGGC CTC		158 39
ABCC2 C-24T	MRP2-Pro	5'-TAAATGGTTGGGATG AAAGG	Bsb I	301
	MRP2-ProR2	5'-GCTTTAGACCAATTGCA CATC		188 113
ABCC2 G1249A	MRP2-10*	5'-AACTTGGCCAGGAAG GAGTACAAC	Acl I	260
	MRP2-10R	5'-CTGGGTgACTTTTTTCT TTACCTGAATG		236 24
ABCC2 C3972T	MRP2-28	5'-AACTTACTTCTCATCTT GTCTCCTTGC	BsrD I	156 28
	MRP2-28R*	5'-CTCCACCTACCTTCTCC ATGCTAG		184

\* MDR1 -2352r, MDR-10A, MRP2-10, MRP28R: mismatch primer.

**Tab. 5:** PCR-Reaktionsansätze zur Amplifikation der DNA-Fragmente der SNPs ABCB1-2352G>A und -692T>C, sowie 2677G>T bzw. 2677G>A und 3435C>T

Reagenzien	Volumen [ $\mu$ l]	Endkonzentration
Taq-Puffer (10x)	2,5	1x
dNTP (10mM)	2,5	1 mM
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	1,0	2,0 mM
Primer forward (10 $\mu$ M)	0,5	200 nM
Primer reverse (10 $\mu$ M)	0,5	200 nM
Taq-DNA-Polymerase (5 U/ $\mu$ l)	0,1*	0,02 U/ $\mu$ l
DNA (30-100 ng/ $\mu$ l)	1,0	-
Aqua bidest.	ad	-
Endvolumen	25,0	

bei 3435C>T: 0,15  $\mu$ l

## 2 Material und Methoden

**Tab. 6:** Thermocyclerbedingungen zur Amplifikation der DNA-Fragmente für die Detektion der SNPs ABCB1 -2352G>A und -692T>C, sowie 2766G>T bzw. 2677G>A, sowie 3435C>T

Denaturierung	Denaturierung	Annealing	Elongation	terminale Elongation
2 min	30 sec.	30 sec.*	30 sec*.	7 min.
94 °C	94 °C	60 °C	72 °C	72 °C
35 Zyklen				

\* bei 2766G>T bzw. 2677G>A, sowie 3435 C>T: 1 min.

**Tab. 7:** PCR-Reaktionsansätze zur Amplifikation der DNA-Fragmente zur Identifikation der SNPs ABCC2 - 24C>T, 1249G>A, 3972C>T

Reagenzien	Volumen (µl)	Endkonzentration
Taq-Puffer (10x)	2,5	1x
dNTP (10mM)	1,0*	0,4 mM
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	1,25**	2,0 mM
Primer forward (10 µM)	0,5	200 nM
Primer reverse (10 µM)	0,5	200 nM
Taq-DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,15	0,03 U/µl
DMSO (99%)	1***	
DNA (30-100 ng/µl)	1,0	-
Aqua bidest.	ad	-
Endvolumen	25,0	

\*bei 1249G>A: 2,5 µl \*\* bei 3972C>T:1,0 µl \*\*\* bei 1249G>A kein DMSO

**Tab. 8:** Thermocyclerbedingungen zur Amplifikation der DNA-Fragmente für die Detektion der SNPs ABCC2 - 24 C>T, 1249G>A und 3972C>T

Denaturierung	Denaturierung	Annealing	Elongation	terminale Elongation
2 min*	30 sec.	30 sec.	30 sec.	7 min.
94 °C	94 °C	55 °C**	72 °C	72 °C
35 Zyklen				

\* bei 3972C>T: 5 min.

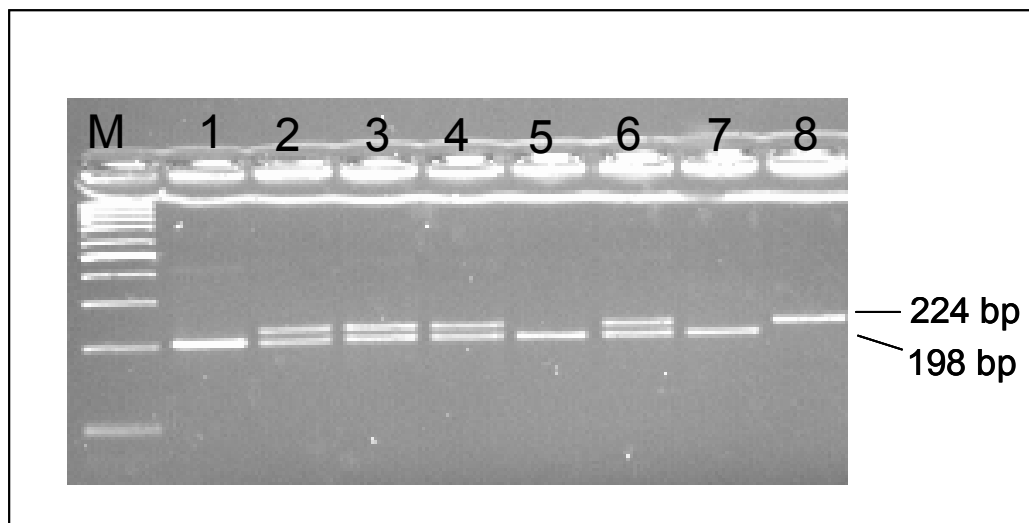
\*\* bei 3972C>T: 57°C, bei 1249G>A: 60°C

**Tab. 9:** Allgemeiner Restriktionsansatz für die Restriktionsreaktionen zur Identifizierung der Genotypen

Reagenzien	Volumen [ $\mu$ l]	Endkonzentration
PCR-Produkt	12,5	
NEB Buffer (10x)	2,5	1x
Enzym (NEB) (10 U/ $\mu$ l)	0,5	0,2 U/ $\mu$ l
Aqua bidest.	9,5	
Endvolumen	25,0	

Nach enzymatischem Verdau der PCR-Produkte bei 37°C (BsrD I, Bsb I: 65°C) für 4-6 Stunden wurden die DNA-Fragmente mittels Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt. In dieser Arbeit wurden 1 bzw. 2%-ige Agarose-Gele (Roti®GAROSE, Roth, Karlsruhe, Deutschland) hergestellt, die in einer Elektrophorese-Kammer (Sub Cell, Wide Mini Sub-Cell, Biorad, München, Deutschland) in 1 x TBE Laufpuffer (90 mM Tris-HCl, Sigma, Deisenhofen, Deutschland), 90 mM Borsäure (Sigma), 2 mM EDTA, pH 8,0 (Merck, Darmstadt, Deutschland) einer Spannung von 120 V für 45 – 60 min. ausgesetzt wurden. Das dem Gel bei der Herstellung zugesetzte Ethidiumbromid (Sigma) interkalierte mit der DNA. Dieses fluoreszierte im ultravioletten Licht und diente so der Sichtbarmachung der DNA-Fragmente in Form eines Bandenmusters (Kodak Image Station 440 CF, Kodak, Stuttgart, Deutschland). Vergleicht man dieses mit einem Größenstandard (DNA-Fragmente definierter Größe), so läßt sich die Größe der einzelnen Fragmente identifizieren. Vor Einbringen der aufzutrennenden Proben in die Geltaschen wurde diese vorher im Verhältnis 1:10 mit Blaumarker (BlueJuice™ Gel-Loading Buffer, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) vermischt. Die verwendeten Größenstandards waren pBR322 DNA / BsuRI (HaeIII) Marker, 5, Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder, sowie bei erwarteten DNA-Fragmenten über 1 000 bp Gene Ruler™ 1 kb DNA Ladder (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland). Abbildung 8 zeigt exemplarisch das Bandenmuster einer Gelelektrophorese zur Identifizierung des ABCB1 2677G>T Polymorphismus.





**Abb. 8:** Bandenmuster der Restriktionsfragmente nach Agarosegel-Elektrophorese. Exemplarisch hier das Bandenmuster zur Identifizierung des ABCB1 2677G>T Polymorphismus. **Bahn 1, 5 und 7:** 2677GG, **Bahn 2, 3, 4 und 6:** 2677GT, **Bahn 8:** 2677TT. Die 24 bp-Bande ist zu kurz, um auf dem Gel sichtbar zu werden. **M:** Bandenmuster des Größenstandards Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder.

### 2.4 mRNA-Quantifizierung

Der ABCB1- und ABCC2-mRNA-Gehalt in den Nierengewebe wurde nach Isolierung der Gesamt-RNA und Reverser Transkription in cDNA, mit Hilfe der Real-time PCR (TaqMan™-Technologie) bestimmt.

#### 2.4.1 RNA-Isolation

Die Gesamt-RNA wurde aus dem homogenisierten Gewebe (vergl. 2.8) unter Verwendung des RNeasy Tissue Kits und der QIAshredder™ Säulen (Quiagen) entsprechend dem Herstellerprotokoll sowohl aus dem Tumorgewebe, als auch aus dem morphologisch entsprechenden, nicht-tumorbefallenen Gewebe isoliert und bei -80 °C eingefroren. Die Quantifizierung erfolgte analog der in 2.3.1 beschriebenen Methode, wobei eine  $OD_{260}=1$  einem Gehalt einzelsträngiger RNA von 40 µg/ml entsprach.

### 2.4.2 Reverse Transkriptase-Reaktion

Da RNA selbst nicht als Template für die Real-time PCR geeignet ist, wurde die isolierte Gesamt-RNA zunächst mit Hilfe der Reversen Transkriptase-Reaktion in die komplementäre, einzelsträngige cDNA umgeschrieben. Hierbei wurde der TaqMan® Reverse Transcription Reagents Kit der Firma Applied Biosystems mit Random Hexamer Primern verwendet. Die einzusetzende RNA-Menge wurde auf 400 ng berechnet. Der Reaktionsansatz der Reversen Transkription ist in Tabelle 10 aufgeführt, die Thermocyclerbedingungen in Tabelle 11.

Die erhaltene cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

**Tab. 10:** Reaktionsansatz für die Reverse Transkription

Komponente	Volumen [ $\mu$ l]	Endkonzentration
RT-Puffer (10x)	5	1x
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	11	5,5 mM
dNTP	10	500 $\mu$ M
Random Hexamer Primer	2,5	2,5 $\mu$ M
RNase-Inhibitor (20 U / $\mu$ l)	1,0	0,4 U / $\mu$ l
Reverse Transkriptase (40 U/ $\mu$ l)	1,25	1,25 U/ $\mu$ l
RNA (400 ng) + Aqua bidest.	19,25	8 ng / $\mu$ l
Endvolumen	50	

**Tab. 11:** Thermocycler-Temperaturprotokoll der Reversen Transkriptionsreaktion

Inkubation	Reverse Transkription	Inaktivierung der Transkriptase
10 min	30 min	5 min
25 °C	48 °C	95 °C

### 2.4.3 Quantifizierung von cDNA mittels Real-time PCR

Bei der Real-time PCR handelt es sich um eine Methode, die gleichzeitig die Amplifikation wie auch den Nachweis der Zielsequenz in einem Reaktionsgefäß ermöglicht. Voraussetzung hierfür ist einerseits die 5'-Exonucleaseaktivität der verwendeten AmpliTaq DNA Polymerase, andererseits der Einsatz einer fluorogenen Sonde, einem Oligonukleotid, das am 5'-Ende mit einem fluoreszenten Reporter-Farbstoff und am 3'-Ende mit einem Quencher-Farbstoff verknüpft ist. Zusätzlich ist die 3'-OH Gruppe der Sonde mit einem Phosphatrest blockiert, damit während der PCR keine Extension des 3'-Endes stattfinden kann. Bei

Anregung der intakten Sonde durch Licht bestimmter Wellenlänge kommt es aufgrund der räumlichen Nähe zwischen Reporter- und Quencher-Farbstoff zu einem Fluoreszenz-Energietransfer (FET), wodurch das Fluoreszenzsignal unterdrückt wird. Während der PCR lagern sich zunächst Primer und Sonde an den Matrizen-Strang an, in der nachfolgenden Extensionsphase trifft die Polymerase auf die Sonde und hydrolysiert diese, wobei sich Reporter und Quencher von einander entfernen. Der FET wird unterbrochen und ein Fluoreszenzsignal wird emittiert. Da die Intensität des Fluoreszenzsignal in Abhängigkeit von den freigesetzten Reporter-Farbstoffmolekülen steigt, kann durch einen Amplifikationsplot der exponentielle Verlauf der PCR nachvollzogen werden (Abb. 9). Dabei wird die Fluoreszenzemission und damit die Amplifikation des PCR-Produkts als  $\Delta R_n$  angegeben, wobei dieser Wert die Differenz aus der Fluoreszenzemission zu einem bestimmten Zeitpunkt und der Fluoreszenzemission des Grundrauschens (Baseline) darstellt. Der Zeitpunkt bzw. der PCR-Zyklus, an dem das Fluoreszenzsignal erstmalig deutlich einen Schwellenwert (Threshold) überschreitet, wird durch den  $C_T$ -Wert angegeben. Dieser  $C_T$ -Wert ist umgekehrt proportional zur eingesetzten Startkopienzahl. Je früher also ein Anstieg des Fluoreszenzsignal zu beobachten ist, desto größer war die Ausgangs-Kopienzahl.

Um einen Vergleich verschiedener Proben zu ermöglichen, wird neben dem cDNA-Gehalt des Zielgens zusätzlich der Gehalt eines endogenen Referenzgens, auf das normalisiert wird, gemessen. Dieser interne Standard sollte in allen Proben möglichst konstitutiv exprimiert werden. In dieser Studie erwies sich 18S rRNA gegenüber  $\beta$ -Actin und RPLP0 (ribosomales Protein LP 0), die ebenfalls in der Literatur als interne Standards verwendet werden [161, 162] als am wenigsten variabel. Die Variabilität des Gehaltes der drei „house-keeping“ Gene wurde zuvor in einer kleineren Anzahl von 14 sowohl nicht-tumorösen, als auch tumorösen kortikalen Nierengeweben getestet. Hierbei wurde das von Vandesompele et al. [162] entwickelte Programm geNorm v 3.2 benutzt. Im weiteren Verlauf der Untersuchung wurde dann in den Gewebeproben nur noch 18S rRNA bestimmt und als interner Standard verwendet.

Die Auswertung der Real-time PCR kann mittels zwei verschiedener Methoden erfolgen. Entweder durch eine absolute Quantifizierung mittels Standardkurve oder durch eine relative Quantifizierung, der sogenannten  $\Delta\Delta C_T$ -Methode. Bei der Standardkurvenmethode wird durch den Vergleich der  $C_T$ -Werte von Proben mit bekannter Startkopienzahl (Standards) die absolute Startkopienzahl der unbekanntenen Probe ermittelt.

Bei der  $\Delta\Delta C_T$ -Methode, bei der keine Standards benötigt werden, wird von der Differenz der  $C_T$ -Werte des Zielgens und des Referenzgens ( $\Delta C_T$ ) der  $\Delta C_T$ -Wert eines Kalibrators

abgezogen ( $\Delta\Delta C_T$ ). Der normalisierte Gehalt des Zielgens, relativ zu einem Kalibrator ( $X_{n, \text{kal}}$ ) kann dann wie folgt berechnet werden:

$$(X_{n, \text{kal}}) = 2^{-\Delta\Delta C_T} .$$

Da am Institut für Pharmakologie der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald bereits klonierte Standards in Form von Plasmid-DNA für die Zielgene ABCB1 und ABCC2, sowie für die Referenzgene 18S rRNA,  $\beta$ -Actin und RPLP0 vorhanden waren, konnte in dieser Arbeit die Standardkurvenmethode angewandt werden. Hierzu wurden zunächst Standardkurven sowohl für die Referenzgene (18S rRNA, vorher 1:500 mit Aqua bidest. verdünnt,  $\beta$ -Actin, RPLP0), als auch für die Zielgene (ABCB1 und ABCC2) erstellt. Die jeweiligen Standards wurden in einer Verdünnungsreihe von  $10^2$ - $10^6$  ( $10^3$ - $10^7$ , 18S rRNA) hergestellt. Mit diesen Standards bekannter Kopienzahl konnten dann die absoluten Kopienzahlen der zu bestimmenden Proben ermittelt werden.

Die quantitative Real-time PCR wurde mit dem ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (TaqMan™) (Applied Biosystems) durchgeführt. Für die PCR-Reaktionsansätze wurde der TaqMan™ Universal Master Mix (Applied Biosystems) eingesetzt. Dieser enthält neben den üblichen PCR-Reagenzien Uracil-N-Glykosylase (AmpErase UNG) zur Vermeidung von „carry over“ Kontaminationen und eine spezielle DNA-Polymerase mit 5'-3' Exonuklease-Aktivität (AmpliTaQGold). Für die Bestimmung der Zielgene (ABCB1 und ABCC2) wurden die Sequenzen der Primer (TIB Molbiol) so gewählt, dass sie an den Enden benachbarter Exons binden. Die Sonden (TIB Molbiol) wurden so konstruiert, dass sie intronüberspannend und damit cDNA-spezifisch zwischen den jeweiligen Primer hybridisieren (Tab. 12). [163, 164] Zur Quantifizierung der internen Standards 18S rRNA,  $\beta$ -Actin und RPLP0 standen von Applied Biosystems Primer und Sonden in optimaler Zusammensetzung zu Verfügung. Jede Bestimmung wurde als Doppelbestimmung durchgeführt. Tabelle 13 und Tabelle 14 geben die PCR-Ansätze für die Bestimmung des cDNA-Gehaltes des Zielgens bzw. der endogenen Referenzgene wieder. Bei den Volumina der einzelnen Komponenten ist ein 10%iger Sicherheitszuschlag miteingerechnet. Das standardisierte Temperaturprotokoll für die Quantifizierung von cDNA mittels TaqMan™ ist in Tabelle 15 wiedergegeben.

## 2 Material und Methoden

**Tab. 12:** Sequenz der Primer und Sonden zur Quantifizierung der cDNA der Zielgene ABCB1 und ABCC2 [163, 164]

Primer / Sonde	
mdr1 forward	5'-TTC GCA ACC CCA AGA TCC TC
mdr1 reverse	5'-ACA ATG GTG GTC CGA CCT TT
Sonde	5'-6FAM-ATC CAG AGC CAC CTG AAC CAC TGC T XT p
mrp2 forward	5'-CTG GGA ACA TGA TTC GGA AGC
mrp2 reverse	5'-GAG GAT TTC CCA GAG CCG AC
Sonde	5'-6FAM-CAG TCC GAG ATG TGA ACC TGG ACA T XT p

6FAM: 6-Carboxy-Fluorescin, X: TAMRA (6-Carboxy-tetramethyl-rhodamin), p: 3'-Phosphat

**Tab. 13:** TaqMan-PCR-Ansatz zur Quantifizierung der cDNA der Zielgene ABCB1 und ABCC2

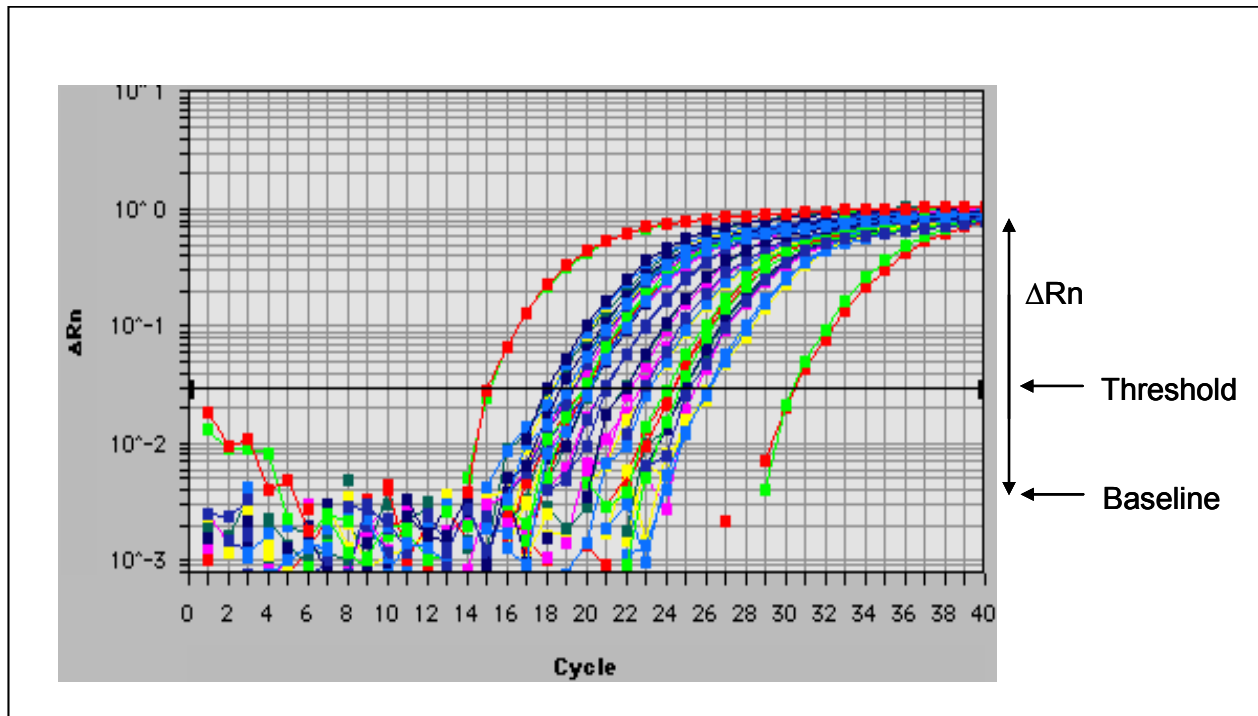
Komponente	Volumina [ $\mu$ l]	Endkonzentration
TaqMan® Universal PCR Master Mix (2x)	11	1x
Primer forward (5 $\mu$ M)	1,32	300 nM
Primer reverse (5 $\mu$ M)	1,32	300 nM
Sonde (5 $\mu$ M)	0,44	100 nM
cDNA (entsprechend 400 ng RNA)	2,2	
Aqua bidest.	5,72	
Endvolumen	22	

**Tab. 14:** TaqMan-PCR-Ansatz zur Quantifizierung der cDNA der endogenen Referenzgene 18S rRNA,  $\beta$ -Actin, RPLP0

Komponente	Volumina [ $\mu$ l]	Endkonzentration
TaqMan® Universal PCR Master Mix (2x)	11	1x
TaqMan® 18S / $\beta$ -Actin / RPLP0 Control Reagent (20x)	1,11	1x
cDNA (entsprechend 400 ng RNA)	2,2	
Aqua bidest.	7,7	
Endvolumen	22	

**Tab. 15:** Standardisiertes Temperaturprotokoll für die Quantifizierung von cDNA mittels TaqMan™

Inkubation	Aktivierung	Denaturierung	Hybridisierung/Elongation
2 min	10 min	15 sec	1 min
50°C	95 ° C	95 ° C	60 ° C
40 Zyklen			



**Abb. 9:** Amplifikationsplots einer Real-time PCR mehrerer Proben am TaqMan™ in halblogarithmischer Darstellung

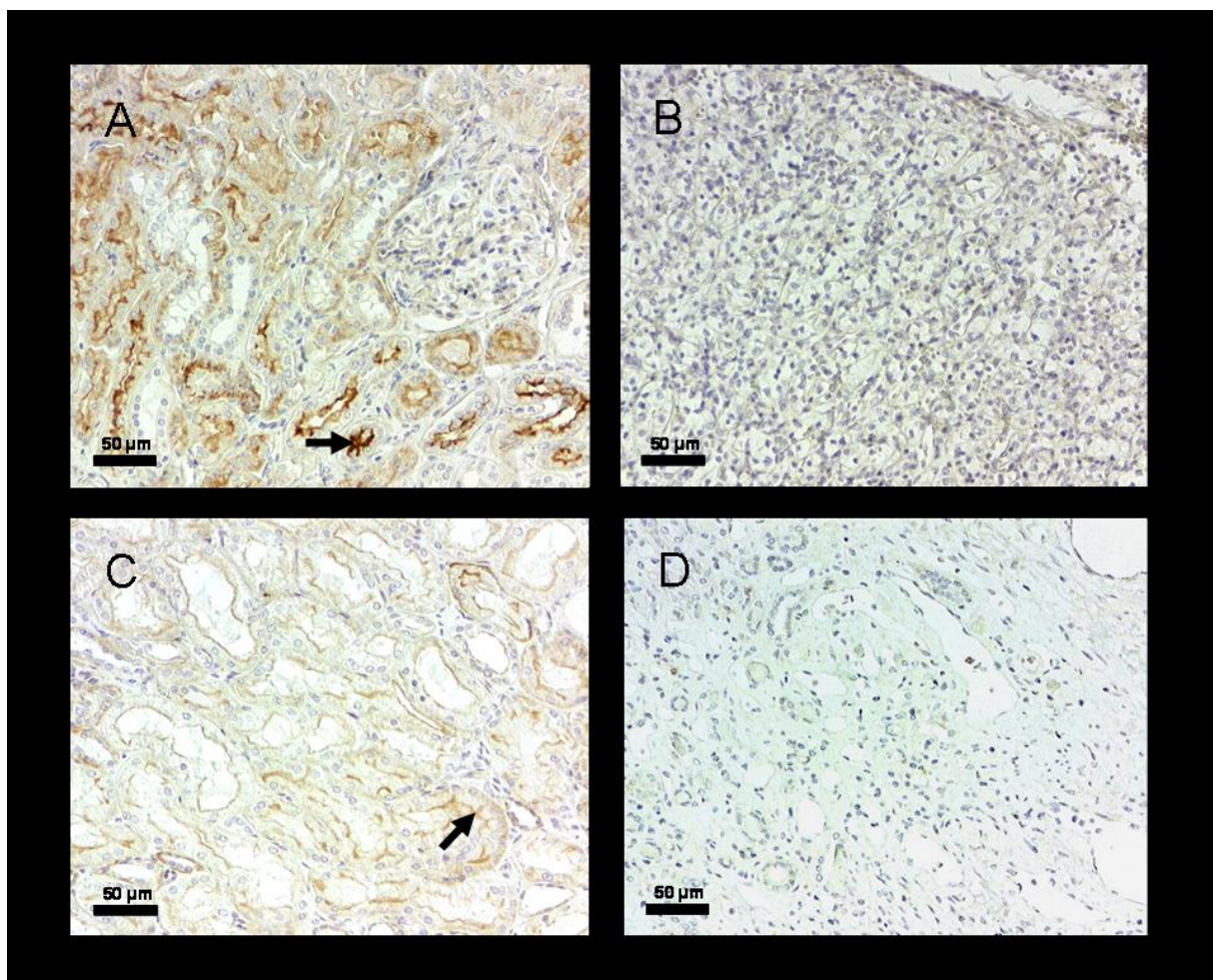
### 2.5 Bestimmung des Proteingehaltes mittels Immunhistochemie

Die semiquantitative Bestimmung der Proteine ABCB1 und ABCC2 in den nicht-tumorösen, sowie tumorösen, kortikalen Nierengeweben wurde dankenswerterweise von Frau Dr. Dazert am Institut für Pathologie der Universität Greifswald mit den dort vorhandenen Protokollen durchgeführt.

Es wurden von 23 Patienten, mit Ausnahme von einem, hier war nur tumoröses Gewebe vorhanden, sowohl von den tumorösen, als auch von den nicht-tumorösen, in Paraffin eingebetteten Gewebeproben 2  $\mu\text{m}$ -dicke Schnitte angefertigt. Nach Deparaffinisierung und Rehydratisierung wurden die Gewebeproben für 5 min. mit Natriumcitrat-Puffer (pH=7) bedampft und danach, um noch im Gewebe eventuell vorhandene Peroxidase zu inaktivieren, in 3%igem  $\text{H}_2\text{O}_2$  inkubiert. Anschließend wurde für 10 min. mit Avidin und Biotin (1:1) (Avidin-Biotin-Blocking-Kit SP-2001 der Firma Linaris, Wertheim-Bettingen, Deutschland) zur Blockierung endogen vorhandenen Biotins behandelt. Diese beiden Schritte dienten der Reduktion einer unspezifischen Hintergrundfärbung. Danach wurden die Schnitte noch einmal für 30 min. mit Horse-Serum (Linaris) inkubiert. Über Nacht konnten nun die Primär-Antikörper JSB-1 (Verdünnung 1:50) und MRP2 III-6 (Alexis, Grünberg, Deutschland), es handelt sich dabei um in der Maus hergestellte anti-ABCB1 bzw. anti-ABCC2-Anikörper,

aufgebracht werden. Anschließend wurde ein biotinkoppelter, im Pferd hergestellter anti-Maus-Antikörper (Verdünnung 1:100) für 30 min. zugegeben. Durch weitere Zugabe von Biotin und Streptavidin, gekoppelt an Horseradish-Peroxidase, sowie des Farbstoff-Substrates DAB (3,3'-Diaminobenzidin) konnten die Proteine durch braune Färbung sichtbar gemacht werden (=labelled streptavidin-biotin horseradish peroxidase technique, LSAB-HRP, Dako, Hamburg, Deutschland).

Zur quantitativen Auswertung wurden aus jedem Schnitt fünf Ausschnitte zufällig ausgewählt und von diesen digitale Bilder angefertigt (Vergrößerung 1:200) (Abb. 10). Mit der Auswertesoftware KS400 imaging system V3.0 der Firma Zeiss (Jena, Deutschland) wurde die Optische Dichte der Färbung bestimmt, wobei das Verhältnis der Anzahl der positiven Pixel zu der Gesamtzahl der Pixel des Hintergrundes mit der Intensität des einzelnen positiven Signals multipliziert wurde. Die erhaltenen Werte für den Proteingehalt sind Mittelwerte der fünf verschiedenen, zufällig ausgewählten Ausschnitte.



**Abb. 10:** ABC1-Protein-Expression im nicht-tumörösen (A) und im tumorösen (B) kortikalen Nierengewebe desselben Patienten. ABCC2-Protein-Expression eines anderen Patienten im nicht karzinösen (C) und im Tumorgewebe (D). Die Pfeile kennzeichnen die für ABC1 und ABCC2 positiven Antikörperreaktionen in der Bürstensaum-Membran der epithelialen Zellen des proximalen Tubulus.

### 2.6 Reporter-gen-Assay

Um den Einfluss des -24C>T Polymorphismus auf der 5'-UTR des ABCC2-Gens auf die Genexpression zu untersuchen, wurde ein Reporter-gen-Assay durchgeführt. Beim Reporter-gen-Assay handelt es sich um eine *in-vitro*-Methode, bei der der Einfluss einer Nucleotidsequenz auf die Genexpression anhand der Aktivität eines nachgeschalteten Reportergens bestimmt werden kann.

In diesem Fall wurden zwei Reporter-gen-Vektorkonstrukte hergestellt. Bei diesen wurde die 5'-UTR des ABCC2-Gens, die entweder das C- oder das T-Allel an der Position -24 aufwies, vor das Firefly-Luciferase-Gen des pGL3-basic-Vektors (Promega, Mannheim, Deutschland) kloniert. Nach Transfektion der Vektor-Konstrukte in HepG2-Zellen und luminometrischer Bestimmung der Luciferaseaktivitäten konnte auf die Aktivität der 5'-UTR des ABCC2-Gens in Abhängigkeit zum -24C>T Polymorphismus rückgeschlossen werden.

#### 2.6.1 Herstellung von Vektorkonstrukten

Zunächst wurden Primer kreiert, an deren 5'-Enden Restriktionsschnittstellen für die Enzyme *Kpn I* bzw. *Nco I* eingeführt wurden. Mit Hilfe dieser Primer wurden, ausgehend von genomischer DNA, 1229 bp der 5'-untranslatierten Region des ABCC2-Gens (Accession No.: AL133353 Position 130178-131406) mit Hilfe der PCR (Polymerase-Kettenreaktion) amplifiziert. Da zwei, sich in einer Base unterscheidende Rückwärtsprimer verwendet wurden, konnten nach Durchführung zweier Reaktionsansätze ein Wildtyp- und ein Variantenfragment erhalten werden, wobei der Basenaustausch in den Rückwärtsprimern den beschriebenen ABCC2 -24C>T SNP widerspiegelte. Tabelle 16 zeigt den Vektor, die Sequenzen der verwendeten Primer zur Amplifikation der Inserts, sowie die Restriktionsenzyme und deren Schnittstellen. Tabelle 17 gibt den PCR-Ansatz und Tabelle 18 die Thermocyclerbedingungen zur Amplifikation der Insert-DNA-Fragmente wieder. Anschließend wurden nach Aufreinigung der PCR-Produkte mittels QIAquick™PCR Purification Kit (Quiagen) die Amplifikate jeweils in einem Restriktionsansatz mit den Enzymen *Kpn I* und *Nco I* geschnitten. Dies war möglich, weil beide Enzyme in dem verwendeten Puffer ausreichende Aktivitäten aufwiesen. Nach wiederholter Aufreinigung (QIAquick™ Purifikation Kit) wurden die Fragmente in den vorher ebenfalls mit den genannten Enzymen aufgeschnittenen und danach aufgereinigten Vektor passend zu ihren spezifischen Überhängen ligiert. Tabelle 19 zeigt die Restriktionsansätze sowohl für den pGL3- basic Vektor, als auch für die beiden Amplifikate.



Bei der Ligase-Reaktion wurden der linearisierter Vektor und das entsprechende Insert in einem molaren Verhältnis von 1:3, sowie 4 µl Ligase Puffer (10x) und 5 U T4-DNA-Ligase (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) in einem Gesamtvolumen von 20 µl bei 16°C über Nacht inkubiert. Bis zur weiteren Verwendung konnten die Ligationsansätze bei -20 °C gelagert werden.

Durch die Wahl der Sequenz der Rückwärtsprimer und die Lage der *Nco I*-Schnittstelle in der Multicloning-Site des Vektors, konnten Reporter-gen-Konstrukte kloniert werden, bei denen das Translations-Initiations-Start-ATG des Luciferase-Gens mit dem der davor eingefügten 5'-UTR des ABCC2-Gens identisch war (Abb. 11).

**Tab. 16:** Vektor, Namen und Sequenzen der Klonierungsprimer, sowie Restriktionsenzyme und deren Schnittstellen. Primer von TIB Molbiol, Restriktionsenzyme von New England Biolabs (NEB).

Vektor	Primer forward / reverse (Wildtyp / Variante) * Restriktionsschnittstelle des Enzyms	Primernamen	Enzym
pGL3 basic ( <i>Kpn I</i> , <i>Nco I</i> )	5'-CTCGGTAC*CTCTAGAATT TGACCAGATTTAAGGCCAATTT	MRP2ProATG-for	<i>Kpn I</i>
	5'-GAGCCATG*GATTCCTGGA CTGCGTCTGGAACGAAGACTC	MRP2ProATG-rev	<i>Nco I</i>
	5'-GAGCCATG*GATTCCTGGA CTGCGTCTGGAACAAAGACTC	MRP2ProATGmut-rev	

**Tab. 17:** PCR-Reaktionsansätze zur Amplifikation der Insert-Fragmente

Reagenzien	Volumen [µl]	Endkonzentration
Taq PCR Master Mix (Quiagen) (2x)	25,0	1x
Primer forward MRP2-ProATG-for (10µM)	1,0	200nM
Primer reverse MRP2-ProATG-rev (10µM) bzw. MRP2-ProATGmut-rev (10µM)	1,0	200nM
DNA (30-100 ng / µl)	1,0	
Aqua bidest.	ad	
Endvolumen	50,0	

## 2 Material und Methoden

**Tab. 18:** Thermocycler-Protokoll zur Amplifikation der Insert-Fragmente

Denaturierung	Denatur.	Anneal.	Elong.	Denatur.	Anneal.	Elong.	terminale Elongation
3 min	30 sec.	30 sec.	1,5 min.	30 sec.	30 sec.	1,5 min.	10 min.
94 °C	94 °C	55 °C	68 °C	94 °C	60 °C	68 °C	68 °C
10 Zyklen			30 Zyklen				

**Tab. 19:** Restriktionsansätze für die Insert-Fragmente und den pGL3-basic-Vektor

Reagenzien	PCR-Produkt (Wildtyp bzw. Variante)	Vektor (pGL3-basic)
	Volumen [ $\mu$ l]	Volumen [ $\mu$ l]
PCR-Produkt (nach Aufreinigung des PCR-Ansatzes)	43,0	-
Vektor (200-300 ng / $\mu$ l)	-	3,0
NEB Buffer 1 (10x)	5,0	2,0
Kpn I (10 U/ $\mu$ l)	1,0	1,0
Nco I (10 U/ $\mu$ l)	1,0	1,0
Aqua bidest.	-	13 $\mu$ l
Endvolumen	50,0	20,0



in einem Thermoschüttler (Thermomixer compact, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bei 225 U/min für 1 Stunde geschüttelt worden waren, wurden je 5 µl der Bakterienkulturen in 95 µl sterilem H<sub>2</sub>O bidest. verdünnt und auf ampicillinhaltigen (50 µg/ml, Ampicillin, Natriumsalz, Sigma) LB-Agarplatten (3,5% LB Agar, Sigma, in LB-Medium) ausplattiert. Der Rest der Baktereinkulturen wurde unverdünnt ausplattiert. Da sich auf dem pGL3-basic-Vektorkonstrukten eine Ampicillinresistenzkassette befindet, konnte dadurch sichergestellt werden, dass sich nur Bakterienklone mit der gewünschten Plasmid-DNA vermehren. Die Platten wurden über Nacht, auf dem Kopf liegend, bei 37 °C inkubiert.

### **2.6.3 Aufreinigung von Plasmid-DNA aus E. coli Bakterien**

Von den in 2.6.2 beschriebenen, über Nacht inkubierten Agarplatten wurden mehrere Kolonien gepickt und je in 3 ml ampicillinhaltiges (50 µg/µl) LB-Medium (2% (m/v) LB BROTH, Sigma) eingebracht. Diese beimpften Medien wurden wiederum bei 37°C über Nacht und 225 U/min in einem Inkubator (Innova™ 4000 incubator shaker, New Brunswick Scientific, Nürtingen, Deutschland) geschüttelt. Die Plasmid-DNA konnte dann mittels QIAprep® Spin Miniprep Kit Plasmid (Quiagen) nach Herstelleranleitung isoliert werden.

### **2.6.4 Glycerin-Kultur**

Um die positiven Bakterienklone langfristig zu lagern, wurden vor der in 2.6.3 beschriebenen Plasmid-DNA-Aufreinigung zunächst 1000 µl Bakterienkultur mit 500 µl sterilem Glycerin (Sigma, verdünnt 1:1 mit Aqua bidest.) gemischt und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die langfristige Lagerung fand bei -80°C statt.

### **2.6.5 Kontroll-Restriktion**

Um den tatsächlichen Einbau des gewünschten Vektorkonstruktes zu überprüfen, wurden 5 µl der Plasmid-DNA (200-300 ng / µl) in einem Restriktionsansatz mit 2 µl Buffer I, je 0,25 µl Kpn I und Nco I in einem Gesamtvolumen von 20 µl für 4 Stunden inkubiert. Die Auftrennung der Restriktionsfragmente wurde mittels 1%igem Agarosegel durchgeführt. Klone, die sowohl eine Bande, die dem linearisierten Vektor, als auch eine Bande, die dem Insert entsprach, aufwiesen, wurden anschließend kontrollsequenziert.

### 2.6.6 Kontroll-Sequenzierung von Plasmid-DNA

Die Kontrollsequenzierung der Plasmid-DNA der in 2.6.1 hergestellten Vektorkonstrukte (pGL3-ABCC2-C und pGL3-ABCC2-T) wurden am Institut für Klinische Molekularbiologie des Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel, mittels eines ABI PRISM 3730 DNA Analyzer der Firma Applied Biosystems durchgeführt, wobei das Prinzip der Sequenzierung auf der Kettenabbruch-Methode nach Sanger [165] basiert. Unter Verwendung des BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kits (Applied Biosystems) und der Sequenzierprimer RV3 und pGL2plus (Sequenzen s. Tab. 20) (TIB Molbiol), die insertflankierend auf der Vektor-DNA sitzen, wurden die Nukleotidsequenzen der Inserts, sowie die der Vektor-Insert-Übergänge ermittelt, durch die Chromas Lite Software Version 2.2 ausgewertet und anschließend mit der Referenzsequenz (Acc.No.: AL133353) abgeglichen.

**Tab. 20:** Namen und Sequenzen der Sequenzierprimer zur Kontrolle der Vektorkonstrukte

Primernamen	Primersequenz
RV3	5'-CTA GCA AAA TAG GCT GTC CC
pGL2plus	5'-ATC TTC CAG CGG ATA GAA TGG

### 2.6.7 Zellkultur

Sämtliche Zellkulturarbeiten wurden an einer Sterilbank (Hera safe, Heraeus Instruments, Hanau) unter Verwendung steriler Zellkulturgefäße und Pipetten durchgeführt.

#### 2.6.7.1 Kultivierung von HepG2-Zellen

Die Kultivierung der HepG2-Zellen erfolgte in MEM (Minimal Essential Medium Eagle)-Medium mit Earle's Salzen mit Glutamin (PAA, Pasching, Österreich), dem im Volumenverhältnis 10% fetales Rinderseum (FCS Gold, PAA), 1% Pyruvat (PAA), 1% nicht essentielle Aminosäuren (PAA), sowie 1% Penicillin / Streptomycin (Gibco, Karlsruhe, Deutschland) zugesetzt wurden. Vor Gebrauch wurde das Medium stets auf 37°C vortemperiert. Zunächst wurden die von DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland) bezogenen, kryokonservierten HepG2-Zellen in einem auf 37°C temperierten Wasserbad aufgetaut und sofort nach Auftauen aller Eiskristalle aus dem Kryovial in Medium aufgenommen und in einem Gesamtvolumen von 10

ml in eine 75cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche (Cell Culture Flask, BD Falcon, Heidelberg, Deutschland) oder auf eine Zellkulturplatte (Nunc™ Surface, 10 cm Durchmesser, Nunc, Roskilde, Dänemark) überführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in sterilen Gefäßen in einem Brutschrank (Heraeus cell, Heraeus Instruments) bei 37°C und in 5%iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre. Ein erster Mediumwechsel erfolgte nach 24 Stunden. Nachdem die Zellen eine 60%ige Konfluenz erreicht hatten, wurde das Medium abgesaugt und mit 37°C warmen 1 x PBS (Gibco) gespült. Durch Zugabe von 2 ml Accutase (PAA) und nach 20-minütigem Inkubieren im Brutschrank konnten die vom Boden der Kulturflasche abgelösten Zellen in frischem Medium aufgenommen werden. Nachdem diese Zellsuspension bei 1000 U/min für 10 min. zentrifugiert wurde (Multifuge 3 SR, Heraeus Instruments), wurde das im Überstand befindliche Medium abgesaugt und die Zellen erneut in 10 ml frischem Medium resuspendiert. Diese Zellsuspension (4 x 10<sup>6</sup> Zellen / 10 cm<sup>2</sup> Platte) wurde entweder zur Weiterkultivierung auf mehrere Kulturplatten verteilt, oder, wobei allerdings vorher die Zellen der Zellsuspension durch Auf- und Abziehen durch eine Kanüle vereinzelt wurden, auf eine 96-well-Platte (Tissue Culture Plate 96 well, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) (2 x 10<sup>4</sup> Zellen / well) verteilt. Auf diesen 96-well-Zellkultur-Platten wurden dann die Transfektionen durchgeführt.

### **2.6.7.2 Bestimmung der Zellzahl**

Zunächst wurden wie in 2.6.7.1 beschrieben die Zellen von der Zellkulturflasche bzw. Platte gelöst, abzentrifugiert und dann in 1 ml vorgewärmten 1 x PBS resuspendiert. Davon wurden 20 µl abgenommen und mit 20 µl einer 0,4 %igen Trypanblau-Lösung (Sigma) versetzt. Nach Einbringen der angefärbten Zellsuspension in die Neubauer-Zählkammer (Optik Labor, Friedrichshofen, Deutschland) konnte mit Hilfe eines Mikroskops (Olympus CK2, Olympus Deutschland, Hamburg, Deutschland) und der in das Deckglas der Zählkammer eingravierten Quadrate durch Auszählen die Zellzahl bestimmt werden.

### **2.6.7.3 Kryokonservierung von HepG2-Zellen**

Die langfristige Lagerung der HepG2 Zellen fand bei -196°C in flüssigem Stickstoff statt. Hierzu wurden die Zellen zunächst wie in 2.6.7.1 beschrieben von der Kulturflasche gelöst, zentrifugiert und in frischem Medium, dem im Volumenverhältnis 5 % DMSO (Dimethylsulfoxid, Sigma) zugesetzt worden war, wieder resuspendiert. Je 1 ml dieser

Zellsuspension ( $4 \times 10^5$  Zellen / ml) wurde in ein Einfrierröhrchen (Sarstedt) abgefüllt und zunächst in einer Styroporbox für 24h bei  $-80^\circ\text{C}$  langsam eingefroren. Danach wurden die Röhrchen in einen Behälter mit flüssigem Stickstoff verbracht.

### 2.6.8 Transiente Transfektion

Um den Einfluss des ABCC2 -24C>T Polymorphismus auf die Gen-Expression zu untersuchen, wurden die beiden in 2.6.1 kreierte Reportergen-Vektorkonstrukte, bei denen 1229 bp der 5'-UTR des ABCC2-Gens vor das Reportergen des pGL3-basic-Vektors (Promega), in diesem Fall die Firefly-Luciferase (aus *Photinus pyralis*), kloniert worden waren, in Form von Plasmid-DNA in HepG2-Zellen transient transfiziert. Die Konstrukte unterschieden sich dabei lediglich durch den Basenaustausch, der dem ABCC2 -24C>T SNP entsprach. Nach Aussaat der nach 2.6.7.1 gewonnenen HepG2-Zellsuspension auf 96-well-Platten ( $2 \times 10^4$  Zellen / well in 100  $\mu\text{l}$  Medium) wurden die Zellen zunächst 12 Stunden kultiviert. Danach wurde das Medium durch vorsichtiges Absaugen und anschließendes Überschichten mit frischem Medium gewechselt. Da die Zellen vor der Transfektion 24 Stunden ohne Penicillin/Streptomycin kultiviert werden mussten, wurde für diesen Mediumwechsel Penicillin / Streptomycin-freies, ansonsten aber wie in 2.6.7.1 beschriebenes MEM- Medium verwendet. Zur Transfektion wurden zunächst in sterilen Eppendorf-Gefäßen (Sarstedt) je well 0,1  $\mu\text{g}$  Vektorkonstrukt (pGL3-ABCC2-C bzw. pGL3-ABCC2-T) und 0,02  $\mu\text{g}$  des phRL-TK-Vektors (Promega,) in 25  $\mu\text{l}$  Medium für 5 min inkubiert. Der kotransfizierte ph-RL-TK-Vektor, der die unter der Kontrolle des Promoters der Thymidin-Kinase des Herpes simplex virus stehende Renilla-Luciferase (aus *Renilla reniformis*) als Reportergen enthält, diente als interne Kontrolle. Auf die gleiche Weise wurden der pGL3-basic Vektor (Negativ-Kontrolle) und der pGL3-control Vektor (Promega) (Positiv-Kontrolle), bei dem die Firefly-Luciferase unter Kontrolle des Simian Virus (SV40)-Promoters steht, inkubiert. Das hierbei verwendete Medium musste sowohl Penicillin/Streptomycin-, als auch FCS-frei sein. Parallel wurde in 25  $\mu\text{l}$  gleichen Mediums (ebenfalls Penicillin / Streptomycin und FCS-frei) 0,5  $\mu\text{l}$  Lipofectamin™ 2000 Transfection Reagent (Invitrogen) für 5 min inkubiert. Danach wurden beide Ansätze vereinigt und weitere 20 min inkubiert. Anschließend wurden die erhaltenen 50  $\mu\text{l}$  des Transfektionsansatzes vorsichtig auf die Zellen pipettiert, so dass sich nun in jedem well ein Gesamtvolumen von 150  $\mu\text{l}$  befand. Nach 4 Stunden wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, um die Zellen bei allzu langer Einwirkung vor toxischen Eigenschaften des Lipofectamin™ 2000 zu schützen.

Dafür wurde der Überstand durch Absaugen entfernt und die Zellen wieder vorsichtig mit frischem Medium überschichtet. Hierbei konnte wieder das sonst zur Kultivierung benutzte komplette MEM-Medium verwendet werden. Nach 24 Stunden weiterer Kultivierung wurde die Aktivität sowohl der Firefly-, als auch der Renilla-Luciferase bestimmt.

### **2.6.9 Bestimmung der Luciferase-Aktivität**

Zur Bestimmung des Einflusses des sich auf der 5'-UTR des ABCC2-Gens befindenden -24C>T SNPs auf die Aktivität des Reportergens Firefly-Luciferase wurde das Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega) verwendet. Das Prinzip dieses Assays beruht auf der Möglichkeit, sequentiell zuerst die Firefly-Luciferaseaktivität der Reportergen-Vektorkonstrukte, anschließend die Renilla-Luciferaseaktivität des internen Standards zu bestimmen. Unter Lichtemission wird bei der Firefly-Luciferasereaktion in Anwesenheit von Sauerstoff,  $Mg^{2+}$ -Ionen und ATP Luciferin zu Oxyluciferin umgesetzt [166]. Bei der Renilla-Luciferasereaktion wird das Substrat Coelenterazin ebenfalls unter Lichtentwicklung decarboxyliert. Die Intensitäten beider Lichtemissionen können luminometrisch bestimmt werden und entsprechen der Aktivität der Enzyme. Die benötigten, sich in diesem Kit befindenden Reagenzien (Passive Lysis-Buffer, Luciferase Assay Reagent II und Stop&Glo®-Reagent) wurden nach Herstellerangaben hergestellt. Dann wurde zunächst von den transfizierten Zellen das Medium abgenommen, mit 30 µl PBS je well gespült und anschließend mit 20 µl je well Lyse-Puffer überschichtet. Nachdem die Zellen 15 min unter leichtem Schwenken bei Raumtemperatur lysiert worden waren, wurde das Zelllysat in Luminometerplatten (Nunclon™ Surface, 96well cell culture plate, white bottom, NUNC, Roskilde, Dänemark) überführt. Anschließend wurden über einen Injektor des Luminometers (Turner Biosystems, Sunnyvale, USA) das Luciferase Assay Reagent II auf das Lysat pipetiert und nach 2 sec. die Firefly-Luciferaseaktivität gemessen. Nach 10 sec. wurde dann durch einen zweiten Injektor die Stop&Glo®-Reagent dazugegeben, wodurch die Firefly-Luciferasereaktion gestoppt, gleichzeitig aber die Renilla-Luciferasereaktion gestartet wurde. Wiederum nach 2 sec. wurde dann die Renilla-Luciferaseaktivität bestimmt. Die Luciferaseaktivitäten wurden zunächst in relative light units (RLU) editiert. Da die Firefly-anschließend auf die Renilla-Luciferaseaktivität normalisiert wurde, wurde die Aktivität der Reportergen-Vektorkonstrukte dann aber als dimensionslose Ratio Firefly/Renilla Luciferaseaktivität angegeben.



### 2.7 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Um den Einfluss des ABCC2 -24C>T Polymorphismus auf die Bindung von Kernproteinen an die DNA zu untersuchen, wurde ein Gel Shift Assay, oder auch Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) durchgeführt. Dies ist eine Methode zur Detektion von DNA-bindenden-Proteinen. Die Methode basiert auf der Tatsache, dass im elektrischen Feld DNA-Protein-Komplexe langsamer durch ein nichtdenaturierendes Polyacrylamidgel wandern als freie DNA-Fragmente. Durch die Verwendung von radioaktiv markierten Sonden, die einen Teil der 5'-UTR des ABCC2-Gens darstellten und die entweder das Wildtyp- oder das Variantenallel enthielten, wurde die Bindung von Kernproteinen in Abhängigkeit zum -24C>T SNP untersucht.

#### 2.7.1 Isolierung von Kernproteinen

HepG2 Zellen wurden auf einer 10 cm Zellkulturschale wie oben beschrieben kultiviert bis sie fast konfluent gewachsen waren. Zunächst wurden nach Absaugen des Mediums gründlich mit auf 37 °C aufgewärmten 1 x PBS gespült. Dann wurden nach Zugabe von 500 µl Lyse-Puffer A, die Zellen auf Eis abgekratzt und in ein Eppendorf-Tube überführt. Es ist zu beachten, dass den Lysepuffern A (10 mM HEPES, pH=7,9 (Sigma), 10 mM KCl (Merck), 0,2 mM EDTA (Merck)) und B (10 mM HEPES, pH=7,9 (Sigma), 0,4 M NaCl (Merck), 0,2 mM EDTA (Merck)) vor Verwendung 1 mM DTT (Amersham, Freiburg, Deutschland), 0,5 mM PMSF (Amersham) und 10 µg/ml Aprotinin (Amersham) frisch zugesetzt werden muss. Dieses Tube wurde 10 sec. gevortext und eine Stunde auf Eis stehen gelassen. Danach wurden die Zellen bei 4 °C im Kühlraum im EppiSchüttler (IKA-Vibrax-VXR, IKA-Werke, Staufen, Deutschland) 5 min. geschüttelt und anschließend ebenfalls bei 4 °C und 4000 rpm zentrifugiert (Centrifuge 5415 R, Eppendorf). Durch diese Schritte wurde die Integrität der Zellmembranen aufgelöst und das Zytosol freigesetzt. Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Pelett in 50 µl Lyse-Puffer B durch Auf- und Abpipettieren homogen resuspendiert. Nun wurde die Probe wieder 15 min. im Eppischüttler bei 4 °C im Kühlraum geschüttelt und anschließend 10 min. bei 13 000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Hierdurch wurde das Kernplasma extrahiert, während die intakte Kernhülle und die genomische DNA zurückbleiben. Der sich nun im Überstand befindende Kernproteinextrakt wurde vorsichtig in ein neues Tube überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -70 °C eingefroren.

### 2.7.1.1 Bestimmung des Proteingehaltes

Zur Protein-Gehalt-Bestimmung des Kernextraktes, der aus HepG2 Zellen isoliert wurde, wurde die Methode nach Bradford [167] angewandt. Die Methode basiert auf der Beobachtung, dass bei Bindung an Proteine sich das Absorptionsmaximum einer Commassie Brilliant Blau G-250 Lösung von 465 nm auf 595 nm verschiebt. Hierzu wurde zunächst eine Standardreihe aus 0,1, 0,2, 0,4, 0,6 µg/µl BSA (bovine serum albumine) hergestellt. Das zuvor 1:50 verdünnte Kernprotein-Isolat und die Standards wurden mit der nach Herstellerangaben verdünnten Färbelösung (Protein Assay, Biorad) zusammengemischt, kurz gevortext und 10 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Setzt man die Absorption der Probe mit der der Standards mittels linearer Regression in Relation, so kann der Protein-Gehalt des isolierten Kernextraktes bestimmt werden.

### 2.7.2 Sonden-Annealing

Um doppelsträngige DNA-Sonden, in diesem Falle zwei 41 bp lange DNA-Fragmente, die der 5'-UTR des ABCC2-Gens entsprachen (Position 131 364 – 131 404, Acc No. AL133353) herzustellen, die entweder das Wildtyp- oder Varianten-Allel des beschriebenen -24C>T SNPs enthielten (Sequenz des jeweiligen 5'-3'-Stranges der Sonden -24C und -24T s. Tab. 21), wurden zunächst zwei entsprechende einzelsträngige Oligonukleotide, sowie deren jeweilig gegenläufige Komplementäre generiert. Die Oligonukleotide (TIB Molbiol) wurden in einem salzhaltigen Puffer (10mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM NaCl (Merck), 1 mM EDTA (Merck)) gelöst und dann Strang und jeweiliger Gegenstrang äquimolar gemischt. Das Hybridisieren, oder auch Annealing, der Oligonukleotide zu den doppelsträngigen DNA-Sonden fand während eines langsamen Abkühlungsprozesses statt. Hierfür wurden die Oligonukleotidmischungen in einen auf 94 °C aufgeheizten Heizblock (Thermomixer compact, Eppendorf) eingestellt, der dann einfach ausgeschaltet wurde. Die DNA-Sonden konnten nach Abkühlung bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert werden.

Durch Stöckel et al. wurde für die Sequenz „TATTAA“ (Position 131 365 - 131 371, Acc. No.: AL133353) eine putative Bindesequenz für BRN2 (Brain-specific factor 2) beschrieben [80], welche auch in den beiden Sonden enthalten war (Position 2-7). Um zu prüfen, ob auch noch andere Proteine an den hergestellten DNA-Sonden binden können, wurden in gleicher, wie oben beschriebener Weise zwei zusätzliche, doppelsträngige DNA-

Sonden generiert, die am 5'-Ende um 5 bzw. 10 bp verkürzte Varianten der Sonde -24C darstellten ( $\Delta_1$ -24C,  $\Delta_2$ -24C, Tab. 21) und somit eine unvollständig Bindestelle für BRN2 aufwiesen.

**Tab. 21:** Name und Sequenz der doppelsträngiger DNA-Sonden nach Annealing der einzelsträngigen Oligonukleotide

Name der DNA-Sonde	5'-3'-Sequenz der doppelsträngigen DNA-Sonde
-24C	5'-ATA TTA ATA GAA GAG TCT TCG TTC CAG ACG CAG TCC AGG AA
-24T	5'-ATA TTA ATA GAA GAG TCT TTG TTC CAG ACG CAG TCC AGG AA
$\Delta_1$ -24C	5'-AAT AGA AGA GTC TTC GTT CCA GAC GCA GTC CAG GAA
$\Delta_2$ -24C	5'- AAG AGT CTT CGT TCC AGA CGC AGT CCA GGA A

### 2.7.3 Sonden-Markierung

Eine Voraussetzung für den Electrophoretic Mobility Shift Assay ist die radioaktive Markierung von DNA-Sonden. Hierfür wurde die Fähigkeit der T4-Polynukleotid-Kinase, das  $\gamma$ -Phosphat von ATP auf die terminale 5'-OH-Gruppe eines DNA-Fragments zu übertragen, ausgenutzt [168], wobei die Kinase und der Puffer des Gel Shift Assay Systems der Firma Promega verwendet wurden. Zusammen mit [ $\gamma$ - $^{32}$ P]-ATP (10 mCi/ml, Amersham) und den oben generierten DNA-Sonden wurden diese in einem sterilen Eppendorftube wie in Tab. 22 dargestellt zusammenpipettiert.

Die Reaktionsansätze wurden dann für 30 min. bei 37 °C inkubiert. Für die spätere Messung der Einbaurrate wurde 1  $\mu$ l je Ansatz mit samt der Pipettenspitze in je ein Szintillationsröhrchen überführt. Danach wurden, um die markierten DNA-Sonden von nicht eingebautem [ $\gamma$ - $^{32}$ P]-ATP und nicht markierten Oligonukleotiden abzutrennen, die Ansätze auf je eine Aufreinigungssäule (MicroSpin™ G-25 Coulmns, Amersham) gegeben und 2 min. bei 2800 rpm zentrifugiert. Die Säulen waren vorher entsprechend den Herstellerangaben durch vortexen und abzentrifugieren des Puffers für die Aufreinigung vorbereitet worden. Nach der Aufreinigung wurde je Eluat wiederum 1  $\mu$ l wie oben beschrieben in je ein Szintillationsröhrchen überführt. Durch Messung der Zerfallsraten im Szintillationsmesser (Liquid Scintillation Conter WALLAC 1409, PerkinElmer Wallac, Freiburg, Deutschland), sowohl vor, als auch nach der Aufreinigung, konnte die Effizienz der Markierung bestimmt

werden. Dabei sollte die Einbaurate zwischen 20 und 30 % liegen. Da bei der späteren Hybridisierungsreaktion mit den Proteinen des Kernextrakt der HepG2-Zellen die DNA-Sonden mit jeweils 30 000 cpm eingesetzt wurden, mussten die aufgereinigten Sonden-Eluate noch auf die entsprechende Anzahl der Zerfälle mit H<sub>2</sub>O bidest. verdünnt werden.

**Tab. 22:** Reaktionsansatz für die Markierung der DNA-Sonden

Reagenzien	Volumina [ $\mu$ l]	Endkonzentration
Aqua bidest.	14	-
Kinase-Puffer (10 x)	2	1x
DNA-Sonde (100 ng / $\mu$ l), -24C bzw. -24T	2	10 ng / $\mu$ l
T4-Polynukleotid-Kinase (10 U/ $\mu$ l)	1	0,5 U / $\mu$ l
[ $\gamma$ - <sup>32</sup> P]-ATP (10 mCi / ml)	1	10 $\mu$ Ci
Endvolumen	20	

### 2.7.4 Inkubation der DNA-Sonden mit dem HepG2-Kernextrakt

Die in 2.7.3 beschriebenen [<sup>32</sup>P]-5'-endmarkierten DNA-Sonden, eingestellt auf 30 000 cpm, wurden mit dem Kernproteinextrakt von HepG2-Zellen inkubiert. Um die Spezifität von DNA-Protein-Bindungen nachzuweisen, wurden zusätzliche Konkurrenzexperimente durchgeführt. Hierbei wurden den Inkubationsansätzen, die generell den unspezifische Kompetitor Poly(dI-dC)•(dI-dC) (Amersham) enthielten, dieselben, aber unmarkierten DNA-Sonden als spezifische Kompetitoren zugesetzt. In der Tabelle 23 sind die verschiedenen Inkubationsansätze, nach der Reihenfolge des Zusammenpipettierens der Einzelkomponenten aufgeführt, wobei der 5x Binding Buffer des Gel Shift Assay Systems® (Promega) zur Anwendung kam. Die Ansätze wurden dann für 30 min. bei 4°C inkubiert, bevor sie dann durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt wurden.

**Tab. 23:** Inkubationsansätze der DNA-Sonden mit dem HepG2-Zellkernextrakt

	Negativ- Kontrolle	Positiv- Kontrollen	Kompetitions- experimente
Reagenzien	Volumina [ $\mu$ l]		
Aqua bidest.	6	5	4
Binding Buffer 5x (Promega®)	2	2	2
Poly(dI-dC)•(dI-dC) (500 ng / $\mu$ l)	1	1	1
HepG2-Kernextrakt (5 $\mu$ g / $\mu$ l)	-	1	1
unmarkierte DNA-Sonde (-24C bzw. -24T), (100 ng / $\mu$ l, 200 ng / $\mu$ l)	-	-	je 1
[ <sup>32</sup> P]-5'-endmarkierte Sonde (30 000 cpm)	1 (-24C)	1 (-24C bzw. -24T)	1 (-24C)
Endvolumen	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l

### 2.7.5 Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Zur Auftrennung nicht gebundener DNA-Sonden von Protein-DNA-Komplexen wurde die vertikale Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese benutzt. Bei Polyacrylamid handelt es sich um ein Polymerisationsprodukt aus Acrylamid und Bisacrylamid, wobei der Vernetzungsgrad und damit die Porengröße abhängig sind von der Acrylamidkonzentration und dem Verhältnis der beiden eingesetzten Monomere. Die Polymerisationsreaktion wird durch APS (Ammoniumpersulfat, Sigma) und TEMED (N, N, N', N',-Tetramethylethylendiamin, Sigma) katalysiert. In diesem Falle wurde ein 4%-iges Polyacrylamid-Gel hergestellt, wobei das Verhältnis Acrylamid / Bisacrylamid 60:1 gewählt wurde. Die zur Gelherstellung verwendeten Komponenten setzten sich bei einem Gesamtvolumen von 30 ml wie folgt zusammen: 3 ml 5 x TBE, 1,13 ml Acrylamid / Bisacrylamid (37,5:1) (40% m/v) (Sigma), 1,88 ml Acrylamid-Lösung (40%) (Sigma), 938  $\mu$ l Glycerin (80% v/v) (Sigma), sowie 24,4 ml H<sub>2</sub>O bidest. . Um die Polymerisationsreaktion zu starten wurden dann 300  $\mu$ l des frisch hergestellten APS (10%) und 25  $\mu$ l TEMED zugesetzt. Das noch flüssige Gel wurde zügig zwischen die beiden Glasplatten gegossen und der Kamm für die Geltaschen blasenfrei eingesetzt. Die Auspolymerisierung fand dann für zwei Stunden bei Raumtemperatur statt. Wenn die Elektrophorese erst am nächsten Tag durchgeführt werden sollte, so konnte das Gel, verpackt in befeuchtete Einmalpapierhandtücher und Frischhaltefolie, über Nacht bei 4 °C gelagert werden. Für die Elektrophorese wurde das Gel vertikal in die Kammer (Multigel-Long, Biometra, Göttingen, Deutschland) eingespannt und diese mit 0,5 x TBE Laufpuffer

befüllt. Die Taschen wurden gründlich mit Laufpuffer gespült. Um die Proben besser einfüllen zu können, wurden die Taschen von außen auf der Glasplatte mit einem Folienstift markiert. Nachdem das Gel eine halbe Stunde bei 250 V vorgelaufen war, konnten die in 2.7.4 erstellten Inkubationsansätze in die Taschen gefüllt werden. Zur Kontrolle der Laufstrecke wurden zusätzlich in eine weitere Tasche 8 µl Blaumarker (BlueJuice™ Gel-Loading Buffer, Invitrogen) pipettiert. Die Elektrophorese wurde dann für 45 min. bei einer Spannung von 170 V durchgeführt.

### **2.7.6 Auswertung des Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)**

Nach Auftrennung der Proben mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde der Gel shift assay durch Autoradiographie ausgewertet. Hierzu wurde nach der Elektrophorese in der Dunkelkammer ein Film (Kodak BioMax, Kodak, Stuttgart) auf das Gel gelegt und für 24-48 Stunden bei -70°C in einer Filmkassette der radioaktiven Strahlung ausgesetzt. Die durch diese Strahlung verursachte Belichtung des Films ergab ein Bandenmuster, das durch anschließende Fotoentwicklung sichtbar gemacht werden konnte.

### **2.8 Berechnung von mRNA-Sekundärstrukturen**

Um die putativen mRNA-Sekundärstrukturen der verschiedenen ABCC2-Haplotypen zu berechnen, wurde der „Mfold“ web-server [169] verwendet. Nach Aufladen der den Haplotypen entsprechenden ABCC2-cDNA-Sequenzen, wurde die Sekundärstruktur der mRNA berechnet. Die Referenzsequenz Acc. No.: NM 000392 wurde hierbei als Grundlage verwendet. Die Struktur mit der geringsten freien Energie wurde als die stabilste und wahrscheinlichste Variante angenommen.

### **2.9 Statistische Methoden**

Es wurde überprüft, ob sich die untersuchte Population im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht befindet. Dieses Gesetz beschreibt den Zusammenhang zwischen Allelfrequenz und Genotypenfrequenz ( $p^2 + 2pq + q^2 = 1$ , wobei p und q die beobachteten Allelfrequenzen der

beiden Allele an einem Gen-Lokus darstellen). Die beobachteten und erwarteten Häufigkeiten wurden dann mittels  $\chi^2$ -Test verglichen.

Zur Untersuchung möglicher Unterschiede in den Genotypenhäufigkeiten zwischen Patienten und Kontrollgruppe wurde ebenfalls der  $\chi^2$ -Test angewandt. Die Odds ratio wurde berechnet, um zu überprüfen, ob der Genotyp ein Risikofaktor für die Erkrankung darstellt. Dabei wurde das Statcalc-Programm (version 6.0) benutzt.

Mit Hilfe des EH-Programms [170] konnte anhand der ermittelten Genotypenhäufigkeiten die Frequenz bestimmter, in der untersuchten Population vorkommender Haplotypen abgeschätzt werden.

Um auf Unterschiede der Expressionen in Abhängigkeit vom Genotyp, des histologischen Subtyps oder des Tumorstadiums zu prüfen, wurden unter Verwendung der Statistik-Software SPSS version 13.0 der Mann-Whitney-U Test und der Kruskal-Wallis-Test angewandt. Der Jonckheere-Terpstra-Test wurde verwendet, um auf einen Trend innerhalb der verschiedenen Genotypen eines SNPs hinsichtlich ihres Einflusses auf die Transporterexpression zu testen.

In dieser Arbeit wurde eine maximale Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% ( $p = 0,05$ ) als Signifikanzgrenze, die als zweiseitige Signifikanz berechnet wurde, angenommen. Lediglich bei multiplem Testen wurde die Bonferroni-Holm-Methode angewandt, wobei sich die Signifikanzgrenze entsprechend der Anzahl der Tests ( $n$ ) nach der Beziehung  $0,05 / n$  verringerte.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Genotypisierung

#### 3.1.1 Verteilung der ABCB1- und ABCC2-Genotypen in Nierenzellkarzinompatienten und in gesunden Probanden

Es wurden die ABCB1-Polymorphismen -2352G>A, -692T>C, 2677G>T/A (Ala893Ser/Thr) und 3435C>T, sowie die ABCC2-Polymorphismen -24C>T, 1249G>A (Val417Ile) und 3972C>T im Tumorgewebe, im angrenzenden, gesunden Gewebe, sowie in den Lymphozyten der gesunden Probanden untersucht.

Alle ermittelten Genotypenfrequenzen befanden sich im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Die Genotypen im Tumorgewebe und angrenzendem gesundem Gewebe waren identisch. Das heißt, dass im Tumorgewebe keine Neumutationen an den entsprechenden Loci nachgewiesen werden konnten. Tabelle 24 zeigt die Allel- und Genotypenverteilungen unter den 82 Nierenzellkarzinompatienten, sowie unter den 164 gesunden Probanden. Die Genotypenverteilung bei Patienten und Kontrollen wiesen keine signifikanten Unterschiede auf. Somit war keiner der untersuchten Polymorphismen ein Risiko-Faktor für die Entstehung des Nierenzellkarzinoms. Auch nach Unterteilung der Patienten-Gruppe in die histologischen Subgruppen der klarzelligen und nicht-klarzelligen Nierenzellkarzinome wurden keine signifikanten Unterschiede gegenüber den gesunden Kontrollen hinsichtlich deren Allel- und Genotypenverteilung gefunden. Beispielsweise betrug die Häufigkeit des ABCB1 3435T-Allels 53,7 % bei den gesunden Probanden, bei Patienten mit klarzelligen Nierenzellkarzinomen 60,3 % ( $p = 0,20$ ) und bei Patienten mit nicht-klarzelligen Nierenzellkarzinomen 47,3 % ( $p = 0,46$ ).

Auffällig war allerdings, dass der Genotyp ABCC2 1249AA bei den Nierenzellkarzinompatienten überhaupt nicht auftrat. Der Vergleich der Allelfrequenzen ergab für 1249A eine Häufigkeit von 15,1 % bei den klarzelligen Nierenkarzinom-Patienten im Gegensatz zu 22,2 % bei den gesunden Probanden, wobei jedoch der Unterschied keine statistische Signifikanz erreichte ( $p = 0,09$ ).



**Tab. 24:** Allel- und Genotypenfrequenzen in 82 Nierenzellkarzinompatienten und 164 gesunden Probanden

Lokus	Allel	Allelfrequenz [%]		Genotyp	Genotypfrequenz [%]		Odds ratio (95% C.I.)	p-Wert
		Pat.	Kontr.		Pat.	Kontr.		
ABCB1								
-2352	G	99,4	99,1	GG	98,8	98,2	0,66 (0,03-7,29)	0,72
	A	0,6	0,9	GA	1,2	1,8		
				AA	0,0	0,0		
-692	T	98,0	97,0	TT	96,3	93,3	0,53 (0,11-2,12)	0,33
	C	2,0	3,0	TC	3,7	6,7		
				CC	0,0	0,0		
2677	G	58,5	54,3	GG	35,4	32,3	0,87 (0,48-1,59)	0,63
	T	39,6	43,6	GT	42,7	41,5		
	A	1,8	2,1	TT	18,3	22,0		
				GA	3,7	2,4		
				TA	0,0	1,8		
				AA	0,0	0,0		
3435	C	42,7	46,3	CC	18,3	22,6	1,3 (0,64-2,69)	0,44
	T	57,3	53,7	CT	48,8	47,6		
				TT	32,9	29,9		
ABCC2								
-24	C	78,0	81,4	CC	64,6	68,9	1,21 (0,67-2,20)	0,50
	T	22,0	18,6	CT	26,8	25,0		
				TT	8,5	6,1		
1249	G	83,5	77,8	GG	67,1	61,6	0,79 (0,43-1,43)	0,40
	A	16,5	22,2	GA	32,9	32,3		
				AA	0,0	6,1		
3972	C	62,8	69,2	CC	41,5	51,2	1,48 (0,84-2,62)	0,15
	T	37,2	30,8	CT	42,7	36,0		
				TT	15,9	12,8		

### 3.1.2 Verteilung der ABCB1- und ABCC2-Haplotypen in Nierenzellkarzinompatienten und in gesunden Probanden

Mittels des EH-Programms [170] war es möglich, die Häufigkeit der durch die ABCB1- bzw. durch die ABCC2- Polymorphismen gebildete Haplotypen in dem Patienten- und in dem Kontrollkollektiv abzuschätzen.

Da die beiden SNPs -2352G>A (Allelfrequenz: 0,6 % bzw. 0,9 %) und -692T>C (Allelfrequenz: 2,0 % bzw. 3,0 %) mit nur geringer Häufigkeit auftraten, wurden sie in die Haplotypenberechnung nicht mit einbezogen. Es konnten bei den Patienten vier und bei den Kontrollen sechs ABCB1-Haplotypen identifiziert werden (Tab. 25). Bei Auswertung der durch das EH-Programm gelieferten Daten zeigte sich ein Linkage disequilibrium der beiden Polymorphismen 2677G>T/A und 3435C>T, dieses betrug bei den gesunden Kontrollen 86%, bei den Patienten 100%. Die Haplotypen H1 (2677G/3435C), H2 (2677G/3435T) und H4 (2677T/3435T) waren dabei die häufigsten und stellten bei den Patienten 98,2 % und bei den gesunden Probanden 91,8% aller Haplotypen. Der Vergleich mittels 12-Felder-Test ergab einen signifikanten Unterschied zwischen Patienten und Kontrollen ( $\chi^2 = 11,63$ ,  $df=5$ ,  $p = 0,04$ ), wobei auffiel, dass der in der gesunden Probandengruppe mit 6,1 % Häufigkeit gefundene Haplotyp H3 (2677T/3435C) bei den Patienten überhaupt nicht auftrat. Diese drei häufigsten ABCB1-Haplotypen (H1, H2 und H4) bildeten in der Patientengruppe sechs Diplotypen: H1/H1 (15,8%), H1/H2 (18,3 %), H1/H4 (29,3%), H4/H4 (18,3 %), H2/H4 (13,4 %) und H2/H2 (1,2 %). Bei den gesunden Probanden war nicht jedem Individuum ein definierter Diplotyp zuzuordnen, da auf Grund der zusätzlich vorkommenden Haplotypen H3 (2677T/3435C) und H6 (2677A/3435T) sich für einige Diplotypen mehrere theoretische Haplotyp-Kombinationen ergaben.

Auch bei der Untersuchung der ABCC2-SNPs zeigte sich eine starke Verlinkung der Polymorphismen -24C>T und 3972C>T. Diese betrug bei den gesunden Kontrollen 92,5%, bei den Patienten 100%. Des Weiteren ergaben die Berechnungen ebenfalls vier Haplotypen bei den Patienten und sechs bei den gesunden Kontrollen (Tab. 25). Der Vergleich der Patienten und der Kontrollen hinsichtlich der ABCC2-Haplotypen-Frequenzen ergab keinen signifikanten Unterschied ( $\chi^2 = 8,55$ ,  $df = 5$ ,  $p = 0,13$ ). Die vier ABCC2-Haplotypen H1 (-24C/1249G/3972C), H3 (-24C/1249A/3972C), H5 (-24C/1249G/3972T) und H6 (-24T/1249G/3972T) bildeten bei den Patienten neun Diplotypen: H1/H1 (23,2 %), H1/H3 (18,3 %), H1/H5 (9,8 %), H3/H6 (4,9 %), H5/H5 (1,2 %), H5/H6 (6,1%), H6/H6 (8,5 %).

Auch hier war bei den gesunden Kontrollen auf Grund der zusätzlichen Haplotypen keine eindeutige Diplotypen-Zuordnung möglich.

**Tab. 25:** Frequenzen der ABCB1- und ABCC2-Haplotypen in 82 Nierenzellkarzinompatienten und 164 gesunden Probanden, berechnet mit dem EH-program [170].

Haplotyp	ABCB1 2677G>A/T	3435C>T	Frequenz [%]	
			Patienten	Kontrollen
H1	G	C	40,9	38,8
H2	G	T	17,7	15,5
H3	T	C	0,0	6,1
H4	T	T	39,6	37,5
H5	A	C	1,8	1,5
H6	A	T	0,0	0,6
$\chi^2 = 11,63, df = 5, p = 0,04$				

Haplotyp	ABCC2 -24C>T	1249G>A	3972C>T	Frequenz [%]	
				Patienten	Kontrollen
H1	C	G	C	45,8	47,0
H2	T	G	C	0,0	1,4
H3	C	A	C	16,4	20,8
H4	T	A	C	0,0	0,0
H5	C	G	T	15,8	12,2
H6	T	G	T	22,0	17,2
H7	C	A	T	0,0	1,4
H8	T	A	T	0,0	0,0
$\chi^2 = 8,55, df = 5, p = 0,13$					

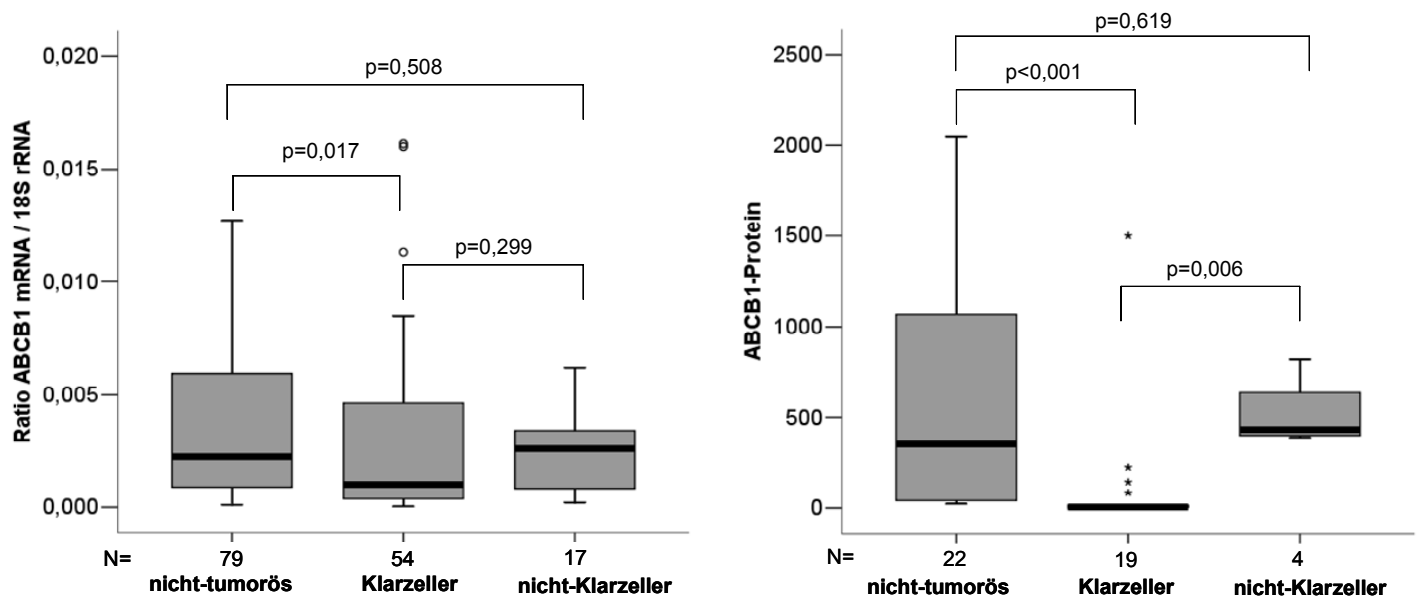
### 3.2 Bestimmung der ABCB1- und ABCC2-Gen-Expression

Nach Umschreiben der Gesamt-RNA-Menge in cDNA wurde deren Gehalt mittels Real-time PCR (TaqMan™-Technologie) bestimmt, wobei eine absolute Quantifizierung durchgeführt wurde. Es konnten in insgesamt 79 nicht-tumorösen und 71 tumorösen kortikalen Nierengewebe die RNA-Menge von ABCB1 und ABCC2, bezogen auf den internen Standard 18S rRNA, das sich gegenüber den anderen „house-keeping“-Genen  $\beta$ -Actin und RPLP0 als am meisten konstitutiv exprimiert erwies, bestimmt werden.

Die Bestimmung des ABCB1- und ABC2-Proteingehaltes wurde mittels Immunhistochemie durchgeführt. Die Quantifizierung der positiven Signale der Antikörperreaktion erfolgte in fünf zufällig ausgewählten Ausschnitten eines jeden Gewebe-Schnittes, aus denen dann der Mittelwert gebildet wurde. Der Proteingehalt wurde in insgesamt 22 nicht-tumorösen und 23 tumorösen kortikalen Nierengewebe bestimmt.

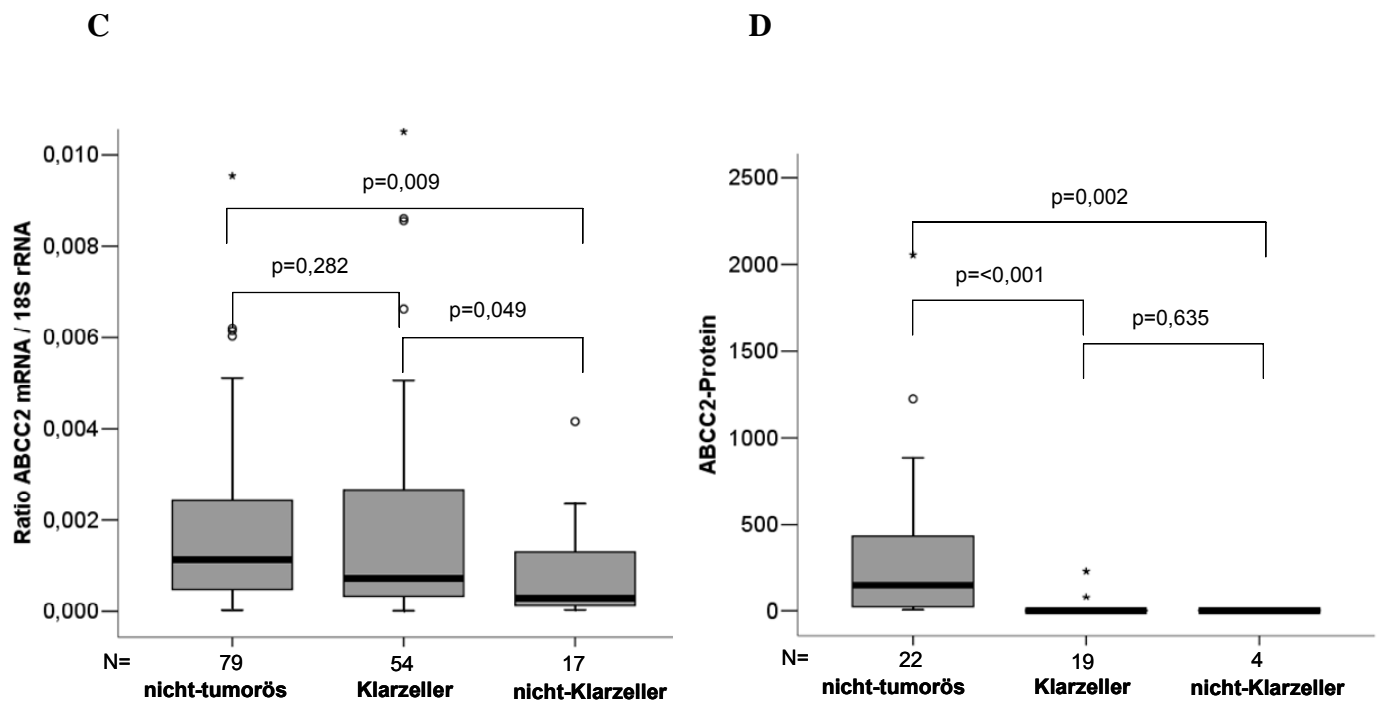
### **3.2.1 Vergleich des nicht-tumorösen und des tumorösen kortikalen Nierengewebes hinsichtlich der ABCB1- und ABCC2-mRNA- und Proteinexpressionen**

Es zeigte sich, dass im nicht-tumorösen Gewebe die Proteine ABCB1 und ABCC2 signifikant höher exprimiert waren, als im tumorösen Gewebe ( $p < 0,001$  bzw.  $p < 0,001$ ). Auf RNA-Ebene konnte dies auch für ABCB1 ( $p = 0,026$ ) und tendenziell auch für ABCC2 ( $p = 0,056$ ) beobachtet werden. Unterteilte man jedoch die Tumorgewebe hinsichtlich ihrer histologischen Subgruppen in klarzellige und nicht-klarzellige Nierenzellkarzinome, so wurde deutlich, dass der ABCB1-Protein-Gehalt um den Faktor 70 im normalen Gewebe höher war als in den klarzelligen Nierenzellkarzinomen (Median: 349,5 vs. 5;  $p < 0,001$ ). Im Gegensatz dazu war in den nicht-klarzelligen Tumoren das ABCB1-Protein auf ähnlichem Niveau exprimiert wie im normalen Gewebe ( $p = 0,62$ ). (Abb. 12 B). Auf RNA-Ebene zeigte sich eine höhere mediane ABCB1-Expression im normalen gegenüber dem klarzelligen Tumorgewebe ( $2,2 \times 10^{-3}$  vs.  $1,0 \times 10^{-3}$ ;  $p = 0,017$ ), wobei nach der Bonferroni-Holm-Methode ein p-Wert von 0,016 als Signifikanzgrenze angenommen wurde. Demgegenüber waren die RNA-Expressionsunterschiede zwischen normalem und nicht-klarzelligem Nierenzellkarzinomgewebe nicht signifikant ( $p = 0,508$ ) (Abb. 12 A).



**Abb. 12:** Relative ABCB1-mRNA-Expression (A) und ABCB1-Proteingehalt (B) im nicht-tumorösen und im Tumorgewebe, das in klarzelliges und nicht-klarzelliges Nierenzellkarzinomgewebe unterteilt wurde (p-Werte durch Mann-Whintney U Test berechnet).

Im Gegensatz dazu unterschieden sich die ABCC2-Proteinmengen im klarzelligen und im nicht-klarzelligen Nierenzellkarzinomgewebe nicht voneinander ( $p = 0,635$ ). Beide waren signifikant niedriger exprimiert als im nicht-tumorösen Gewebe (klarzellig:  $p<0,001$ ; nicht-klarzellig:  $p = 0,002$ ) (Abb. 13 B). Auf mRNA-Ebene wies das normale Gewebe eine signifikant höhere ABCC2-Expression als im nicht-klarzelligen Nierengewebe ( $p = 0,009$ ) auf, während gegenüber dem klarzelligen Tumorgewebe kein signifikanter mRNA-Expressionsunterschied zu beobachten war ( $p = 0,282$ ) (Abb. 13 A).

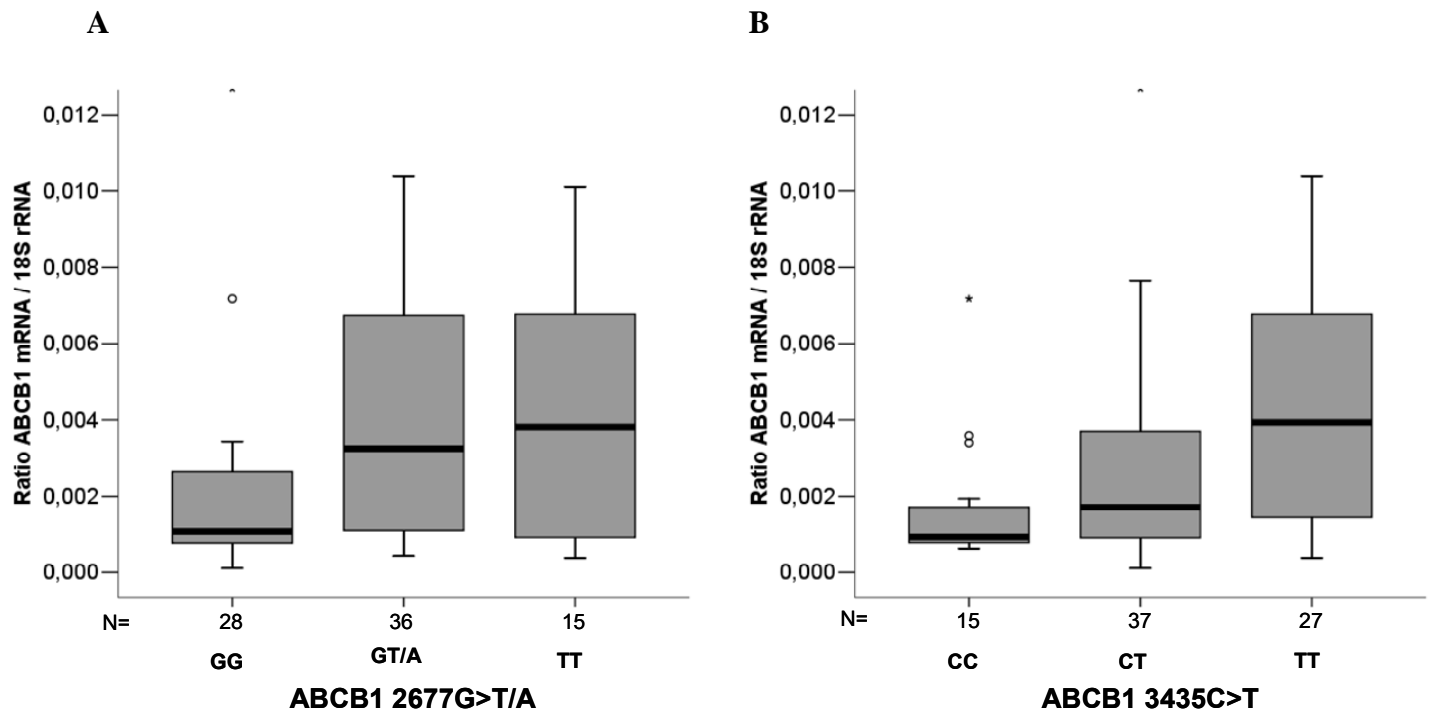


**Abb. 13:** Relative ABCC2-mRNA-Expression (**A**) und ABCC2 Protein-Gehalt (**B**), im nicht-tumorösen und im Tumorgewebe, das in klarzelliges und nicht-klarzelliges Nierenzellkarzinomgewebe unterteilt wurde (p-Werte durch Mann-Whintney U Test berechnet).

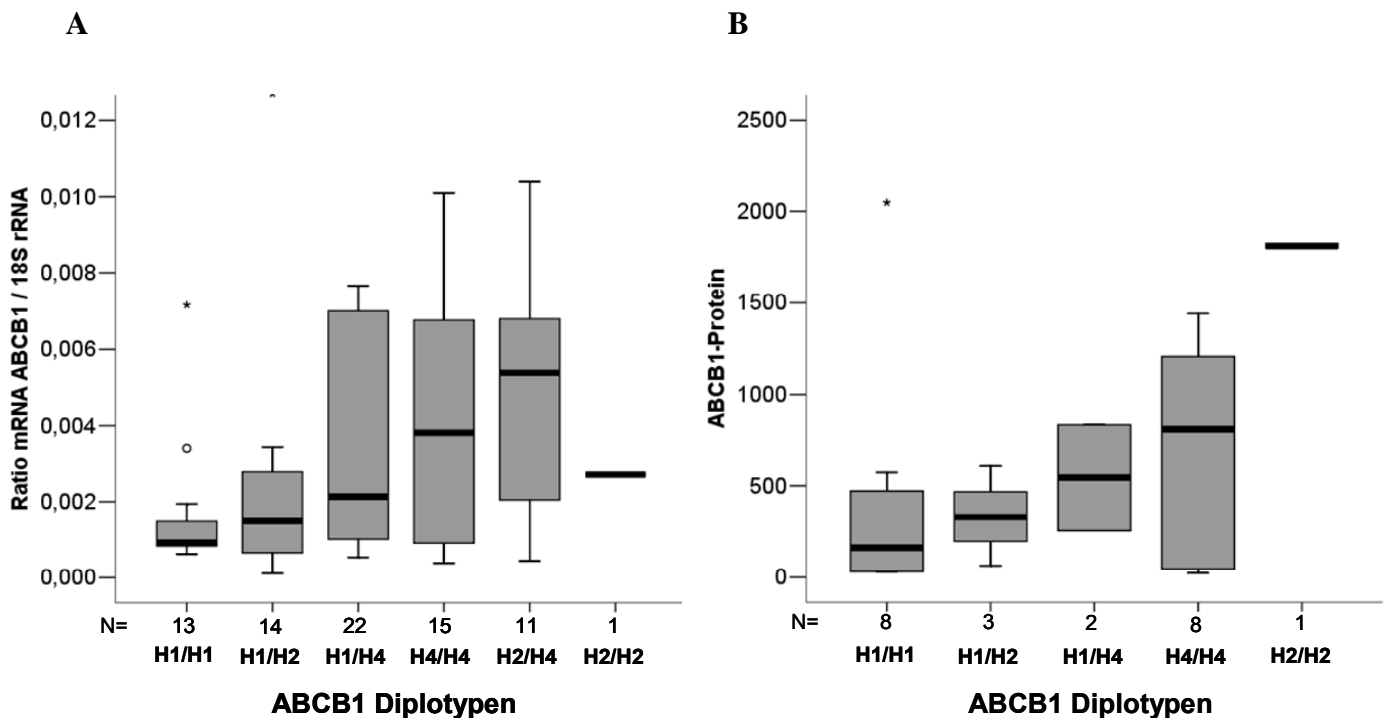
### 3.2.2 Untersuchung des Einflusses der ABCB1- und ABCC2-Polymorphismen auf die Transporterexpression

Bei der Betrachtung der ABCB1-mRNA-Expressionen im nicht-tumorösen kortikalen Nierengewebe zeigte sich ein signifikanter Einfluss sowohl des 2677G>T/A als auch des 3435C>T Polymorphismus. Gewebeproben, die mindestens ein 2677T/A-Allel aufwiesen, zeigten gegenüber den homozygoten 2677G-Proben höhere mediane ABCB1-mRNA-Expressionen. (2677GG:  $1,06 \times 10^{-3}$ , 2677GT/A:  $3,25 \times 10^{-3}$ , 2677TT:  $3,81 \times 10^{-3}$ ;  $p = 0,023$ , Kruskal-Wallis Test,  $p = 0,012$ , Jonckheere-Terpstra-Test) (Abb. 14 A). Ebenso zeigten Varianten-Allel-Träger des 3434C>T Polymorphismus signifikant erhöhte mediane ABCB1-mRNA-Expressionen gegenüber den homozygoten 3435C-Allelträgern (3435CC:  $0,935 \times 10^{-3}$ , 3435CT:  $1,71 \times 10^{-3}$ , 3435TT:  $3,93 \times 10^{-3}$ ;  $p = 0,043$ , Kruskal-Wallis Test,  $p = 0,017$  Jonckheere-Terpstra-Test) (Abb. 14 B). Berücksichtigte man die drei häufigsten ABCB1-Haplotypen H1 (2677G/3435C), H2 (2677G/3435T) und H4 (2677T/3435T) und die sich daraus ergebenden Diplotypen, so zeigten die Diplotypen H1/H4 ( $p = 0,044$ ), H4/H4 ( $p = 0,134$ ) und H2/H4 ( $p = 0,01$ ) (Mann-Whitney-U Test) tendenziell erhöhte mRNA-Expressionen gegenüber H1/H1, wobei für das Multiple Testen eine Signifikanzgrenze von  $p = 0,008$  angenommen wurde ( $p = 0,11$ , Kruskal-Wallis Test,  $p = 0,005$  Jonckheere-Terpstra-

Test) (Abb. 15 A). Ein Einfluss der beiden ABCB1-Polymorphismen auf den ABCB1-Protein-Gehalt in nicht-tumorösen Geweben war jedoch nicht zu erkennen. Auch die ABCB1-Diplotypen beeinflussten den Proteingehalt im nicht vom Tumor befallenen Gewebe nicht ( $p = 0,46$ ; Kruskal-Wallis Test) (Abb. 15 B). In den tumorösen kortikalen Nierengewebe war weder auf mRNA-, noch auf Proteinebene ein Einfluss der beiden Polymorphismen 2677G>T/A und 3435C>T zu beobachten.



**Abb. 14:** **A** Relative ABCB1-mRNA-Expression in Abhängigkeit von den Genotypen 2677G>T/A ( $p = 0,023$ ) und **B** 3435C>T ( $p = 0,043$ ) (Kruskal-Wallis Test) im nicht-tumorösen kortikalen Nierengewebe.



**Abb. 15:** **A** Relative ABCB1-mRNA-Expression ( $p = 0,067$ ) und **B** ABCB1-Protein-Gehalt ( $p = 0,46$ ) (Kruskal-Wallis Test) in Abhängigkeit von den ABCB1-Diplotypen im nicht-tumorösen kortikalen Nierengewebe.

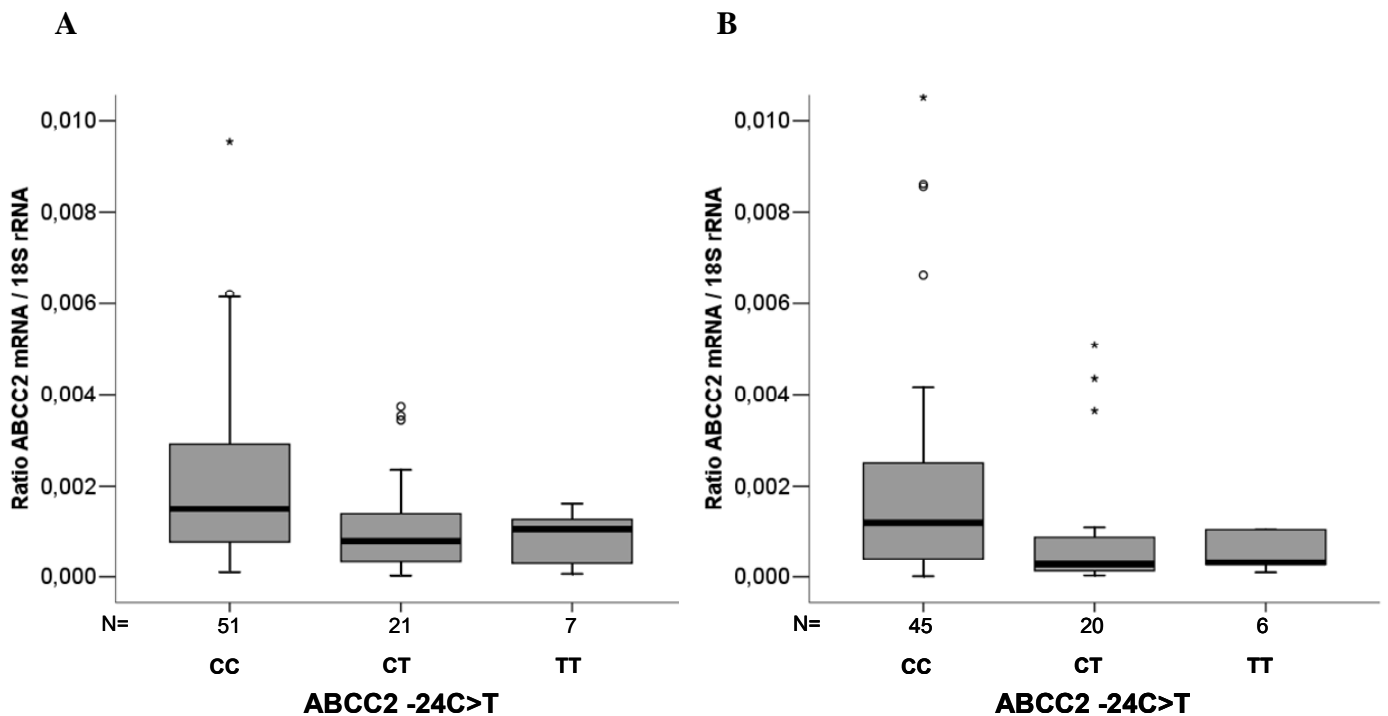
Im nicht-tumorösen kortikalen Nierengewebe zeigte der Polymorphismus ABCC2 -24C>T, nicht aber die SNPs 1249G>A und 3972C>T, einen signifikanten Einfluss auf die mRNA-Expression. Homozygote -24C-Allel-Träger wiesen um den Faktor 1,91 bzw. 1,43 höhere mediane ABCC2-mRNA-Expressionen auf als heterozygote bzw. homozygote -24T-Allelträger ( $p = 0,032$ , Kruskal-Wallis Test,  $p = 0,01$  Jonckheere-Terpstra-Test) (Abb. 16 A). Im Tumorgewebe war dieser Einfluss des -24C>T SNPs auf mRNA-Ebene tendenziell ebenfalls zu sehen ( $p = 0,058$ , Kruskal-Wallis Test,  $p = 0,026$ , Jonckheere-Terpstra-Test) (Abb. 16 B). Bei Unterteilung in die histologischen Subgruppen war dieser Einfluss allerdings ausgeprägter bei den nicht-klarzelligen ( $p = 0,035$  Kruskal-Wallis Test;  $p = 0,035$  Jonckheere-Terpstra-Test) als bei den klarzelligen Nierenzellkarzinomen ( $p = 0,29$ ,  $p = 0,132$  Jonckheere-Terpstra-Test). Die Polymorphismen 1249G>A und 3972C>T zeigten auch im Tumorgewebe keine Assoziation zur mRNA-Expression.

Auf Proteinebene war weder im nicht-tumorösen, noch im Tumorgewebe ein Einfluss der ABCC2- Polymorphismen zu beobachten.

Die ABCC2-Diplotypen H1/H1 (-24C/1249G/3972C)/(-24C/1249G/3972C) zeigten gegenüber H6/H6 (-24T/1249G/3972T)/(-24T/1249G/3972T) im nicht-tumorösen Gewebe tendenziell höhere mRNA-Expressionen ( $p = 0,053$ , Mann-Whitney U Test). Darüber hinaus

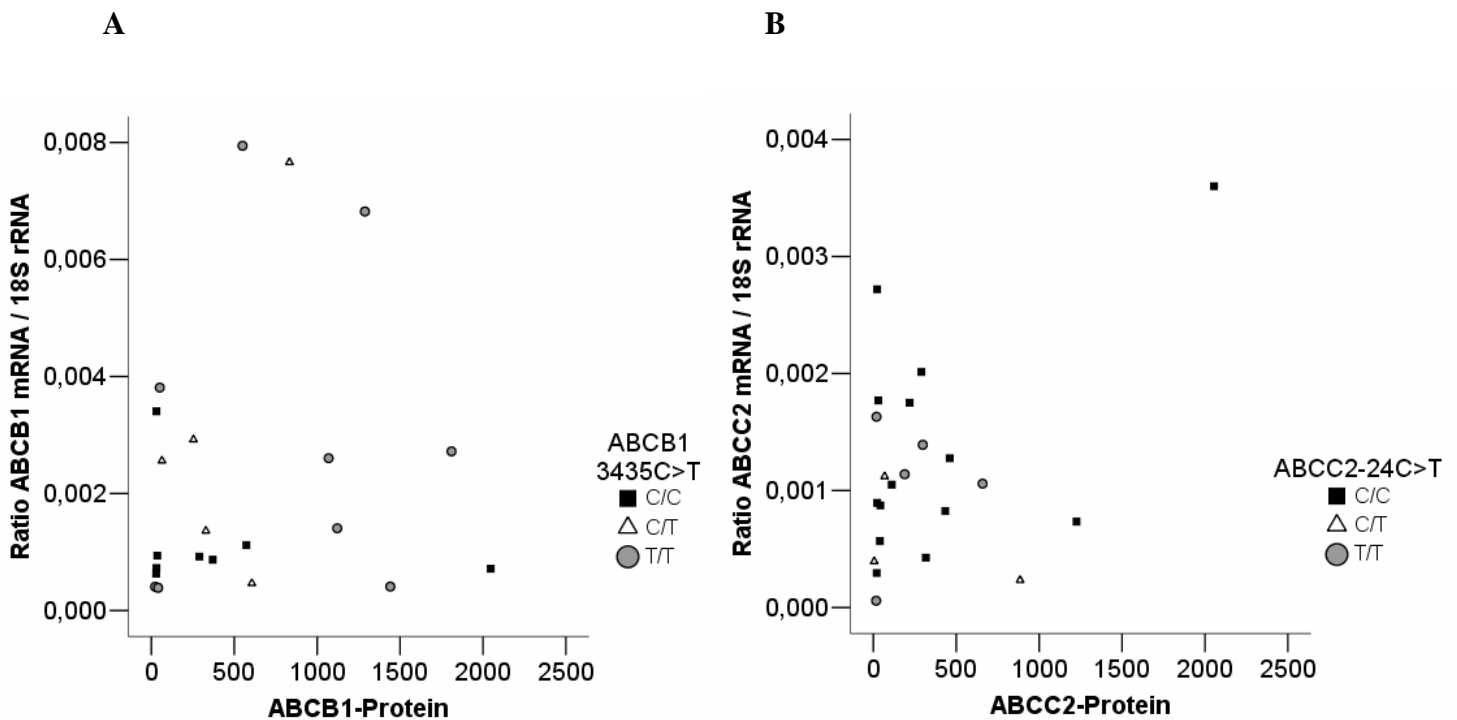


waren die übrigen ABCC2-Diplotypen weder auf Protein noch auf mRNA-Ebene, sowohl im normalen, als auch im tumorösen Gewebe, mit der Transporterexpression assoziiert.



**Abb. 16:** **A** Relative-ABCC2 mRNA-Expression in Abhängigkeit vom Genotyp -24C>T im nicht-tumorösen ( $p = 0,032$ ) und **B** im Tumorgewebe ( $p = 0,058$ ) (Kruskal-Wallis Test).

Generell waren die mRNA- und die Proteinexpressionen beider Gene, sowohl im nicht-tumorösen (ABCB1:  $r=0,142$ ,  $p = 0,528$ ; ABCC2:  $r=0,407$ ,  $p = 0,06$ ) (Abb. 17 A und B), als auch im Tumorgewebe (ABCB1:  $r=0,275$ ,  $p = 0,215$ ; ABCC2:  $r=0,148$ ,  $p = 0,511$ ) nicht miteinander korreliert. Auch die Genotypen-Unterteilung der Expressionsdaten zeigte für keinen Genotyp eine Korrelation der mRNA- Expression mit dem Protein-Gehalt.



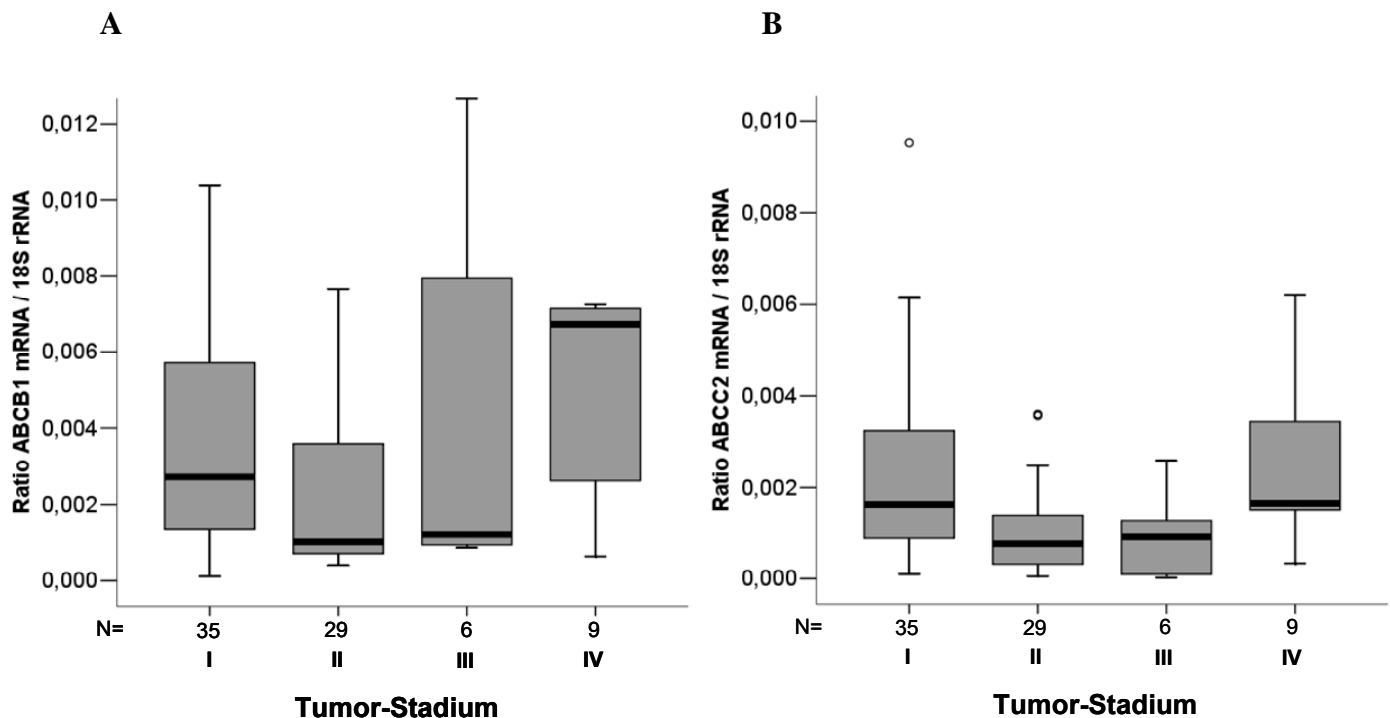
**Abb. 17:** **A** Korrelation der relativen ABCB1-mRNA-Expression und des ABCB1-Protein-Gehalts ( $r=0,142$ ,  $p=0,528$ ) und **B** Korrelation der relativen ABCC2-mRNA-Expression und des ABCC2-Proteins-Gehaltes ( $r=0,407$ ,  $p = 0,06$ ) im nicht-tumorösen kortikalen Nierengewebe.

### 3.2.3 Untersuchung des Einflusses des Tumorstadiums und der Chemotherapie auf die Transporterexpression

Die ABCB1- und ABCC2-mRNA-Expressionen im nicht-tumorösen Gewebe unterschieden sich signifikant in Abhängigkeit vom Tumorstadium (ABCB1:  $p = 0,049$ , ABCC2:  $p = 0,004$ ; Kruskal-Wallis Test) (Abb. 18 A und B), nicht aber im Tumorgewebe. Die Tumorstadien I und IV zeigten höhere mediane Expressionen als die Stadien 2 und 3. Zwischen Tumorstadium und dem ABCB1- und ABCC2 Protein-Gehalt war jedoch, weder im normalen, noch im Tumorgewebe, keine Assoziation zu beobachten.

Eine im Abstand von mindestens 6 Monaten zur Nephrektomie durchgeführte Chemotherapie beeinflusste die ABCB1 und ABCC2-Expression, sowohl im nicht-tumorösen, als auch im Tumorgewebe, weder auf mRNA-, noch auf Proteinebene.

Auch der Raucherstatus spielte für die Transporterexpressionen keine Rolle.



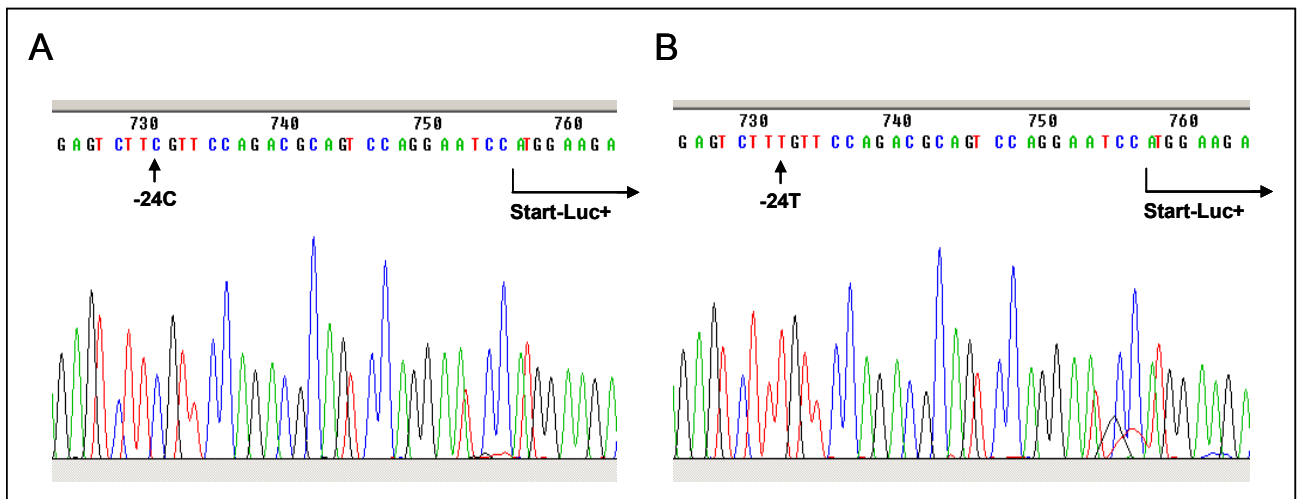
**Abb. 18:** **A** Relative ABCB1-mRNA-Expression ( $p = 0,049$ ) und **B** relative ABCC2-mRNA-Expression ( $p=0,004$ ) (Kruskal-Wallis Test) in Abhängigkeit zum Tumorstadium im nicht-tumorösen kortikalen Nierengewebe.

### 3.3 Untersuchung des funktionellen Einflusses des ABCC2 -24C>T Polymorphismus mittels Reporter-gen-Assay

#### 3.3.1 Herstellung von Reporter-gen-Vektorkonstrukten

Um unterschiedliche Promoteraktivitäten bestimmen zu können, wurde der pGL3-basic Vektor zur Herstellung von Reporter-gen-Vektorkonstrukten verwendet. Da in diesem das Reporter-gen ohne 5'-regulatorische Elemente enthalten ist, ist die Aktivität des Reporter-gens, hier der Firefly-Luciferase, abhängig von der davor eingefügten Promotersequenz. Ausgehend von genomischer DNA als Template wurden mittels PCR und flankierender Primer 1229 bp der 5'-UTR des ABCC2-Gens amplifiziert. Es wurden unterschiedliche Rückwärtsprimer eingesetzt, die entweder ein C-Allel oder ein T-Allel an der Position trugen, die den -24C>T Polymorphismus repräsentieren, so dass ein Wildtyp- und ein Varianten-PCR-Produkt erhalten wurde. Durch die Primer wurden in die Amplifikate am 5'-Ende für Kpn I und am 3'-Ende für Nco I Schnittstellen eingeführt. Die Amplifikate konnten dann nach Restriktion entsprechend der entstandenen Überhänge in der geeigneten Orientierung in den ebenfalls mit diesen Restriktionsenzymen linearisierten pGL3-basic Vektor in der Weise vor das

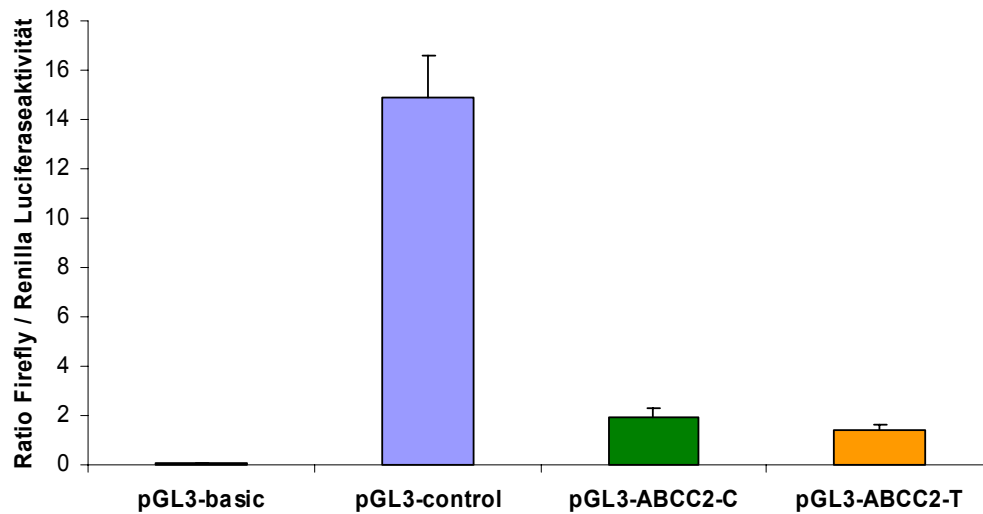
Luciferase-Gen ligiert werden, dass das initiale Start-ATG des ABCC2-Gens dem des Reportergens entsprach. Durch die Nco I-Schnittstelle bedingt wurde vor dem Start-ATG ein zusätzliches Cytidin eingefügt, so dass im Reporter-gen-Vektorkonstrukt der -24C>T SNP an Position -25 lokalisiert ist. Nach Vermehrung der Plasmide in kompetenten E. coli Zellen wurde die Richtigkeit der Vektorkonstrukte durch Kontrollsequenzierung bestätigt (Abb. 19 A und B).



**Abb. 19:** Kontrollsequenzierungen der Plasmid-DNA der Reporter-gen-Vektorkonstrukte **A** pGL3-ABCC2-C und **B** pGL3-ABCC2-T.

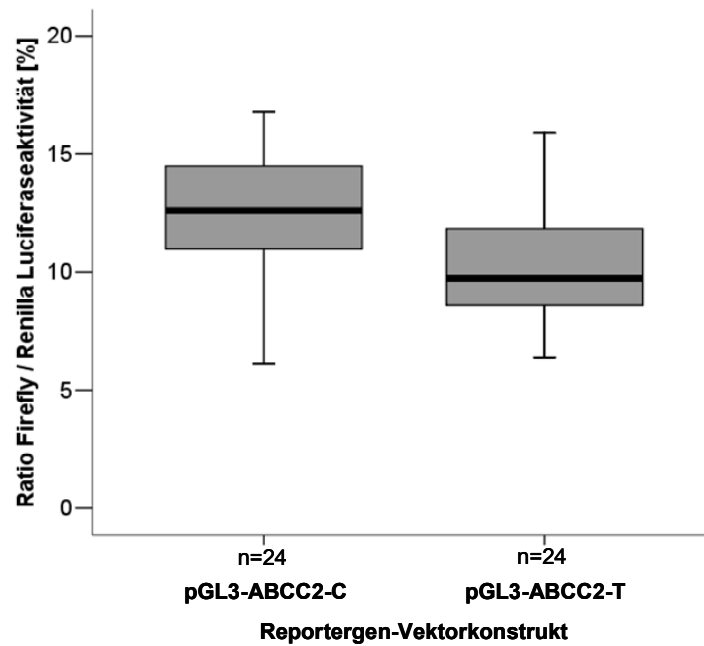
### 3.3.2 Luciferaseaktivität in Abhängigkeit vom ABCC2 -24C>T Polymorphismus

Zur Bestimmung der Luciferase-Aktivität wurden je well 0,1 µg des Vektorkonstrukts (pGL3-ABCC2-C bzw. pGL3-ABCC2-T), sowie zum Abgleich eventuell unterschiedlicher Transfektionseffizienzen 0,02 µg phRL-TK-Vektor als interner Standard transient in subkonfluent gewachsene HepG2-Zellen cotransfiziert. Nach 24 Stunden wurde mittels des Dual-Luciferase® Assay Systems von Promega sowohl die Aktivität der Firefly-Luciferase, als auch die der Renilla-Luciferase, auf die normalisiert wurde, luminometrisch bestimmt. Um die Abhängigkeit der Luciferaseaktivität von der davor klonierten 5'-UTR des ABCC2-Gens nachzuweisen, wurden zusätzlich der pGL3-basic und der pGL3-control Vektor, bei dem das Firefly-Luciferase-Gen unter Kontrolle des Simian Virus (SV40)-Promoters steht, ebenfalls zusammen mit dem internen Standard in HepG2-Zellen cotransfiziert und in gleicher Weise die Luciferase-Aktivitäten gemessen (Abb. 20).



**Abb. 20:** Relative Luciferase-Aktivitäten des pGL3-basic Vektors, des pGL3-control Vektors (n= 4 Transfektionen) und der Vektorkonstrukte pGL3-ABCC2-C, sowie pGL3-ABCC2-T (n= 8 Transfektionen) in HepG2-Zellen. Eines von 3 repräsentativen Experimenten.

Es wurden drei identische Experimente mit je 8 Transfektionen durchgeführt. Um alle drei Experimente miteinander vergleichen zu können, wurden die gemessenen Aktivitäten eines jeden Experiments in Relation zu den jeweiligen Aktivitäten des pGL3-control Vektors gesetzt. Dieser Wert wurde willkürlich als 100% angenommen. Die Messungen ergaben für das pGL3-ABCC2-C-Konstrukt eine um den Faktor 1,23 erhöhte mittlere Luciferaseaktivität gegenüber dem pGL3-ABCC2-T-Konstrukt (12,66 +/- 2,66 % vs. 10,3 +/- 2,53 %,  $p = 0,003$ , Mann-Whitney U Test) (Abb. 21). Diese Ergebnisse deuten auf einen Einfluss des -24C>T Polymorphismus auf die Regulation des ABCC2-Gens hin.



**Abb. 21:** Relative Luciferaseaktivitäten der Vektorkonstrukte pGL3-ABCC2-C und pGL3-ABCC2-T, bezogen auf die Aktivität des pGL3-control Vektors in HepG2-Zellen ( $p = 0.003$ , Mann-Whitney-U Test).

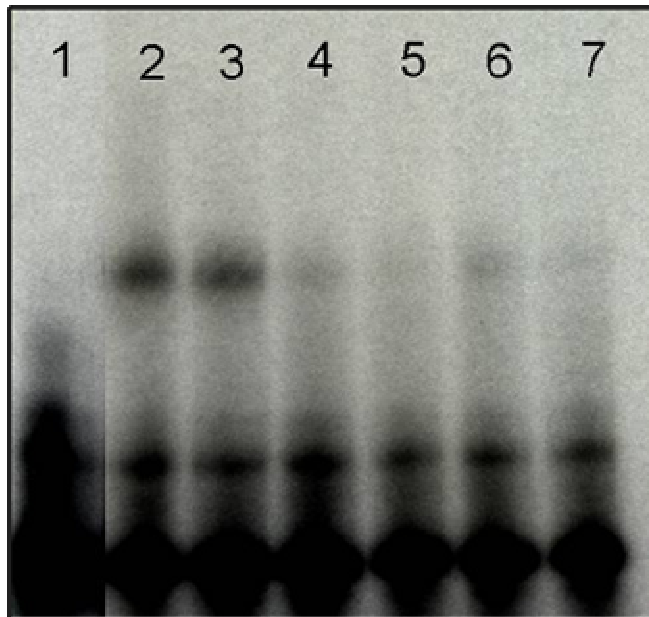
### 3.4 Untersuchung des Einflusses des ABCC2 -24C>T Polymorphismus auf DNA-Protein-Interaktionen mittels Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Um einen möglichen Einfluss des ABCC2 -24C>T Polymorphismus auf die Aktivität von DNA-Protein-Bindungen zu untersuchen, wurde ein Gel shift assay oder auch Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) durchgeführt. Dabei wurden die Proteine eines HepG2-Kern-Extrakts mit [ $^{32}$ P]-5'-endmarkierten DNA-Sonden, die 41 bp der 5'-UTR des ABCC2-Gens repräsentierten und entweder ein C-Allel oder ein T-Allel an der Position -24C>T enthielten, inkubiert. Um spezifische DNA-Protein-Bindungen nachzuweisen, wurden zusätzlich Konkurrenzexperimente mit unmarkierten Sonden durchgeführt. Des Weiteren wurden Deletionsvarianten der DNA-Sonden verwendet, bei denen die Bindungsstelle für BRN2 verloren gegangen war, die von Stöckel et al. [80] beschrieben wurde und sich ebenfalls auf den 41 bp-Sonden befand (TATTAA, Position 2-7).

Mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese konnten die DNA-Protein-Komplexe dann von ungebundenen DNA-Sonden getrennt werden. Die Auswertung des Gel Shift Assays erfolgte durch Autoradiographie. Die Auswertung des Bandenmusters zeigt sowohl für die -24C als auch für die -24T-Sonde eine spezifische Proteinbindung. Diese Proteinbindung zeigt aber keine Abhängigkeit zum -24C>T Polymorphismus (Abb. 22).

### 3 Ergebnisse

Bahn	1	2	3	4	5	6	7
Experiment	Kontrollen			Kompetition			
	negativ	positiv					
Kernextrakt	-	1 µg	1 µg	1 µg	1 µg	1 µg	1 µg
[ <sup>32</sup> P]-Sonde	-24C	-24T	-24C	-24C	-24C	-24C	-24C
Sonde, unmarkiert	-	-	-	-24C (10 ng / µl)	-24C (20 ng / µl)	-24T (10 ng / µl)	-24T (20 ng / µl)



**DNA-Sonde-Protein-Komplex**

**unspezifische Protein-Bindung**

**ungebundene DNA-Sonde**

**Abb. 22:** Autoradiogramm des Electrophoretic Mobility Shift Assays. **Bahn 1:** Negativkontrolle. **Bahn 2 und 3:** Positivkontrollen, zeigen sowohl für die -24T als auch für -24C-Sonde eine DNA-Protein-Bindung. Banden 4 bis 7: Kompetitionsexperimente zum Nachweis der spezifischen DNA-Protein-Interaktion, **Bahn 4 und 5:** spezifische Kompetition der markierten -24C-Sonde mit 10 bzw. 20 ng / µl der unmarkierten -24C-Sonde, **Bahn 6 und 7:** spezifische Kompetition der markierten -24C-Sonde mit 10 bzw. 20 ng / µl der unmarkierter -24T-Sonde.

Die Deletionsvarianten der DNA-Sonden, die keine intakte Bindesequenz mehr für das putative BRN2-cis-Element [80] (TATTAA, Position 2-7) besaßen, zeigten einen Verlust der Proteinbindung, was auf eine DNA-Protein-Interaktion dieses Transkriptionsfaktors an dieser Sequenz schließen lässt (Abb. 23).

Bahn	1	2	3	4	5
Experiment	Kontrollen		Deletion		
	negativ	positiv			
Kernextrakt	-	1 µg	1 µg	1 µg	1 µg
[ <sup>32</sup> P]-Sonde	-24C	-24T	-24C	Δ <sub>1</sub> -24C	Δ <sub>2</sub> -24C
Sonde, unmarkiert	-	-	-	-	-



DNA-Sonde-Protein-Komplex

unspezifische Protein-Bindung  
ungebundene DNA-Sonde

**Abb. 23:** Autoradiogramm des Electrophoretic Mobility Shift Assays. **Bahn 1:** Negativkontrolle. **Bahn 2 und 3:** Positivkontrollen, zeigen sowohl für die -24T als auch für -24C-Sonde eine DNA-Protein-Bindung. **Bahn 4 und 5:** -5 bzw. -10 bp-Deletionsvarianten der markierten Sonden zeigen keine DNA-Protein-Bindung.

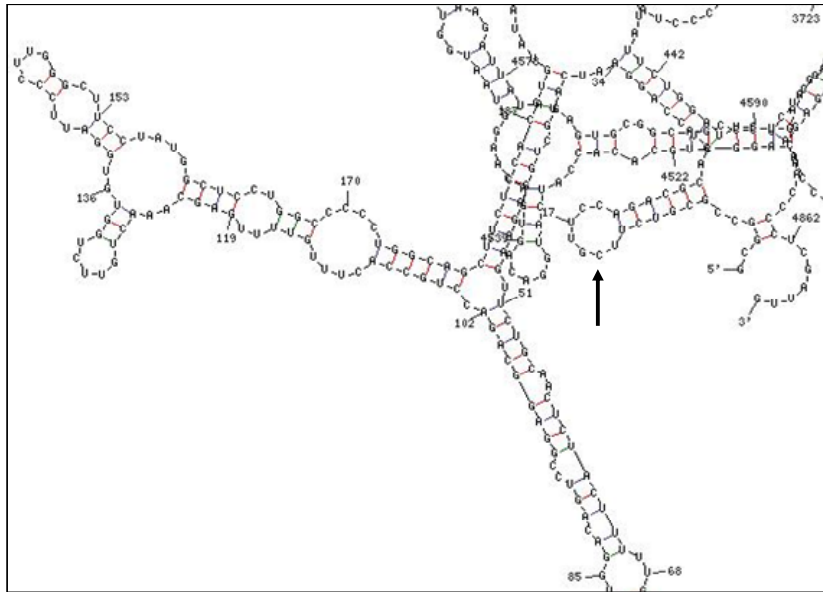
### 3.5 Berechnung der mRNA-Sekundärstruktur der ABCC2-Haplotypen

Mittels des „Mfold“ web-servers [169] wurden die putativen mRNA-Sekundärstrukturen der sechs in den Kontrollen vorgekommenen Haplotypen H1 (-24C/1249G/3972C), H2 (-24T/1249G/3972C), H3 (-24C/1249A/3972C), H5 (-24C/1249G/3972T), H6 (-24T/1249G/3972T) und H7 (-24C/1249A/3972T) ermittelt, wobei den Berechnungen die mRNA-Referenzsequenz Acc. No.: NM 000392 zu Grunde lag. Alle Haplotypen wiesen die gleiche mRNA-Sekundärstruktur mit einer freien Energie von -5926,30 kJ / mol auf. Der ABCC2 -24C>T Polymorphismus lag dabei in einem Hairpin-Loop in der Nähe des 5'-Endes der mRNA. Die Abbildungen 24 A und B zeigen ausschnittsweise die Sekundärstrukturen der beiden Haplotypen H1 und H2, die sich durch

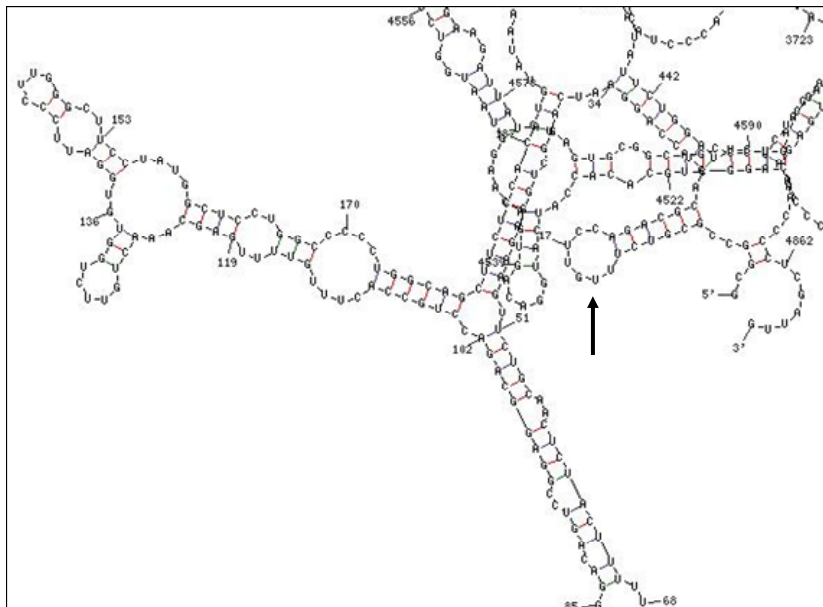


den Basenaustausch -24C>T unterscheiden, der hier an Position 14 (C>U) der mRNA lokalisiert ist.

**A**



**B**



**Abb. 24:** Ausschnitt der mRNA-Sekundärstruktur der Haplotypen **A** H1 und **B** H2. Die Pfeile markieren den ABCC2 -24C>T SNP, der sich in einem Hairpin-Loop in der Nähe des 5'-Endes der mRNA befindet.

### 4 Diskussion

Die Beobachtung interindividuell differierender Plasmaspiegel eines Arzneistoffes und das damit einhergehende unterschiedliche Ansprechen auf eine Arzneimitteltherapie bzw. das interindividuell unterschiedliche Auftreten von Nebenwirkungen kann zum Teil durch genetische Polymorphismen, die zu unterschiedlich ausgeprägten Aktivitäten der am Metabolismus beteiligten Enzyme führen, erklärt werden [1]. Neben den Enzymen des Phase I- und Phase II- Metabolismus sind aber auch Transportproteine, die den Stoff-Übertritt durch Biomembranen der verschiedenen Kompartimente des Körpers steuern, an der Absorption, Verteilung und Elimination endogener wie exogener Substanzen beteiligt. Auf Grund ihrer Lokalisation und ihres breiten Substratspektrums stellen für die Prozesse der Absorption und der Elimination vor allem die auswärts gerichteten ABC-Transporter ABCB1 und ABCC2 wichtige Parameter für die Bioverfügbarkeit von Arzneistoffen, aber auch für die Abwehr von potentiell toxischen oder karzinogenen Fremdstoffen dar. Da diese Transporter ebenfalls interindividuell hohe Variabilitäten in ihrer Expression aufweisen [2], stellt sich die Frage, ob diese Variabilität auch durch genetische Polymorphismen verursacht wird und ob diese auf Grund unterschiedlicher Transportaktivitäten zur Klärung interindividueller Unterschiede in der Bioverfügbarkeit von Arzneistoffen, aber auch der Toxizität von Fremdstoffen beitragen können.

In den letzten Jahren wurden zahlreiche Studien durchgeführt, in deren Fokus vor allem Untersuchungen zur funktionellen Bedeutung von Polymorphismen des ABCB1-Transporters standen. Obwohl nicht völlig konsistent, so zeigten doch einige Ergebnisse einen Zusammenhang zwischen genetischen Polymorphismen und der Funktion des Transportproteins. Nachdem für den synonymen 3435C>T Polymorphismus erhöhte Digoxin-Plasmaspiegel, sowie verringerte intestinale ABCB1-Protein-Expressionen beschrieben wurden [3], wurden vor allem dieser und der stark mit diesem verlinkte 2677G>T/A Basenasustausch, der zu einem Aminosäureaustausch an der Position 893 des Proteins von Alanin zu Threonin bzw. Serin führt, hinsichtlich ihrer funktionellen Bedeutung untersucht. Dabei wurde der Einfluss dieser genetischen Varianten auf die mRNA, sowie Proteinexpression in verschiedenen Geweben, auf die Bioverfügbarkeit von Arzneistoffen, auf das Therapieansprechen und auf die Suszeptibilität für Krankheiten beleuchtet [9, 108, 171]. Einige Studien zeigten eine Assoziation des ABCB1-Transporters in Abhängigkeit vom 3435C>T Polymorphismus für das Auftreten von Erkrankungen wie Colitis Ulcerosa [123,

172, 173], frühzeitigem Auftreten der Parkinson'schen Erkrankung [95], Parkinsonismus nach Exposition mit Pestiziden [124], sowie dem Auftreten einer Ciclosporin-induzierten Nephrotoxizität nach Nierentransplantation, wenn der Spender den ABCB1 3435TT-Genotyp trug [174]. Eine weitere, kürzlich von Siegmund et al. publizierte Assoziationsstudie beschrieb einen weiteren, außerordentlich interessanten Befund. Nach Genotypisierung von 50 Patienten, die an einem nicht-klarzelligen Nierenzellkarzinom erkrankt waren, konnte lediglich ein Patient als homozygoter 3435C-Allelträger identifiziert werden, während alle anderen Patienten mindestens ein T-Allel aufwiesen. Dabei errechneten die Autoren für das 3435T-Allel gegenüber dem C-Allel eine Odds Ratio von 2,3 ( $p = 0,0005$ ). Beim Vergleich der homozygoten Varianten- gegenüber den homozygoten Wildtypallel-Trägern ergab sich sogar für den Genotyp 3435TT ein noch drastischere Erhöhung des Risikos an einem nicht-klarzelligen Nierenzellkarzinoms zu erkranken. (Odds Ratio: 21,7;  $p < 0,0001$ ) [4].

Auf Grund dieser Assoziationsstudien in Zusammenhang mit der Entstehung bestimmter Erkrankungen, und der durch Siegmund et al. gefundenen außerordentlichen Suszeptibilitätserhöhung gegenüber dem Auftreten eines Nierenzellkarzinoms, ergab sich die Frage, ob der ABCB1-Auswärtstransporter durch diesen genetischen Polymorphismus in seiner protektiven Funktion bei der Fremdstoffabwehr, insbesondere in den Epithelzellen des proximalen Tubulus, beeinträchtigt wird und deshalb ein Risikofaktor für die Entstehung dieses Tumors darstellt. Außerdem stellte sich die Frage, ob auch das ebenfalls für die Elimination von Fremdstoffen bedeutsame und renal exprimierte Transportprotein ABCC2 in das Geschehen des Nierenzellkarzinoms involviert ist und ob es auch hier zu einer genotypenabhängigen Modulation der Funktion und damit des Erkrankungsrisikos kommt.

Da der Nierenzellkarzinom eine ausgeprägte Resistenz gegenüber einer Chemotherapie zeigt, stellte sich des Weiteren umgekehrt die Frage, ob diese Auswärts-Transporter an diesem Phänomen beteiligt sind.

In dieser Arbeit wurde deshalb in kortikalen, sowohl tumorösen, als auch entsprechenden nicht-tumorösen Gewebeproben von 82 nephrektomierten Patienten die Genotypenverteilung der ABCB1 und ABCC2-Polymorphismen, die Genexpression der Auswärtstransporter ABCB1 und ABCC2 sowohl auf RNA-, als auch auf Proteinebene, sowie der mögliche Einfluss der Genotypen auf die renale Transporterexpression untersucht.

Um mögliche Einflüsse von genetischen Polymorphismen auf die Gen-Aktivität auf molekularer Ebene besser zu verstehen, wurden des Weiteren molekularbiologische *in vitro* Untersuchungen durchgeführt. Hierbei wurde die Bedeutung des sich auf der 5'-UTR des ABCC2-Gens befindenden -24C>T Polymorphismus für die Genexpression mittels

Reporter-Gen-Assay, sein Einfluss auf DNA-Protein-Bindungen mittels Electrophoretic mobility shift assay und seine Bedeutung für die mRNA-Sekundärstruktur mittels des ‚Mfold‘-web-servers untersucht.

### 4.1 Genotypen- und Haplotypenverteilung

Es wurden 82 Nierenzellkarzinom-Patienten und 164 gesunden Kontrollen hinsichtlich der ABCB1- und ABCC2-Polymorphismen mittels PCR-RFLP genotypisiert, wobei es sich hier um etablierte und durch Kontrollsequenzierung einzelner Proben verifizierte Methoden handelte. Es konnten zwischen Patienten und Kontrollen keine signifikanten Unterschiede in der Genotypenverteilung beobachtet werden (Tab. 24). Im Gegensatz zu den ABCC2-Haplotypen unterschied sich die ABCB1-Haplotypenverteilung der Patienten im 12-Felder-Test von denen der Kontrollen. Bei den Patienten konnte kein H3-Haplotyp (2677T/3435C) gefunden werden. Als die drei häufigsten Haplotypen konnten H1 (2677G/3435C), H2 (2677G/3435T) und H4 (2677T/3435T) identifiziert werden. Der Haplotyp H2 wurde von Johne et al. als funktionell bedeutsam beschrieben. Probanden, die Träger mindestens eines H2-Haplotyps waren, zeigten in dessen Studie höhere Digoxin-Plasmaspiegel [98]. In dieser Studie zeigten diese drei Haplotypen allerdings keine unterschiedlichen Häufigkeiten zwischen Patienten und Kontrollen (Tab. 25).

Zwar wiesen in dieser Studie die Patienten für den putativ funktionellen ABCB1 3435C>T SNP eine leichte Frequenzerhöhung für das T-Allel gegenüber den Kontrollen auf (57,3 % vs. 53,7 %), dieser Unterschied erreichte aber keine statistische Signifikanz (Odds ratio: 1,16;  $p = 0,44$ ). Beim Vergleich der Genotypen 3435TT/CT gegenüber den Wildtypen zeigte sich ebenfalls keine signifikante Risikoerhöhung gegenüber den Kontrollen (Odds ratio: 1,3;  $p = 0,44$ ). Bei der Betrachtung der histologischen Subgruppen ergab sich bei den klarzelligen Nierenzellkarzinomen eine Allelfrequenz von 60,3 % (1,31;  $p = 0,2$ ) und bei den nicht-klarzelligen Nierenzellkarzinomen eine Allelfrequenz von 47,4 % (Odds ratio: 0,78;  $p = 0,46$ ). Die Ergebnisse konnten die von Siegmund et al. beschriebene Assoziation zwischen dem ABCB1 3435C>T SNP und dem Auftreten eines Nierenzellkarzinoms, insbesondere des nicht-klarzelligen Subtyps, nicht bestätigen und somit den 3435C>T Polymorphismus nicht als Risiko-Faktor für die Entstehung dieser Tumorerkrankung identifizieren. Dort wurde in einer Studie mit insgesamt 212 Nierenzellkarzinom-Patienten eine signifikante Erhöhung des Erkrankungsrisikos für die 3435TT- gegenüber den 3435CC-Genotypen (Odds ratio: 1,8;  $p = 0,0098$ ), in einer weiteren Studie mit ausschließlich nicht-

klarzelligen Nierenzellkarzinom-Patienten (n = 50) sogar eine Odds ratio von 21,7 (p = 0,0001) beobachtet. Das Erkrankungsrisiko verringerte sich aber, wenn man die Gruppe der Heterozygoten mit berücksichtigte, also die 3435TT/CT-Genotypen mit den Wiltypen verglich. (Odds ratio: 1,55; p = 0,03 in der ersten Studie, bzw. Odds ratio 17,2; p = 0,0002 in der zweiten Studie) [4]. Allerdings haben auf Grund der geringeren Anzahl von eingeschlossenen Patienten (n = 82) die Ergebnisse in dieser Arbeit eine etwas schwächere epidemiologische Aussagekraft. Zusätzlich ist zu berücksichtigen, dass die Patienten nicht dem Alter nach mit den Kontrollen gemacht werden konnten, da nicht genügend freiwillige Probanden, die das gleiche Alter wie die Patienten aufwiesen, zur Verfügung standen. Dies ist aus epidemiologischen Gesichtspunkten eine Schwäche der Studie, da der Nierenzellkarzinom sein Inzidenzmaximum bei einem Alter über 60 Jahre hat. Auf der anderen Seite ist davon auszugehen, dass sich die Genotypenverteilung mit dem Alter nicht ändert, sofern es sich um „low-penetrance“ Gene handelt. Deswegen muss diese Studie nicht zwingend im Gegensatz zu den Beobachtungen von Siegsmond et. al. stehen.

Auch in dieser Studie wurde eine starke Kopplung der ABCB1-Polymorphismen 2677G>T/A und 3435C>T gefunden, bei den Kontrollen betrug sie 86 %, bei den Patienten sogar 100 %. Dieser Befund war übereinstimmend mit anderen bisher veröffentlichten Studien [96, 98, 102, 104].

Die beiden von Taniguchi et al. beschriebenen SNPs -2352G>A und -692T>C in der 5'-UTR des ABCB1-Gens, treten in der Japanischen Bevölkerung mit einer Allelfrequenz von 28 % bzw. 10 % auf und zeigten sowohl einen Einfluss auf die ABCB1-mRNA-Expression im Kolon, als auch in-vitro auf DNA-Protein-Bindungen [122]. In dieser Studie, die ausschließlich Personen Kaukasischer Abstammung einschloss, wurden diese SNPs lediglich mit einer Allelfrequenz von 0,6 % bzw. 2,0 % bei den Patienten und 0,9 % bzw. 3,0 % bei den Kontrollen gefunden.

Bei Betrachtung der ABCC2-Polymorphismen war auffallend, obwohl der Unterschied der Allelfrequenzen zu den Kontrollen keine statistische Signifikanz erreichte (odds ratio: 0,68; p = 0,12), dass kein 1249AA-Genotyp unter den Patienten zu finden war. An der Position 417, die sich in der transmembranären Domäne TMD1 befindet, führt dieser Polymorphismus zu einem Valin / Isoleucin Aminosäureaustausch. Da die transmembranären Domänen für die Substraterkennung eine wichtige Rolle spielen [25, 42], könnte dieser SNP zu einer veränderten Substratspezifität führen. Untersuchungen am ABCC2-Transportprotein der Ratte und des Menschen haben bereits gezeigt, dass einzelne Aminosäureaustausche in den transmembranären Domänen zu veränderten Substratspezifitäten und Transportaktivitäten

führen [175-178]. Beispielsweise führten die Aminosäureaustausche Lys325Met und Arg586Leu im Protein der Ratte zu einem reduzierten Transport von Glutathion-Konjugaten, während der Transport von Glucuronid-Konjugaten erhalten blieb [176]. Darüber hinaus führte der Austausch von Tryptophan zu Phenylalanin an der Position 1254 in der TMD2 des humanen Proteins zu einem Verlust des Leukotrien C<sub>4</sub>- und Methotrexat-, nicht aber zu einem Verlust des 17-β-Estradiol-17β-Glucuronid-Transports. Der Austausch zu Tyrosin an dieser Position dagegen führte lediglich zu einem Verlust des Methotrexat-, nicht aber des 17-β-Estradiol-17β-Glucuronid- und Leukotrien C<sub>4</sub>-Transports [177]. Untermauert wird diese Überlegung durch kürzlich am Institut für Klinische Pharmakologie der Universität Greifswald erhobene Untersuchungen, die bei homozygoten 1249A-Allelträger nach oraler Medikation signifikant niedrigere Plasmaspiegel für das ABCC2-Substrat Talinolol zeigten. Da dieser SNP keinen Einfluss auf die duodenale ABCC2-mRNA- und Proteinexpression aufwies, konnte eine höhere Genexpression nicht für die höhere intestinale Transportaktivität verantwortlich sein [179]. Damit liegt die Vermutung nahe, dass dieser Aminosäureaustausch, zumindest für Talinolol, zu einer höheren Substraterkennung und damit zu einer höheren Transportkapazität des ABCC2-Transporters führen könnte. Möglicherweise könnte der 1249G>A Polymorphismus somit auch gegenüber bestimmten karzinogenen Substanzen zu einer höheren Substraterkennung und damit zu einem erhöhten protektiven Effekt des ABCC2-Transporters führen. Aber auch hier gilt, wie oben schon erwähnt, dass auf Grund der relativ kleinen Patientenzahl von 82 diese Vermutung aus epidemiologischer Sicht durch eine größere Anzahl Patienten und mit geeigneteren Kontrollen verifiziert werden müsste. Auch in dieser ausschließlich an Kaukasiern durchgeführten Studie zeigte sich ein starke Verlinkung der beiden SNPs ABCC2 -24C>T und ABCC2 3972C>T. In den Kontrollen waren die beiden Polymorphismen zu 92,5% und in den Patienten zu 100% verlinkt. Dies stimmte mit Beobachtungen von Itoda et al. in der Japanischen Bevölkerung überein [180].

### **4.2 Expression des ABCB1- und des ABCC2-Transporters**

Die Bestimmung des relativen mRNA- und des Protein-Gehalts mittels Real-time PCR und Immunhistochemie ergab für den ABCB1-Transporter im kortikalen Nierentumorgewebe eine signifikant niedrigere Expression sowohl auf mRNA-, als auch auf Proteinebene ( $p = 0,026$  bzw.  $p < 0,001$ ) gegenüber dem nicht-tumorösen Nierengewebe. Dieser Befund war übereinstimmend mit Ergebnissen einer Japanischen Arbeitsgruppe, die in 24 nephrektomierten, japanischen Nierenzellkarzinompatienten ebenfalls eine signifikante

Erniedrigung der ABCB1- mRNA-Expression im Tumorgewebe feststellen konnten [181]. Betrachtete man aber die histologischen Subgruppen getrennt, so wurde deutlich, dass diese Beobachtung nur auf die klarzelligen Tumore zutrif, diese exprimierten das ABCB1-Protein um den Faktor 70 niedriger als das gesunde Gewebe. Die nicht-klarzelligen Tumorgewebe dagegen exprimierten den ABCB1-Transporter sowohl auf mRNA, als auch auf Proteinebene in ähnlichem Maße wie das normale Nierengewebe. In cytogenetischen Untersuchungen wurde gefunden, dass der chromophile (papilläre) Nierenzellkarzinom, mit einer Ausnahme waren in dieser Studie alle nicht-klarzelligen Tumore von diesem Subtyp, gekennzeichnet ist durch eine Trisomie der Chromosomen 7 und 17, sowie durch Monosomie des Y-Chromosoms [182]. Da das ABCB1-Gen auf Chromosom 7q21 lokalisiert ist, könnte eine Genamplifikation die höhere ABCB1-Expression der nicht-klarzelligen gegenüber den klarzelligen Tumoren begründen. Eine weitere Ursache für diesen Expressionsunterschied könnte ein differentielles Expressionsmuster von Transkriptionsfaktoren sein. Es ist bekannt, dass Xenobiotika über die nukleären Rezeptoren PXR und CAR die ABCB1-Expression induzieren [17, 88, 89], dass aber auch andere Faktoren, wie C/EBP $\beta$ , AP1, NF- $\kappa$ B, HSF-1 und HIF-1 bei Inflammation, bei genotoxischem Stress oder Hypoxie induzierend auf die Genexpression von ABCB1 wirken [44, 45]. Da Interleukin-6 eine ABCB1-Aktivierung über das C/EBP $\beta$  und Interleukin-2 durch die Translokation des YB-1 (Y-Box binding protein-1) vom Zytoplasma in den Nukleus eine Hochregulierung der ABCB1-Expression [45, 85, 183, 184] vermitteln, stellt sich die Frage in wie weit entzündliche Prozesse und Zytokine bei diesem differentiellen ABCB1-Expressionsmuster zwischen den histologischen Tumor-Subtypen involviert sind. Aber auch mutierte Varianten des p53 in den nicht-klarzelligen Nierenzellkarzinomzellen könnten, insbesondere wenn es durch eine Trisomie des Chromosom 17p, auf dem das für p53 kodierende Gen lokalisiert ist, zu einer Überexprimierung solcher mutierter p53 Varianten kommt, die beobachtete ABCB1-Expressionsunterschiede zwischen den Tumorsubtypen bewirken [157]. Obwohl auch viele klarzellige Nierenzellkarziome häufig ein mutiertes oder hypermethyliertes VHL-Gen aufweisen, was zu einer insuffizienten proteosomalen Degradation von HIF-1 und in Folge dessen zu einer HIF-1-induzierten VEGF (Vascular endothelial growth factor)-Überexprimierung mit einer starken Vaskularisierung des Nierenzellkarzinoms führt [157], ist zu überlegen, ob unterschiedliche HIF-1- Expressionen zum differentiellen ABCB1-Expressionsmuster der beiden histologischen Subtypen des Nierenzellkarzinoms beitragen. Denkbar wäre aber auch eine ungenügende Proteinreifung oder eine frühzeitige Degradation des Proteins in den klarzelligen Nierenzellkarzinom-Zellen, die gegenüber den anderen

histologischen Subtypen den geringsten Differenzierungsgrad aufweisen. Bei der Erwägung, bei einem Nierenzelltumor eine Chemotherapie durchzuführen, könnten diese Unterschiede in der ABCB1-Expression in den histologischen Subtypen von Bedeutung sein, da sie möglicherweise den Therapieerfolg auf Grund einer ABCB1-vermittelten Chemotherapieresistenz beeinflussen könnten. Andererseits ergibt sich die Frage, ob möglicherweise Patienten mit dem nicht-klarzelligen Tumortyp besonders von einer Kombinationstherapie mit einem ABCB1-Inhibitor profitieren könnten. Diese Überlegungen müssten allerdings in weiteren Studien an Patienten unter Zytostatika-Therapie bestätigt werden.

Der ABCC2-Transporter war im Tumorgewebe auf Proteinebene ebenfalls signifikant ( $p < 0,001$ ) und auf mRNA-Ebene tendenziell ( $p = 0,056$ ) niedriger exprimiert als im normalen Nierengewebe. Im Gegensatz zu den ABCB1-mRNA-Expressionen waren die ABCC2-mRNA-Expressionen höher in den klarzelligen Nierentumoren als in den nicht-klarzelligen. Auf Proteinebene allerdings war der ABCC2-Transporter in beiden histologischen Subgruppen signifikant niedriger exprimiert als im nicht-tumorösen Gewebe. Auch die ABCC2-Genexpression wird über Liganden der nukleären Rezeptoren PXR, CAR und FXR [13, 86] induziert, sowie durch weitere Transkriptionsfaktoren gesteuert. Hierzu gehören u.a. HNF1, HNF3 $\beta$ , AP1, AP2, C/EBP  $\beta$ , USF und SP1 [44, 69, 79-81]. Zudem wurde beschrieben, dass Interleukin 1  $\beta$  die ABCC2-Expression hemmt [79, 82]. Interessanterweise wird dabei die ABCC2-Transkription, im Gegensatz zu ABCB1, durch die Translokation von YB-1 vom Zytoplasma in den Zellkern herabreguliert [43, 185]. Somit könnten Zytokine und das YB-1-Protein bei der differentiellen Expression des ABCB1- und ABCC2-Transporters in den histologischen Subtypen, insbesondere des nicht-klarzelligen Nierenzellkarzinoms, involviert sein. (Abb. 12 und 13)

Im Gegensatz zu dem ABCB1-Gen ist das ABCC2-Gen auf Chromosom 10q24 lokalisiert. Für dieses Chromosom wurden bei den chromophilzelligen Tumoren keine cytogenetischen Abberationen beschrieben, was den Unterschied der beiden Transporter-Expressionen in diesem Tumortyp ebenfalls erklären könnte.

Leider konnten die Transporter-Expressionen in kortikalem Nierengewebe von gesunden Probanden nicht gemessen werden, so dass nicht geklärt werden konnte, ob die Expressionen im nicht-tumorösen Gewebe die tatsächlichen physiologischen Bedingungen widerspiegeln, oder ob der Tumor das normale Gewebe in seiner Expression beeinflusst. Die gefundenen Expressionsunterschiede zwischen dem normalen und tumorösen Nierengewebe stehen aber klar der Annahme entgegen, dass die ausgeprägte Resistenz des Nierenzellkarzinoms



gegenüber Chemotherapeutika die Folge einer per se vorhandenen erhöhten Expression der Auswärtstransporter ABCB1 und ABCC2 ist. Denkbar wäre allerdings eine rasche Hochregulierung der ABCB1- und ABCC2-Expression im Tumorgewebe nach Beginn einer Zytostatikaapplikation. Da aber die Patienten bei Nephrektomie unter keiner Chemotherapie standen, müsste diese Überlegung in weiteren Untersuchungen überprüft werden. Eine weitere Frage beim Phänomen der Chemotherapieresistenz ist, welche Rolle das umliegende, tumorös nicht veränderte Gewebe spielt und ob es möglicherweise für den Tumor eine abschirmende Funktion gegenüber Zytostatika einnimmt.

Die Frage nach der Tumorgenese konnte mit diesen Ergebnissen nicht vollständig geklärt werden. Es bleibt unklar, ob zunächst eine geringere Expression der Auswärtstransporter bestand und dann auf Grund eines geringeren protektiven Effektes die Tumorentstehung begünstigt wurde, oder ob die niedrigere Transporterexpression des tumorösen Nierengewebes Folge einer durch den Tumor verursachten Herabregulierung der Genexpression ist.

### **4.3 Der Einfluss der ABCB1- und ABCC2-Polymorphismen auf die Transporterexpression**

In dieser Studie konnte ein klarer Einfluss der Genotypen der ABCB1-Polymorphismen 2677G>T/A ( $p = 0,023$ ) und 3435C>T ( $p = 0,043$ ) auf die mRNA-Expression im nicht-tumorösen kortikalen Nierengewebe gefunden werden. Ähnliche Befunde auf mRNA-Ebene sind auch von zwei Japanischen Arbeitsgruppen im Duodenum [100, 186], von Meissner et al. im myocardialen Gewebe [187] und von Illmer et al. in Blutzellen des Knochenmarks gemacht worden [97]. Einige Studien deuteten darauf hin, dass die Haplotypenbildung aus den beiden SNPs, die ein hohes Kopplungsungleichgewicht aufweisen, zur besseren Erklärung der interindividuellen Unterschiede der Bioverfügbarkeit des ABCB1-Substrats Digoxin beitragen könnte [98, 109]. In dieser Studie zeigten die Individuen mit dem H4/H4-Diplotyp (homozygote 2677T/3435T-Haplotypträger) um den Faktor 4,1 erhöhte ABCB1mRNA-Expressionen gegenüber den H1/H1-Diplotypen (homozygote 2677G/3435C-Haplotypträger). Der Haplotyp H2 (2677G/3435T), der von John et al. mit einer erniedrigten ABCB1-Aktivität und einer daraus resultierende höheren Digoxin-Bioverfügbarkeit in Verbindung gebracht wurde [98], zeigte in dieser Studie dagegen hinsichtlich der mRNA-Expression eine verstärkende Funktion. Sowohl die Diplotypen H1/H2, als auch H2/H4

wiesen höhere mRNA-Expressionen als deren jeweilige homozygote Diplotypen H1/H1 bzw. H4/H4 auf (Abb. 15 A).

Bei der Untersuchung des Genotypeneinflusses auf die ABCC2-Expression ergab sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem -24C>T SNP und der mRNA-Expression im nicht-tumorösen Nierengewebe. Homozygote -24C-Allelträger wiesen eine um den Faktor 1,4 höhere mRNA-Expression auf als homozygote Variantenallel-Träger. Die Individuen mit dem Diplotyp H1/H1 (-24C/3972C) wiesen ebenfalls tendenziell eine höhere ABCC2-mRNA-Expression auf als die homozygoten H6-Träger (-24T/3972T) ( $p = 0,053$ ). Der sich in der kodierenden Region des ABCC2-Gens befindende 1249G>A SNP, und auch der synonyme 3972C>T Polymorphismus zeigten keinen Einfluss auf die ABCC2-Expression, weder im normalen, noch im tumorösen Gewebe. Zu den funktionellen Einflüssen der ABCC2-Polymorphismen sind bisher erst recht wenige Untersuchungen durchgeführt worden. Eine japanische Arbeitsgruppe fand in 13 Duodenal-Biopsaten keinen Einfluss der ABCC2-Polymorphismen auf die ABCC2-mRNA-Expression [100]. Dies war übereinstimmend mit Untersuchungen an 42 Duodenal-Biopsaten von gesunden, kaukasischen Freiwilligen, die im Institut für Pharmakologie der Universität Greifswald durchgeführt worden waren [179]. Die ABCC2-Haplotypen zeigten keinen Einfluss auf die intrazelluläre Bioverfügbarkeit des HIV-Protease-Inhibitors Nelfinavir [137]. Meyer zu Schwabedissen et al. fanden einen Einfluss des 1249G>A SNPs auf die ABCC2-mRNA-Expression in 28 Plazenten von Frühgeborenengeburten [139].

Unserem Wissen nach sind dies die ersten Untersuchungen zum Einfluss von ABCC2-Polymorphismen auf die ABCC2-Expression im kortikalen Nierengewebe. Die hier gefundene, höhere Aktivität der -24C-Allelträger auf mRNA-Ebene in den Epithelzellen des proximalen Tubulus wird interessanterweise durch Bioverfügbarkeitsstudien mit dem ABCC2-Substrat Talinolol gestützt. Obwohl Talinolol zu weniger als 2% metabolisiert wird [188, 189] zeigten die -24CC-Genotypen nach intravenöser Applikation eine signifikant höhere renale Clearance für die Talinolol-Metaboliten als die -24T-Allelträger [179].

Sowohl der relative ABCB1-, als auch der ABCC2-mRNA-Gehalt korrelierte weder im tumorösen, noch im normalen Gewebe mit den jeweiligen Protein-Gehalten. Es ist aber bekannt, dass die Translationseffizienz auf Grund von posttranskriptionellen Kontrollmechanismen nicht immer proportional zur Transkriptionseffizienz ist [190]. Für das ABCB1-Protein wurde mittels fluoreszierender Fusionsproteine eine Halbwertszeit von 3,7

Tage berechnet [191], während die Halbwertszeit der mRNA mit 14 Stunden angegeben wurde [93]. Johnson et al. zeigten in Untersuchungen an Ratten ebenfalls, dass für das *Abcc2*-Gen der mRNA-Gehalt kein guter Indikator für die Proteinexpression darstellt [192, 193].

Beim Vergleich dieser Ergebnisse mit den in den letzten 5 Jahren erhaltenen Daten zu den funktionellen Einflüssen der beiden *ABCB1*-Polymorphismen 2677G>T/A und 3435C>T, und des sich daraus ergebenden, teilweise uneinheitlichen Bildes [9, 108, 171], liegt die Überlegung nahe, dass bestimmte Kofaktoren und Untersuchungsbedingungen derartige Befunde beeinflussen können und bei künftigen Untersuchungen mit berücksichtigt werden sollten:

Beispielsweise führen gewebeabhängig differentielle Expressionen von Transkriptionsfaktoren und Nukleären Rezeptoren zu unterschiedlichen Basal-Expressionen in verschiedenen Geweben. Beispielsweise wurden in der Niere um den Faktor 2,5 höhere *ABCB1*- und *ABCC2*-mRNA-Expressionen gemessen als im Dünndarm [30, 194, 195]. Dies könnte erklären, warum in dieser Studie der Einfluss des *ABCC2* -24C>T SNPs auf renaler, bisher aber nicht auf duodener Ebene in Erscheinung getreten ist [100, 179, 196]. Auch Tanaka et al. zeigten mittels Reporter-Gen Assays in verschiedenen Zelllinien deutliche Aktivitätsunterschiede der identischen *ABCC2*-Promotersequenz [81]. Dies kann dazu führen, dass der Einfluss eines Genotyps auf die Transporteraktivität gewebeabhängig mehr oder weniger deutlich ausgeprägt ausfällt.

Posttranskriptionelle Kontrollmechanismen, die ihrerseits gewebe- oder statusabhängig sein können, können zu unterschiedlichen Ergebnissen auf mRNA- bzw. Protein-Ebene führen, insbesondere dann, wenn die Halbwertszeiten der Zielproteine mehrere Tage betragen. So ist also zwischen Studien zu unterscheiden, die Untersuchungen auf mRNA-Ebene, oder auf Proteinebene durchführen. Beispielsweise zeigten einige Arbeitsgruppen, wie oben bereits erwähnt, in verschiedenen Geweben eine höhere *ABCB1*-mRNA-Expression für den 2677G>T/A bzw. den 3435C>T Polymorphismus [97, 100, 186, 187], während andere Arbeitsgruppen für die Wildtyp-3435C-Allelträger einen höheren Proteingehalt feststellten [3, 4, 197].

Darüber hinaus müssen auch hormonelle, sowie geschlechtsspezifische Einflüsse auf die Transporterexpression berücksichtigt werden. Beispielsweise zeigten murine und humane männliche Lebern höhere Proteinexpressionen des ABC-Auswärtstransporter *ABCG2* als weibliche Lebern [198], während die *Abcc2* Expression in weiblichen Rattenlebern um das vierfache höher war als in den männlichen [199]. Siegmund et al. konnte einen induzierenden Effekt nach Levothyroxingabe auf die *ABCB1*-Proteinexpression finden [200]. Interessant

sind außerdem Befunde, die an Mäusegeweben durchgeführt wurden und auf eine circadiane Rhythmik der ABCB1-Expression schließen lassen. Hierbei zeigten sich morgens niedrigere Expressionen als am späten Nachmittag [201].

Verschiedene Substrate weisen eine unterschiedliche Affinität zum Transportprotein auf, werden also verschieden effektiv transportiert. Polymorphismen, die zu einem Aminosäureaustausch in der transmembranären Region führen und somit die Substraterkennung modulieren könnten, zeigen einerseits keinen Einfluss auf den mRNA- oder Proteingehalt, können aber andererseits bei der Applikation unterschiedlicher Arzneistoffe zu unterschiedlichen Studien-Ergebnissen führen. Das ABCB1-Substrat Digoxin zeigte in Individuen mit dem homozygoten 2677G/3435C-Diployp signifikant niedrigere Plasmaspiegel als in den Variantenhaplotyp-Trägern, interessanterweise konnte aber nur dieser Diployp durch eine Clarithromycin-Komedikation in seiner Digoxin-Clearance gehemmt werden [99]. Kim et al. zeigten dagegen für das ABCB1-Substrat Fexofenadin höhere Plasmaspiegel unter den ABCB1 2677GG-Träger, was auf eine schwächere Aktivität dieses Genotyps bezogen auf dieses Substrat schließen lässt [104]. Für die Immunsuppressiva Tacrolimus und Ciclosporin dagegen fanden Zheng et al. und Anglicheau et al. bzw. Chowbay et al. für die 2677T-Allelträger höhere Plasmaspiegel als für die Wildtyp-Allelträger [111, 112, 202]. Schaefer et al. konnten in *in vitro* Experimenten mit Membranvesikeln von Insektenzellen, die nach Transfektion die drei ABCB1-Varianten 893Ala (2677G), 893Ser (2677T), 893Thr (2677A), in gleichem Maße exprimierten, zeigen, dass das Wildtyp-Protein für das Zytostatikum Vincristin eine um das 2 bzw. 3 fach niedrigere Transportkapazität aufwies, als die 893Ser- bzw. 893Thr-Varianten [203].

Je nach Expressionsort der Transporter besteht lokal eine unterschiedliche Substratkonzentration. So sind die Arzneistoffkonzentrationen nach oraler Applikation im Duodenum initial höher als beispielsweise nach Absorption, Verteilung und Metabolismus in der Leber oder im proximalen Tubulus des Nephrons. Zusätzlich besteht dort möglicherweise ein anderes Zusammensetzungsverhältnis der Muttersubstanz zu ihren Metaboliten, die ihrerseits wiederum eine andere Affinität zum untersuchten Transporter aufweisen können bzw. über andere Transporter transportiert werden. Diese unterschiedlichen Substratkonzentrationen können dazu führen, dass bei hohen Konzentrationen die Sättigungskonzentration der Transporter überschritten wird und somit Genotypeneinflüsse in diesen Untersuchungsorten überdeckt werden [171].

Da bestimmte Substrate auch die Transporteraktivität induzieren können und damit ihre eigene Elimination beschleunigen, ist zwischen Studien zu unterscheiden, die entweder nach

Einmalgabe, oder während einer Langzeitbehandlung auf genotypenabhängige Einflüsse für die Bioverfügbarkeit eines Arzneistoffs testen. Hoffmeyer et. al und Johne et al. untersuchten die Digoxin-Kinetik im steady-state, hier zeigte der ABCB1 3435TT-Genotyp höhere Digoxin-Bioverfügbarkeiten am fünften Einnahmetag. Gerloff et al. konnte dagegen nach Einmalgabe von 0,25 mg Digoxin zwischen den ABCB1 3435-Genotypen keinen Unterschied in den pharmakokinetischen Parameter finden. Sakaeda et al. untersuchte ebenfalls die Digoxin-Bioverfügbarkeit nach Einmalgabe an Japanischen Probanden, hier wiesen dagegen die 3435T-Allelträger niedrigere Plasmalevel als die homozygoten 3435C-Allelträger auf. *In vitro* Untersuchungen zeigten an Caco2-Zellen die Hochregulierung der ABCB1-mRNA-Expression nach 24-stündiger Inkubation der Zellen mit 1 µM Digoxin [204]. Es ist also nicht auszuschließen, dass sich eine Induktion des ABCB1-Transporters modulierend oder sogar mit umkehrendem Effekt auf die genotypenabhängige, basale Aktivität auswirkt. Denkbar ist auch, dass es erst nach Induktion zu relevanten genotypenabhängigen Aktivitätsunterschieden kommt, die unter physiologischen Bedingungen nicht in Erscheinung treten. Möglicherweise kann hier die Berücksichtigung genetischer Varianten der an den Signalwegen der Transporterexpression beteiligten Nukleären Rezeptoren PXR und CAR, ähnlich wie es für das häufig koregulierte CYP3A4 gezeigt werden konnte [205], die Vorhersagbarkeit der Einflüsse der beschriebenen ABCB1-Genotypen verbessern [206].

Obwohl Wang et al. eine durch den 3435C>T Polymorphismus bedingte geringere ABCB1-mRNA-Stabilität beschrieben haben [207], ist immer noch nicht völlig geklärt, ob dieser synonyme 3435C>T Polymorphismus ursächlich oder auf Grund von genetischer Verlinkung mit funktionell bedeutsamen SNPs auf regulatorischen Einheiten des ABCB1-Gens zu den beobachtete Assoziationen führt. Bei derartigen Studien müssen also immer auch ethnische Unterschiede mit berücksichtigt werden, da solche Verlinkungen interethnisch variieren können. So zeigten sich beispielsweise für die duodenale ABCB1-mRNA-Expression in Kaukasiern kein Einfluss des 3435C>T Polymorphismus [106], während in Japanern die 3435T-Allelträger höhere mRNA-Expressionen aufwiesen [100, 186].

Bei Beurteilung und Vergleich der Ergebnisse solcher Assoziationsstudien, bei denen Genotypen mit Transporteraktivitäten korreliert werden, müssen also immer die ethnische Herkunft der Probanden, die untersuchten Parameter, wie mRNA-, oder Proteingehalt, Art des untersuchten Gewebes, Struktur des Substrats, dessen Bioverfügbarkeit geprüft wird, Art der Substratapplikation, sowie weitere Kofaktoren, die bei der Entstehung einer Erkrankung oder zu unterschiedlichem Therapieansprechen führen können, mit berücksichtigt werden.

### **4.4 *In vitro* und *in silico* Untersuchungen zum funktionellen Einfluss des ABCC2 -24C>T-Polymorphismus**

Durch Reporter-gen-assays konnte der in dieser Arbeit *in vivo* beobachtete Einfluss des ABCC2 -24C>T Polymorphismus auf die mRNA-Expression im nicht-tumorösen kortikalen Nierengewebe bestätigt werden. Das Wildtyp-Vektor-konstrukt (pGL3-ABCC2-C) zeigte nach Transfektion in HepG2-Zellen ein um den Faktor 1,23 höhere Geneexpression als das Varianten-Konstrukt (pGL3-ABCC2-T).

Da aber mit diesen Assays nicht geklärt werden kann, auf welcher Ebene der Genexpression der funktionelle Einfluss des Polymorphismus zum Tragen kommt, wurde untersucht, ob bestimmte Kern-Proteine in Abhängigkeit dieses SNPs, der sich auf der 5'-UTR des ABCC2-Gens befindet, unterschiedliche Bindungsaktivitäten mit der DNA aufweisen und ob es somit zu einer differentiellen Effizienz der Transkriptionsmaschinerie kommt. Die Ergebnisse der Electrophoretic mobility shift assays zeigten einerseits eine vom ABCC2 -24C>T SNP unabhängige, spezifische Bindung eines HepG2-Kern-Proteins oder Protein-Komplexes in der Nähe des -24C>T Polymorphismus, andererseits aber, dass an der Position -24 direkt keine DNA-Protein-Interaktion stattfindet. Die bei diesem EMSA verwendeten Sonden wiesen am 5'-Ende eine von Stöckel et al. beschriebene putative Bindesequenz für den Transkriptionsfaktor BRN2 auf [80]. Bei Deletion dieser Sequenz ging die DNA-Protein-Bindung verloren. Ob es sich tatsächlich um die Bindung dieses Transkriptionsfaktors handelt, müssen künftige Studien unter Einbeziehung eines Super shift assays mit einem gegen diesen Transkriptionsfaktor gerichteten Antikörper verifizieren. Aus diesen Experimenten ergab sich die Schlussfolgerung, dass vermutlich genotypabhängige, posttranskriptionelle Mechanismen die ABCC2-Genexpression beeinflussen. Zu diskutieren sind hier mögliche Einflüsse auf das mRNA-trafficking aus dem Zellkern ins Zytoplasma oder unterschiedliche mRNA-Stabilitäten durch unterschiedliche Degradationsvorgänge [190, 208]. Für das Endothelin-1 konnte eine derartige vom Genotyp abhängige mRNA-Stabilität gezeigt werden. Hier zeigte ein Adenin-Insertions-Polymorphismus 138 bp nach dem Transkriptionsstart gegenüber der Deletionsvariante auf Grund einer höheren mRNA-Stabilität eine höhere Genexpression [209].

Aus diesem Grund wurden mittels des ‚Mfold‘-web servers [169] Sekundärstrukturen der ABCC2-mRNA der sechs gefundenen Haplotypen generiert. Dabei zeigten alle Haplotypen identische mRNA-Sekundärstrukturen. Interessanterweise befand sich dabei der -24C>T SNP in einem Hairpin-Loop in der Nähe des 5'-Endes der ABCC2-mRNA. Es stellt sich nun die

Frage, ob zum Beispiel unterschiedliche Bindeaktivitäten von 5'-Cap bindenden Proteinen (Cap binding complex) zu unterschiedlichen mRNA-Protein-Komplexen, den sogenannten mRNPs (Ribonucleoproteinpartikeln) führen und dies zu einem differentiellen Transport der mRNA aus dem Nucleus führt, oder ob die Halbwertszeit der mRNA im Zytosol in Abhängigkeit vom -24C>T SNP beeinflusst wird. Zur Beantwortung dieser Fragen müssen weitere, an diese Arbeit anschließende Experimente, u.a. mRNA-Stabilitätstests durchgeführt werden.

Zusammenfassend hat diese Arbeit gezeigt, dass die beiden Auswärtstransporter ABCB1 und ABCC2 sowohl auf mRNA, als auch auf Proteinebene niedriger im tumorösen Gewebe exprimiert werden als im nicht-tumorösen kortikalen Nierengewebe. Darüber hinaus hat die Arbeit gezeigt, dass sich der nicht-klarzellige Tumortyp nicht nur histologisch, sondern auch durch eine signifikant höhere ABCB1-Protein-Expression vom klarzelligen Nierenzellkarzinom unterscheidet. Diese Befunde tragen somit zu einem erweiterten Wissen um das Geschehen beim Nierenzellkarzinom bei.

Obwohl sich keiner der untersuchten ABCB1- und ABCC2-Polymorphismen in dieser an 82 Patienten und 164 Kontrollen durchgeführten Studie als Risikofaktor für die Entstehung eines Nierenzellkarzinoms erwies, konnte ein klarer Einfluss der ABCB1-Polymorphismen 2677G>T/A und 3435C>T auf die ABCB1-mRNA-Expression und des ABCC2-Polymorphismus -24C>T auf die ABCC2-mRNA-Expression in normalen kortikalen Gewebe der Patienten nachgewiesen werden. Die mit dem -24T-Allel assoziierte erniedrigte ABCC2-mRNA-Expression konnte durch *in vitro* Untersuchungen bestätigt werden, so dass diese Arbeit einen entscheidenden Beitrag zum tieferen molekularbiologischen Verständnis der funktionellen Bedeutung dieses Polymorphismus auf die ABCC2-Genexpression liefert und Grundlage für künftige Untersuchungen im Hinblick auf die Pharmakokinetik von ABCC2-Substraten darstellt.

## 5 Zusammenfassung

Fremdstoff-metabolisierende Enzyme und Transportproteine sind entscheidende Einflussfaktoren für die Bioverfügbarkeit von Xenobiotika. Die transmembranären, ATP-bindenden Efflux-Transporter ABCB1 (MDR1, P-gp) und ABCC2 (MRP2) spielen auf Grund ihrer Lokalisation in vielen Organen und ihres breiten Substratspektrums eine wichtige Rolle bei der Elimination endogener wie exogener Stoffe. Genetische Polymorphismen können die Aktivität dieser Proteine beeinflussen und somit, zumindest teilweise, das Auftreten individueller Arzneistoff-Bioverfügbarkeit, aber auch das interindividuell unterschiedliche Ausmaß der Toxizität von Schadstoffen erklären. Am Beispiel des Nierenzellkarzinoms sollte in dieser Arbeit überprüft werden, ob ABCB1 und ABCC2 auf mRNA-, wie auch auf Proteinebene im Karzinomgewebe anders als in gesundem Nierengewebe exprimiert sind. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob genetische Varianten dieser Transporter Suszeptibilitätsfaktoren für die Entstehung dieser Tumorerkrankung darstellen, wobei in diesem Zusammenhang auch geprüft wurde, welchen Einfluss die untersuchten Polymorphismen dabei auf die Regulation und Expression dieser Gene haben.

Es wurden in 82 nephrektomierten Nierenzellkarzinompatienten und in 164 gesunden Probanden die Genotypen der ABCB1-Polymorphismen -2352G>A, -692T>C, 2677G>T/A (Ala893Ser/Thr), 3435C>T, sowie der ABCC2-Polymorphismen -24C>T, 1249G>A (Val417Ile) und 3972C>T bestimmt. Mittels Real-time PCR und Immunhistochemie wurden im normalen Nierengewebe sowie dem Tumorgewebe die mRNA- und die Proteingehalte der beiden Transporter bestimmt. *In vitro* wurde mit Hilfe von Reporter-Gen-Assays und Elektrophoretic Mobility Shift Assays überprüft, welchen funktionellen Einfluss der sich in der 5'-untranslatierten Region des ABCC2-Gens befindliche -24C>T SNP auf die Genexpression hat, und ob unterschiedliche Bindungsaktivitäten zwischen Kernproteinen und der DNA zu einer genotypenabhängigen unterschiedlichen Transkription führen können. Durch computergestützte Analysen wurden des Weiteren mRNA-Sekundärstrukturen der gefundenen ABCC2-Haplotypen generiert.

Sowohl ABCB1 als auch ABCC2 wiesen tendenziell in Tumorgewebe, auf mRNA- wie auch auf Proteinebene, eine niedrigere Expression auf als im gesunden kortikalen Nierengewebe. Bei ABCB1 beruhte der Unterschied auf einer signifikant erniedrigten Expression in



klarzelligen Karzinomen, während keine signifikanten Unterschiede bei nicht-klarzelligen Tumoren beobachtet wurden.

Die untersuchten ABCB1- und ABCC2-Polymorphismen wiesen gegenüber den gesunden Probanden in den Nierenzellkarzinom-Patienten keine signifikant unterschiedliche Häufigkeitsverteilung auf und erwiesen sich somit nicht als Risikofaktoren für die Entstehung des Nierenzellkarzinoms.

Die ABCB1-mRNA-Expression im normalen Nierengewebe wurde durch die genetischen Varianten 2677G>T/A und 3435C>T moduliert. Träger von 2677T bzw. 3435T wiesen eine signifikant höhere mRNA-Expression auf als die homozygoten Träger des Wildtyps ( $p=0,023$  bzw. ( $p=0,043$ ). Auch die ABCC2-Expression im nicht-tumorösen Nierengewebe wurde durch genetische Varianten beeinflusst. Hier zeigten homozygote -24C-Allelträger eine 1,43-fach höhere mRNA-Expression als homozygote -24T-Allelträger ( $p=0,032$ ). Der funktionelle Einfluss von -24C>T konnte mittels Reporter-Gen-Assays auch *in vitro* nachgewiesen werden. Das -24C-Vektorkonstrukt wies eine 1,23-fach höhere Luciferase-Aktivität als das Vektorkonstrukt mit dem -24T-Allel auf ( $p=0,003$ ). Nach Durchführung von Elektrophoretic Mobility Shift Assays konnte in der Nähe des -24C>T SNP des ABCC2-Gens eine spezifische, aber vom Genotyp unabhängige DNA-Protein-Bindung identifiziert werden. Diese Resultate deuten auf einen funktionellen Einfluss des -24C>T SNP auf die ABCC2-Genexpression auf posttranskriptioneller Ebene hin.

*In silico* Untersuchungen zufolge ist der -24C>T SNP an Position 14 innerhalb eines Hairpin Loops in der Nähe des 5'-Endes der ABCC2-mRNA lokalisiert, die Sekundärstruktur scheint sich aber nicht zu ändern. Weitere Untersuchungen müssen daher klären, ob posttranskriptionelle Regulationsmechanismen beeinflusst werden und ob in Folge dessen, beispielsweise durch unterschiedliche mRNA-Stabilitäten, die differentielle Genexpression bedingt ist.

Unklar ist derzeit, ob die Expression von ABCC2 in Abhängigkeit von -24C>T in unterschiedlichen Gewebetypen unterschiedlich ausgeprägt moduliert wird. Die Ergebnisse dieser Arbeit erweitern insgesamt das Wissen um die Expression von Transportern im Nierenzellkarzinom, können aber auch Grundlage für künftige pharmakokinetische Studien sein. Da ABCC2 ein wichtiger Transporter konjugierter wie unkonjugierter Xenobiotika ist, ist zu prüfen, welchen Einfluss insbesondere der ABCC2 -24C>T SNP für die Elimination wichtiger Arzneistoffe, aber auch anderer Fremdstoffe, haben könnte. Dadurch könnte ein weiterer Beitrag zum Verständnis inter-individuell unterschiedlicher Bioverfügbarkeiten von Arzneistoffen, aber auch Fremdstoffen, geleistet werden.

## Summary

Drug metabolizing enzymes and transporter proteins are crucial parameters for the bioavailability of xenobiotics. Due to their localisation in many organs and their broad spectrum of substrates, the ATP-binding transmembrane export transporters ABCB1 (MDR1, P-gP) and ABCC2 (MRP2) play an important role in elimination of endogenous and exogenous substances. Genetic polymorphisms may influence the activity of these proteins and might therefore, at least in part, contribute to the explanation of inter-individual variability of drug bioavailability, but also the inter-individual differing extent of toxicity of e.g. potential mutagenic contaminants. The aim of this thesis was to determine the mRNA and protein expression in non-tumorous and tumorous kidney cortex tissue. Additionally it was investigated whether genetic variants of the xenobiotic-eliminating transporters ABCB1 and ABCC2 are susceptibility factors for renal cell cancer, and, in this regard, if and how these polymorphisms affect the expression *in-vivo* and *in-vitro*.

The genotype and haplotype distribution of the ABCB1 polymorphisms -2352G>A, -692T>C, 2677G>T/A (Ala893Ser/Thr), 3435C>T, and the ABCC2 polymorphisms -24C>T, 1249G>A (Val417Ile) and 3972C>T were determined in a total of 82 renal cell carcinoma patients and 164 healthy volunteers. The mRNA expression of both transporters in adjacent non-tumorous and tumorous tissue samples was estimated using Real-time PCR and the protein content by immuno-histochemistry. The functional impact of the ABCC2 5'-UTR SNP -24C>T was investigated *in vitro* performing reporter gene assays. Moreover, electrophoretic mobility shift assays were conducted in order to investigate DNA-protein-interactions in the 5'-untranslated region of ABCC2. Possible consequences for secondary mRNA structures were analyzed *in silico*.

In this study, both, ABCB1 and ABCC2, were less expressed in tumorous cortex tissue than in normal tissue on mRNA, as well as on protein level. For ABCB1 the differences were more pronounced in clear cell carcinoma showing significantly lowered ABCB1 protein contents than the non-clear cell carcinomas, which exhibited similar ABCB1 expressions as the normal tissues. However, none of the investigated ABCB1 and ABCC2 polymorphisms were identified as risk factor for renal cell cancer.

The ABCB1 2677G>T/A and 3435C>T polymorphisms exhibited a clear influence on the ABCB1 mRNA expression in the normal kidney cortex tissue. Carriers of the variant-alleles showed significant higher mRNA-expression than homozygote 2677G carriers ( $p=0.023$ ) and

3435C allele carriers ( $p=0.043$ ), respectively. Out of the ABCC2 variants investigated, ABCC2 -24C>T modulated significantly the mRNA expression in non-tumorous kidney cortex tissue. Homozygote -24C carriers bore 1.43 fold higher mRNA expressions than homozygote -24T-allele carriers ( $p=0.032$ ). The functional impact of the ABCC2 -24C>T SNP was verified by reporter gene assay also *in vitro*. The wild-type vector construct exhibited a 1.23 fold higher luciferase activity than the vector construct containing the -24T-allele ( $p=0.023$ ). After performing electrophoretic mobility shift assays a specific but genotype-independent DNA-protein interaction could be observed. These results suggest a functional influence of the -24C>T SNP on the ABCC2 gene expression on post-transcriptional level.

According to *in silico* analyses, -24C>T is located at position 14 in a hairpin loop near the 5'-end of the ABCC2 mRNA. Further studies should clarify if this SNP modulates post-transcriptional control mechanisms or if the differential gene expression is caused e.g. by altered mRNA stability.

Currently it is unclear, whether the influence of -24C>T on ABCC2 expression is differentially pronounced in different tissue types. The results of this study however may contribute to the knowledge on expression of ABC transporters in renal cell cancer, but may be considered as a basis of future pharmacokinetic studies. ABCC2 is an important transporter of conjugated and unconjugated drugs. Therefore the influence of particularly ABCC2 -24C>T on the elimination of important drugs but also of xenobiotics should be investigated in order to contribute to the understanding of differences in inter-individual bioavailability of these substances.

## Literaturverzeichnis

- [1] Brockmoller J, Kirchheiner J, Meisel C, Roots I. Pharmacogenetic diagnostics of cytochrome P450 polymorphisms in clinical drug development and in drug treatment. *Pharmacogenomics* 2000; **1**:125-151.
- [2] 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* 1995; **275**:1011-1018.
- [3] Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmoller J, John A *et al.* Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; **97**:3473-3478.
- [4] Siegsmond M, Brinkmann U, Schaffeler E, Weirich G, Schwab M, Eichelbaum M *et al.* Association of the P-glycoprotein transporter MDR1(C3435T) polymorphism with the susceptibility to renal epithelial tumors. *J Am Soc Nephrol* 2002; **13**:1847-1854.
- [5] Brockmoller J, Cascorbi I, Henning S, Meisel C, Roots I. Molecular genetics of cancer susceptibility. *Pharmacology* 2000; **61**:212-227.
- [6] Cascorbi I, Brockmoller J, Roots I. Molecular-epidemiological aspects of carcinogenesis: the role of xenobiotic metabolizing enzymes. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2002; **40**:562-563.
- [7] Cascorbi I. Genetic basis of toxic reactions to drugs and chemicals. *Toxicol Lett* 2006; **162**:16-28.
- [8] Ho RH, Kim RB. Transporters and drug therapy: implications for drug disposition and disease. *Clin Pharmacol Ther* 2005; **78**:260-277.
- [9] Marzolini C, Paus E, Buclin T, Kim RB. Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): recent advances and clinical relevance. *Clin Pharmacol Ther* 2004; **75**:13-33.

- [10] Meisel C, Roots I, Cascorbi I, Brinkmann U, Brockmoller J. How to manage individualized drug therapy: application of pharmacogenetic knowledge of drug metabolism and transport. *Clin Chem Lab Med* 2000; **38**:869-876.
- [11] Plant N. Interaction networks: coordinating responses to xenobiotic exposure. *Toxicology* 2004; **202**:21-32.
- [12] Dietrich CG, Geier A, Oude Elferink RP. ABC of oral bioavailability: transporters as gatekeepers in the gut. *Gut* 2003; **52**:1788-1795.
- [13] Kullak-Ublick GA, Becker MB. Regulation of drug and bile salt transporters in liver and intestine. *Drug Metab Rev* 2003; **35**:305-317.
- [14] Moore LB, Parks DJ, Jones SA, Bledsoe RK, Consler TG, Stimmel JB *et al.* Orphan nuclear receptors constitutive androstane receptor and pregnane X receptor share xenobiotic and steroid ligands. *J Biol Chem* 2000; **275**:15122-15127.
- [15] Watkins RE, Maglich JM, Moore LB, Wisely GB, Noble SM, Davis-Searles PR *et al.* 2.1 A crystal structure of human PXR in complex with the St. John's wort compound hyperforin. *Biochemistry* 2003; **42**:1430-1438.
- [16] Sparreboom A, van Asperen J, Mayer U, Schinkel AH, Smit JW, Meijer DK *et al.* Limited oral bioavailability and active epithelial excretion of paclitaxel (Taxol) caused by P-glycoprotein in the intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; **94**:2031-2035.
- [17] Synold TW, Dussault I, Forman BM. The orphan nuclear receptor SXR coordinately regulates drug metabolism and efflux. *Nat Med* 2001; **7**:584-590.
- [18] Moore LB, Goodwin B, Jones SA, Wisely GB, Serabjit-Singh CJ, Willson TM *et al.* St. John's wort induces hepatic drug metabolism through activation of the pregnane X receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; **97**:7500-7502.
- [19] Ruschitzka F, Meier PJ, Turina M, Luscher TF, Noll G. Acute heart transplant rejection due to Saint John's wort. *Lancet* 2000; **355**:548-549.

- [20] Saeki T, Ueda K, Tanigawara Y, Hori R, Komano T. Human P-glycoprotein transports cyclosporin A and FK506. *J Biol Chem* 1993; **268**:6077-6080.
- [21] de Lannoy IA, Silverman M. The MDR1 gene product, P-glycoprotein, mediates the transport of the cardiac glycoside, digoxin. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; **189**:551-557.
- [22] Greiner B, Eichelbaum M, Fritz P, Kreichgauer HP, von Richter O, Zundler J *et al.* The role of intestinal P-glycoprotein in the interaction of digoxin and rifampin. *J Clin Invest* 1999; **104**:147-153.
- [23] Oswald S, Haenisch S, Fricke C, Sudhop T, Remmler C, Giessmann T *et al.* Intestinal expression of P-glycoprotein (ABCB1), multidrug resistance associated protein 2 (ABCC2), and uridine diphosphate-glucuronosyltransferase 1A1 predicts the disposition and modulates the effects of the cholesterol absorption inhibitor ezetimibe in humans. *Clin Pharmacol Ther* 2006; **79**:206-217.
- [24] Klein I, Sarkadi B, Varadi A. An inventory of the human ABC proteins. *Biochim Biophys Acta* 1999; **1461**:237-262.
- [25] Chang G, Roth CB. Structure of MsbA from *E. coli*: a homolog of the multidrug resistance ATP binding cassette (ABC) transporters. *Science* 2001; **293**:1793-1800.
- [26] Sarkadi B, Homolya L, Szakacs G, Varadi A. Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoinnity defense system. *Physiol Rev* 2006; **86**:1179-1236.
- [27] Borst P, Evers R, Kool M, Wijnholds J. The multidrug resistance protein family. *Biochim Biophys Acta* 1999; **1461**:347-357.
- [28] Dombrowski SM, Desai SY, Marroni M, Cucullo L, Goodrich K, Bingaman W *et al.* Overexpression of multiple drug resistance genes in endothelial cells from patients with refractory epilepsy. *Epilepsia* 2001; **42**:1501-1506.

- [29] Kusuhara H, Sugiyama Y. Role of transporters in the tissue-selective distribution and elimination of drugs: transporters in the liver, small intestine, brain and kidney. *J Control Release* 2002; **78**:43-54.
- [30] Nishimura M, Naito S. Tissue-specific mRNA expression profiles of human ATP-binding cassette and solute carrier transporter superfamilies. *Drug Metab Pharmacokinet* 2005; **20**:452-477.
- [31] Schaub TP, Kartenbeck J, König J, Spring H, Dorsam J, Staehler G *et al.* Expression of the MRP2 gene-encoded conjugate export pump in human kidney proximal tubules and in renal cell carcinoma. *J Am Soc Nephrol* 1999; **10**:1159-1169.
- [32] Schinkel AH, Jonker JW. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Adv Drug Deliv Rev* 2003; **55**:3-29.
- [33] Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta* 1976; **455**:152-162.
- [34] Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer* 2002; **2**:48-58.
- [35] Ueda K, Cardarelli C, Gottesman MM, Pastan I. Expression of a full-length cDNA for the human "MDR1" gene confers resistance to colchicine, doxorubicin, and vinblastine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; **84**:3004-3008.
- [36] Schinkel AH, Mayer U, Wagenaar E, Mol CA, van Deemter L, Smit JJ *et al.* Normal viability and altered pharmacokinetics in mice lacking mdr1-type (drug-transporting) P-glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; **94**:4028-4033.
- [37] Ambudkar SV, Dey S, Hrycyca CA, Ramachandra M, Pastan I, Gottesman MM. Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999; **39**:361-398.
- [38] Ambudkar SV, Kimchi-Sarfaty C, Sauna ZE, Gottesman MM. P-glycoprotein: from genomics to mechanism. *Oncogene* 2003; **22**:7468-7485.

- [39] Chan LM, Lowes S, Hirst BH. The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability. *Eur J Pharm Sci* 2004; **21**:25-51.
- [40] Hoffmann U, Kroemer HK. The ABC transporters MDR1 and MRP2: multiple functions in disposition of xenobiotics and drug resistance. *Drug Metab Rev* 2004; **36**:669-701.
- [41] Payen L, Sparfel L, Courtois A, Vernhet L, Guillouzo A, Fardel O. The drug efflux pump MRP2: regulation of expression in physiopathological situations and by endogenous and exogenous compounds. *Cell Biol Toxicol* 2002; **18**:221-233.
- [42] Suzuki H, Sugiyama Y. Single nucleotide polymorphisms in multidrug resistance associated protein 2 (MRP2/ABCC2): its impact on drug disposition. *Adv Drug Deliv Rev* 2002; **54**:1311-1331.
- [43] Geier A, Mertens PR, Gerloff T, Dietrich CG, En-Nia A, Kullak-Ublick GA *et al*. Constitutive rat multidrug-resistance protein 2 gene transcription is down-regulated by Y-box protein 1. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; **309**:612-618.
- [44] Muller M. Transcriptional control of hepatocanalicular transporter gene expression. *Semin Liver Dis* 2000; **20**:323-337.
- [45] Scotto KW. Transcriptional regulation of ABC drug transporters. *Oncogene* 2003; **22**:7496-7511.
- [46] Jedlitschky G, Leier I, Buchholz U, Hummel-Eisenbeiss J, Burchell B, Keppler D. ATP-dependent transport of bilirubin glucuronides by the multidrug resistance protein MRP1 and its hepatocyte canalicular isoform MRP2. *Biochem J* 1997; **327 ( Pt 1)**:305-310.
- [47] Kamisako T, Leier I, Cui Y, Konig J, Buchholz U, Hummel-Eisenbeiss J *et al*. Transport of monoglucuronosyl and bisglucuronosyl bilirubin by recombinant human and rat multidrug resistance protein 2. *Hepatology* 1999; **30**:485-490.
- [48] Cui Y, Konig J, Buchholz JK, Spring H, Leier I, Keppler D. Drug resistance and ATP-dependent conjugate transport mediated by the apical multidrug resistance protein, MRP2, permanently expressed in human and canine cells. *Mol Pharmacol* 1999; **55**:929-937.



- [49] Jedlitschky G, Leier I, Buchholz U, Barnouin K, Kurz G, Keppler D. Transport of glutathione, glucuronate, and sulfate conjugates by the MRP gene-encoded conjugate export pump. *Cancer Res* 1996; **56**:988-994.
- [50] Akita H, Suzuki H, Ito K, Kinoshita S, Sato N, Takikawa H *et al.* Characterization of bile acid transport mediated by multidrug resistance associated protein 2 and bile salt export pump. *Biochim Biophys Acta* 2001; **1511**:7-16.
- [51] Keppler D, König J. Hepatic secretion of conjugated drugs and endogenous substances. *Semin Liver Dis* 2000; **20**:265-272.
- [52] Trauner M, Boyer JL. Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation. *Physiol Rev* 2003; **83**:633-671.
- [53] König J, Nies AT, Cui Y, Leier I, Keppler D. Conjugate export pumps of the multidrug resistance protein (MRP) family: localization, substrate specificity, and MRP2-mediated drug resistance. *Biochim Biophys Acta* 1999; **1461**:377-394.
- [54] Dietrich CG, de Waart DR, Ottenhoff R, Schoots IG, Elferink RP. Increased bioavailability of the food-derived carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine in MRP2-deficient rats. *Mol Pharmacol* 2001; **59**:974-980.
- [55] Dietrich CG, de Waart DR, Ottenhoff R, Bootsma AH, van Gennip AH, Elferink RP. Mrp2-deficiency in the rat impairs biliary and intestinal excretion and influences metabolism and disposition of the food-derived carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo. *Carcinogenesis* 2001; **22**:805-811.
- [56] Kivisto KT, Grisk O, Hofmann U, Meissner K, Moritz KU, Ritter C *et al.* Disposition of oral and intravenous pravastatin in MRP2-deficient TR- rats. *Drug Metab Dispos* 2005; **33**:1593-1596.
- [57] Matsushima S, Maeda K, Kondo C, Hirano M, Sasaki M, Suzuki H *et al.* Identification of the hepatic efflux transporters of organic anions using double-transfected Madin-Darby canine kidney II cells expressing human organic anion-transporting polypeptide 1B1

(OATP1B1)/multidrug resistance-associated protein 2, OATP1B1/multidrug resistance 1, and OATP1B1/breast cancer resistance protein. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; **314**:1059-1067.

[58] Sasaki M, Suzuki H, Ito K, Abe T, Sugiyama Y. Transcellular transport of organic anions across a double-transfected Madin-Darby canine kidney II cell monolayer expressing both human organic anion-transporting polypeptide (OATP2/SLC21A6) and Multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2/ABCC2). *J Biol Chem* 2002; **277**:6497-6503.

[59] Kala SV, Neely MW, Kala G, Prater CI, Atwood DW, Rice JS *et al.* The MRP2/cMOAT transporter and arsenic-glutathione complex formation are required for biliary excretion of arsenic. *J Biol Chem* 2000; **275**:33404-33408.

[60] Leier I, Jedlitschky G, Buchholz U, Center M, Cole SP, Deeley RG *et al.* ATP-dependent glutathione disulphide transport mediated by the MRP gene-encoded conjugate export pump. *Biochem J* 1996; **314 ( Pt 2)**:433-437.

[61] Paulusma CC, van Geer MA, Evers R, Heijn M, Ottenhoff R, Borst P *et al.* Canalicular multispecific organic anion transporter/multidrug resistance protein 2 mediates low-affinity transport of reduced glutathione. *Biochem J* 1999; **338 ( Pt 2)**:393-401.

[62] Suzuki H, Sugiyama Y. Excretion of GSSG and glutathione conjugates mediated by MRP1 and cMOAT/MRP2. *Semin Liver Dis* 1998; **18**:359-376.

[63] Evers R, de Haas M, Sparidans R, Beijnen J, Wielinga PR, Lankelma J *et al.* Vinblastine and sulfinpyrazone export by the multidrug resistance protein MRP2 is associated with glutathione export. *Br J Cancer* 2000; **83**:375-383.

[64] Haimeur A, Conseil G, Deeley RG, Cole SP. The MRP-related and BCRP/ABCG2 multidrug resistance proteins: biology, substrate specificity and regulation. *Curr Drug Metab* 2004; **5**:21-53.

[65] Ballatori N, Rebeor JF. Roles of MRP2 and oatp1 in hepatocellular export of reduced glutathione. *Semin Liver Dis* 1998; **18**:377-387.

- [66] Ballatori N, Hammond CL, Cunningham JB, Krance SM, Marchan R. Molecular mechanisms of reduced glutathione transport: role of the MRP/CFTR/ABCC and OATP/SLC21A families of membrane proteins. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005; **204**:238-255.
- [67] Muller M, de Vries EG, Jansen PL. Role of multidrug resistance protein (MRP) in glutathione S-conjugate transport in mammalian cells. *J Hepatol* 1996; **24 Suppl 1**:100-108.
- [68] Muller M, Jansen PL. Molecular aspects of hepatobiliary transport. *Am J Physiol* 1997; **272**:G1285-G1303.
- [69] Vollrath V, Wielandt AM, Iruretagoyena M, Chianale J. Role of Nrf2 in the regulation of the Mrp2 (ABCC2) gene. *Biochem J* 2006; **395**:599-609.
- [70] Paulusma CC, Bosma PJ, Zaman GJ, Bakker CT, Otter M, Scheffer GL *et al.* Congenital jaundice in rats with a mutation in a multidrug resistance-associated protein gene. *Science* 1996; **271**:1126-1128.
- [71] Taniguchi K, Wada M, Kohno K, Nakamura T, Kawabe T, Kawakami M *et al.* A human canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) gene is overexpressed in cisplatin-resistant human cancer cell lines with decreased drug accumulation. *Cancer Res* 1996; **56**:4124-4129.
- [72] Cole SP, Bhardwaj G, Gerlach JH, Mackie JE, Grant CE, Almquist KC *et al.* Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* 1992; **258**:1650-1654.
- [73] Cole SP, Deeley RG. Multidrug resistance mediated by the ATP-binding cassette transporter protein MRP. *Bioessays* 1998; **20**:931-940.
- [74] Narasaki F, Oka M, Nakano R, Ikeda K, Fukuda M, Nakamura T *et al.* Human canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) is expressed in human lung, gastric, and colorectal cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; **240**:606-611.
- [75] Kool M, de Haas M, Scheffer GL, Scheper RJ, van Eijk MJ, Juijn JA *et al.* Analysis of expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, homologues of the multidrug

resistance-associated protein gene (MRP1), in human cancer cell lines. *Cancer Res* 1997; **57**:3537-3547.

[76] Minemura M, Tanimura H, Tabor E. Overexpression of multidrug resistance genes MDR1 and cMOAT in human hepatocellular carcinoma and hepatoblastoma cell lines. *Int J Oncol* 1999; **15**:559-563.

[77] Koike K, Kawabe T, Tanaka T, Toh S, Uchiumi T, Wada M *et al.* A canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) antisense cDNA enhances drug sensitivity in human hepatic cancer cells. *Cancer Res* 1997; **57**:5475-5479.

[78] Hooijberg JH, Broxterman HJ, Kool M, Assaraf YG, Peters GJ, Noordhuis P *et al.* Antifolate resistance mediated by the multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2. *Cancer Res* 1999; **59**:2532-2535.

[79] Hisaeda K, Inokuchi A, Nakamura T, Iwamoto Y, Kohno K, Kuwano M *et al.* Interleukin-1beta represses MRP2 gene expression through inactivation of interferon regulatory factor 3 in HepG2 cells. *Hepatology* 2004; **39**:1574-1582.

[80] Stockel B, Konig J, Nies AT, Cui Y, Brom M, Keppler D. Characterization of the 5'-flanking region of the human multidrug resistance protein 2 (MRP2) gene and its regulation in comparison with the multidrug resistance protein 3 (MRP3) gene. *Eur J Biochem* 2000; **267**:1347-1358.

[81] Tanaka T, Uchiumi T, Hinoshita E, Inokuchi A, Toh S, Wada M *et al.* The human multidrug resistance protein 2 gene: functional characterization of the 5'-flanking region and expression in hepatic cells. *Hepatology* 1999; **30**:1507-1512.

[82] Denson LA, Auld KL, Schiek DS, McClure MH, Mangelsdorf DJ, Karpen SJ. Interleukin-1beta suppresses retinoid transactivation of two hepatic transporter genes involved in bile formation. *J Biol Chem* 2000; **275**:8835-8843.

[83] Jigorel E, Le Vee M, Boursier-Neyret C, Parmentier Y, Fardel O. Differential regulation of sinusoidal and canalicular hepatic drug transporter expression by xenobiotics activating drug-sensing receptors in primary human hepatocytes. *Drug Metab Dispos* 2006.

- [84] Geier A, Mertens PR, Gerloff T, Dietrich CG, En-Nia A, Kullak-Ublick GA *et al.* Constitutive rat multidrug-resistance protein 2 gene transcription is down-regulated by Y-box protein 1. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; **309**:612-618.
- [85] Kuwano M, Uchiumi T, Hayakawa H, Ono M, Wada M, Izumi H *et al.* The basic and clinical implications of ABC transporters, Y-box-binding protein-1 (YB-1) and angiogenesis-related factors in human malignancies. *Cancer Sci* 2003; **94**:9-14.
- [86] Kast HR, Goodwin B, Tarr PT, Jones SA, Anisfeld AM, Stoltz CM *et al.* Regulation of multidrug resistance-associated protein 2 (ABCC2) by the nuclear receptors pregnane X receptor, farnesoid X-activated receptor, and constitutive androstane receptor. *J Biol Chem* 2002; **277**:2908-2915.
- [87] Bombail V, Taylor K, Gibson GG, Plant N. Role of Sp1, C/EBP alpha, HNF3, and PXR in the basal- and xenobiotic-mediated regulation of the CYP3A4 gene. *Drug Metab Dispos* 2004; **32**:525-535.
- [88] Burk O, Arnold KA, Geick A, Tegude H, Eichelbaum M. A role for constitutive androstane receptor in the regulation of human intestinal MDR1 expression. *Biol Chem* 2005; **386**:503-513.
- [89] Geick A, Eichelbaum M, Burk O. Nuclear receptor response elements mediate induction of intestinal MDR1 by rifampin. *J Biol Chem* 2001; **276**:14581-14587.
- [90] Honkakoski P, Negishi M. Regulation of cytochrome P450 (CYP) genes by nuclear receptors. *Biochem J* 2000; **347**:321-337.
- [91] Pascussi JM, Gerbal-Chaloin S, Drocourt L, Assenat E, Larrey D, Pichard-Garcia L *et al.* Cross-talk between xenobiotic detoxication and other signalling pathways: clinical and toxicological consequences. *Xenobiotica* 2004; **34**:633-664.
- [92] Savas U, Griffin KJ, Johnson EF. Molecular mechanisms of cytochrome P-450 induction by xenobiotics: An expanded role for nuclear hormone receptors. *Mol Pharmacol* 1999; **56**:851-857.

- [93] Wang H, Lecluyse EL. Role of orphan nuclear receptors in the regulation of drug-metabolising enzymes. *Clin Pharmacokinet* 2003; **42**:1331-1357.
- [94] Giessmann T, Modess C, Hecker U, Zschesche M, Dazert P, Kunert-Keil C *et al.* CYP2D6 genotype and induction of intestinal drug transporters by rifampin predict presystemic clearance of carvedilol in healthy subjects. *Clin Pharmacol Ther* 2004; **75**:213-222.
- [95] Furuno T, Landi MT, Ceroni M, Caporaso N, Bernucci I, Nappi G *et al.* Expression polymorphism of the blood-brain barrier component P-glycoprotein (MDR1) in relation to Parkinson's disease. *Pharmacogenetics* 2002; **12**:529-534.
- [96] Horinouchi M, Sakaeda T, Nakamura T, Morita Y, Tamura T, Aoyama N *et al.* Significant genetic linkage of MDR1 polymorphisms at positions 3435 and 2677: functional relevance to pharmacokinetics of digoxin. *Pharm Res* 2002; **19**:1581-1585.
- [97] Illmer T, Schuler US, Thiede C, Schwarz UI, Kim RB, Gotthard S *et al.* MDR1 gene polymorphisms affect therapy outcome in acute myeloid leukemia patients. *Cancer Res* 2002; **62**:4955-4962.
- [98] Johne A, Kopke K, Gerloff T, Mai I, Rietbrock S, Meisel C *et al.* Modulation of steady-state kinetics of digoxin by haplotypes of the P-glycoprotein MDR1 gene. *Clin Pharmacol Ther* 2002; **72**:584-594.
- [99] Kurata Y, Ieiri I, Kimura M, Morita T, Irie S, Urae A *et al.* Role of human MDR1 gene polymorphism in bioavailability and interaction of digoxin, a substrate of P-glycoprotein. *Clin Pharmacol Ther* 2002; **72**:209-219.
- [100] Moriya Y, Nakamura T, Horinouchi M, Sakaeda T, Tamura T, Aoyama N *et al.* Effects of polymorphisms of MDR1, MRP1, and MRP2 genes on their mRNA expression levels in duodenal enterocytes of healthy Japanese subjects. *Biol Pharm Bull* 2002; **25**:1356-1359.
- [101] Tanabe M, Ieiri I, Nagata N, Inoue K, Ito S, Kanamori Y *et al.* Expression of P-glycoprotein in human placenta: relation to genetic polymorphism of the multidrug resistance (MDR)-1 gene. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; **297**:1137-1143.

- [102] Cascorbi I, Gerloff T, Johne A, Meisel C, Hoffmeyer S, Schwab M *et al.* Frequency of single nucleotide polymorphisms in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene in white subjects. *Clin Pharmacol Ther* 2001; **69**:169-174.
- [103] Gerloff T, Schaefer M, Johne A, Oselin K, Meisel C, Cascorbi I *et al.* MDR1 genotypes do not influence the absorption of a single oral dose of 1 mg digoxin in healthy white males. *Br J Clin Pharmacol* 2002; **54**:610-616.
- [104] Kim RB, Leake BF, Choo EF, Dresser GK, Kubba SV, Schwarz UI *et al.* Identification of functionally variant MDR1 alleles among European Americans and African Americans. *Clin Pharmacol Ther* 2001; **70**:189-199.
- [105] Schaeffeler E, Eichelbaum M, Brinkmann U, Penger A, Asante-Poku S, Zanger UM *et al.* Frequency of C3435T polymorphism of MDR1 gene in African people. *Lancet* 2001; **358**:383-384.
- [106] Siegmund W, Ludwig K, Giessmann T, Dazert P, Schroeder E, Sperker B *et al.* The effects of the human MDR1 genotype on the expression of duodenal P-glycoprotein and disposition of the probe drug talinolol. *Clin Pharmacol Ther* 2002; **72**:572-583.
- [107] Ameyaw MM, Regateiro F, Li T, Liu X, Tariq M, Mobarek A *et al.* MDR1 pharmacogenetics: frequency of the C3435T mutation in exon 26 is significantly influenced by ethnicity. *Pharmacogenetics* 2001; **11**:217-221.
- [108] Cascorbi I. Role of pharmacogenetics of ATP-binding cassette transporters in the pharmacokinetics of drugs. *Pharmacol Ther* 2006.
- [109] Verstuyft C, Schwab M, Schaeffeler E, Kerb R, Brinkmann U, Jaillon P *et al.* Digoxin pharmacokinetics and MDR1 genetic polymorphisms. *Eur J Clin Pharmacol* 2003; **58**:809-812.
- [110] Fellay J, Marzolini C, Meaden ER, Back DJ, Buclin T, Chave JP *et al.* Response to antiretroviral treatment in HIV-1-infected individuals with allelic variants of the multidrug resistance transporter 1: a pharmacogenetics study. *Lancet* 2002; **359**:30-36.

- [111] Anglicheau D, Verstuyft C, Laurent-Puig P, Becquemont L, Schlageter MH, Cassinat B *et al.* Association of the multidrug resistance-1 gene single-nucleotide polymorphisms with the tacrolimus dose requirements in renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol* 2003; **14**:1889-1896.
- [112] Chowbay B, Cumaraswamy S, Cheung YB, Zhou Q, Lee EJ. Genetic polymorphisms in MDR1 and CYP3A4 genes in Asians and the influence of MDR1 haplotypes on cyclosporin disposition in heart transplant recipients. *Pharmacogenetics* 2003; **13**:89-95.
- [113] Hitzl M, Drescher S, van der KH, Schaffeler E, Fischer J, Schwab M *et al.* 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* 2001; **11**:293-298.
- [114] Sakaeda T, Nakamura T, Horinouchi M, Kakumoto M, Ohmoto N, Sakai T *et al.* MDR1 genotype-related pharmacokinetics of digoxin after single oral administration in healthy Japanese subjects. *Pharm Res* 2001; **18**:1400-1404.
- [115] Moriya Y, Nakamura T, Horinouchi M, Sakaeda T, Tamura T, Aoyama N *et al.* Effects of polymorphisms of MDR1, MRP1, and MRP2 genes on their mRNA expression levels in duodenal enterocytes of healthy Japanese subjects. *Biol Pharm Bull* 2002; **25**:1356-1359.
- [116] Nakamura T, Sakaeda T, Horinouchi M, Tamura T, Aoyama N, Shirakawa T *et al.* 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 Japanese subjects. *Clin Pharmacol Ther* 2002; **71**:297-303.
- [117] Calado RT, Falcao RP, Garcia AB, Gabellini SM, Zago MA, Franco RF. Influence of functional MDR1 gene polymorphisms on P-glycoprotein activity in CD34+ hematopoietic stem cells. *Haematologica* 2002; **87**:564-568.
- [118] Goto M, Masuda S, Saito H, Uemoto S, Kiuchi T, Tanaka K *et al.* C3435T polymorphism in the MDR1 gene affects the enterocyte expression level of CYP3A4 rather than Pgp in recipients of living-donor liver transplantation. *Pharmacogenetics* 2002; **12**:451-457.



- [119] Morita N, Yasumori T, Nakayama K. Human MDR1 polymorphism: G2677T/A and C3435T have no effect on MDR1 transport activities. *Biochem Pharmacol* 2003; **65**:1843-1852.
- [120] Oselin K, Gerloff T, Mrozikiewicz PM, Pahkla R, Roots I. MDR1 polymorphisms G2677T in exon 21 and C3435T in exon 26 fail to affect rhodamine 123 efflux in peripheral blood lymphocytes. *Fundam Clin Pharmacol* 2003; **17**:463-469.
- [121] Oselin K, Nowakowski-Gashaw I, Mrozikiewicz PM, Wolbergs D, Pahkla R, Roots I. Quantitative determination of MDR1 mRNA expression in peripheral blood lymphocytes: a possible role of genetic polymorphisms in the MDR1 gene. *Eur J Clin Invest* 2003; **33**:261-267.
- [122] Taniguchi S, Mochida Y, Uchiumi T, Tahira T, Hayashi K, Takagi K *et al.* Genetic polymorphism at the 5' regulatory region of multidrug resistance 1 (MDR1) and its association with interindividual variation of expression level in the colon. *Mol Cancer Ther* 2003; **2**:1351-1359.
- [123] Schwab M, Schaeffeler E, Marx C, Fromm MF, Kaskas B, Metzler J *et al.* Association between the C3435T MDR1 gene polymorphism and susceptibility for ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2003; **124**:26-33.
- [124] Drozdziak M, Bialecka M, Mysliwiec K, Honczarenko K, Stankiewicz J, Sych Z. Polymorphism in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene: a possible link between environmental and genetic factors in Parkinson's disease. *Pharmacogenetics* 2003; **13**:259-263.
- [125] Kafka A, Sauer G, Jaeger C, Grundmann R, Kreienberg R, Zeillinger R *et al.* Polymorphism C3435T of the MDR-1 gene predicts response to preoperative chemotherapy in locally advanced breast cancer. *Int J Oncol* 2003; **22**:1117-1121.
- [126] Siddiqui A, Kerb R, Weale ME, Brinkmann U, Smith A, Goldstein DB *et al.* Association of multidrug resistance in epilepsy with a polymorphism in the drug-transporter gene ABCB1. *N Engl J Med* 2003; **348**:1442-1448.

- [127] DUBIN IN, JOHNSON FB. Chronic idiopathic jaundice with unidentified pigment in liver cells; a new clinicopathologic entity with a report of 12 cases. *Medicine (Baltimore)* 1954; **33**:155-197.
- [128] Keitel V, Kartenbeck J, Nies AT, Spring H, Brom M, Keppler D. Impaired protein maturation of the conjugate export pump multidrug resistance protein 2 as a consequence of a deletion mutation in Dubin-Johnson syndrome. *Hepatology* 2000; **32**:1317-1328.
- [129] Materna V, Lage H. Homozygous mutation Arg768Trp in the ABC-transporter encoding gene MRP2/cMOAT/ABCC2 causes Dubin-Johnson syndrome in a Caucasian patient. *J Hum Genet* 2003; **48**:484-486.
- [130] Mor-Cohen R, Zivelin A, Rosenberg N, Shani M, Muallem S, Seligsohn U. Identification and functional analysis of two novel mutations in the multidrug resistance protein 2 gene in Israeli patients with Dubin-Johnson syndrome. *J Biol Chem* 2001; **276**:36923-36930.
- [131] Paulusma CC, Kool M, Bosma PJ, Scheffer GL, ter Borg F, Scheper RJ *et al.* A mutation in the human canalicular multispecific organic anion transporter gene causes the Dubin-Johnson syndrome. *Hepatology* 1997; **25**:1539-1542.
- [132] Toh S, Wada M, Uchiumi T, Inokuchi A, Makino Y, Horie Y *et al.* Genomic structure of the canalicular multispecific organic anion-transporter gene (MRP2/cMOAT) and mutations in the ATP-binding-cassette region in Dubin-Johnson syndrome. *Am J Hum Genet* 1999; **64**:739-746.
- [133] Tsujii H, Konig J, Rost D, Stockel B, Leuschner U, Keppler D. Exon-intron organization of the human multidrug-resistance protein 2 (MRP2) gene mutated in Dubin-Johnson syndrome. *Gastroenterology* 1999; **117**:653-660.
- [134] Wada M, Toh S, Taniguchi K, Nakamura T, Uchiumi T, Kohno K *et al.* Mutations in the canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) gene, a novel ABC transporter, in patients with hyperbilirubinemia II/Dubin-Johnson syndrome. *Hum Mol Genet* 1998; **7**:203-207.

- [135] 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* 2001; **11**:175-184.
- [136] Haenisch S. Häufigkeit von MRP2-Polymorphismen in der deutschen Bevölkerung. *Diplomarbeit* 2002.
- [137] Colombo S, Soranzo N, Rotger M, Sprenger R, Bleiber G, Furrer H *et al.* Influence of ABCB1, ABCC1, ABCC2, and ABCG2 haplotypes on the cellular exposure of nelfinavir in vivo. *Pharmacogenet Genomics* 2005; **15**:599-608.
- [138] Haenisch S, Zimmermann U, Dazert E, Wruck CJ, Dazert P, Siegmund S *et al.* Influence of polymorphisms of ABCB1 and ABCC2 on mRNA and protein expression in normal and cancerous kidney cortex. *Pharmacogenomics J* 2006.
- [139] Meyer zu Schwabedissen HE, Jedlitschky G, Gratz M, Haenisch S, Linnemann K, Fusch C *et al.* Variable expression of MRP2 (ABCC2) in human placenta: influence of gestational age and cellular differentiation. *Drug Metab Dispos* 2005; **33**:896-904.
- [140] Storkel S, van den BE. Morphological classification of renal cancer. *World J Urol* 1995; **13**:153-158.
- [141] Bray F, Sankila R, Ferlay J, Parkin DM. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 1995. *Eur J Cancer* 2002; **38**:99-166.
- [142] Godley PA, Escobar MA. Renal cell carcinoma. *Curr Opin Oncol* 1998; **10**:261-265.
- [143] Chow WH, Devesa SS, Warren JL, Fraumeni JF, Jr. Rising incidence of renal cell cancer in the United States. *JAMA* 1999; **281**:1628-1631.
- [144] Mathew A, Devesa SS, Fraumeni JF, Jr., Chow WH. Global increases in kidney cancer incidence, 1973-1992. *Eur J Cancer Prev* 2002; **11**:171-178.
- [145] Motzer RJ, Bander NH, Nanus DM. Renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 1996; **335**:865-875.

[146] Finney R. The value of radiotherapy in the treatment of hypernephroma--a clinical trial. *Br J Urol* 1973; **45**:258-269.

[147] Rini BI, Vogelzang NJ, Dumas MC, Wade JL, III, Taber DA, Stadler WM. Phase II trial of weekly intravenous gemcitabine with continuous infusion fluorouracil in patients with metastatic renal cell cancer. *J Clin Oncol* 2000; **18**:2419-2426.

[148] Interferon-alpha and survival in metastatic renal carcinoma: early results of a randomised controlled trial. Medical Research Council Renal Cancer Collaborators. *Lancet* 1999; **353**:14-17.

[149] Berg WJ, Divgi CR, Nanus DM, Motzer RJ. Novel investigative approaches for advanced renal cell carcinoma. *Semin Oncol* 2000; **27**:234-239.

[150] Bukowski RM. Cytokine therapy for metastatic renal cell carcinoma. *Semin Urol Oncol* 2001; **19**:148-154.

[151] Nanus DM. New treatment approaches for metastatic renal cell carcinoma. *Curr Oncol Rep* 2000; **2**:417-422.

[152] Negrier S, Escudier B, Lasset C, Douillard JY, Savary J, Chevreau C *et al.* Recombinant human interleukin-2, recombinant human interferon alfa-2a, or both in metastatic renal-cell carcinoma. Groupe Francais d'Immunotherapie. *N Engl J Med* 1998; **338**:1272-1278.

[153] Batist G, Patenaude F, Champagne P, Croteau D, Levinton C, Hariton C *et al.* Neovastat (AE-941) in refractory renal cell carcinoma patients: report of a phase II trial with two dose levels. *Ann Oncol* 2002; **13**:1259-1263.

[154] Fishman M, Antonia S. Novel therapies for renal cell carcinoma--an update. *Expert Opin Investig Drugs* 2003; **12**:593-609.

[155] Fishman M, Antonia S. Specific antitumour vaccine for renal cancer. *Lancet* 2004; **363**:583-584.

- [156] Dhote R, Pellicer-Coeuret M, Thiounn N, Debre B, Vidal-Trecan G. Risk factors for adult renal cell carcinoma: a systematic review and implications for prevention. *BJU Int* 2000; **86**:20-27.
- [157] Kopper L, Timar J. Genomics of renal cell cancer-- does it provide breakthrough? *Pathol Oncol Res* 2006; **12**:5-11.
- [158] Rini BI, Jaeger E, Weinberg V, Sein N, Chew K, Fong K *et al.* Clinical response to therapy targeted at vascular endothelial growth factor in metastatic renal cell carcinoma: impact of patient characteristics and Von Hippel-Lindau gene status. *BJU Int* 2006.
- [159] Brauch H, Weirich G, Brieger J, Glavac D, Rodl H, Eichinger M *et al.* VHL alterations in human clear cell renal cell carcinoma: association with advanced tumor stage and a novel hot spot mutation. *Cancer Res* 2000; **60**:1942-1948.
- [160] Brauch H, Weirich G, Hornauer MA, Storkel S, Wohl T, Bruning T. Trichloroethylene exposure and specific somatic mutations in patients with renal cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1999; **91**:854-861.
- [161] Bieche I, Parfait B, Nogues C, Andrieu C, Vidaud D, Spyrtos F *et al.* The CGA gene as new predictor of the response to endocrine therapy in ER alpha-positive postmenopausal breast cancer patients. *Oncogene* 2001; **20**:6955-6959.
- [162] Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002; **3**:RESEARCH0034.
- [163] Meissner K, Sperker B, Karsten C, Zu Schwabedissen HM, Seeland U, Bohm M *et al.* Expression and localization of P-glycoprotein in human heart: effects of cardiomyopathy. *J Histochem Cytochem* 2002; **50**:1351-1356.
- [164] Vogelgesang S, Kunert-Keil C, Cascorbi I, Mosyagin I, Schroder E, Runge U *et al.* Expression of multidrug transporters in dysembryoplastic neuroepithelial tumors causing intractable epilepsy. *Clin Neuropathol* 2004; **23**:223-231.

- [165] Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977; **74**:5463-5467.
- [166] DeLuca M. Firefly luciferase. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 1976; **44**:37-68.
- [167] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; **72**:248-254.
- [168] Berkner KL, Folk WR. Polynucleotide kinase exchange reaction: quantitative assay for restriction endonuclease-generated 5'-phosphoroyl termini in DNA. *J Biol Chem* 1977; **252**:3176-3184.
- [169] Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* 2003; **31**:3406-3415.
- [170] Terwilliger, JDaOJ. Handbook of human genetic linkage. Johns Hopkins University Press, 1994. 1994.
- [171] Sakaeda T. MDR1 genotype-related pharmacokinetics: fact or fiction? *Drug Metab Pharmacokinet* 2005; **20**:391-414.
- [172] Brant SR, Panhuysen CI, Nicolae D, Reddy DM, Bonen DK, Karaliukas R *et al*. MDR1 Ala893 polymorphism is associated with inflammatory bowel disease. *Am J Hum Genet* 2003; **73**:1282-1292.
- [173] Ho GT, Nimmo ER, Tenesa A, Fennell J, Drummond H, Mowat C *et al*. Allelic variations of the multidrug resistance gene determine susceptibility and disease behavior in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2005; **128**:288-296.
- [174] Hauser IA, Schaeffeler E, Gauer S, Scheuermann EH, Wegner B, Gossmann J *et al*. ABCB1 genotype of the donor but not of the recipient is a major risk factor for cyclosporine-related nephrotoxicity after renal transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2005; **16**:1501-1511.

- [175] Ito K, Suzuki H, Sugiyama Y. Single amino acid substitution of rat MRP2 results in acquired transport activity for taurocholate. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; **281**:G1034-G1043.
- [176] Ito K, Suzuki H, Sugiyama Y. Charged amino acids in the transmembrane domains are involved in the determination of the substrate specificity of rat Mrp2. *Mol Pharmacol* 2001; **59**:1077-1085.
- [177] Ito K, Oleschuk CJ, Westlake C, Vasa MZ, Deeley RG, Cole SP. Mutation of Trp1254 in the multispecific organic anion transporter, multidrug resistance protein 2 (MRP2) (ABCC2), alters substrate specificity and results in loss of methotrexate transport activity. *J Biol Chem* 2001; **276**:38108-38114.
- [178] Ryu S, Kawabe T, Nada S, Yamaguchi A. Identification of basic residues involved in drug export function of human multidrug resistance-associated protein 2. *J Biol Chem* 2000; **275**:39617-39624.
- [179] Bernsdorf A. Intestinale Absorptionsmechanismen - Pharmakokinetische Untersuchungen mit dem Modellarzneistoff Talinolol. *Dissertation* 2006.
- [180] Itoda M, Saito Y, Soyama A, Saeki M, Murayama N, Ishida S *et al.* Polymorphisms in the ABCC2 (cMOAT/MRP2) gene found in 72 established cell lines derived from Japanese individuals: an association between single nucleotide polymorphisms in the 5'-untranslated region and exon 28. *Drug Metab Dispos* 2002; **30**:363-364.
- [181] Uwai Y, Masuda S, Goto M, Motohashi H, Saito H, Okuda M *et al.* Common single nucleotide polymorphisms of the MDR1 gene have no influence on its mRNA expression level of normal kidney cortex and renal cell carcinoma in Japanese nephrectomized patients. *J Hum Genet* 2004; **49**:40-45.
- [182] Kovacs G, Fuzesi L, Emanuel A, Kung HF. Cytogenetics of papillary renal cell tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 1991; **3**:249-255.

- [183] Masuda S, Goto M, Kiuchi T, Uemoto S, Kodawara T, Saito H *et al.* Enhanced expression of enterocyte P-glycoprotein depresses cyclosporine bioavailability in a recipient of living donor liver transplantation. *Liver Transpl* 2003; **9**:1108-1113.
- [184] Tsujimura S, Saito K, Nakayamada S, Nakano K, Tsukada J, Kohno K *et al.* Transcriptional regulation of multidrug resistance-1 gene by interleukin-2 in lymphocytes. *Genes Cells* 2004; **9**:1265-1273.
- [185] Kauffmann HM, Vorderstemann B, Schrenk D. Basal expression of the rat, but not of the human, multidrug resistance protein 2 (MRP2) gene is mediated by CBF/NF-Y and Sp1 promoter-binding sites. *Toxicology* 2001; **167**:25-35.
- [186] Nakamura T, Sakaeda T, Horinouchi M, Tamura T, Aoyama N, Shirakawa T *et al.* 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 Japanese subjects. *Clin Pharmacol Ther* 2002; **71**:297-303.
- [187] Meissner K, Jedlitschky G, Meyer zu SH, Dazert P, Eckel L, Vogelgesang S *et al.* Modulation of multidrug resistance P-glycoprotein 1 (ABCB1) expression in human heart by hereditary polymorphisms. *Pharmacogenetics* 2004; **14**:381-385.
- [188] Oertel R, Richter K, Trausch B, Berndt A, Gramatte T, Kirch W. Elucidation of the structure of talinolol metabolites in man. Determination of talinolol and hydroxylated talinolol metabolites in urine and analysis of talinolol in serum. *J Chromatogr B Biomed Appl* 1994; **660**:353-363.
- [189] Trausch B, Oertel R, Richter K, Gramatte T. Disposition and bioavailability of the beta 1-adrenoceptor antagonist talinolol in man. *Biopharm Drug Dispos* 1995; **16**:403-414.
- [190] Day DA, Tuite MF. Post-transcriptional gene regulatory mechanisms in eukaryotes: an overview. *J Endocrinol* 1998; **157**:361-371.
- [191] Petriz J, Gottesman MM, Aran JM. An MDR-EGFP gene fusion allows for direct cellular localization, function and stability assessment of P-glycoprotein. *Curr Drug Deliv* 2004; **1**:43-56.



- [192] Johnson DR, Klaassen CD. Regulation of rat multidrug resistance protein 2 by classes of prototypical microsomal enzyme inducers that activate distinct transcription pathways. *Toxicol Sci* 2002; **67**:182-189.
- [193] Johnson DR, Guo GL, Klaassen CD. Expression of rat Multidrug Resistance Protein 2 (Mrp2) in male and female rats during normal and pregnenolone-16 $\alpha$ -carbonitrile (PCN)-induced postnatal ontogeny. *Toxicology* 2002; **178**:209-219.
- [194] Langmann T, Mauerer R, Zahn A, Moehle C, Probst M, Stremmel W *et al.* Real-time reverse transcription-PCR expression profiling of the complete human ATP-binding cassette transporter superfamily in various tissues. *Clin Chem* 2003; **49**:230-238.
- [195] Nishimura M, Naito S, Yokoi T. Tissue-specific mRNA expression profiles of human nuclear receptor subfamilies. *Drug Metab Pharmacokinet* 2004; **19**:135-149.
- [196] Bernsdorf A, Giessmann T, Modess C, Wegner D, Igelbrink S, Hecker U *et al.* Simvastatin does not influence the intestinal P-glycoprotein and MPR2, and the disposition of talinolol after chronic medication in healthy subjects genotyped for the ABCB1, ABCC2 and SLCO1B1 polymorphisms. *Br J Clin Pharmacol* 2006; **61**:440-450.
- [197] Hitzl M, Schaeffeler E, Hocher B, Slowinski T, Halle H, Eichelbaum M *et al.* Variable expression of P-glycoprotein in the human placenta and its association with mutations of the multidrug resistance 1 gene (MDR1, ABCB1). *Pharmacogenetics* 2004; **14**:309-318.
- [198] Merino G, van Herwaarden AE, Wagenaar E, Jonker JW, Schinkel AH. Sex-dependent expression and activity of the ATP-binding cassette transporter breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in liver. *Mol Pharmacol* 2005; **67**:1765-1771.
- [199] Simon FR, Iwahashi M, Hu LJ, Qadri I, Arias IM, Ortiz D *et al.* Hormonal regulation of hepatic multidrug resistance-associated protein 2 (Abcc2) primarily involves the pattern of growth hormone secretion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; **290**:G595-G608.
- [200] Siegmund W, Altmannsberger S, Paneitz A, Hecker U, Zschesche M, Franke G *et al.* Effect of levothyroxine administration on intestinal P-glycoprotein expression: consequences for drug disposition. *Clin Pharmacol Ther* 2002; **72**:256-264.

- [201] Ando H, Yanagihara H, Sugimoto K, Hayashi Y, Tsuruoka S, Takamura T *et al.* Daily rhythms of P-glycoprotein expression in mice. *Chronobiol Int* 2005; **22**:655-665.
- [202] Zheng H, Webber S, Zeevi A, Schuetz E, Zhang J, Bowman P *et al.* Tacrolimus dosing in pediatric heart transplant patients is related to CYP3A5 and MDR1 gene polymorphisms. *Am J Transplant* 2003; **3**:477-483.
- [203] Schaefer E, Roots I, Gerloff T. In vitro transport characteristics discriminate wildtype MDR1 (ABCB1) from Ala893Ser and Ala893Thr polymorphisms. *Eur J Clin Pharmacol* 2005; **61**, **718**.
- [204] Takara K, Takagi K, Tsujimoto M, Ohnishi N, Yokoyama T. Digoxin up-regulates multidrug resistance transporter (MDR1) mRNA and simultaneously down-regulates steroid xenobiotic receptor mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; **306**:116-120.
- [205] Hustert E, Zibat A, Presecan-Siedel E, Eiselt R, Mueller R, Fuss C *et al.* Natural protein variants of pregnane X receptor with altered transactivation activity toward CYP3A4. *Drug Metab Dispos* 2001; **29**:1454-1459.
- [206] Lamba J, Lamba V, Schuetz E. Genetic variants of PXR (NR1I2) and CAR (NR1I3) and their implications in drug metabolism and pharmacogenetics. *Curr Drug Metab* 2005; **6**:369-383.
- [207] Wang D, Johnson AD, Papp AC, Kroetz DL, Sadee W. Multidrug resistance polypeptide 1 (MDR1, ABCB1) variant 3435C>T affects mRNA stability. *Pharmacogenet Genomics* 2005; **15**:693-704.
- [208] Jones BR, Li W, Cao J, Hoffman TA, Gerk PM, Vore M. The role of protein synthesis and degradation in the post-transcriptional regulation of rat multidrug resistance-associated protein 2 (Mrp2, Abcc2). *Mol Pharmacol* 2005; **68**:701-710.
- [209] Popowski K, Sperker B, Kroemer HK, John U, Laule M, Stangl K *et al.* Functional significance of a hereditary adenine insertion variant in the 5'-UTR of the endothelin-1 gene. *Pharmacogenetics* 2003; **13**:445-451.

## **Danksagung**

Ich möchte mich bei allen bedanken, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation sowohl mit praktischen Ratschlägen, als auch mit fachlichen Diskussionen unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. I. Cascorbi für die langjährig gute und angenehme Zusammenarbeit.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. E. Maser für die freundliche Unterstützung und die Betreuung dieser Arbeit. Ebenfalls bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. W. Blaschek für die fachlichen Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. H. K. Kroemer, Prof. Dr. W. Siegmund sowie Prof. Dr. R. Warzok danke ich für die unkomplizierte Kooperation bei den gemeinsam am Institut für Pharmakologie der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald durchgeführten Studien. Ein besonderer Dank gilt dabei OA Dr. Zimmermann und Prof. Dr. Klebingat für die Bereitstellung der Nierengewebe-Proben.

Ich bedanke mich bei allen Mitarbeitern des Institutes für Pharmakologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel, den Mitarbeitern des Institutes für Anatomie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, den Mitarbeitern des Instituts für Pharmakologie und des Institutes für Pathologie, sowie der kardiologischen und kinder-onkologischen Arbeitsgruppen der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald für die stets hilfreiche und freundliche Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt dabei Dr. Katrin Bühler, Ramona Harberg, Dr. Eike Dazert, Prof. Dr. P. Meisel und Ingrid Geißler (Greifswald), sowie Christoph Wruck, Cornelia Remmler, Magarita Frisman, Miriam Lemmer und Marion Pauer (Kiel).

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Igor Mosyagin für die gemeinsame Zeit in Greifswald und Kiel, die nicht nur durch eine produktive Zusammenarbeit im Labor, sondern auch durch gemeinsame private Unternehmungen geprägt war.

Besonders herzlich danke ich meinen Eltern, Großeltern und Freunden für ihr Verständnis und den Rückhalt, den sie mir zu jeder Zeit und in jeder ihnen möglichen Form entgegen gebracht haben.

## Lebenslauf

Name: Sierk Erik Haenisch  
geboren am: 23.4.1975 in Offenburg  
Anschrift: Waitzstr. 98  
24118 Kiel  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig

Schulbildung:  
1981-1985 Grundschule Steinach-Welschensteinach  
1985-1994 Grimmelshausen-Gymnasium Offenburg  
1994 Abitur

Hochschulbildung:  
10/1994-5/1999 Pharmaziestudium an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald und an der Ruprechts-Karls-Universität Tübingen  
10/2000 Staatsexamen und Approbation als Apotheker  
09/2002 Diplom-Pharmazeut

Praktische Ausbildung:  
5/1999-11/1999 Pharmaziepraktikum in der Krankenhausapotheke des Unfallkrankenhauses Berlin  
01/2000-06/2000 Pharmaziepraktikum in der Schwan-Apotheke in Dresden

Beruflicher Werdegang:  
11/2000-01/2001 Monitor bei Clinical Research Services in Kelkheim  
03/2001-12/2001 Angestellter Apotheker in der Apotheke am Bönischplatz in Dresden  
01/2002-12/2003 Stipendiat im Rahmen des BMBF-NBL3-Programms in der AG Pharmakogenetik (Prof. Dr. Dr. I. Cascorbi) des Instituts für Pharmakologie der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald, Anfertigung einer Diplomarbeit (-09/2002)  
01/2004-12/2004 Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der AG Pharmakogenetik des Instituts für Pharmakologie der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald  
Seit 01/2005 Wissenschaftlicher Mitarbeiter des Instituts für Pharmakologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel (Direktor Prof. Dr. Dr. I. Cascorbi)

## **Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, dass diese Arbeit bisher von mir weder an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, noch an einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung zum Zwecke der Promotion eingereicht wurde. Ferner erkläre ich, dass ich diese Arbeit, abgesehen von der Beratung durch den Betreuer, selbstständig verfasst und unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis angefertigt habe.

Kiel, den 1.11.06

Sierk Haenisch

## Publikationen

Haenisch S, Zimmermann U, Dazert E, Wruck CJ, Dazert P, Siegmund W, Kroemer HK, Warzok RW, Cascorbi I. Influence of polymorphisms of ABCB1 and ABCC2 on mRNA and protein expression in normal and cancerous kidney cortex. *Pharmacogenomics J* 2006.

Oswald S, Haenisch S, Fricke C, Sudhop T, Remmler C, Giessmann T, Jedlitschky G, Adam U, Dazert E, Warzok R, Wacke W, Cascorbi I, Kroemer HK, Weitschies W, von Bergmann K, Siegmund W. Intestinal expression of P-glycoprotein (ABCB1), multidrug resistance associated protein 2 (ABCC2), and uridine diphosphate-glucuronosyltransferase 1A1 predicts the disposition and modulates the effects of the cholesterol absorption inhibitor ezetimibe in humans. *Clin Pharmacol Ther* 2006; **79**:206-217.

Bernsdorf A, Giessmann T, Modess C, Wegner D, Igelbrink S, Hecker U, Haenisch S, Cascorbi I, Terhaag B, Siegmund W. Simvastatin does not influence the intestinal P-glycoprotein and MRP2, and the disposition of talinolol after chronic medication in healthy subjects genotyped for the ABCB1, ABCC2 and SLCO1B1 polymorphisms. *Br J Clin Pharmacol* 2006; **61**:440-450.

Meyer zu Schwabedissen HE, Jedlitschky G, Gratz M, Haenisch S, Linnemann K, Fusch C, Cascorbi I, Kroemer HK. Variable expression of MRP2 (ABCC2) in human placenta: influence of gestational age and cellular differentiation. *Drug Metab Dispos* 2005; **33**:896-904.

Renders L, Frisman M, Ufer M, Mosyagin I, Haenisch S, Ott U, Caliebe A, Dechant M, Braun F, Kunzendorf U, Cascorbi I. CYP3A5 genotype markedly influences the pharmacokinetics of tacrolimus and sirolimus in kidney transplant recipients, *Clin Pharmacol Ther* 2006 (in press)

## Posterbeiträge

Giessmann T, Haenisch S, Dazert P, Hecker U, Schroder E, Warzok R, Kroemer HK, Cascorbi I, Siegmund W. Effects of the human MDR1 and MRP2 genotype on expression and function of duodenal transporter proteins. *Eur J Clin Pharmacol* 58:A87. 2002.

Haenisch S, Mossiaguine I, Siegmund W, and Cascorbi I. Frequency of Single Nucleotide Polymorphisms in the MRP2 Gene in Healthy German Subjects. *Eur J Clin Pharmacol* 58:A91. 2002.

Giessmann T, Westphal K, Haenisch S, Dazert P, Hecker U, Oertel R, Schroder E, Warzok R, Kroemer HK, Cascorbi I, Siegmund W. Disposition of propiverine is influenced by expression of intestinal MRP2. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 41: 548, P7. 2003.

Haenisch S, Zimmermann U, Dazert P, Warzok R, Cascorbi, I. MDR1 und MRP2 mRNA expression and prevalence of genetic variants in renal cell carcinoma. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 41:550, P13. 2003.

May K, Giessmann T, Dazert P, Schroeder E, Warzok R, Haenisch S, Cascorbi I, Kroemer HK, Siegmund W. Expression of duodenal P-glycoprotein and MRP2 and disposition of talinolol in male and female healthy volunteers. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 41: 553, P24. 2003.

Cascorbi I, Haenisch S, Zimmermann U, Dazert P, Warzok R. Modulation of ABCB1 (MDR1) and ABCC2 (MRP2) expression dependent on genetic polymorphisms in renal cell carcinoma. *Proc Annu Meet Am Assoc Cancer Res* 45:469, #2035. 2004.

Giessmann T, Haenisch S, Bernsdorf A, Hecker U, Schroeder E, Warzok R, Cascorbi I, Siegmund W. Does simvastatin influence the kinetics of the P-gp-substrate talinolol? *Int J Clin Pharmacol Ther.* 42:610. 2004.

Oswald S, Haenisch S, Remmler C, Giessmann T, Schroder E, Warzok R, Cascorbi I, Kroemer HK, Siegmund W. Serum concentration of ezetimibe are markedly decreased by rifampicin. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 42:622. 2004.

Haenisch S, Zimmermann U, Wruck CJ, Dazert E, Warzok R, Cascorbi I. Impact of Genetic Variants in ABCB1 and ABCC2 mRNA-Expression in Peritumorous Tissue or Renal Cell Carcinoma. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol.* 371 (Suppl.1): R138, 574. 2005.

Haenisch S, Zimmermann U, Wruck CJ, Cascorbi I. Functional Characterization of the -24C>T Polymorphism in the Promoter of the MRP2 Gene in Renal Cell Carcinoma. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 97 (Suppl. 1): 56, A203. 2005.

Frisman M, Renders L, Mosyagin I, Haenisch S, Cascorbi I. Effects of CYP3A5 and MDR1 Polymorphisms on Tacrolimus Kinetics of Kidney Transplant Recipients. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 97 (Suppl. 1): 119, A435. 2005.

Oswald S, Haenisch S, Remmler C, Giessmann T, Dazert E, Warzok R, Cascorbi I, Kroemer HK, Siegmund W. Disposition of the Cholesterol Uptake Inhibitor Ezetimibe in Man is Influenced by the Rifampicin Inducible Intestinal Expression of P-Glycoprotein, MRP2 and UGT1A1. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 97 (Suppl. 1): 120, A438. 2005.

Oswald S, Haenisch S, Fricke C, Remmler C, Giessmann T, Cascorbi I, Kroemer HK, von Bergmann K, Siegmund W. Disposition and sterol lowering effects of ezetimibe are predicted by intestinal expression of ABCB1, ABCC2 and UGT1A1. *Eur J Clin Pharmacol* 61:696, O-36. 2005.

Frisman M, Renders L, Haenisch S, Mosyagin I, Cascorbi I. Impact of CYP3A5 and MDR1 polymorphisms on tacrolimus and sirolimus kinetics of kidney transplant recipients. *Eur J Clin Pharmacol* 61:705, P-68. 2005.

Remmler C, Haenisch S, Hecker U, Siegmund W, Cascorbi I. Genotype depended inducibility of UGT1A1 mRNA expression in human duodenum. *Eur J Clin Pharmacol* 61:717, P-107. 2005.

Haenisch S, Zimmermann U, Kroemer HK, Wruck CJ, Cascorbi I. Functional Impact of a Genetic 5'-UTR Polymorphism in the ABCC2 Gene on mRNA-Expression in Human Kidney and on Activity in Vitro. *Drug Metab Rev.* 38 (Suppl.1):116, A157. 2006.



Remmler C, Haenisch S, Giessmann T, Lerch M, Siegmund W, Cascorbi I. Genotype Dependent Inducibility of UGT1A1 mRNA Expression in Human Duodenum. *Drug Metab Rev.* 38 (Suppl.1):53, A65. 2006.

### **Vorträge**

Haenisch, S., Zimmermann, U., Dazert, P., Schroeder, E., Warzok, R., and Cascorbi, I. ABCB1 und ABCC2 mRNA Expression in Nierenzellkarzinomen und Prävalenz von genetischen Polymorphismen. 45. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT), Mainz, A 605. 2004