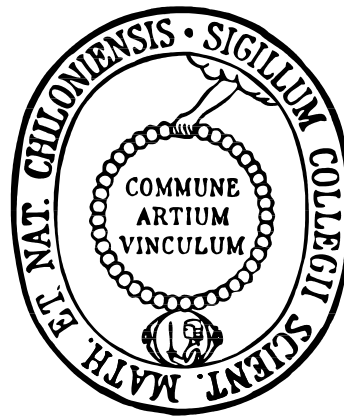


# Funktionelle Analyse von ABCC2-Haplotypen



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

vorgelegt von

Sandra Lächelt

Kiel, 2009

Referent: Prof. Dr. Dr. Ingolf Cascorbi

Koreferentin: Prof. Dr. Manuela Dittmar

Tag der mündlichen Prüfung: 04.12.2009

Zum Druck genehmigt: 04.12.2009

gez. Prof. Dr. Lutz Kipp, Dekan

---

---

# Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	V
Tabellenverzeichnis .....	VII
Abkürzungsverzeichnis .....	IX
1. Einleitung .....	1
1.1 Das ABC-Transportprotein ABCC2.....	2
<b>1.1.1 Struktur und Lokalisation von ABCC2</b> .....	4
<b>1.1.2 Substrate und Inhibitoren von ABCC2</b> .....	8
<b>1.1.3 Polymorphismen im ABCC2-Gen</b> .....	10
<b>1.1.4 Regulation von ABCC2</b> .....	12
1.1.4.1 Initiation der ABCC2-Transkription und Regulation durch Transkriptionsfaktoren .....	12
1.1.4.2 Regulation der ABCC2-Expression durch endogene und exogene Faktoren .	13
1.1.4.3 Posttranskriptionelle Regulationsmechanismen von ABCC2.....	16
1.2 Ziele der Arbeit .....	17
2. Material und Methoden .....	19
2.1 Genotypisierung und Haplotypenbestimmung .....	19
<b>2.1.1 Probanden</b> .....	19
<b>2.1.2 DNA-Isolierung</b> .....	19
<b>2.1.3 Genotypisierung</b> .....	19
<b>2.1.4 Haplotypenbestimmung</b> .....	21
2.2 Klonierung.....	21
<b>2.2.1 RNA-Isolierung</b> .....	22
<b>2.2.2 cDNA-Synthese</b> .....	22
<b>2.2.3 Klonierungs-PCR</b> .....	23
<b>2.2.4 Aufreinigung von PCR-Produkten</b> .....	24
<b>2.2.5 Phosphorylierung des Inserts</b> .....	24

---

---

2.2.6 Restriktionsverdau .....	24
2.2.7 Dephosphorylierung .....	25
2.2.8 Konzentrationsbestimmung .....	25
2.2.9 Ligation .....	25
2.2.10 Agarose-Gelelektrophorese .....	26
2.2.11 Transformation .....	26
2.2.12 PCR-Screen .....	26
2.2.13 Mini-Plasmidpräparation .....	27
2.2.14 Maxi-Plasmidpräparation .....	27
2.2.15 Einfrieren von Bakterienzellen .....	28
2.2.16 Sequenzierung .....	28
2.2.17 Mutagenese .....	28
2.2.18 Umklonierung .....	29
2.3 Zellkulturen .....	30
2.3.1 Zelllinien und Zellkulturmedien .....	30
2.3.2 Zellkulturbedingungen .....	30
2.3.3 Beschichtung mit Poly-D-Lysin .....	31
2.3.4 Passagieren von Zellen .....	31
2.3.5 Einfrieren von Zellen .....	31
2.3.6 Auftauen von Zellen .....	31
2.3.7 Transiente Transfektion .....	32
2.4 mRNA-Analysen .....	32
2.4.1 mRNA-Sekundärstrukturen .....	32
2.4.2 Klonierung von Standards .....	32
2.4.3 mRNA-Degradation .....	33
2.5 Proteinanalysen .....	35
2.5.1 Isolierung von Proteinen .....	35
2.5.2 Isolierung von Kernextrakt .....	36
2.5.3 Bradford-Test .....	36
2.5.4 Protein-Gelelektrophorese .....	36
2.5.5 Western Blot .....	37
2.5.6 Electromobility Shift Assay (EMSA) .....	38

---

---

<b>2.5.7 Immunfluoreszenz</b> .....	40
2.6 Transport-Assay .....	41
2.7 Pharmakokinetik von Talinolol .....	42
2.8 Statistische Analysen.....	43
<b>3. Ergebnisse</b> .....	44
3.1 Genotypisierung der ABCC2-Polymorphismen -24C>T, 1249G>A und 3972C>T und Bestimmung der ABCC2-Haplotypen und -Diplotypen.....	44
<b>3.1.1 Genotypisierung, Haplotypen- und Diplotypenbestimmung von gesunden,         kaukasischen Probanden</b> .....	44
<b>3.1.2 Genotypisierung, Haplotypen- und Diplotypenbestimmung von Zelllinien</b> ...	46
3.2 Einfluss des ABCC2 -24C>T-Polymorphismus auf DNA-Protein-Interaktionen in der 5'-UTR des ABCC2-Gens.....	48
3.3 Einfluss von Haplotypen auf die ABCC2-mRNA .....	49
<b>3.3.1 Einfluss von ABCC2-Haplotypen auf die mRNA-Sekundärstrukturen und         die mRNA-Stabilitäten</b> .....	49
<b>3.3.2 Einfluss des ABCC2 -24C&gt;T-Polymorphismus auf die mRNA-Degradation</b> ..	51
3.4 Klonierung von ABCC2-Haplotypen.....	52
3.5 Einfluss von Haplotypen auf die Proteinexpression von ABCC2 .....	57
3.6 Untersuchung der Transportaktivität von ABCC2 .....	60
<b>3.6.1 Etablierung eines In-vitro-Transportsystems zum Nachweis der         Transportaktivität von ABCC2</b> .....	60
<b>3.6.2 Einfluss von Haplotypen auf die Transportaktivität von ABCC2</b> .....	63
3.7 Einfluss von ABCC2-Haplotypen auf die Pharmakokinetik von Talinolol .....	66
<b>4. Diskussion</b> .....	68
4.1 Allelfrequenz der ABCC2-Polymorphismen -24C>T, 1249G>A und 3972C>T in der kaukasischen Bevölkerung .....	68
4.2 DNA-Protein-Interaktionen in der 5'-UTR des ABCC2-Gens.....	70
4.3 Einfluss von ABCC2-Haplotypen auf die mRNA-Sekundärstruktur, -Stabilität und -Degradation .....	72
4.4 Einfluss von Haplotypen auf die Proteinexpressionen von ABCC2 .....	74

---

---

<b>4.4.1 Funktionelle Bedeutung der ABCC2-Haplotypen</b> .....	74
<b>4.4.2 Funktionelle Bedeutung der ABCC2-Varianten</b> .....	75
<b>4.5 Transportfunktion von ABCC2</b> .....	79
<b>4.5.1 Einfluss von Haplotypen auf die Transportaktivität von ABCC2 in vitro</b> .....	80
<b>4.5.2 Einfluss von ABCC2-Haplotypen auf die Pharmakokinetik von Talinolol in vivo</b> .....	81
5. Zusammenfassung .....	84
6. Summary .....	86
7. Literaturverzeichnis .....	87
8. Danksagung .....	98
9. Lebenslauf .....	99
10. Posterbeiträge, Vorträge und Publikationen.....	100
11. Selbstständigkeitserklärung .....	102

---

---

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1.1</b>	Transport und Biotransformation von endogenen Substanzen, Arzneistoffen und Karzinogenen.	1
<b>Abbildung 1.2</b>	Struktur des ABCC2-Proteins in der Membran.	5
<b>Abbildung 1.3</b>	Lokalisation des ABC-Transporters ABCC2 in der Leber, der Niere und dem Darm zusammen mit weiteren Auswärts- und Aufnahmetransportern.	7
<b>Abbildung 3.1</b>	Pyrogramme nach der Genotypisierung der Zelllinien mit der PSQ-Technologie.	47
<b>Abbildung 3.2</b>	Autoradiogramme von Electromobility Shift Assays (EMSAs) mit <sup>32</sup> P-markierten ABCC2 -24C- oder -24T-Sonden und Kernextrakt aus der humanen Leberadenokarzinomzelllinie SK-Hep 1 und der humanen Nierenkarzinomzelllinie A-498.	49
<b>Abbildung 3.3</b>	mRNA-Sekundärstrukturen der ABCC2-Haplotypen H1 (Wildtyp; -24C/1249G/3972C), H2 (-24C/1249A/3972C), H3 (-24C/1249A/3972T), H9 (-24C/1249G/3972T), H10 (-24T/1249G/3972C) und H12 (-24T/1249G/3972T), die mit Hilfe des Mfold-Webservers berechnet wurden.	50
<b>Abbildung 3.4</b>	ABCC2-mRNA-Degradation in SK-Hep 1- und A-489-Zellen nach Behandlung mit Actinomycin D.	52
<b>Abbildung 3.5</b>	Ausschnitte der Kontrollsequenzierungen der klonierten ABCC2-Haplotypen H1, H2, H9, H10 und H12, die jeweils die Bereiche der Polymorphismen -24C>T, 1249G>A und 3972C>T darstellen.	53
<b>Abbildung 3.6</b>	Vektorkarte von ABCC2/pIRES2-ZsGreen1.	54
<b>Abbildung 3.7</b>	Fluoreszenzmikroskopie von transient mit ABCC2/pIRES2-ZsGreen1 und pDsRed2-C1 transfizierten HEK293T/17-Zellen.	55
<b>Abbildung 3.8</b>	Immunfluoreszenzen von rekombinant exprimierten ABCC2/pIRES2-ZsGreen1-Konstrukten, die transient in HEK293T/17-Zellen transfiziert wurden.	56
<b>Abbildung 3.9</b>	Proteinexpression des ABCC2/pIRES2-ZsGreen1 Vektorkonstruktes 24 h, 48 h und 72 h nach der Transfektion.	57
<b>Abbildung 3.10</b>	Proteinexpression der ABCC2-Haplotypen H1 (WT), H10, H2, H9 und H12 nach transients Transfektion der Vektorkonstrukte in HEK293T/17-Zellen.	58

---

<b>Abbildung 3.11</b>	Proteinexpression von ABCC2, ZsGreen1, dsRed und $\beta$ -Aktin in HEK293T/17-Zellen, die transient mit den Vektorkonstrukten transfiziert wurden.	59
<b>Abbildung 3.12</b>	Metabolismus von CMFDA zu Glutathion-Methylfluorescein.	60
<b>Abbildung 3.13</b>	Messung der Fluoreszenz von Glutathion-Methylfluorescein in HEK293T/17-Zellen ohne (unbehandelt) und mit Inkubation mit CMFDA und mit ansteigenden Konzentrationen an Probenecid, einem Inhibitor des ABCC2-Transporters.	61
<b>Abbildung 3.14</b>	Messung der Fluoreszenz von Glutathion-Methylfluorescein im Überstand von HEK293T/17-Zellen nach Inkubation mit CMFDA und ansteigenden Konzentrationen an Probenecid, einem Inhibitor des ABCC2-Transporters.	62
<b>Abbildung 3.15</b>	Einfluss der Substanzen Primovist, Talinolol, Ezetimib, Ezetimib-Glukuronid und Verapamil auf den ABCC2-abhängigen Efflux von Glutathion-Methylfluorescein in HEK293T/17-Zellen.	63
<b>Abbildung 3.16</b>	Vergleich der Transportaktivität von HEK293T/17-Zellen und MDCK II-Zellen, die entweder mit dem Leervektor pIRES2-ZsGreen1 oder mit dem ABCC2/pIRES2-ZsGreen1-Vektorkonstrukt (Haplotyp H1, Wildtyp) transfiziert wurden über einen Zeitraum von 90 Minuten.	64
<b>Abbildung 3.17</b>	Transportaktivitäten der Haplotypen H10, H2, H9 und H12 im Vergleich zum Wildtyp (Haplotyp H1) in transient transfizierten MDCK II-Zellen.	65
<b>Abbildung 3.18</b>	Bioverfügbarkeit und $AUC_{oral}$ von 24 gesunden kaukasischen Probanden nach oraler und intravenöser Gabe von Talinolol.	67



---

---

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1.1</b>	Molekulare Charakteristiken der Membrantransporter der ABCC-Subfamilie.	3
<b>Tabelle 1.2</b>	Homologien des humanen ABCC2 mit orthologen Genen in verschiedenen Spezies.	4
<b>Tabelle 1.3</b>	Endogene und exogene ABCC2-Substrate und ABCC2-Inhibitoren.	9
<b>Tabelle 2.1</b>	Primersequenzen für die Genotypisierung der ABCC2-Polymorphismen -24C>T, 1249G>A und 3972C>T mit der PSQ-Technologie.	20
<b>Tabelle 2.2</b>	Reaktionsansatz für die Genotypisierung der ABCC2-Polymorphismen -24C>T, 1249G>A und 3972C>T mit der PSQ-Technologie.	20
<b>Tabelle 2.3</b>	Thermocyclerbedingungen für die Genotypisierung der ABCC2-Polymorphismen -24C>T, 1249G>A und 3972C>T mit der PSQ-Technologie.	20
<b>Tabelle 2.4</b>	Reaktionsansatz der Klonierungs-PCR.	23
<b>Tabelle 2.5</b>	Thermocyclerbedingungen der Klonierungs-PCR.	24
<b>Tabelle 2.6</b>	Thermocyclerbedingungen des PCR-Screens.	27
<b>Tabelle 2.7</b>	Verwendete Sequenzierprimer der Kontrollsequenzierung.	28
<b>Tabelle 2.8</b>	Sequenzen der Mutageneseprimer.	29
<b>Tabelle 2.9</b>	Zelllinien und Zellkulturmedien.	30
<b>Tabelle 2.10</b>	Primer und TaqMan-Assay für die Klonierung von TaqMan-Standards.	32
<b>Tabelle 2.11</b>	Reaktionsansatz der Klonierung von TaqMan-Standards.	33
<b>Tabelle 2.12</b>	Thermocyclerbedingungen der Klonierung von TaqMan-Standards.	33
<b>Tabelle 2.13</b>	Sequenz der allel-spezifischen ABCC2-Sonden.	34
<b>Tabelle 2.14</b>	Reaktionsansatz der qRT-PCR von 18S rRNA.	34
<b>Tabelle 2.15</b>	Reaktionsansatz der allel-spezifischen qRT-PCR der ABCC2-mRNA.	35
<b>Tabelle 2.16</b>	Thermocyclerbedingungen der qRT-PCR.	35
<b>Tabelle 2.17</b>	Verwendete primäre Antikörper im Western Blot.	38
<b>Tabelle 2.18</b>	Verwendete sekundäre Antikörper im Western Blot.	38
<b>Tabelle 2.19</b>	Verwendete DNA-Sonden im EMSA.	39
<b>Tabelle 2.20</b>	Reaktionsansatz für den EMSA.	40
<b>Tabelle 2.21</b>	Verwendete Substanzen im Transport-Assay.	42
<b>Tabelle 3.1</b>	Allel- und Genotypfrequenzen der 335 gesunden, kaukasischen Probanden.	44
<b>Tabelle 3.2</b>	ABCC2-Haplotypfrequenzen der 335 gesunden, kaukasischen Probanden.	45
<b>Tabelle 3.3</b>	ABCC2-Diploptypfrequenzen der 335 gesunden, kaukasischen Probanden.	46
<b>Tabelle 3.4</b>	Ermittelte ABCC2-Genotypen und -Diploptypen der verwendeten Zelllinien.	48

---

---

<b>Tabelle 3.5</b>	Enthalpien der mRNA-Sekundärstrukturen der untersuchten ABCC2-Haplotypen bei 37°C.	50
<b>Tabelle 4.1</b>	Allelfrequenzen der ABCC2-Polymorphismen -24C>T, 1249G>A und 3972C>T in unterschiedlichen Populationen.	70

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius	CDNB	1-chloro-2,4-dinitrobenzene
µg	Mikrogramm	CdxA	caudal type homeobox transcription factor 1
µl	Mikroliter		
µm	Mikrometer	CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
µM	Mikromol		
18S	18 Svedberg	ChIP	Chromatinimmunpräzipitation
<sup>32</sup> P	Phosphorisotop	CMFDA	5-chloromethylfluorescein-diacetate
40S	40 Svedberg	CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
A	Adenin	cpm	counts per minute
AAF	2-Acetylaminofluoren	C <sub>T</sub>	Threshold cycle
ABC	ATP-binding cassette	CYP	Cytochrom P450
ABCB	ABC-Transporter der Subfamilie B	D, Asp	Asparaginsäure
ABCC	ABC-Transporter der Subfamilie C	dam <sup>+</sup>	dAdenin-Methyltransferase positiv
ABCG	ABC-Transporter der Subfamilie G	DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
AhR	aromatischer Kohlenwasserstoff-Rezeptor	DEPC	Diethylpyrocarbonat
AP	Aktivatorprotein	dI-dC	deoxyinosinic-deoxycytidylic
apoE	Apolipoprotein E	DJS	Dubin-Johnson-Syndrom
APS	Ammoniumpersulfat	Dlg	Discs large
ASBT	apical sodium-dependent bile acid transporter	DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
ATP	Adenosintriphosphat	DMSO	Dimethylsulfoxid
AU	arbiträre Einheit	DNA	Desoxyribonukleinsäure
AUC	Area under the concentration time curve	DNP-SG	2,4-dinitrophenyl-S-gluatthione
BIO	Biotinylierung	dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphate
bp	Basenpaare	<i>Dpn</i> I	Restriktionsendonuklease
BRN	brain-specific factor	dsDNA	doppelsträngige DNA
BSA	bovine serum albumin	DTT	Dithiothreitol
bzw.	beziehungsweise	E, Glu	Glutaminsäure
C	Cytosin	<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
C, Cys	Cystein	E <sub>2</sub> 17βG	17β-Estradiolglukuronid
C/EBPβ	CCAAT-enhancer binding protein β	ECL	Enhanced Chemiluminescence
ca.	circa	EDTA	Ethylendiamintetraacetat
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat	EHBR	Eisai hyperbilirubinämische-Ratten
CAR	constitutive androstane receptor	EMSA	electromobility shift assay
cDNA	komplementäre DNA	ER	everted repeat
		et al.	et alteri
		EtBr	Ethidiumbromid
		F, f	forward

FAM	Fluoreszenzfarbstoff	LDS	lithium dodecyl sulfate
FCS	fötale Kälberserum	LEF	lymphoid enhancer factor
FOLFIRI	Folinsäure (Leukovorin) / Fluorouracil / Irinotecan	LPS	Lipopolysaccharid
FXR	farnesoid X receptor	LTC <sub>4</sub>	Leukotrien C <sub>4</sub>
G	Guanin	M	Mol
g	Erdbeschleunigung	mCi	Millicurie
g	Gramm	MCS	multiple cloning site
G418	Geneticin	MCT	monocarboxylate carrier
geDNA	genomische DNA	MDR	multidrug resistance
GSH	Glutathion	MEM	Minimal Essential Medium Eagle
GY/TR	Gronigen Yellow/transport-deficient	mg	Milligramm
h	Stunde	MGB	minor-groove-binder
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution	MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
HCl	Salzsäure	MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
HDAC	Histon-Deacetylase	min.	Minute
HEPES	N-2-Hydroxyethylenpiperazin-N- ethansulfonsäure	ml	Milliliter
HNF	hepatic nuclear factor	mM, mmol	Millimol
HSF	heat shock factor	MPA	Mycophenolsäure
HSV	Herpes Simplex Virus	mRNA	messenger RNA
I, Ile	Isoleucin	MRP	multidrug resistance-associated protein
IgG	Immunglobulin G	n	Anzahl
IL	Interleukin	NaCl	Natriumchlorid
Inr	Initiator region	NaOH	Natriumhydroxid
IRES	internal ribosomal entry site	NBD	Nukleotid-bindende Domäne
IRF	interferon regulatory factor	NCBI	National Center for Biotechnology Information
ISRE	interferon stimulatory response element	Neo <sup>R</sup>	Neomycinresistenz
k	Geschwindigkeitskonstante	NF-Y	nuclear factor Y
K, Lys	Lysin	ng	Nanogramm
Kan <sup>R</sup>	Kanamycinresistenz	<i>Nhe</i> I	Restriktionsendonuklease
kb	Kilobasen	nm	Nanometer
KCl	Kaliumchlorid	NR	nukleärer Rezeptor
kDa	Kilodalton	Nrf2	nuclear factor-erythroid 2 p45-related factor 2
kg	Kilogramm	NSAID	non steroidal anti inflammatory drugs
kJ	Kilojoule	NTCP	sodium-taurocholate cotransporting polypeptide
L	cytoplasmatische Schleife	O <sub>2</sub>	Sauerstoff
l	Liter	OAT	organic anion transporter
LB	Luria Bertani		

OATP	organic anion transporting polypeptide	RXR $\alpha$	retinoid X receptor alpha
OCT	organic cation transporter	S	sequencing
OD	optische Dichte	S, Ser	Serin
ori	origin of replication	sek.	Sekunde
p	Signifikanzniveau	Seq	Sequenzierung
PAPS	„aktiviertes Sulfat“	Sf	<i>Spodoptera frugiperda</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>	SLC	solute carrier protein
PBT	PBS/Triton-X-100	SNP	single nucleotide polymorphism
P <sub>CMV IE</sub>	immediate early Cytomegalovirus-Promotor	SOC	Super Optimal Broth
PCN	Pregnenolon-16 $\alpha$ -carbonitril	SP	specifity protein
PCR	polymerase chain reaction	<i>spec.</i>	<i>species</i>
PDZ	PSD95/Dlg/ZO-1	SUMO	small ubiquitin-like modifier
PDZK	PDZ domain containing	SV	Simian Virus
PEPT	peptide transporter	T	Thymin
PFA	Paraformaldehyd	T, Thr	Threonin
Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>	Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
pH	potentia hydrogenii	TBE	Tris / Borat / EDTA
PhIP	2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridin	TBP	TATA-Box bindendes Protein
PI	Phosphoinositid	TBS-T	Tris-Buffered Saline Tween-20
pmol	Pikomol	TCF	T-cell factor
Pol II	Polymerase II	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
poly A	Polyadenylierungssignal		Thymidin Kinase
PSD	Post synaptic density	TM	transmembranäres Segment
PSQ, PQ	Pyrosequencing	TMD	membranüberspannende Domäne
PVDF	Polyvinylidendifluorid	TNF	Tumornekrosefaktor
PXR	pregnane X receptor	tRNA	transfer RNA
qRT-PCR	quantitative Real-time-PCR	TSA	Trichostatin A
R, r, rev	reverse	U	Unit
RAR	Retinoic acid receptor	U	Uracil
RFLP	restriction fragment length polymorphism	UDPGlcUA	Uridin-5'-diphosphoglukuronsäure
RNA	Ribonukleinsäure	USF	upstream stimulatory factor
rpm	rounds per minute	UTR	untranslated region
RPMI	Roswell Park Memorial Institute	UV	Ultraviolett
rRNA	ribosomale RNA	V	Volt
rs	reference SNP	V, Val	Valin
RT	Reverse Transkriptase	v/v	volume to volume
		vgl.	vergleiche
		VIC	Fluoreszenzfarbstoff
		w/v	weight per volume
		WT	Wildtyp

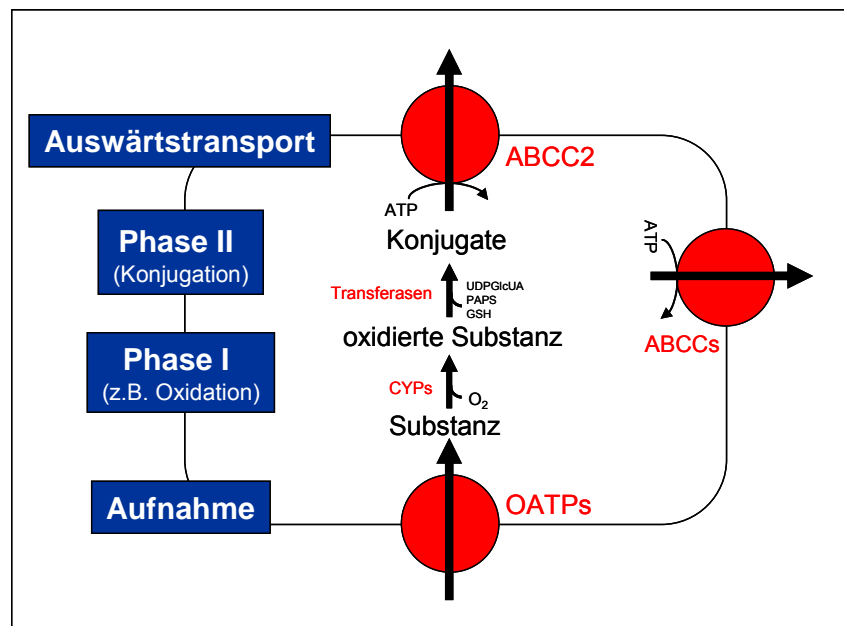
---

---

X	jede beliebige Aminosäure
<i>Xma</i> I	Restriktionsendonuklease
Y	Tyrosin
YB-1	Y-Box binding protein
z.B.	zum Beispiel
ZO-1	Zonula occludentes-1
Φ	hydrophobe Aminosäure

## 1. Einleitung

Interindividuelle Unterschiede in der Antwort auf Arzneistoffe sind wichtige Ursachen für Therapieversagen und unerwünschten Arzneimittelwirkungen. Bei oral verabreichten Arzneistoffen ist das Ausmaß der pharmakologischen Aktivität wesentlich von der intestinalen Absorption und Verteilung sowie von metabolischen und exkretorischen Prozessen abhängig, die die Konzentration am Wirkort beeinflussen. Der Arzneistoff-Metabolismus ist in zwei Phasen aufgeteilt: Phase I und Phase II. Phase I-Reaktionen beinhalten Veränderungen wie Oxidationen, Reduktionen und Hydrolyse und sind zu einem großen Teil durch Enzyme der Cytochrom P450 (CYP)-Familie vermittelt. Phase II-Reaktionen nutzen endogene Glukuronsäure, Glutathion oder Sulfat zur direkten Konjugation der Arzneistoffe oder deren in Phase I-Reaktionen gebildeten Metaboliten, um polarere Endprodukte zu produzieren, die leichter über die Nieren exkretiert werden können (Abbildung 1.1) [1;2].



**Abbildung 1.1:** Transport und Biotransformation von endogenen Substanzen, Arzneistoffen und Karzinogenen. Nach der Aufnahme einer Substanz durch Aufnahmetransporter, wie OATPs in die Hepatozyten, wird diese metabolisiert bevor sie durch Auswärtstransporter, wie z.B. ABCC2 aus der Zelle heraustransportiert wird. OATP: organic anion transporting polypeptide; CYP: Cytochrom P450-Enzym; UDPGlcUA: Uridin-5'-diphosphoglukuronsäure; PAPS: „aktiviertes Sulfat“ für Sulfatierungen; GSH: Glutathion; ATP: Adenosintriphosphat; ABCC: ABC-Subfamilie C; ABCC2: ABC-Transporter der Subfamilie C. (Verändert nach [3])

Die Bioverfügbarkeit vieler Arzneistoffe hängt neben deren physikochemischen Eigenschaften und Metabolismus zu einem großen Teil von der Expression und Aktivität von Arzneistofftransportern ab. Bei den Arzneistofftransportern wird zwischen Aufnahme- und Auswärtstransportern unterschieden. Die wichtigsten Aufnahmetransporter sind OATPs (organic anion transporting polypeptide, solute carrier protein; SLC21A), OATs (organic anion transporter, SLC22A), OCTs (organic cation transporter; SLC22A), PEPTs (peptide transporter; SLC15A) und MCTs (monocarboxylate carrier, SLC28A) [1;2]. Die meisten Auswärtstransporter gehören zu der ATP-binding cassette (ABC)-Familie von Membranproteinen. Die Auswärtstransporter benötigen für die Translokation von Substraten über die Plasmamembran Energie, die aus der Hydrolyse von ATP gewonnen wird. Dadurch wird der Transport von Substraten gegen einen Konzentrationsgradienten ermöglicht. Insbesondere die Effluxtransporter der ABC-Familie, wie ABCB1, die ABCC-Subfamilie und ABCG2 sind von entscheidender Bedeutung bei der Chemoresistenz von Tumorzellen. Sie sind in den apikalen Membranen von vielen Barrieregeweben, wie Darm, Leber, Blut-Hirn-Schranke, Niere, Plazenta, Hoden und in Lymphozyten exprimiert [1-3]. In Organen wie der Leber und der Niere vermittelt die koordinierte Expression und Aktivität von Aufnahme- und Auswärtstransportern die Absorption von exogenen (Arzneistoffen) und endogenen Substanzen vom Blut in die Hepatozyten oder in die proximalen Tubuluszellen. Die Arzneistoffe werden transformiert oder unmodifiziert zur Elimination aus dem Körper in die Galle oder den Urin exkretiert. Im Darm dient die Expression und Aktivität der Aufnahme- und Auswärtstransporter entweder der verstärkten oder der begrenzten Absorption von Arzneistoffen aus dem intestinalen Lumen. Dies spielt eine entscheidende Rolle in der Bestimmung der Bioverfügbarkeit von oral verabreichten Arzneistoffen. Da die Expression und Funktion der Membrantransporter eine breite Variabilität aufweist, wird angenommen, dass vererbare Variationen in den Genen der Transporter einige der interindividuellen Unterschiede in der Pharmakokinetik und im klinischen Verlauf von Arzneistoffen erklären könnte [1;2].

## 1.1 Das ABC-Transportprotein ABCC2

ABCC2 gehört zu der Subfamilie C der ABC-Transporter, ebenso wie 12 weitere Membranproteine. Innerhalb der ABCC-Subfamilie weist ABCC2 die größten Homologien im Hinblick auf die Aminosäuresequenz mit ABCC1, ABCC3 und ABCC6 auf und die geringste



mit ABCC11 und CFTR (Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) (Tabelle 1.1) [4].

**Tabelle 1.1:** Molekulare Charakteristiken der Membrantransporter der ABCC-Subfamilie [4].

Symbol	alternativer Name	Chromosomen- lokalisation	Anzahl der		Homologie (%)	Accession number
			Exons	Amino- säuren		
ABCC2	MRP2	10q24	32	1.545	100	NP_000383
ABCC1	MRP1	16p13.1	31	1.531	50	NP_004987
ABCC3	MRP3	17q22	31	1.527	48	NP_003777
ABCC4	MRP4	13q32	31	1.325	39	NP_005836
ABCC5	MRP5	3q27	32	1.437	38	NP_005679
ABCC6	MRP6	16p13.1	31	1.503	40	NP_001162
ABCC7	CFTR	7q31.2	27	1.480	30	NP_000483
ABCC8	SUR1	11p15.1	41	1.581	34	NP_000343
ABCC9	SUR2A	12p12.1	39	1.549	35	NP_005682
	SUR2B	12p12.1	39	1.549	35	NP_005682
ABCC10	MRP7	6p21.1	22	1.464	34	NP_258261
ABCC11	MRP8	16q12.1	28	1.382	33	NP_149163
ABCC12	MRP9	16q12.1	29	1.359	35	NP_150229

Das humane ABCC2-Gen ist auf Chromosom 10q24 lokalisiert und umfasst 65 Kilobasenpaare. Es besteht aus 32 Exons mit einem hohen Anteil an Klasse 0-Introns. Das ABCC2-Protein wiederum besteht aus 1.545 Aminosäuren und weist ein Molekulargewicht von 190 kDa auf. Zurzeit sind die vollständigen Sequenzen von sechs Säugetierspezies (Mensch, Rhesusaffe, Ratte, Kaninchen, Maus und Hund) und von drei anderen Vertebraten (Huhn, Zebrafisch und kleiner Meeresrochen (*Raja erinacea*)) bekannt (Tabelle 1.2). ABCC2-ähnliche Sequenzen wurden aber auch für andere Spezies, wie *Caenorhabditis elegans* und *Arabidopsis thaliana* beschrieben [4].

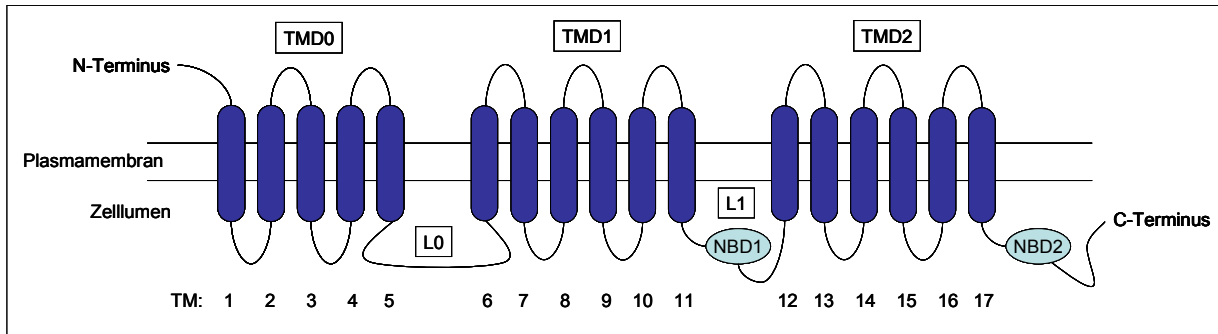
**Tabelle 1.2:** Homologien des humanen ABCC2 mit orthologen Genen in verschiedenen Spezies [4].

Spezies	Symbol	Chromosomen- lokalisierung	Anzahl der		Identität (%)	Accession number
			Exons	Amino- säuren		
Mensch	ABCC2	10q24	32	1.545	100	NP_000383
Rhesusaffe	Abcc2			1.545	96	AAY41167
Hund	Abcc2	28	32	1.544	84	AAS91646
Kaninchen	Abcc2			1.564	82	CAA89004
Maus	Abcc2	19	32	1.543	78	AAL36985
Ratte	Abcc2	1q51		1.541	78	NP_036965
Huhn	Abcc2	6	31	1.542	64	XP_421698
Zebrafisch	Abcc2	13	26	1.567	59	NP_956883
Meeresrochen	Abcc2			1.564	57	AAL92112

Die Überexpression von ABCC2 in Tumoren führt zum Phänotyp der „multidrug resistance“ (MDR), welcher wie oben beschrieben vor allem für ABCB1 (P-Glykoprotein) bekannt ist. Die Herunterregulation des ABCC2-vermittelten Transports führt dagegen zum Krankheitsbild der Hyperbilirubinämie oder zu veränderten pharmakokinetischen Parametern von ABCC2-Substraten. Den Faktoren, die an der Regulation der ABCC2-Expression und -Aktivität beteiligt sind sowie genetischen Varianten, die die Aktivität verändern, kann somit große Bedeutung zukommen. Es wurden bereits einige SNPs (Single nucleotide polymorphisms) beschrieben, die die Expression und Funktion von ABCC2 beeinflussen und an der interindividuellen Variation der Wirkung von Arzneimitteln beteiligt sind [1;5].

### 1.1.1 Struktur und Lokalisation von ABCC2

Das ABCC2-Protein besteht aus 17 transmembranären Segmenten (TM), die in drei membranüberspannende Domänen (TMD0, TMD1 und TMD2) unterteilt sind. Die N-terminale Domäne TMD0, die aus ca. 200 Aminosäuren besteht, besitzt einen extracytosolischen N-Terminus und ist aus 5 transmembranären Segmenten (TM1 - TM5) aufgebaut. Diese Domäne ist mit der TMD1 über eine cytoplasmatische Schleife (L0) verbunden. Die TMD1- und TMD2-Domänen bestehen aus jeweils 6 transmembranären Segmenten (TMD1: TM6 - TM11; TMD2: TM12 - TM17) und sind verbunden über das intrazelluläre Segment L1. ABCC2 weist zwei cytosolische Nukleotid-bindende Domänen (NBD1 und NBD2) auf, an die ATP binden kann. Diese Domänen sind am L1-Segment und dem intrazellulären C-Terminus der TMD2-Domäne lokalisiert (Abbildung 1.2) [5].



**Abbildung 1.2:** Struktur des ABCC2-Proteins in der Membran. TMD: membranüberspannende Domäne; L: cytoplasmatische Schleife; NBD: Nukleotid-bindende Domäne; TM: transmembranäres Segment. (Verändert nach [6])

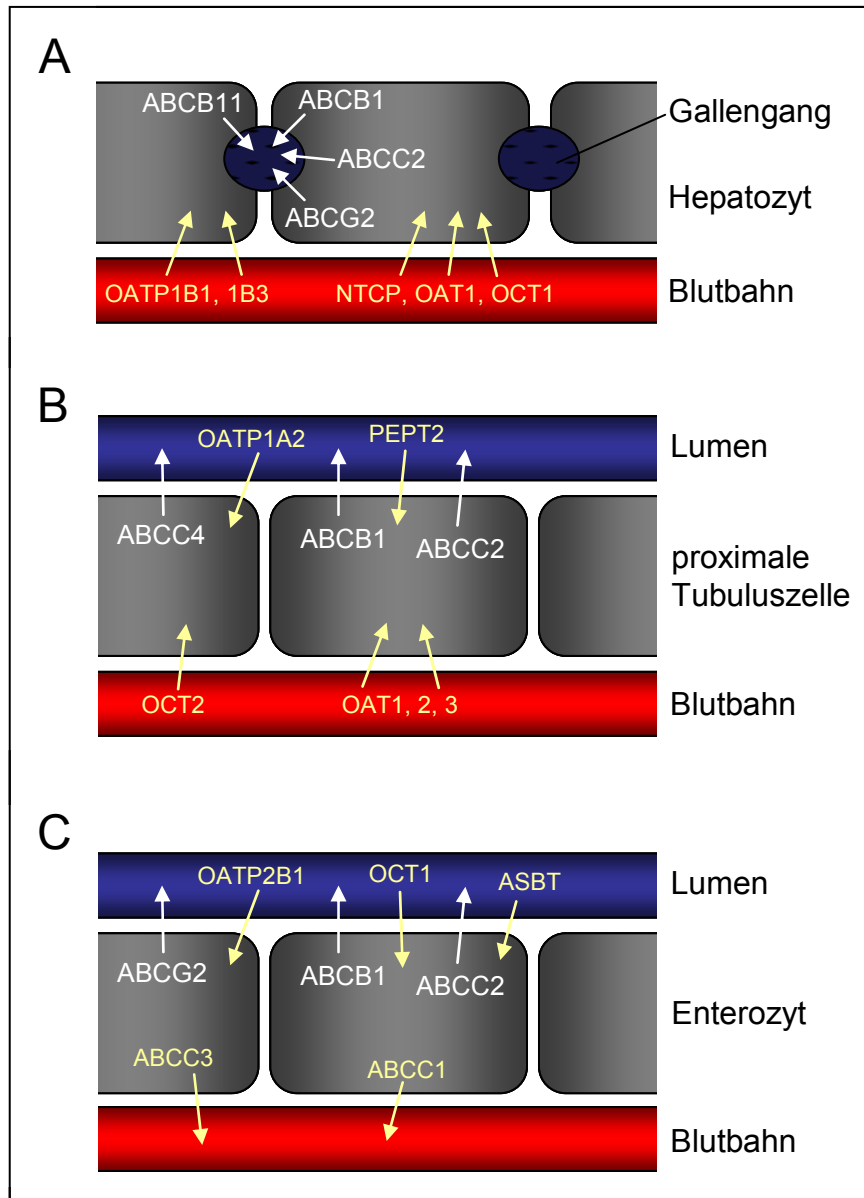
Mutagenesestudien haben gezeigt, dass TM6, TM9, TM16 und TM17 im humanen ABCC2-Protein wahrscheinlich für die Substratbindung verantwortlich sind [7]. ABCC2 weist zwei ähnlich aber nicht identische Ligandenbindungsstellen auf. Von der einen Ligandenbindungsstelle werden die Substrate transportiert und von der zweiten wird die Affinität für die Substrate reguliert [8]. Außerdem scheinen die TMD0- und die L0-Domänen entscheidend für das Steuern von ABCC2 in die apikale Membran zu sein, da ABCC2-Mutanten, denen der N-Terminus fehlt, intrazellulär verbleiben [9]. Der molekulare Mechanismus, durch den ABCC2 in die apikale Membran gesteuert wird, ist allerdings noch nicht vollständig bekannt [5].

In-vitro-Studien im Mausmodell haben gezeigt, dass Radixin, ein Mitglied der Ezrin/Radixin/Moesin-Familie, das Aktin mit verschiedenen integralen Membranproteinen vernetzt, offenbar für die korrekte apikale Lokalisation von Abcc2 notwendig ist [4;10]. Es wurde zudem beobachtet, dass Radixin-knock-out-Mäuse eine konjugierte Hyperbilirubinämie und einen selektiven Rückgang von Abcc2-Proteinen in der kanalikulären Membran der Hepatozyten entwickeln [11]. Auch die kanalikuläre Lokalisation von humanem ABCC2 scheint abhängig von der Interaktion mit Radixin zu sein [12]. Weitere Proteine, die in vitro gezeigt haben, dass sie mit ABCC2 interagieren, gehören zu der PSD95/Dlg/ZO-1 (PDZ)-Familie und binden am C-Terminus des ABCC2-Proteins an eine Konsensussequenz (T/S-X- $\Phi$ , wobei X jede beliebige Aminosäure sein kann und  $\Phi$  eine hydrophobe Aminosäure) [4]. Die Interaktion von ABCC2 mit PDZK1 und anderen PDZ-Proteinen wurde bereits beschrieben [13;14] und auch die meisten der bekannten ABCC-Orthologe (vgl. Tabelle 1.2) weisen am C-Terminus eine Konsensussequenz für ein PDZ-Bindungsmotiv auf [4]. Allerdings konnte in PDZK1-knock-out-Mäusen gezeigt werden, dass es zu einer korrekten

apikalen Lokalisation von Abcc2 in der Niere kommt. Dies bedeutet, dass PDZK1 in vivo entweder nicht notwendig ist oder, dass das Fehlen von PDZK1 von anderen PDZ-Proteinen kompensiert werden kann [15]. Eine weitere Studie hat gezeigt, dass es sich bei dem PDZ-Bindungsmotiv um ein Zielsignal für die Integration von ABCC2 in die apikale Membran handelt [16]. Diese Tatsache wurde aber wiederum von vielen anderen Studien nicht bestätigt. Diese Studien weisen darauf hin, dass das Zielsignal für die Integration von ABCC2 in die apikale Membran keine klar begrenzte Aminosäure-Sequenz ist, sondern sich aus vielen verschiedenen Motiven in unterschiedlichen Teilen des Proteins zusammensetzt, die nur im intakten Protein zusammenkommen [4;9;10;17;18].

Das ABCC2-Protein ist in der apikalen Membran von polarisierten Zellen, wie Hepatozyten, Epithelien des proximalen Nierentubulus und Darmepithelien lokalisiert. Diese Lokalisation unterstützt die Funktion von ABCC2 in der terminalen Exkretion und Detoxifikation von endogenen und xenobiotischen organischen Anionen [4].

Hepatozyten repräsentieren 80% der Lebermasse [19]. Die basolaterale und die kanalikuläre Membran variieren in ihrer Zusammensetzung und ihrer Funktion und sind durch Tight Junctions, die den Gallengang abdichten, abgetrennt [20]. Die basolaterale Membran steht im Kontakt mit dem sinusoidalen Blut und die kanalikuläre Membran repräsentiert den exkretorischen Pol des Hepatozyten [19]. Die Bildung der Gallenflüssigkeit ist stark abhängig vom aktiven Transport von gelösten Substanzen, wie Gallensäure, Glutathion und Bikarbonat über die kanalikuläre Membran gefolgt vom passiven Einstrom von Wasser. In Säugetieren ist die Galle essentiell für die Solubilisierung und den Aufschluss von Nahrungsfetten [19;20]. Wie oben beschrieben, eliminiert ABCC2 Glutathion-, Glukuronid- und Sulfat-Konjugate von verschiedenen endogenen Stoffen und Xenobiotika von Hepatozyten in die Galle, von proximalen Nierentubuli in den Urin bzw. von Zellen des Darmepithels in das Darmlumen [2;4]. In nicht-polarisierten Zellen können auch andere Mitglieder der ABCC-Subfamilie diese Aufgabe der terminalen Detoxifikation übernehmen [4]. Aufgrund der Lokalisation des Transportproteins und seiner Vielzahl an wichtigen Substraten, handelt es sich um ein Schlüsselprotein der hepatobiliären Sekretion von Arzneistoffen [5]. Dies spiegelt sich auch in einer veränderten Pharmakokinetik von Substanzen in Abcc2-defizienten Ratten (TR<sup>-</sup>-Ratten) wieder. Diese Ratten zeigen eine deutlich verringerte biliäre Exkretion von Abcc2-Substraten [5;21]. Die Lokalisation von ABCC2 in der Niere zeigt den möglichen Beitrag der renalen Elimination von Arzneistoffen und die Lokalisation in den apikalen Bereichen der intestinalen Zellen, wo ABCC2 als Effluxtransporter Arzneistoffe in das digestive Lumen transportiert, limitiert die Absorption der Substrate (Abbildung 1.3) [5].



**Abbildung: 1.3:** Lokalisation des ABC-Transporters ABCC2 in (A) der Leber, (B) der Niere und (C) dem Darm zusammen mit weiteren Auswärts- und Aufnahmetransportern. ABCB11: ABC-Protein B11; ABCB1: ABC-Protein B1; ABCC1, 2, 3, 4: ABC-Protein C1, C2, C3, C4; ABCG2: ABC-Protein G2; OATP1B1, 1B3, 1A2, 2B1: Mitglieder der OATPs; NTCP: sodium-taurocholate cotransporting polypeptide; OAT1, 2, 3: Mitglieder der OATs; OCT1, 2: Mitglieder der OCTs; PEPT2: Peptidtransporter 2; ASBT: apical sodium-dependent bile acid transporter. (Verändert nach [2])

Des Weiteren wurde die Expression von ABCC2 auch in der Gallenblase, den Bronchien und der Plazenta beschrieben [4]. Im Gegensatz dazu wird die Expression von ABCC2 in der humanen Blut-Hirn-Schranke kontrovers diskutiert [4;10;22-24].

Außer in gesundem Gewebe wird ABCC2 auch in vielen malignen Tumoren exprimiert, wie klarzelligem Nierenkarzinom, hepatozellulärem Karzinom, Ovarialkarzinom und kolorektalem Karzinom. Außerdem in Lungen-, Brust- und Magenkarzinom. Dahingegen ist die Proteinexpression von ABCC2 in primären Hodentumoren, im Adenokarzinom des Pankreas und in Gliomen zu vernachlässigen [4]. Die Überexpression von ABCC2, die zum Phänotyp der MDR in Tumorzellen führt, zeigt die klinische Relevanz von ABCC2 in der Therapie von Krebspatienten [4;5].

### 1.1.2 Substrate und Inhibitoren von ABCC2

ABCC2 ist in erster Linie ein Bilirubinglukuronid-Transporter, der außerdem unkonjugierte anionische Substanzen, wie Methotrexat und Bromsulphophthalein, sowie reduziertes und oxidiertes GSH transportiert [4]. Weitere Substrate von ABCC2 sind Epigallocatechin-3-gallat, ein wichtiges Polyphenol des grünen Tees [25], 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridin (PhIP), ein Karzinogen aus der Nahrung [26] und die nephrotoxische Substanz Ochratoxin A [27]. Aufgrund dieses breiten Substratspektrums nimmt ABCC2 eine wichtige Rolle im Detoxifikationsprozess ein [1]. Da aber auch endogene Substanzen von ABCC2 transportiert werden, können Veränderungen in der physiologischen Funktion von ABCC2 bereits zu Erkrankungen führen [5]. Tabelle 1.3 zeigt eine Zusammenfassung der ABCC2-Substrate.

Verschiedene Substanzen wie Cyclosporin A, Glibenclamid, Probenecid, Indomethacin, MK571 und die Antibiotika Azithromycin und Fusidat blockieren die ABCC2-Aktivität [5;28]. Diese Wirkung wurde ebenfalls für Flavonoide, wie Luteolin und Quercetin beschrieben (Tabelle 1.3). Diese Inhibitoren wirken, indem sie um die Substrat-Bindungsstellen des ABCC2-Proteins konkurrieren, wobei gezeigt werden konnte, dass z.B. Probenecid und Azithromycin durch ABCC2 transportiert werden [5]. Des Weiteren können Substanzen als Inhibitoren wirken, indem sie mit dem zellulären Glutathionlevel interagieren [29]. Viele der ABCC2-Inhibitoren sind allerdings auch in der Lage mit anderen Transportern, wie mit ABCC1, ABCB1 oder Aufnahmetransportern wie OATPs (organic anion transporting polypeptides) zu interagieren, was zum Verlust der Spezifität dieser Inhibitoren führt [5].

**Tabelle 1.3:** Endogene und exogene ABCC2-Substrate und ABCC2-Inhibitoren [1;5]

<b>Substanzklasse</b>		<b>Substanz</b>
<b>endogen</b>		Bilirubinglukuronid oxidiertes und reduziertes Glutathion Leukotrien C <sub>4</sub> (LTC <sub>4</sub> ) 17 $\beta$ -Estradiolglukuronid Hormon-Konjugate
<b>exogen</b>	Zytostatika	Cisplatin, Doxorubicin, Etoposid, Irinotecan, Methotrexat, Vinblastin, Vincristin
	Antibiotika	Ampicillin, Ceftriaxon, Grepafloxacin
	Statine	Pravastatin
	HIV-Protease-Inhibitoren	Saquinavir, Ritonavir, Indinavir
	$\beta$ -Blocker	Talinolol, Carvedilol
	diverses	PhiP, Epigallocatechin-3-gallat, Ochratoxin A Bromsulphophthalein, Sulfinpyrazon, Arsen
	Fluoreszierende Farbstoffe	Carboxyfluorescein, Glutathion-Methylfluorescein
<b>Inhibitoren</b>		Probenecid, MK571
	Immunsuppressiva	Cyclosporin A
	Anti-Diabetika	Glibenclamid
	NSAID	Indomethacin
	Antibiotika	Azithromycin, Fusidat
	Flavonoide	Luteolin, Quercetin

Der exakte Mechanismus, mit dem ABCC2-Substrate über die Membran transportiert werden, ist nicht vollständig geklärt [5]. Für den Transport wird ATP benötigt und es konnte gezeigt werden, dass viele ABCC2-Substrate die ATPase-Aktivität stimulieren [30]. Allerdings konnte bei z.B. p-Aminohippurat kein Effekt auf die ATPase-Aktivität beobachtet werden. Dies lässt vermuten, dass der ABCC2-vermittelte Transport nicht zwingend mit einem messbaren Anstieg der ATPase-Aktivität gekoppelt ist [5].

Ein weiterer wichtiger Parameter für den ABCC2-vermittelten Efflux ist GSH, das z.B. beim Transport von Vinblastin benötigt wird [31]. Allerdings stellt sich die Frage welche Rolle GSH beim ABCC2-vermittelten Transport einnimmt. Es wird diskutiert, ob GSH als Aktivator oder als kotransportiertes Substrat benötigt wird [32]. In Nierenzellen, die mit einem ABCC2-cDNA-Konstrukt transfiziert wurden, konnte gezeigt werden, dass der ABCC2-vermittelte

Transport von Vinblastin proportional den GSH-Transport induziert. Außerdem wurde beobachtet, dass GSH von ABCC2-transfizierten Zellen sekretiert wird [33]. Verschiedene Experimente lassen vermuten, dass es sich bei GSH selbst bereits um ein ABCC2-Substrat handelt, das auch unabhängig von Arzneistoffen transportiert wird [32].

Das Modell von Borst et al. sieht vor, dass zwei Arzneistoff-Bindungsstellen existieren, wobei eine Bindungsstelle eine sehr hohe Affinität für GSH aufweist (G-site) und eine geringere Affinität für Arzneistoffe. Die andere Bindungsstelle dagegen zeigt eine hohe Affinität für Arzneistoffe und eine geringere für GSH (D-site). Sind keine Arzneistoffe vorhanden, sind beide Bindungsstellen von GSH besetzt und es kommt zu einem langsamen Export von GSH. Bei geringen Arzneistoffkonzentrationen ist die G-site durch GSH und die D-site von dem Arzneistoff besetzt. Dies führt dann zu einem Kotransport von beiden Substanzen. Bei hohen Konzentrationen sind einige in erster Linie negativ geladenen Arzneistoffe in der Lage beide Bindungsstellen zu besetzen, wodurch nur diese Substanz transportiert wird. Substanzen, die mit Glutathion, Glukuronid oder Sulfat gekoppelt vorliegen, benötigen kein freies GSH für den Transport der Substanzen. Es wird vermutet, dass diese gekoppelten Substanzen eine hohe Affinität für beide Bindungsstellen aufweisen [32].

### 1.1.3 Polymorphismen im ABCC2-Gen

Mehr als 200 natürlich vorkommende Sequenzvariationen wurden in den Exons, Introns und in den 5'- und 3'-UTRs des humanen ABCC2-Gens identifiziert. Bei vielen von diesen Variationen handelt es sich um SNPs [4].

SNPs, die zu einem funktionell inaktiven ABCC2-Protein führen, sind die molekulare Grundlage des Dubin-Johnson-Syndroms (DJS) beim Menschen. DJS ist eine autosomal rezessiv vererbte Erkrankung, die durch eine konjugierte Hyperbilirubinämie (z.B. erhöhte Konzentrationen von Bilirubin-Glukuroniden im Blut) und Ablagerung von dunklen Pigmenten in den Hepatozyten charakterisiert ist. Die Leber von betroffenen Personen sieht dadurch dunkelblau oder schwarz aus [1;4;34]. Die Erkrankung wurde 1954 von Dubin und Johnson beschrieben [34]. Zurzeit stehen zwei Tiermodelle für das DJS zur Verfügung, wobei es sich um zwei mutante Hyperbilirubinämie-Ratten-Stämme handelt, die GY/TR<sup>-</sup>-Ratten [35] und die Eisai hyperbilirubinämischen-Ratten (EHBR) [36;37]. Beide Rattenstämme haben einen vererbten Defekt im Abcc2-Protein, der die Sekretion von anionischen Konjugaten in die Galle behindert [4]. Zwei verschiedene natürlich vorkommende Sequenzvariationen im Abcc2-Gen der Ratte führen zu diesen Rattenstämmen. GY/TR<sup>-</sup>-Ratten weisen eine Mutation in Codon 401 [38] und EHBR in Codon 855 [39] auf, die jeweils zu vorzeitigen Stoppcodons



führen und damit zu einem Fehlen von Abcc2-Proteinen in der kanalikulären Membran der Hepatozyten [4].

Neben den Mutationen, die das DJS verursachen wurden noch weitere SNPs beschrieben. Bisher wurden mehr als 40 SNPs in gesunden Individuen verschiedener Ethnien identifiziert. Es wird vermutet, dass diese Polymorphismen dazu beitragen können, die interindividuellen Unterschiede in der Transport- und Exkretionsaktivität von ABCC2 zu erklären [1].

Die häufigsten SNPs in der kaukasischen Bevölkerung sind -24C>T in der 5'-UTR (Allelfrequenz 0,18), 1249G>A (V417I) in Exon 10 (Allelfrequenz 0,21) und die stille Mutation 3972C>T (I1324I) in Exon 28 (Allelfrequenz 0,34). Weitere nicht-synonyme SNPs sind 3563T>A (V1188E) in Exon 25 und 4544G>A (C1515Y) in Exon 32, die allerdings Allelfrequenzen von 1% aufweisen [1] oder der synonyme SNP 1446C>G (T482T, Allelfrequenz 0,01) [40].

In-vitro- und In-vivo-Studien haben gezeigt, dass SNPs einen Einfluss auf die Expression und Funktion von ABCC2 haben [41]. Der 5'-UTR SNP -24C>T, der zuerst von Ito et al. in einer japanischen Population identifiziert wurde [6], konnte mit einer verringerten Funktion des ABCC2-Transporters in Verbindung gebracht werden und befindet sich im Linkage Disequilibrium mit dem 3972C>T SNP [1]. Es konnte gezeigt werden, dass es bei Nierentransplantatempfängern, die das variante -24T-Allel tragen zu einer verringerten Clearance von Mycophenolsäure kommt. Dadurch wird die MPA-Exposition nicht verringert und dies kann zu einer milden Leber-Dysfunktion führen [42]. Bei weiblichen Kindern mit akuter lymphatischer Leukämie wurde ebenfalls eine verringerte Clearance bei der Behandlung mit Methotrexat beobachtet, wenn diese Träger des varianten Allels waren [43]. Außerdem weist nicht-tumoröses kortikales Nierengewebe von -24T-Allel-Trägern eine signifikant geringere ABCC2-mRNA-Expression auf [44]. Übereinstimmend mit diesen Beobachtungen zeigen Patienten mit nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom, die das variante Allel tragen, ein besseres Ansprechen auf die Therapie mit Irinotecan [45]. Des Weiteren wurde zum einen eine gesteigerte Hepatotoxizität nach der Einnahme von Diclofenac beobachtet [46] und zum anderen nach der Gabe von pflanzlichen Arzneimitteln ein tendenziell gesteigertes Risiko für die Entwicklung einer hepatozellulären Hepatitis [47]. Diese Beobachtungen sprechen für eine verringerte Aktivität des Transporters.

Der SNP 1249G>A befindet sich in der Substrat-Bindungsstelle der ersten transmembranären Domäne (TMD1) und führt zu einem Aminosäureaustausch von Valin zu Isoleucin im ABCC2-Protein an Position 417 [1]. Es konnte gezeigt werden, dass dieser SNP mit einer verringerten Bioverfügbarkeit von Talinolol assoziiert ist, woraus geschlossen werden konnte, dass es zu einer höheren Aktivität des Transporters kommt [48]. Außerdem wurde bei

afrikanischen Amerikanern mit Rheumatoider Arthritis, die Träger des varianten 1249A-Allels waren, eine erhöhte gastrointestinale Toxizität bei der Behandlung mit Methotrexat beobachtet [49]. Übereinstimmend mit diesen Beobachtungen wiesen japanische Patienten mit metastasierendem kolorektalem Karzinom, die neben Irinotecan mit 5-Fluorouracil / Leucovorin (FOLFIRI) behandelt wurden, im Zusammenhang mit 1249A eine geringere AUC (area under the concentration time curve) von Irinotecan auf [50]. Im Gegensatz dazu haben Hirouchi et al. gezeigt, dass es in vitro zwischen Wildtyp-ABCC2 und dem 1249G>A-Polymorphismus keinen Unterschied im Transport von LTC<sub>4</sub>, E<sub>2</sub>17βG (17β-Estradiolglukuronid) und DNP-SG (2,4-dinitrophenyl-S-glutathione) nach Normalisierung auf den Proteingehalt gibt [51].

Bei dem Polymorphismus 3972C>T im ABCC2-Gen handelt es sich um eine stille Mutation. Der SNP befindet sich an der dritten Position des Basentriplets, so dass die Aminosäure Isoleucin an Position 1324 im ABCC2-Protein nicht beeinflusst wird [1]. Der Polymorphismus 3972C>T ist mit einer höheren Bioverfügbarkeit von Irinotecan [52] und mit einem erhöhten Risiko für eine intrahepatische Cholestase während der Schwangerschaft assoziiert [53]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass 3972T das Risiko für Gallengangkrebs erhöht [54] und es nach der Gabe von pflanzlichen Arzneimitteln zu einem gesteigerten Risiko für die Entwicklung einer hepatozellulären Hepatitis kommt [47].

Die in der kaukasischen Bevölkerung eher selten auftretenden SNPs 3563T>A (V1188E) und 4544G>A (C1515Y) sind gelinkt und mit einer höheren ABCC2-Proteinexpression in der Leber assoziiert [55]. Des Weiteren wurde für die stille Mutation 1446C>G (T482T) eine höhere ABCC2-mRNA-Expression in der Leber und eine verringerte AUC von Pravastatin beschrieben [40].

#### **1.1.4 Regulation von ABCC2**

ABCC2 ist nicht nur konstitutiv exprimiert, sondern wird sowohl auf transkriptioneller als auch auf posttranskriptioneller Ebene reguliert. Diese Regulation findet als Antwort auf eine Vielzahl von endogenen und xenobiotischen Substanzen und in Abhängigkeit von verschiedenen Krankheitszuständen statt [4].

##### **1.1.4.1 Initiation der ABCC2-Transkription und Regulation durch Transkriptionsfaktoren**

Viele Gene, die von der Polymerase II (Pol II) transkribiert werden, enthalten eine TATA-Box auf ihrem Promotor. Diese TATA-Box wird in erster Instanz von dem generellen Transkriptionsfaktor TBP erkannt, der an die TATA-Box bindet. Darauf folgen eine Vielzahl

von Protein-Protein-Interaktionen, wodurch die Pol II an das TATA-Element rekrutiert wird und die Transkription ca. 25-30 bp downstream des Transkriptionsstartpunktes initiiert wird. Interessanterweise fehlt bei allen bisher untersuchten Arzneistofftransportern die TATA-Box [56]. Es wurde zwar beschrieben, dass ABCC2 ein TATA-ähnliches Element in der Promotorregion aufweist, allerdings befindet sich dieses mehr als 400 bp upstream vom Transkriptionsstart und ist somit wahrscheinlich funktionell nicht relevant [57]. Bisher ist noch nicht vollständig geklärt, wie die Transkription bei Promotoren ohne TATA-Box reguliert wird [56]. Viele dieser Promotoren weisen aber ein Inr-Element auf und es konnte bereits gezeigt werden, dass die Transkription von ABCB1 durch ein Inr-Element reguliert wird [58]. Inr-Elemente in anderen Transportern wurden bisher noch nicht funktionell beschrieben. Es wurde aber eine Konsensussequenz eines Inr-Elements im ABCC2 Promotor identifiziert [56]. Weitere ubiquitäre Pol II-Promotor-Elemente sind GC-Elemente und CCAAT-Boxen. Diese Elemente werden oft in Promotoren ohne TATA-Box gefunden [56]. Der proximale ABCC2-Promotor scheint kein GC-Element zu besitzen. Allerdings wurde eine Konsensussequenz für den Transkriptionsfaktor SP1 an Position -1709 identifiziert, die aber zurzeit noch nicht funktionell charakterisiert wurde. Mitglieder der SP-Familie von Transkriptionsfaktoren sind in der Lage mit GC-Elementen zu interagieren. ABCC2 weist eine putative CCAAT-Box auf, die In-vitro-Versuchen zur Folge wahrscheinlich eher mit YB-1 als mit NF-Y interagiert. Allerdings scheint die CCAAT-Box für die konstitutive Transkription nicht notwendig zu sein [59].

Des Weiteren weist der ABCC2-Promotor eine Konsensussequenz für ein AP-1-Bindungselement auf, das aber ebenfalls noch nicht funktionell untersucht wurde [60]. In HepG2-Zellen konnte gezeigt werden, dass TSA (Trichostatin A), ein Inhibitor der Histon-Deacetylase (HDAC) die Transkription von ABCC2 reprimiert und zwar ausgehend von der Region von -517 bis -197. Es wird davon ausgegangen, dass Chromatin-Modifikationen dazu führen, dass ein Repressor-Komplex an den ABCC2 Promotor bindet [57]. Im Bereich von -356 bis -343 des ABCC2-Promotors befindet sich außerdem eine C/EBP $\beta$ -Bindungsstelle [60]. Des Weiteren wurden im Promotor von ABCC2 unter anderem Bindesequenzen für HNF1 (hepatic nuclear factor 1), HNF3 $\beta$  (hepatic nuclear factor 3  $\beta$ ), USF (upstream stimulatory factor), AP-2 (activator protein 2) und Nrf2 (nuclear factor-erythroid 2 p45-related factor 2) identifiziert [56].

#### **1.1.4.2 Regulation der ABCC2-Expression durch endogene und exogene Faktoren**

Die ABCC2-Expression wird in den Hepatozyten durch endogene Faktoren wie Gallensäuren (z.B. Chenodesoxycholsäure) verstärkt [5]. In diese Regulation ist vermutlich FXR (farnesoid X receptor; NR1H4) involviert, der als Heterodimer mit RXR $\alpha$  (retinoid X receptor alpha;

NR2B1) an eine 26 bp-Sequenz des ABCC2-Promotors bindet. Diese Sequenz befindet sich 440 bp upstream des Transkriptionsinitiationsstart (Transkriptionsstart: Nukleotid -247) und besteht aus einem „everted repeat“ eines AGTTCA-Motivs, das durch 8 Nukleotide getrennt ist (ER-8) [4;5]. An dieses Hormon-Response-Element (ER-8) binden außerdem Heterodimere von RXR $\alpha$  mit den Liganden-aktivierten Transkriptionsfaktoren PXR (pregnane X receptor; NR112) oder CAR (constitutive androstane receptor; NR113) [5]. Diese nukleären Rezeptoren werden durch verschiedene Xenobiotika, wie das Antibiotikum Rifampicin, das synthetische Glukukortikoid Dexamethason und Pregnenolon-16 $\alpha$ -carbonitril (PCN) über PXR, oder durch Phenobarbital über CAR aktiviert [4]. Die nukleäre Rezeptoren FXR, PXR und CAR teilen sich einen gemeinsamen Signal-Mechanismus: binden eines Liganden an den Rezeptor, Dimerisierung mit RXR $\alpha$ , binden des Heterodimers an ein Response-Element des Zielgens und Initiation der Transkription des Zielgens [2;4;5].

Einige Gallensäuren regulieren ABCC2 aber auch unabhängig von FXR. Cholsäure und Ursodesoxycholsäure erhöhen die hepatische, renale und intestinale ABCC2-Expression sowohl in FXR-Wildtyp- als auch in FXR-knock-out-Mäusen. Diese Hochregulation trägt dazu bei, dass die hepatozelluläre Akkumulation von potentiell toxischen Gallensäuren verhindert wird und stimuliert die Gallensekretion [5]. Gallensäuren-Vorläufer können die ABCC2-Expression auch über den PXR-Pathway erhöhen [61]. Dexamethason, Mifepriston und PCN erhöhen die Expression von ABCC2 [5]. Es wird vermutet, dass in diesen Prozess PXR involviert ist, da eine Studie zeigen konnte, dass zumindest Dexamethason und PCN in PXR-Null-Mäusen zu keiner ABCC2-Induktion führen [62;63]. Substanzen die PXR aktivieren, wie Rifampicin, Nifedipin, Spironolacton oder Ritonavir sind Bestandteil einer wichtigen Klasse von ABCC2-Induktoren. Sie führen zu einer Interaktion von PXR mit dem ABCC2-Promotor [5]. Außerdem induzieren auch Echtes Johanniskraut (*Hypericum perforatum*) und andere natürliche Substanzen, wie Karotinoide und ihre Metaboliten ABCC2 über eine Interaktion mit PXR [64;65]. Die Induktion von ABCC2 über PXR ist aber auch assoziiert mit einer Heraufregulierung von anderen PXR-kontrollierten detoxifizierenden Proteinen, wie z.B. Cytochrom P450 3A4 und ABCB1 [5].

Des Weiteren sind inflammatorische Zytokine an der ABCC2-Regulation beteiligt [5]. Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) verringert die ABCC2-Expression in humanen hepatischen Zellen vermutlich durch die Inaktivierung der Bindung von IRF3 (interferon regulatory factor 3) an das ISRE (interferon stimulatory response element) des ABCC2-Promotors [66;67]. Außerdem ist IL-1 $\beta$  in der Lage die ABCC2-Promotoraktivität durch die Unterdrückung der Retinoid-Transaktivierung zu verringern [68]. Es wird vermutet, dass bei Cholestase aufgrund einer Gallengangligation die Sekretion von IL-1 $\beta$  hochreguliert wird, wodurch es zu einer

verringerten Bindung des RXR $\alpha$ /RAR $\alpha$ -Heterodimers an den Abcc2-Promotor der Ratte kommt und somit zu einer Herunterregulation von hepatischem Abcc2 [69]. Während der LPS (Lipopolysaccharid)-induzierten Cholestase, scheint IL-1 $\beta$  dafür verantwortlich zu sein, dass sich die ABCC2-mRNA-Expression verringert, da durch Blockade von IL-1 $\beta$  dieser Effekt aufgehoben wird [5]. Weiterhin wird vermutet, dass durch LPS Kupffer-Zellen IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  (Tumornekrosefaktor alpha) sekretieren, wodurch die ABCC2-mRNA-Expression erniedrigt wird. Allerdings führt eine Inaktivierung von TNF- $\alpha$  nicht zur Inhibition der Herunterregulation von ABCC2-mRNA, so dass die Verringerung der ABCC2-mRNA wahrscheinlich über LPS durch IL-1 $\beta$  vermittelt wird [70;71]. Außerdem wurde beschrieben, dass IL-6 (Interleukin 6) ABCC2 in Nagetieren und primären Hepatozytenkulturen herunterreguliert. Dies findet wahrscheinlich über den PXR-regulatorischen Pathway statt, da in PXR-knock-out-Mäusen keine Regulation von ABCC2 über IL-6 zu beobachten ist [5]. Die Effekte von Zytokinen auf die ABCC2-Expression werden allerdings zur Zeit noch kontrovers diskutiert, da die Ergebnisse wahrscheinlich stark von den verwendeten Konzentrationen, Zeitpunkten aber auch verwendeten Modellen, bei In-vitro-Versuchen z.B. von der verwendeten Zelllinie abhängen [70-74].

Die ABCC2-Expression wird durch weitere exogene Faktoren reguliert. Dies sind verschiedene chemisch nicht verwandte Substanzen, wie Schwermetalle, chemische Karzinogene und Arzneistoffe [5]. Die Exposition mit metallartigen Salzen wie Natriumarsenit und Kaliumantimonyltartrat induziert in primären Rattenhepatozyten, humanen Hepatozyten und in HepG2-Zellen die Expression von ABCC2 [75;76]. Bei dieser Aktivierung kommt es zur aktiven Transkription, die mit der Aktivierung des c-Jun-N-terminalen-Kinase-Pathway und mit einer Reduktion des zellulären Glutathion-Levels assoziiert ist [77]. Cisplatin, ein Zytostatikum aus der Klasse der Platinkomplexe, erhöht ebenfalls das ABCC2-Level in hepatischen Zellen und in der Niere. Die renale Induktion von ABCC2 reflektiert die renale Toxizität von Cisplatin, da bei chronischem Nierenversagen diese Heraufregulierung in der Ratte nicht stattfindet [5]. Außerdem wurde gezeigt, dass ABCC2 durch das chemische Karzinogen AAF (2-Acetylaminofluoren) in primären Ratten-Hepatozyten und in humanen und Ratten-Leberzellen heraufreguliert wird [57]. Dieses Karzinogen verringert allerdings die Aktivität des ABCC2-Promotors. Daher wird davon ausgegangen, dass die Effekte auf den Transporter auf posttranskriptionelle Mechanismen, wie eine verbesserte mRNA-Stabilität zurückzuführen sind [5;57]. Im Gegensatz zu AAF hat die karzinogene Substanz Dioxin keinen Effekt auf die hepatischen ABCC2-mRNA-Level [78] und auch keinen Einfluss auf die Expression in humanen intestinalen Caco-2-Zellen [79]. Daher wird vermutet, dass der AhR (aromatische Kohlenwasserstoff-Rezeptor), der durch Dioxin induziert wird, nicht an der ABCC2-Regulation

beteiligt zu sein scheint [5]. Des Weiteren konnte in Leberzellen der Ratte gezeigt werden, dass die Abcc2-mRNA-Expression nach Behandlung mit dem Proteinsyntheseinhibitor Cycloheximid heraufreguliert wird [80].

Neben vielen Substanzen, die ABCC2 induzieren, wirken einige auch inhibierend. Die Exposition mit Nocodazol oder dem Histon-Deacetylase-Inhibitor Trichostatin A führt in HepG2-Zellen zu einer Herunterregulation von ABCC2 auf mRNA- und auf Proteinebene [5].

#### **1.1.4.3 Posttranskriptionelle Regulationsmechanismen von ABCC2**

Neben der transkriptionellen Regulation von ABCC2, sind auch posttranskriptionelle Regulationsmechanismen von Bedeutung. Ein wichtiger Faktor ist dabei die Anzahl an ABCC2-Transportproteinen in der apikalen Membran von Zellen [4;20]. Es wird davon ausgegangen, dass Transportproteine aus einem intrazellulären Pool in die Membran gelangen können und von der Membran wieder in den intrazellulären Pool [20;81;82]. Die Insertion von Abcc2 in die kanalikuläre Membran von Rattenhepatozyten ist vermutlich abhängig von der Lipidkinase Phosphoinositid (PI)-3-Kinase [83], von der Proteinkinase C [84] und von cyclischem AMP [85]. Die Behandlung von HepG2-Zellen mit Phorbol-Ester, einem Agonisten der Proteinkinase C, resultiert im Verlust von Abcc2 in der apikalen Membran, wobei durch einen Proteinkinase C-Inhibitor dieser Effekt aufgehoben werden kann [20;86]. Die Gabe von Dibutyryl-cAMP führt bei Rattenhepatocytenpaaren in vitro zu einer Ausbreitung der apikalen Domäne und zu einer gesteigerten und verbesserten kanalikulären Exkretion von fluoreszierenden Abcc2-Substraten. Dies war assoziiert mit einer vermehrten Expression von Abcc2 in der apikalen Membran [85]. Dabei handelt es sich um akute Effekte durch cAMP, die nicht abhängig von der Proteinsynthese sind. Inhibitoren der Mikrotubulifunktion wiederum blockieren diese Effekte. Mikrotubuli scheinen daher in diesem regulatorischen Prozess eine Rolle zu spielen [20]. Studien in Ratten zeigen ebenfalls nach Behandlung mit Dibutyryl-cAMP und auch nach Behandlung mit Taurocholat einen schnellen Anstieg von Abcc2 (ebenso wie Abcb1 bzw. Abcb11) in kanalikulären Membranvesikeln, die aus Rattenlebern isoliert wurden. Diese Beobachtungen korrelieren auch funktionell mit einem gesteigerten Transport von Substraten dieser Transporter [20;87]. Dieser Prozess wird durch Colchicin und Wortmannin, einem Inhibitor der PI-3-Kinase, gehemmt, was einen Einfluss von Mikrotubulis und der PI-3-Kinase in diesem Prozess unterstützt [4;20]. Die Behandlung mit Cycloheximid hat keinen Effekt auf das Phänomen, wodurch bestätigt wird, dass es sich um ein posttranskriptionelles Ereignis handelt [20]. Die Rückgewinnung des Ratten-Abcc2-Transporters von der kanalikulären Membran in den Hepatozyten wurde unter verschiedenen cholestatischen Bedingungen, z.B. nach Behandlung mit Phalloidin, nach

Zytokin-Stimulation und unter hyperosmolaren Bedingungen untersucht [4]. Dabei erfolgten die Nachweise der Lokalisation von Abcc2 durch Immunfärbungen, die zeigten, dass der Transporter sich nach der Behandlung nicht nur in der Membran befand sondern zusätzlich im Hepatozyten akkumulierte [20]. Ähnliche Ergebnisse bei Immunfärbungen, die auf die Rückgewinnung von Transportproteinen aus der Membran in intrazelluläre Pools hinweisen, zeigten sich bei humanen Lebererkrankungen, wie z.B. entzündungs-induzierter ikterischer Cholestase [88], obstruktiver Cholestase [89;90] und fortgeschrittenen Stadien von primärer biliärer Zirrhose [12;91].

Des Weiteren kann die Anzahl an ABCC2-Transportproteinen in der kanalikulären Membran der Hepatozyten über eine Veränderung in der Syntheserate oder der Degradationsrate reguliert werden [4]. Die physiologische Halbwertszeit von Abcc2 der Ratte in der kanalikulären Membran der Hepatozyten beträgt rund 27 h [92]. Weitere posttranskriptionelle Mechanismen betreffen die kurzfristige Regulation von ABCC2. Es wurde bereits beschrieben, dass microRNAs an der Regulation der ABC-Transporter ABCB1 und ABCG2 beteiligt sind [93;94]. MicroRNAs sind ca. 22 Nukleotide lange, hoch konservierte, nicht kodierende RNAs, die in der Lage sind die Genexpression posttranskriptionell zu beeinflussen [95].

## 1.2 Ziele der Arbeit

Zurzeit ist nicht bekannt wie genetische Varianten die Expression und Funktion von ABCC2 beeinflussen.

Erstes Ziel der Arbeit war es, die ABCC2-Haplotyp-Frequenzen einer großen Kohorte kaukasischer Herkunft bezüglich der ABCC2-Polymorphismen -24C>T, 1249G>A und 3972C>T zu ermitteln. Insbesondere sollte aber die funktionelle Bedeutung einzelner ABCC2-SNPs und deren Haplotypen untersucht werden.

Da ABCC2 wahrscheinlich gewebeabhängig unterschiedlich reguliert wird, sollten DNA-Protein-Interaktionen und die vom -24C>T-Polymorphismus abhängige mRNA-Degradation zum einen in der Leberadenokarzinomzelllinien SK-Hep1 und zum anderen in der Nierenkarzinomzelllinie A-498 untersucht werden. Außerdem sollte der Einfluss der Polymorphismen -24C>T, 1249G>A und 3972C>T in den ABCC2-Haplotypen im Hinblick auf die mRNA-Sekundärstruktur und mRNA-Stabilität analysiert werden.

---

Ausgehend von der vollständigen cDNA von ABCC2 sollten weiterführend Vektorkonstrukte generiert werden, die neben der Wildtyp-Sequenz die wichtigsten ABCC2-Haplotypen repräsentierten. Mit Hilfe dieser Vektorkonstrukte sollten die haplotypenabhängige Transkriptions- und Translationseffizienz in vitro untersucht werden. Des Weiteren sollte die haplotypenabhängige Transportaktivität von ABCC2 in vitro und in vivo analysiert werden. Ziel dieser Untersuchungen ist es somit, einen Beitrag zur Erklärung interindividueller Unterschiede der Bioverfügbarkeit von Arzneistoffen auf Transporterebene zu erbringen, der langfristig in Konzepten der individualisierten Therapie berücksichtigt werden könnte.



## 2. Material und Methoden

### 2.1 Genotypisierung und Haplotypenbestimmung

#### 2.1.1 Probanden

Das Kollektiv der Probanden bestand aus 335 freiwilligen, gesunden, kaukasischen Personen. Es handelte sich um 228 Frauen und 107 Männer im Alter von 22 bis 64 Jahren mit einem durchschnittlichen Alter von 30,2 Jahren. Die Probanden haben ihr schriftliches Einverständnis gegeben und die Studie wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel zustimmend bewertet.

#### 2.1.2 DNA-Isolierung

Die DNA der gesunden Probanden wurde aus venösem Blut mit Hilfe des QIAmp DNA Blood Mini Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Angaben des Herstellers isoliert. Die DNA von verschiedenen Zelllinien (vgl. 2.3.1) wurde ebenfalls nach Angaben des Herstellers mit dem DNeasy Tissue Kit (Qiagen) isoliert.

#### 2.1.3 Genotypisierung

Die ABCC2-Polymorphismen -24C>T (rs717620), 1249G>A (V417I, rs2273697) und 3972C>T (I1324I, rs3740066) in der DNA von Probanden und Zelllinien wurden mittels Pyrosequencing (PSQ)-Technologie (PSQ96HS System, Biotage, Uppsala, Schweden) bestimmt. Die verwendeten Primer (Sigma, Steinheim, Deutschland) wurden mit der Assay Design Software Version 1.0 (Biotage) generiert und sind in Tabelle 2.1 angegeben. Zunächst wurde eine PCR mit einem 5'-biotinylierten und einem nicht-biotinylierten Primer durchgeführt und das PCR-Produkt in einem Agarosegel (vgl. 2.2.10) kontrolliert. Der Reaktionsansatz und die Thermocyclerbedingungen der PCR sind in den Tabellen 2.2 und 2.3 aufgeführt. Taq-Polymerase, 10x Puffer und MgCl<sub>2</sub> für die PCR-Reaktion stammten von Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) und die verwendeten dNTPs von Biozym (Hessisch Oldendorf, Deutschland).

**Tabelle 2.1:** Primersequenzen für die Genotypisierung der ABCC2-Polymorphismen -24C>T, 1249G>A und 3972C>T mit der PSQ-Technologie.

ABCC2-SNP	Primer	Sequenz
-24C>T	PSQ -24C>T geDNA F	5'-GGTCATCCTTTACGGAGAACAT-3'
	PSQ -24C>T geDNA R2	5'-BIO-GCAGAACTTCTCCAGCATGATT-3'
	PSQ -24C>T geDNA S	5'-TCATATTAATAGAAGAGTCT-3'
1249G>A	PQ ABCC2 1249 F	5'-BIO-CAACTTGGCCAGGAAGGAGTA-3'
	PQ ABCC2 1249 R	5'-TTCTGGGCATCCACAGACA-3'
	PQ ABCC2 1249 S	5'-TCAGGTTCACTGTTTCTC-3'
3972C>T	PQ ABCC2 3972C>T F	5'-BIO-CTGGTCCTCAGAGGGATCACTT-3'
	PQ ABCC2 3972C>T R	5'-TCCACCTACCTTCTCCATGCTAC-3'
	PQ ABCC2 3972C>T S	5'-CCTACCTTCTCCATGCTA-3'

**Tabelle 2.2:** Reaktionsansatz für die Genotypisierung der ABCC2-Polymorphismen -24C>T, 1249G>A und 3972C>T mit der PSQ-Technologie.

Komponente	Volumen (µl)
Wasser	16,6
10x Puffer	2,5
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1,25
dNTP (10 mM)	2,5
Vorwärts-Primer (10 µM)	0,5
Rückwärts-Primer (10 µM)	0,5
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,15
DNA	1
Endvolumen	25

**Tabelle 2.3:** Thermocyclerbedingungen für die Genotypisierung der ABCC2-Polymorphismen -24C>T, 1249G>A und 3972C>T mit der PSQ-Technologie.

Zeit	Temperatur	Zyklen
4 min.	94 °C	
30 sek.	94 °C	45
30 sek.	63 °C	
30 sek.	72 °C	
7 min.	72 °C	
∞	4 °C	

Im Anschluss an die PCR wurden 10 µl des PCR-Produktes mit 3 µl Streptavidin-Sepharose High Performance Beads (GE Healthcare, München, Deutschland) in 37 µl Binding-Puffer (Biotage) und 30 µl Wasser 15 Minuten unter Schütteln vermischt. Mit Hilfe der Vacuum Prep Workstation (Biotage) wurde das PCR-Produkt nacheinander mit 70 % Ethanol, 0,1 mM NaOH und Waschpuffer (Biotage) behandelt und in eine 96-well-Platte (Biotage) überführt, die 11 µl Annealing-Puffer (Biotage) und 1 µl Sequenzierprimer (10 µM; Sequenzen vgl. Tabelle 2.1) enthielt. Nach einem Inkubationsschritt von 2 Minuten bei 80 °C wurde der Ansatz auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Ansätze wurden mit Hilfe des PSQ96HS Systems (Biotage) typisiert. Anhand der resultierenden Peak-Höhen im Pyrogramm, war es möglich die jeweiligen Genotypen zu bestimmen.

#### **2.1.4 Haplotypenbestimmung**

Nach der Genotypisierung der ABCC2-Polymorphismen -24C>T, 1249G>A und 3972C>T wurden die Haplotypen der Probanden und der Zelllinien (vgl. 2.3.1) mit Hilfe des Programms PHASE Version 2.0 bestimmt.

## **2.2 Klonierung**

Um ABCC2-Haplotypen näher zu charakterisieren, wurde die vollständige ABCC2-cDNA in einen Expressionsvektor kloniert. Dazu wurde zunächst die Gesamt-RNA der ABCC2-exprimierenden Zelllinie HepG2 isoliert (vgl. 2.2.1). Nach reverser Transkription der RNA in cDNA (vgl. 2.2.2), wurde diese in einer Klonierungs-PCR (vgl. 2.2.3) als Template eingesetzt. Mit Hilfe genspezifischer Primer wurde die vollständige cDNA von ABCC2 (NCBI accession number NM000392; Stand 17.01.2007) amplifiziert. Nach Phosphorylierung des Inserts (vgl. 2.2.5), wurde dieses über eine blunt-end Ligation (vgl. 2.2.9) in den pBluescript II SK-Vektor (Invitrogen) ligiert. Mittels site-directed Mutagenese (vgl. 2.2.17) wurden Mutationen in die Wildtyp-Sequenz von ABCC2 (-24C/1249G/3972C) eingeführt, die den zu untersuchenden Haplotypen von ABCC2 entsprachen: H2 (-24C/1249A/3972C), H9 (-24C/1249G/3972T), H10 (-24T/1249G/3972C) und H12 (-24T/1249G/3972T). Anschließend wurden die verschiedenen ABCC2-Haplotypen in den Expressionsvektor pIRES2-ZsGreen1 (Takara Bio Europe/Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) umkloniert (vgl. 2.2.18). Zur Vervielfältigung der Vektor-DNA, wurde diese in kompetente

Bakterien transformiert (vgl. 2.2.11) und über eine Plasmid-Präparation (vgl. 2.2.13) aufgereinigt. Zur Kontrolle wurden die klonierten Konstrukte sequenziert (vgl. 2.2.16).

### 2.2.1 RNA-Isolierung

Die Gesamt-RNA wurde mit Hilfe des RNeasy Mini Kits von Qiagen isoliert. Nach der Lyse der Zellen wurden diese homogenisiert. Dazu wurde das Lysat auf eine QIAShredder-Säule (Qiagen) gegeben und bei 16.000 x g 2 Minuten zentrifugiert. Der Lyse-Puffer enthielt Guanidinisothiocyanat, ein chaotropes Salz, das Proteine und RNasen denaturiert. Als Oxidationsschutz zur Stabilisierung der RNA wurden 10 µl β-Mercaptoethanol (Roth, Karlsruhe, Deutschland) pro ml Lyse-Puffer hinzugefügt. Durch Zusatz von Ethanol wurden die entsprechenden Bedingungen für die Bindung der RNA an eine Silicagel-basierte Membran geschaffen. Nach verschiedenen Waschschrritten, wurde die RNA in Wasser eluiert. Die RNA-Isolierung wurde gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt und die RNA bei -80 °C gelagert. Die Quantifizierung erfolgte analog der in 2.2.8 beschriebenen Methode, wobei eine  $OD_{260} = 1$  einem Gehalt von 40 µg/ml RNA entsprach.

### 2.2.2 cDNA-Synthese

Der Anteil an mRNA an der zellulären Gesamt-RNA beträgt ungefähr 1-2 %. Allerdings weisen nahezu alle eukaryotischen mRNAs am 3'-Ende eine längere poly(A)-Sequenz auf, die es erlaubt mRNA aus RNA-Präparationen durch den Einsatz von Oligo-(dT)-Primern anzureichern und in cDNA umzuschreiben.

Für die cDNA-Synthese (SuperScript™ III First-Strand Synthesis System, Invitrogen) wurden 4 µg RNA eingesetzt und mit DEPC-behandeltem Wasser auf ein Endvolumen von 8 µl gebracht. Nach Zugabe von 1 µl Oligo-(dT)<sub>20</sub>-Primern (50 µM) und 1 µl dNTP-Mix (10 mM) wurde die RNA für 5 Minuten bei 65 °C denaturiert. Durch diesen Vorgang wurden Sekundärstrukturen in der RNA aufgelöst. Anschließend wurde der Ansatz für 1 Minute auf Eis inkubiert. Ein Mix, der aus 2 µl 10x RT-Puffer, 2 µl 0,1 M DTT, 4 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 1 µl RNaseOUT (40 U/µl) und 1 µl SuperScript III RT (200 U/µl) bestand, wurde zu RNA, Primern und dNTPs gegeben und der gesamte Ansatz wurde für 50 Minuten bei 50 °C inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten bei 85 °C und 2 Minuten auf Eis, wurde der Ansatz mit 1 µl RNase H (2 U/µl) versetzt und 20 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

### 2.2.3 Klonierungs-PCR

Bei der Klonierungs-PCR wurde die „proofreading“-Polymerase PfuUltra Hotstart High-Fidelity DNA-Polymerase (Stratagene, La Jolla, USA) verwendet. Dieses Enzym besitzt eine 3'-5'-Exonuclease-Aktivität, die es erlaubt falsch eingebaute Basen sofort wieder abzubauen. Des Weiteren weist diese Polymerase keine terminale Deoxynucleotidyltransferase-Aktivität auf, so dass es zu glatten Enden (blunt ends) bei den PCR-Produkten kommt.

Der verwendete Vorwärts-Primer (5'-GAT CG\*C TAG CGA TAA TTC CTG TTC CAC TTT CTT TGA TGA AAC AAG TAA AG-3') enthielt eine Sequenz für eine *Nhe*I-Schnittstelle (markiert durch einen \*). Der Rückwärts-Primer (5'-TCC\* CCG GGT CAC **TTA TCG TCA TCG TCC TTA TAA TCG** AAT TTT GTG CTG TTC ACA TTC TCA ATG CCA GCT TCC-3') enthielt neben einer Sequenz für einen Flag-Tag (DYKDDDDK, fett gedruckt), ein Stopp-Codon (kursiv gedruckt) und eine *Xma*I-Schnittstelle (markiert durch einen \*). Der Reaktionsansatz der Klonierungs-PCR ist in Tabelle 2.4 aufgeführt und die Thermocyclerbedingungen in Tabelle 2.5.

**Tabelle 2.4:** Reaktionsansatz der Klonierungs-PCR

Komponente	Volumen (µl)
Wasser	31,8
Puffer (10x)	5
dNTP-Mix (10 mM)	4
Vorwärts-Primer (10 µM)	2,5
Rückwärts-Primer (10 µM)	2,5
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1
DMSO	1
cDNA	1,2
DNA Polymerase (2.5 U/µl)	1,5
Endvolumen	50

**Tabelle 2.5.:** Thermocyclerbedingungen der Klonierungs-PCR

Zeit	Temperatur	Zyklen
2 min.	95 °C	
30 sek.	96 °C	30
30 sek.	67 °C	
10 min.	72 °C	
10 min.	72 °C	
∞	4 °C	

### 2.2.4 Aufreinigung von PCR-Produkten

Um zu verhindern, dass Verunreinigungen nachfolgende enzymatische Reaktionen hemmen, wurden PCR-Produkte, die für Klonierungen verwendet wurden, mit Hilfe des QIAquick PCR Purification-Kits (Qiagen) aufgereinigt. Die Aufreinigung wurde gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt.

### 2.2.5 Phosphorylierung des Inserts

Da die entstehenden PCR-Produkte für die Klonierung glatte Enden (blunt ends) ohne 5'-Phosphat-Ende aufwiesen, mussten die PCR-Produkte phosphoryliert werden, um die Ligation in den Vektor zu gewährleisten. Die T4-Polynucleotid-Kinase (Promega, Mannheim, Deutschland) katalysiert den Transfer von  $\gamma$ -Phosphat von ATP an das 5'-Ende von Polynukleotiden. 250 ng PCR-Produkt wurden mit 4  $\mu$ l 10x Puffer, 0,1 mM ATP (Sigma) und 15 U T4-Polynucleotid-Kinase (10 U/ $\mu$ l) 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 2  $\mu$ l 0,5 M EDTA gestoppt und mit dem QIAquick PCR Purification-Kit (Qiagen) aufgereinigt (vgl. 2.2.4).

### 2.2.6 Restriktionsverdau

Es wurden spezifische Restriktionsendonukleasen verwendet, um kompatible Enden für eine Ligation zwischen Vektor und Insert zu erhalten. Diese Enzyme erkennen spezifisch vier bis acht Basenpaare einer DNA-Sequenz. Je nach Restriktionsendonuklease können durch die Hydrolyse der Phosphodiesterbindungen entweder DNA-Fragmente mit doppelsträngigen glatten Enden (blunt ends) oder einzelsträngigen 3'- oder 5'-überstehenden Enden (sticky ends) entstehen.

Für einen Standard-Restriktionsverdau wurden bei einem Endvolumen von 20  $\mu$ l maximal 4  $\mu$ g DNA, 2  $\mu$ l 10x Restriktionspuffer, 2  $\mu$ l BSA (1 mg/ml) und 5-10 U Restriktionsenzym

(New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland) eingesetzt. Der Ansatz wurde mit Wasser auf ein Endvolumen von 20 µl aufgefüllt. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C bei der Restriktion von Vektoren für 2 bis 4 Stunden und bei der Restriktion von Inserts über Nacht. Anschließend wurden die Spaltprodukte durch das QIAquick PCR Purification-Kit (Qiagen) aufgereinigt (vgl. 2.2.4). Zur Beurteilung der Spaltung wurde ein Aliquot auf ein 1 %iges Agarosegel (vgl. 2.2.10) aufgetragen.

### 2.2.7 Dephosphorylierung

Um die Religation eines Vektors nach einem Restriktionsverdau zu verhindern, wurden die Phosphatreste der 5'-Enden des geschnittenen Vektors durch eine Phosphatase entfernt (Dephosphorylierung). Für eine erfolgreiche Ligation reichen die 5'-Phosphatreste des Inserts aus, um dieses mit dem dephosphorylierten Vektor zu ligieren.

Zur Dephosphorylierung von 5'-DNA-Enden wurde die Shrimp Alkaline-Phosphatase (Promega) eingesetzt. Für die Reaktion wurden zu 2 µg der zu dephosphorylierenden DNA 2 U Shrimp Alkaline-Phosphatase gegeben und für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Zur Inaktivierung des Enzyms wurde der Ansatz 15 Minuten bei 65 °C inkubiert. Anschließend wurde der dephosphorylierte Vektor mit Hilfe des QIAquick PCR Purification-Kits (Qiagen) aufgereinigt (vgl. 2.2.4).

### 2.2.8 Konzentrationsbestimmung

Über die Messung der optischen Dichte (OD) mit einem Photometer (Biophotometer, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) wurde die Konzentration einer Nukleinsäurelösung bestimmt. Die Nukleinsäurekonzentration berechnete sich aus der OD bei 260 nm, einem für DNA beziehungsweise für RNA spezifischen Multiplikationsfaktor, der bei RNA 40 und bei dsDNA 50 betrug, und der eingesetzten Verdünnung (z.B.: DNA-Konzentration [µg/ml] =  $OD_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50$ ). Des Weiteren konnte aus dem Verhältnis der optischen Dichte bei 260 nm und der OD bei 280 nm die Reinheit der Nukleinsäurelösung bestimmt werden. Dieses Verhältnis betrug bei proteinfreien Nukleinsäurelösungen 1,8 bis 2,0.

### 2.2.9 Ligation

Bei der Ligation kommt es zur Ausbildung von Phosphodiesterbindungen zwischen einer 3'-Hydroxylgruppe und einer 5'-Phosphatgruppe. Katalysiert wird diese Reaktion von der DNA-Ligase. Für die Ligation wurden maximal 1 µg DNA mit 3 µl 10x Ligase-Puffer und 2 µl T4-Ligase (1 U/µl; Roche, Mannheim, Deutschland) in einem Endvolumen von 30 µl über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion 10 Minuten bei 65 °C inaktiviert.

### 2.2.10 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient dazu, DNA-Fragmente von 0,5 bis 25 kb Länge voneinander zu trennen und zu identifizieren. Dabei wurden Agarosegele in entsprechenden Konzentrationen von 0,5 bis 2,0 % eingesetzt.

Zunächst wurde die Agarose in TBE-Puffer (90 mM Tris-HCl; 90 mM Borsäure; 2 mM EDTA, pH 8,0; 0,5 µg/ml EtBr) unter Erwärmung gelöst und in eine Gelkammer mit Kämmen gegossen. Sobald die Agarose erstarrt war, wurde das Gel in eine mit TBE-Puffer befüllte Elektrophoresekammer (SubCell, Bio-Rad, München, Deutschland) eingesetzt. Die Proben wurden mit DNA-Probenpuffer (BlueJuice™ Gel Loading Buffer, Invitrogen) versetzt und in die Taschen des Agarosegels gegeben, ebenso wie ein entsprechender Größenstandard (GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder bzw. GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland). Die DNA wurde bei einer Spannung von 100 bis 200 V aufgetrennt. Unter UV-Licht (Kodak Image Station 440 CF, Kodak, Stuttgart, Deutschland) konnten DNA-Banden ab circa 20 ng im Gel identifiziert werden.

### 2.2.11 Transformation

Als Transformation wird bei Bakterien das Einbringen von DNA in kompetente Zellen bezeichnet. Bei der Hitzeschock-Transformation wird die DNA mit einer Zellsuspension aus chemisch kompetenten Bakterien gemischt und einem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt.

Für die Transformation wurden 50 µl kompetente Bakterienzellen (One Shot TOP10 Competent Cells, Invitrogen) mit 2 µl DNA gemischt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Transformationsansatz für 30 Sekunden in einem 42 °C-warmen Wasserbad einem Hitzeschock ausgesetzt. Nach 2 Minuten auf Eis wurden 250 µl SOC-Medium (2 % Trypton (Sigma); 0,5 % Hefeextrakt (Sigma); 10 mM NaCl (Merck, Darmstadt, Deutschland); 2,5 mM KCl (Merck); 10 mM MgCl<sub>2</sub> (Merck); 10 mM MgSO<sub>4</sub> (Merck); 20 mM Glucose (Merck)) zu den Bakterien gegeben und diese für maximal 1 h bei 37 °C und 180 rpm inkubiert (innova 4000, incubator shaker, New Brunswick Scientific, Nürting, Deutschland). Dann wurden Aliquots (50 µl, 100 µl und 150 µl) der Zellsuspension auf LB-Agarplatten (LB-Agar; Sigma) mit entsprechendem Antibiotikum (Ampicillin bzw. Kanamycinsulfat, Invitrogen) zur Selektion ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### 2.2.12 PCR-Screen

Für einen PCR-Screen wurden pro Transformationsansatz 24 Klone von entsprechenden LB-Agarplatten gepickt. Dabei wurde jeder Klon zunächst auf einer Masterplatte ausgestrichen und anschließend in ein Probengefäß für die PCR gegeben, in der ein Mix aus 15,9 µl



Wasser, 2 µl 10x Puffer, 0,6 µl MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 0,4 µl dNTPs (10 mM), 0,5 µl Vorwärts-Primer (10 µM, Primersequenz vgl. 2.2.3), 0,5 µl Rückwärts-Primer (10 µM, Primersequenz vgl. 2.2.3) und 0,1 µl Taq-Polymerase (5 U/µl) vorgelegt wurde. Die Thermocyclerbedingungen sind in Tabelle 2.6 angegeben.

**Tabelle 2.6.:** Thermocyclerbedingungen des PCR-Screens

Zeit	Temperatur	Zyklen
3 min.	94 °C	
45 sek.	94 °C	
30 sek.	67 °C	35
4 min. 30 sek.	72 °C	
10 min.	72 °C	
∞	4 °C	

### 2.2.13 Mini-Plasmidpräparation

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien in kleinem Maßstab wurde das QIAprep Miniprep-Kit von der Firma Qiagen verwendet. Das System setzt die modifizierte alkalische Lyse-Methode von Birnboim und Doly (1979) [96] ein. Nach Neutralisation des Lysates wurde dieses unter hohen Salzbedingungen an eine Silica-Membran gebunden. Durch verschiedene Waschschriffe wurden RNA und andere Verunreinigungen entfernt. Anschließend wurde die gereinigte Plasmid-DNA unter niedrigen Salzbedingungen von der Säule eluiert.

Für die Präparation der Plasmid-DNA wurden 3 ml LB-Medium (10 g/l Trypton (Sigma); 5 g/l Hefeextrakt (Sigma); 5 g/l NaCl (Merck)), dem ein entsprechendes Antibiotikum zur Selektion zugesetzt wurde, mit einer Einzelkolonie der Bakterien, die das gewünschte Plasmid enthielten, angeimpft. Die Kultur wurde über Nacht bei 37 °C und 180 rpm inkubiert (innova 4000, incubator shaker, New Brunswick Scientific). Am nächsten Tag erfolgte die Plasmid-Präparation nach Angaben des Herstellers. Die Konzentration der DNA-Lösung wurde über die Messung der optischen Dichte ermittelt (vgl. 2.2.8).

### 2.2.14 Maxi-Plasmidpräparation

Um Plasmid-DNA in großem Maßstab zu isolieren wurde das NucleoBond Xtra Maxi-Kit von der Firma Macherey-Nagel (Düren, Deutschland) verwendet. Dieses Kit nutzt eine silica-basierte Anionenaustauscher-Säule, um DNA von Proteinen, RNA und anderen Verunreinigungen zu trennen. Für die Präparation der Plasmid-DNA wurde zunächst eine Vorkultur (2 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum) mit einer Einzelkolonie

angeimpft und 3 h bei 37 °C und 180 rpm inkubiert (innova 4000, incubator shaker, New Brunswick Scientific). Mit dieser Vorkultur wurde dann die Hauptkultur (250-300 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum) angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 180 rpm kultiviert (innova 4000, incubator shaker, New Brunswick Scientific). Die Plasmidpräparation erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Konzentration der DNA-Lösung wurde über die Messung der optischen Dichte ermittelt (vgl. 2.2.8).

### 2.2.15 Einfrieren von Bakterienzellen

Um Bakterienklone langfristig zu lagern, wurden jeweils 1 ml Flüssigkultur mit 1 ml sterilem 20 %igem Glycerin (Merck) vermischt und bei -80 °C gelagert. Ausgehend von diesem Stock konnten neue Flüssigkulturen angeimpft werden.

### 2.2.16 Sequenzierung

Die Kontrollsequenzierungen der klonierten Konstrukte wurden von der Firma GATC (Konstanz, Deutschland) durchgeführt. Dazu wurden 30-70 ng/µl DNA in einem Endvolumen von 30 µl und entsprechende Sequenzierprimer (10 pmol/ml) verwendet, die in Tabelle 2.7 aufgeführt sind.

**Tabelle 2.7:** Verwendete Sequenzierprimer der Kontrollsequenzierung

Primer	Sequenz
ABCC2_Seq_rev	5'-AGGAGATGAAGAACAGGCAGG-3'
ABCC2_Seq_1	5'-TTCCTGTTCCACTTTCTTTGATG-3'
ABCC2_Seq_2	5'-TCGATACTCTGTGGCACTTTCC-3'
ABCC2_Seq_3	5'-CCTGGTTGATGAAGGCTCTGTT-3'
ABCC2_Seq_4	5'-GGTGATGGTGCTTGTAATCCC-3'
ABCC2_Seq_5	5'-CCTCCTTTACCTGGGAACATG-3'
ABCC2_Seq_6	5'-CCAATGGCCTGTTGAAAGG-3'
ABCC2_Seq_7	5'-AGCAATAGGATTGTTTTCGATATTC-3'
ABCC2_Seq_8	5'-TTTATGTGTCTACCTCCCGCC-3'
ABCC2_Seq_9	5'-ACCTGAGCTGGATCTGGTCC-3'
ABCC2_Seq_10	5'-CATCCAAAACGAGTTCGCC-3'

### 2.2.17 Mutagenese

Um Punktmutationen in das bestehende Vektorkonstrukt einzubringen, wurde das QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis-Kit von der Firma Stratagene verwendet. Bei

diesem Kit wurden jeweils zwei Oligonucleotid-Primer generiert, die die entsprechende Mutation tragen. Des Weiteren wurde als Template Vektor-DNA genutzt, die aus einem *E. coli*-Stamm isoliert wurde, der *dam*<sup>+</sup> war. Dies bedeutet, dass diese DNA methyliert vorlag. Die Template Vektor-DNA wurde dann zusammen mit den Primern in einer PCR-Reaktion eingesetzt, um Amplifikate zu erhalten, die die entsprechende Mutation tragen. Die PCR-Produkte wurden anschließend mit dem Enzym *Dpn* I behandelt, das spezifisch methylierte und hemimethylierte DNA schneidet. Dadurch wurde ausschließlich die Template-DNA geschnitten und nicht die mutagenisierten Amplifikate. Anschließend wurden die mutagenisierten Vektorkonstrukte in XL10-Gold kompetente Zellen (Stratagene) transformiert und nach Vermehrung der Zellen mittels Mini-Plasmidpräparation (vgl. 2.2.13) isoliert. Die Durchführung der Mutagenese erfolgte nach Angaben des Herstellers und die Primer wurden mit Hilfe des QuikChange<sup>®</sup> Primer Design-Programms (Stratagene) generiert. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind in Tabelle 2.8 aufgeführt.

**Tabelle 2.8:** Sequenzen der Mutageneseprimer

Primer	Sequenz
ABCC2_C24T_f	5'-ATATTAATAGAAGAGTCTTTGTTCCAGACGCAGTCCAGG-3'
ABCC2_C24T_r	5'-CCTGGACTGCGTCTGGAACAAAGACTCTTCTATTAATAT-3'
ABCC2_G1249A_f	5'-CCAGGAAGGAGTACACCATTGGAGAAACAGTGAACC-3'
ABCC2_G1249A_r	5'-GGTTCAGTGTCTTCTCCAATGGTGTACTCCTTCCTGG-3'
ABCC2_C3972T_f	5'-GAGGGATCACTTGTGACATTGGTAGCATGGAGAAGATTG-3'
ABCC2_C3972T_r	5'-CAATCTTCTCCATGCTACCAATGTCACAAGTGATCCCTC-3'

### 2.2.18 Umklonierung

Um ein Insert von einem Vektor in einen anderen umzuklonieren, wurde zunächst der Zielvektor mit entsprechenden Restriktionsendonukleasen geschnitten (vgl. 2.2.6) und dephosphoryliert (vgl. 2.2.7). Der Vektor, der das Insert trug, wurde ebenfalls mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen geschnitten (vgl. 2.2.6). Anschließend wurde der Verdau in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (vgl. 2.2.10). Um das Insert nach der Gelelektrophorese aus dem Gel aufzureinigen wurde das entsprechende DNA-Fragment unter UV-Licht aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten. Danach erfolgte die Aufreinigung der Insert-DNA mit dem QIAquick Gel Extraction-Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers. Anschließend wurde das Insert in den dephosphorylierten Vektor ligiert (vgl. 2.2.9).

## 2.3 Zellkulturen

### 2.3.1 Zelllinien und Zellkulturmedien

Die verwendeten Zelllinien (DSMZ, Braunschweig, Deutschland bzw. ATCC, Manassas, USA) und die entsprechenden Zellkulturmedien (PAA, Pasching, Deutschland) sind in Tabelle 2.9 zusammengefasst.

**Tabelle 2.9:** Zelllinien und Zellkulturmedien

Zelllinie	Zelltyp	Zellkulturmedium
A-498 (ACC 55, DSMZ)	humane Nierenkarzinomzellen	MEM (Minimal Essential Medium Eagle)
Caco-2 (ACC 169, DSMZ)	humane Kolonadenokarzinomzellen	MEM, versetzt mit nicht-essentiellen Aminosäuren
HEK293T/17 (CRL-11268, ATCC)	humane embryonale Nierenzellen	DMEM (Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium) mit 4,5 g/l Glucose
MDCK II (CCL-34, ATCC)	Hundenierenzellen	DMEM mit 1 g/l Glucose
SK-Hep 1 (ACC 141, DSMZ)	humane Leberadenokarzinomzellen	RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640

Die Zellkulturmedien wurden jeweils mit 1 % Penicillin (10.000 Units/ml) / Streptomycin (10 mg/ml) (PAA) und 10 % fötalem Kälberserum (FCS Gold, PAA), im Fall der SK-Hep 1- und Caco-2-Zellen mit 20% FCS, vervollständigt. Das FCS wurde vor dem Gebrauch für 45 Minuten bei 56 °C inkubiert, um Komplementfaktoren zu deaktivieren.

### 2.3.2 Zellkulturbedingungen

Die Zellen wurden in Kulturflaschen, Petrischalen oder Mehrlochplatten (Nunc, Langenselbold, Deutschland; Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) mit Zellkulturmedium bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Zellkulturinkubator (HERA cell, Thermo Fisher, Langenselbold, Deutschland) kultiviert. Das Medium wurde alle zwei bis drei Tage gewechselt.

### **2.3.3 Beschichtung mit Poly-D-Lysin**

Durch die Beschichtung mit Poly-D-Lysin wurde ein besseres Haften der Zellen auf dem Untergrund gewährleistet. Dies war zum Beispiel bei Immunfluoreszenzen oder Transportversuchen von Bedeutung. Zunächst wurde das Poly-D-Lysin (Sigma) mit sterilem Wasser auf 0,1 mg/ml verdünnt und auf der Oberfläche der Zellkulturplatte verteilt. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten, wurde die Zellkulturplatte dreimal mit Wasser gewaschen und unter der Sterilbank (HERA safe KS 12, Thermo Fisher) getrocknet.

### **2.3.4 Passagieren von Zellen**

Zunächst wurden die Zellen mit warmem PBS (Invitrogen) gewaschen, mit Accutase (PAA) überschichtet und bei 37°C inkubiert bis sich die Zellen vom Boden des Kulturgefäßes lösten. Die abgelösten Zellen wurden mit Medium versetzt und bei 1.000 x g 10 Minuten zentrifugiert. Nach Resuspension des Zellpellets in Medium wurde die Zellzahl mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer (Faktor 5000; Roth) bestimmt. Anschließend wurden eine definierte Anzahl an Zellen weiter kultiviert.

### **2.3.5 Einfrieren von Zellen**

Zum Einfrieren der Zellen wurden diese zunächst mit warmem PBS gewaschen und mit Accutase abgelöst (vgl. 2.3.4). Die Zellsuspension wurde bei 1.000 x g 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das Zellpellet wurde in eiskalter Einfrierlösung (95% FCS und 5% DMSO; Merck) resuspendiert und auf Kryoröhrchen (Nunc) aufgeteilt. Diese wurden im Cryo-1°C-Freezing-Container (Thermo Fisher) bei -80°C eingefroren. Die langfristige Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff.

### **2.3.6 Auftauen von Zellen**

Die im flüssigen Stickstoff gelagerten Zellen wurden zunächst für circa 30 Minuten bei -80 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen so schnell wie möglich im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und in eine Kulturflasche mit Zellkulturmedium überführt. Nach 24 h Kultivierung bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> erfolgte ein Mediumwechsel, um das DMSO, das in der Einfrierlösung enthalten war, zu entfernen.

### 2.3.7 Transiente Transfektion

Die transiente Transfektion von HEK293T/17-Zellen erfolgte mit FuGENE HD (Roche) und die Transfektion von MDCK II-Zellen mit Lipofectamine 2000 (Invitrogen) nach Angaben der Hersteller. Je nach weiterer Verwendung der transfizierten Zellen, wurden diese 24 bis 48 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

## 2.4 mRNA-Analysen

### 2.4.1 mRNA-Sekundärstrukturen

Zur Berechnung der mRNA-Sekundärstrukturen der ABCC2-Haplotypen H1, H2, H3, H9, H10 und H12, wurden die entsprechenden cDNA-Sequenzen ausgehend von der Accession number NM000392 (Stand 17.01.2007), in das Programm des Mfold-Webserver [97] geladen. Die Struktur mit der geringsten freien Energie wurde als die stabilste und wahrscheinlichste Variante angenommen.

### 2.4.2 Klonierung von Standards

Für die Untersuchung der mRNA-Degradation mit Hilfe der TaqMan-Technologie und der Methode der absoluten Quantifizierung wurden von den verwendeten Ziel-mRNAs Standards benötigt. In Tabelle 2.10 sind die klonierten Standards und die jeweils verwendeten Primer (Sigma) bzw. bei der Klonierung des 18S rRNA-Standards der verwendete TaqMan-Assay (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) aufgeführt.

**Tabelle 2.10:** Primer und TaqMan-Assay für die Klonierung von TaqMan-Standards

Standard	Primer	
ABCC2 -24C bzw. -24T	Vorwärts-Primer	5'-GATAATTCCTGTTCCACTTTCTTTG-3'
	Rückwärts-Primer	5'-CCAGGAATGAGGAATTCCAAAAAG-3'
18S rRNA	TaqMan Assay Hs99999901_s1	

Zunächst wurde der jeweilige Standard mittels PCR amplifiziert, wobei als Template für ABCC2 -24C bzw. ABCC2 -24T cDNA aus Zelllinien mit dem entsprechenden Genotyp genutzt wurde. Der Reaktionsansatz der PCR und die Thermocyclerbedingungen sind in den Tabelle 2.11 und 2.12 aufgeführt.

**Tabelle 2.11:** Reaktionsansatz der Klonierung von TaqMan-Standards

Komponente	Volumen ( $\mu$ l)
Wasser	15,6
Puffer (10x)	2,5
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1,25
dNTP-Mix (jeweils 25 mM)	2,5
Vorwärts-Primer (10 $\mu$ M)	0,5
Rückwärts-Primer (10 $\mu$ M)	0,5
Taq-Polymerase (5 U/ $\mu$ l)	0,15
cDNA	2
Endvolumen	25

**Tabelle 2.12:** Thermocyclerbedingungen der Klonierung von TaqMan-Standards

Zeit	Temperatur	Zyklen
4 min.	94 °C	
30 sek.	94 °C	
30 sek.	59 °C	50
30 sek.	72 °C	
7 min.	72 °C	
$\infty$	4 °C	

Das PCR-Produkt wurde mit Hilfe des QIAquick PCR Purification-Kits (Qiagen) aufgereinigt (vgl. 2.2.4) und die Konzentration photometrisch bestimmt (vgl. 2.2.8). Anschließend wurde das PCR-Produkt nach Angaben des Herstellers in den pDrive Cloning-Vektor (Qiagen) ligiert, der bereits in linearisierter Form vorlag. Der Ligationsansatz wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach Transformation des Vektors in kompetente Bakterienzellen (vgl. 2.2.11), konnte dieser durch das QIAprep Miniprep-Kit (Qiagen) isoliert werden (vgl. 2.2.13).

### 2.4.3 mRNA-Degradation

Die Degradation der ABCC2-mRNA in Abhängigkeit von -24C oder -24T wurde mittels allelspezifischer quantitativer Real-time-PCR (qRT-PCR) untersucht. Dazu wurden zunächst SK-Hep 1- (heterozygot -24C>T;  $2 \times 10^5$  Zellen/ml), A-498- (heterozygot -24C>T;  $0,5 \times 10^5$  Zellen/ml) und Caco-2-Zellen (homozygot -24C;  $2 \times 10^5$  Zellen/ml) in 6-well-Platten ausgesät und nach 24 h mit 5  $\mu$ g/ml Actinomycin D (gelöst in Methanol; Sigma) bzw. als Kontrolle mit Methanol (1:4.000) behandelt. Nach 0, 3, 6, 8, 24, 30 und 48 h wurde die RNA

isoliert (vgl. 2.2.1) und jeweils 400 ng RNA mit Hilfe des Transcriptor First Strand cDNA Synthesis-Kit (Roche) nach Angaben des Herstellers in cDNA umgeschrieben. Um die allel-spezifische mRNA-Expression zu messen, wurde die Methode der absoluten Quantifizierung mittels einer Standardkurve genutzt. Dabei wurde durch den Vergleich der erhaltenen  $C_T$ -Werte von Proben mit bekannter Startkopienzahl (Standards) die absolute Startkopienzahl der unbekannt Probe ermittelt. Für die Standardkurven wurden die klonierten Standards in einer Verdünnungsreihe von  $10^7$  bis  $10^3$  Kopien / 2  $\mu$ l eingesetzt. Da die allel-spezifische mRNA-Expression in einem Duplex-Lauf gemessen wurde, wurden für die entsprechende ABCC2-Standardkurve -24C- und -24T-Standards äquimolar gemischt und verdünnt. Außerdem wurde das Zielgen jeweils auf 18S rRNA als Referenzgen normalisiert. Die qRT-PCR wurde mit dem ABI Prism 7900 HT (TaqMan™, Applied Biosystems) durchgeführt. Für die PCR-Ansätze wurde für die Messung der 18S rRNA der TaqMan™ Universal Master Mix (Applied Biosystems) und für die Messung der ABCC2-mRNA der Genotyping Master Mix (Applied Biosystems) verwendet. Die Sequenzen der allel-spezifischen ABCC2-Sonden (Applied Biosystems) sind in Tabelle 2.13 aufgeführt und die Primer in Tabelle 2.10. Die PCR-Ansätze und das Thermocycler-Programm sind in den Tabellen 2.14, 2.15 und 2.16 angegeben.

**Tabelle 2.13:** Sequenz der allel-spezifischen ABCC2-Sonden

Sonde	Sequenz
ABCC2-Sonde -24C (VIC, 10 $\mu$ M)	5'-VIC-AAGAGTCTTCGTTCCAGA-MGB
ABCC2-Sonde -24T (FAM, 10 $\mu$ M)	5'-6FAM-AAGAGTCTTTGTTCCAGAC-MGB

**Tabelle 2.14:** Reaktionsansatz der qRT-PCR von 18S rRNA

Komponente	Volumen ( $\mu$ l)
TaqMan Universal Master Mix (2x)	12,5
TaqMan Assay Hs99999901_s1 (20x)	1,25
cDNA	2
Wasser	9,25
Endvolumen	25



**Tabelle 2.15:** Reaktionsansatz der allel-spezifische qRT-PCR der ABCC2-mRNA

Komponente	Volumen (µl)
TaqMan Genotyping Master Mix (2x)	15
Vorwärts-Primer (10 µM)*	2,7
Rückwärts-Primer (10 µM)*	2,7
ABCC2-Sonde -24C (VIC, 10 µM)	0,6
ABCC2-Sonde -24T (FAM, 10 µM)	0,6
cDNA	1
Wasser	7,4
Endvolumen	30

\*Primersequenz vgl. Tabelle 2.10

**Tabelle 2.16:** Thermocyclerbedingungen der qRT-PCR

Zeit	Temperatur	Zyklen
2 min.	50 °C	
10 min.	95 °C	
15 sek.	95 °C	
1 min.	60 °C	40

Die Halbwertszeiten der verschiedenen mRNA-Spezies wurden mit  $0,693/k$  berechnet, wobei  $k$  nach halb-logarithmischer Auftragung durch die Steigung  $x (-2,303)$  ermittelt wurde.

## 2.5 Proteinanalysen

### 2.5.1 Isolierung von Proteinen

Um Proteine aus Zellen zu isolieren, wurde das Qproteome Mammalian Protein Prep Kit (Qiagen) genutzt. Der Lysepuffer wurde zunächst mit Protease-Inhibitoren vervollständigt, um enzymatische Degradationen zu vermeiden. Die Zellen wurden dann mit PBS gewaschen und anschließend direkt im Lysepuffer vom Zellkulturboden gelöst. Nach einem Zentrifugationsschritt von 10 Minuten bei  $14.000 \times g$  und  $4 \text{ °C}$  befanden sich die Proteine im Überstand. Die Proteinfraction wurde bei  $-80 \text{ °C}$  gelagert.

### 2.5.2 Isolierung von Kernextrakt

Um Kernextrakte aus Zellen zu isolieren, wurden nacheinander zwei Lysepuffer verwendet. Lysepuffer A (10 mmol/l HEPES (Sigma), 0,2 mmol/l EDTA (Merck), 10 mmol/l KCl (Merck)) und Lysepuffer B (10 mmol/l HEPES (Sigma), 0,2 mmol/l EDTA (Merck), 0,4 mol/l NaCl (Merck)) wurden direkt vor dem Gebrauch mit jeweils 1 mM DTT, Protease- und Phosphatase-Inhibitoren (complete mini Protease-Inhibitor und PhosSTOP Phosphatase-Inhibitor, Roche) vervollständigt. Zunächst wurden die Zellen mit PBS gewaschen, auf Eis in 100  $\mu$ l Lysepuffer A vom Boden der Zellkulturplatte gelöst und 10 Sekunden stark gemischt. Nach einer Inkubation von 1 Stunde auf Eis und 5 Minuten bei 4 °C und 600 rpm, wurde das Lysat bei 4 °C und 1.300 x g 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand enthielt die cytosolische Proteinfraction. Das Pellet wurde in 50  $\mu$ l Lysepuffer B resuspendiert und 15 Minuten bei 4 °C und 600 rpm inkubiert. Anschließend wurde das Lysat 10 Minuten bei 14.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand enthielt die nukleäre Proteinfraction.

### 2.5.3 Bradford-Test

Zur Bestimmung der Konzentration einer Proteinlösung wurde die Methode nach Bradford [98] verwendet. Diese beruht auf der Bindung von Coomassie Brilliant Blue an Proteine. Durch die Bindung verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes (465 nm ohne Proteinbindung, 595 nm mit Bindung an das Protein). Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung.

Zunächst wurde eine Eichreihe mit verschiedenen BSA-Konzentrationen hergestellt und mit Färbelösung (Bio-Rad Protein Assay Farbstoff-Konzentrat, Bio-Rad) versetzt. Ebenso wurden Verdünnungen der Proteinlösung erstellt. Die Proben wurden bei 595 nm im Photometer vermessen. Anhand der durch die Eichreihe ermittelten Eichgeraden konnte die Konzentration der Proben bestimmt werden.

### 2.5.4 Protein-Gelelektrophorese

Die Protein-Gelelektrophorese dient der Analyse von Proteingemischen. Proteinproben (10  $\mu$ g Protein in 6,5  $\mu$ l Lysepuffer) wurden zunächst mit 2,5  $\mu$ l 4x LDS-Probenpuffer (Invitrogen) und 1  $\mu$ l 10x Reducing Agent (Invitrogen) versetzt. Als Größenstandard für die Elektrophorese wurde der Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder von Fermentas genutzt. Anschließend wurden die Proben auf ein 10 %iges Bis-Tris Gel (NuPAGE® Novex, Invitrogen) aufgetragen und bei 150-175 V im elektrischen Feld der Größe nach aufgetrennt. Für die Elektrophorese wurde das XCell Sure Lock Mini-Cell System von Invitrogen genutzt.

Erreichte der LDS-Probenpuffer den unteren Rand des Gels, wurde die Elektrophorese beendet und das Gel konnte im Western Blot (vgl. 2.5.5) weiter bearbeitet werden.

### 2.5.5 Western Blot

Beim Western Blot wurden die Proteine, die zuvor in der Protein-Gelelektrophorese aufgetrennt wurden (vgl. 2.5.4), auf eine PVDF (Polyvinylidendifluorid)-Membran (0,45 µm; Millipore, Schwalbach, Deutschland) übertragen und anschließend immunmarkiert.

Nach Aufbau des Blot-Sandwiches wurde dieser in die Tankblot-Apparatur (Bio-Rad) eingesetzt, so dass sich der Pluspol auf der Seite der Membran und der Minuspol auf der Seite des Gels befanden (Blotpuffer: 25 mM Tris (Roth); 192 mM Glycin (Sigma); 20 % (v/v) Methanol (J.T. Baker, Griesheim, Deutschland)). Der Transfer verlief 90-120 Minuten bei 100 V. Nach Beendigung des Transfers wurde die Membran entnommen und zunächst 5-10 Minuten in TBS-T (0,08 % (w/v) NaCl (Merck); 0,002 % KCl (Merck); 5 mM Tris-HCl (Sigma), pH 7,4; 0,1% (w/v) Tween20 (Roth)) gewaschen. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen auf der PVDF-Membran, wurde diese 1 h bei Raumtemperatur unter Schwenken in 5 % Milchpulver (Roth) in TBS-T (Blockierungslösung) inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit dem primären Antikörper (vgl. Tabelle 2.17) in Blockierungslösung über Nacht bei 4° C unter Schwenken inkubiert. Nach Waschen der Membran mit TBS-T (dreimal 10 Minuten) wurde der peroxidase-konjugierte sekundäre Antikörper (vgl. Tabelle 2.18) in Blockierungslösung für 1 h unter Schwenken bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membran wurde wiederum dreimal 10 Minuten mit TBS-T gewaschen. Anschließend wurde durch Zugabe der Substratlösung (ECL<sup>TM</sup> Western Blotting Detection Reagents; Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) die Detektion des gebundenen peroxidase-konjugierten sekundären Antikörpers ermöglicht. Es handelte sich dabei um eine durch die Substratlösung katalysierte Reaktion mit dem an den Antikörper gekoppelten Enzym. Durch die Oxidation des Chemilumineszenz-Substrates kam es zu einer Lichtemission, die auf einem Röntgenfilm (Hyperfilm ECL, Amersham) erfasst werden konnte. Nach verschiedenen Inkubationszeiten des Röntgenfilms auf der Membran wurde dieser mit Hilfe der Curix 60 (Agfa, Köln, Deutschland) entwickelt. Die densitometrische Auswertung der Blots erfolgte mit Hilfe der Quantity One 1-D Analysis-Software 4.6.3 von Bio-Rad.

**Tabelle 2.17:** Verwendete primäre Antikörper im Western Blot

<b>Antikörper</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Verdünnung</b>
MRP2 (M <sub>2</sub> III-6)	Monoklonaler IgG2a-Antikörper aus der Maus (Axxora, Lörrach, Deutschland)	1:500
Flag	Monoklonaler IgG1-Antikörper aus der Maus; bindet an Flag-Epitope (DYKDDDDK) (Anti-Flag M2; Sigma)	1:1.000
DsRed	Polyklonaler Antikörper aus Kaninchen (Living Colors, Clontech)	1:1.000
ZsGreen 1	Polyklonaler Antikörper aus Kaninchen (Living Colors, Clontech)	1:1.000
β-Aktin	Monoklonaler IgG1-Antikörper aus der Maus (Anti-β-actin, Clone AC-15, Sigma)	1:10.000

**Tabelle 2.18:** Verwendete sekundäre Antikörper im Western Blot

<b>Antikörper</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Verdünnung</b>
Anti-Maus	Peroxidase-konjugierter IgG-Antikörper aus Kaninchen (rabbit-anti-mouse; Sigma)	1:10.000
Anti-Kaninchen	Peroxidase-konjugierter IgG-Antikörper aus der Ziege (goat-anti-rabbit; Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland)	1:10.000

### 2.5.6 Electromobility Shift Assay (EMSA)

Um die Bindung von Kernproteinen an die DNA zu untersuchen wurden EMSAs durchgeführt. Dabei wandern DNA-Fragmente, an die Proteine gebunden sind, langsamer durch ein Polyacrylamidgel, als freie DNA-Fragmente. Zum Nachweis der DNA-Protein-Komplexe wurden die DNA-Fragmente (Sonden) radioaktiv markiert. Die EMSAs wurden im Rahmen der medizinischen Doktorarbeit von Alexander Rühmkorf durchgeführt.

**Tabelle 2.19:** Verwendete DNA-Sonden im EMSA

Sonde	Sequenz
-24C	5'-ATA TTA ATA GAA GAG TCT TCG TTC CAG ACG CAG TCC AGG AA-3' 3'-TAT AAT TAT CTT CTC AGA AGC AAG GTC TGC GTC AGG TCC TT-5'
-24T	5'-ATA TTA ATA GAA GAG TCT TTG TTC CAG ACG CAG TCC AGG AA-3' 3'-TAT AAT TAT CTT CTC AGA AAC AAG GTC TGC GTC AGG TCC TT-5'

Zunächst wurden Primer generiert, die dem zu untersuchenden DNA-Fragment entsprachen (Tabelle 2.19). Die lyophilisierten Primer (TIB MOLBIOL, Berlin, Deutschland) wurden in Annealingpuffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,0 (Sigma); 50 mM NaCl (Merck), 1 mM EDTA (Merck)) gelöst und äquimolar gemischt. Zum Annealen der Primer wurde die Primermischung in einen 94 °C-warmen Thermoblock gestellt, der direkt danach ausgeschaltet wurde. Im Thermoblock wurde die Primermischung bis zum Erreichen der Raumtemperatur inkubiert, wobei es zur Ausbildung von doppelsträngigen DNA-Sonden kam. Um die Sonden radioaktiv zu markieren, wurden die T4-Polynukleotid-Kinase und der entsprechende Puffer aus dem Gel Shift Assay System von Promega genutzt. Zusammen mit 2 µl DNA-Sonde (100 ng/µl) und [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP (10 mCi/ml; Amersham) wurden 2 µl Kinase Puffer (10x) und 1 µl T4-Polynukleotid-Kinase (10 U/µl) mit Wasser auf 20 µl Endvolumen aufgefüllt. Der Reaktionsansatz wurde für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Für die spätere Messung der Einbaurrate wurde 1 µl des Ansatzes in ein Szintillationsröhrchen überführt. Dann wurde der Reaktionsansatz mit Hilfe der MicroSpin™ G-25 Säulen (Amersham) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt, um die markierten DNA-Sonden von nicht eingebautem [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP zu trennen. Nach der Aufreinigung wurde wiederum für die Messung der Einbaurrate 1 µl des Eluats in ein Szintillationsröhrchen überführt. Durch Messung der Zerfallsraten im Szintillationsmesser (Liquid Scintillation Counter WALLAC 1409, PerkinElmer Wallac, Freiburg, Deutschland) vor und nach der Aufreinigung, konnte die Effizienz der Markierung bestimmt werden, wobei die Einbaurrate zwischen 20 und 30 % liegen sollte. Um die Spezifität möglicher DNA-Protein-Bindungen nachzuweisen, wurden parallel Konkurrenzexperimente durchgeführt, bei denen unmarkierte DNA-Sonden als spezifische Konkurrenten eingesetzt wurden. Die verschiedenen Reaktionsansätze sind in Tabelle 2.20 aufgeführt.

**Tabelle 2.20:** Reaktionsansatz für den EMSA

Komponente	Reaktionsansätze (µl)		
	Negativ	Kompetition	
	Kontrolle		
Wasser	6	5	4
5x Gel Shift Binding-Puffer	2	2	2
Poly(dI-dC)·(dI-dC) (500 ng/µl)	1	1	1
Kernextrakt (1 µg/µl)	---	1	1
unmarkierte DNA-Sonde (100 bzw. 200 ng/µl)	---	---	1
DNA-Sonde (20.000 cpm)	1	1	1
Endvolumen	10	10	10

Die Reaktionsansätze wurden für 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Für die Elektrophorese wurde ein 4 %iges Polyacrylamidgel (3 ml 5 x TBE; 1,13 ml Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1; Sigma); 1,88 ml Acrylamid (40 %; Sigma); 938 µl Glycerin (80 %; v/v; Sigma); 24,4 ml Wasser; 300 µl APS (10 %; Sigma); 25 µl TEMED (Sigma)) in die Elektrophoresekammer (Multigel-Long, Biometra, Göttingen, Deutschland) eingespannt. Nachdem das Gel in 0,5 x TBE Puffer für 30 Minuten bei 250 V vorgelaufen war, wurden die Reaktionsansätze auf das Gel aufgetragen. Bei 170 V wurden die Proben 45 Minuten elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde ein Röntgenfilm (BioMax, Kodak, Stuttgart, Deutschland) auf das Gel gelegt, bei -70 °C für 36 h inkubiert und dann entwickelt (Curix 60, Agfa). Die densitometrische Auswertung der Autoradiogramme erfolgte mit Hilfe der Quantity One 1-D Analysis-Software 4.6.3 von Bio-Rad.

### 2.5.7 Immunfluoreszenz

Um die Integration des klonierten ABCC2-Vektorkonstruktes in die Membran von HEK293T/17-Zellen zu kontrollieren, wurden Immunfluoreszenzen durchgeführt. Dazu wurden zunächst Objektträger (Lab-Tek™ II Chamber Slide™ System, Nunc) mit Poly-D-Lysin beschichtet (vgl. 2.3.3) und HEK293T/17-Zellen mit einer Konzentration von  $1,5 \times 10^4$  Zellen/ml ausgesät. Nach 24 h unter Kulturbedingungen wurden die Zellen mit dem Vektorkonstrukt transfiziert (vgl. 2.3.7) und für 48 h unter Kulturbedingungen inkubiert. Zur Fixierung der Zellen wurde direkt in das Medium 1:1 4 % PFA (Paraformaldehyd) gegeben. Nach 3 Minuten wurde das Medium mit PFA entfernt. Die Zellen wurden weitere 8 Minuten mit 4 % PFA inkubiert und anschließend dreimal 3 Minuten mit PBS gewaschen. Zur Permeabilisierung der Zellen wurde eiskaltes Methanol auf die Zellen getropft und 3 Minuten

inkubiert. Anschließend wurden die Zellen jeweils 3 Minuten einmal mit 0,5 % PBT (PBS + 0,5 % Triton-X-100) und zweimal mit 0,1 % PBT (PBS + 0,1 % Triton-X-100) inkubiert. Der Blockierungsschritt erfolgte für 60 Minuten in PBT mit 5 % FCS. Der erste Antikörper (Anti-Flag M2; Sigma) wurde 1:100 in Antikörperpuffer (2 % FCS und 1 % BSA in PBT) verdünnt und über Nacht bei 4 °C mit den Zellen inkubiert. Nach drei Waschschritten von 5 Minuten mit PBT wurde der zweite Antikörper (Alexa Fluor 568 goat-anti-mouse IgG, Molecular Probes, Invitrogen) 1:400 verdünnt in Antikörperpuffer für 1 h bei Raumtemperatur im Dunkeln mit den Zellen inkubiert. Nach drei Waschschritten von 5 Minuten mit PBT wurden die Zellen mit Medium, das bereits DAPI für die Kernfärbung enthielt (Immunoselect Antifading Mounting Medium DAPI, Dianova, Hamburg, Deutschland), eingedeckelt (Deckgläser, Walter CMP, Kiel, Deutschland). Die Dokumentation der Immunfluoreszenzen erfolgte mit Hilfe des Zeiss Axio Imager Z1 und dem AxioVision-Programm v4.5 der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Ulrich Kunzendorf (Klinik für Nieren- und Hochdruckkrankheiten des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel).

## 2.6 Transport-Assay

Um die Transportaktivität von ABCC2 zu untersuchen, wurde der CMFDA-Assay verwendet. CMFDA (5-chloromethylfluorescein-diacetate; CellTracker™ Green CMFDA, Invitrogen) ist nicht fluoreszierend und in der Lage die Zellmembran zu überwinden. Intrazellulär wird CMFDA zu Glutathion-Methylfluorescein metabolisiert (Abbildung 3.12), welches ein fluoreszierendes Substrat von ABCC2 ist.

Für die Messung der Transportrate wurden die Zellen zunächst mit HBSS (Hanks` Balanced Salt Solution)-Puffer, der mit 10 mM HEPES, pH 7.5 vervollständigt wurde, gewaschen. Anschließend wurden 2,5 µM CMFDA in HBSS-Puffer zu den Zellen gegeben und unter Kulturbedingungen 15 bis 90 Minuten inkubiert. Die Messung der Fluoreszenz von Glutathion-Methylfluorescein erfolgte entweder im Überstand oder intrazellulär. Bei der Fluoreszenzmessung des Überstandes, wurde dieser in eine schwarze 96-well-Platte (Nunc) aliquotiert. Bei der intrazellulären Fluoreszenzmessung wurden die Zellen direkt in einer schwarzen Kulturplatte ausgesät und vor der Messung dreimal mit HBSS-Puffer gewaschen. Die Fluoreszenzmessung erfolgte mit Hilfe des Fluoroskan Ascent (Filterpaar: 485 nm / 518 nm; Thermo Fisher).

Für die Untersuchung der Transportrate verschiedener Haplotypen, wurden HEK293T/17- und MDCK II-Zellen 48 h vor dem Transport-Assay transient mit den entsprechenden Vektorkonstrukten transfiziert (vgl. 2.3.7). Nach der Fluoreszenzmessung im Überstand, wurden direkt im Anschluss die Proteine isoliert (vgl. 2.5.1) und mittels Western Blot (vgl. 2.5.5) die Proteinexpression bestimmt, um die Transportrate auf die jeweilige Proteinexpression zu beziehen.

Um den Einfluss verschiedener Substanzen auf die Transportrate zu untersuchen, wurden diese gemeinsam mit 2,5  $\mu\text{M}$  CMFDA in HBSS-Puffer zu den Zellen gegeben. Nach einer Inkubation von 30 bis 90 Minuten wurde die Fluoreszenz von Glutathion-Methylfluorescein gemessen. Untersucht wurden Ezetimib, Ezetimib-Glukuronid, Primovist und Talinolol (diese wurden von Prof. Dr. med. Werner Siegmund, Abteilung für Klinische Pharmakologie des Instituts für Pharmakologie der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald zur Verfügung gestellt) und Probenecid und Verapamil, die von Sigma bezogen wurden (vgl. Tabelle 2.21).

**Tabelle 2.21:** Verwendete Substanzen im Transport-Assay

<b>Substanz</b>	<b>Konzentration (<math>\mu\text{M}</math>)</b>
Ezetimib	50
Ezetimib-Glukuronid	50
Primovist	100-125
Probenecid	1-100
Talinolol	50
Verapamil	10-20

## 2.7 Pharmakokinetik von Talinolol

Bezüglich der in dieser Arbeit untersuchten ABCC2-Haplotypen, wurde eine pharmakokinetische Studie mit Talinolol [48] erneut analysiert. Dabei wurden die Bioverfügbarkeit und die  $\text{AUC}_{\text{oral}}$  von 24 gesunden Probanden kaukasischer Herkunft (15 männlich, 9 weiblich; Alter 19 bis 35; Körpergewicht 49 bis 99 kg), die die untersuchten ABCC2-Haplotypen aufwiesen, untersucht. Die Probanden erhielten intravenös 30 mg und oral 100 mg Talinolol (Cordanum; Arzneimittelwerk Dresden, Dresden, Deutschland). Die klinische Studie wurde unter der Leitung von Prof. Dr. med. Werner Siegmund in der



---

Abteilung für Klinische Pharmakologie des Instituts für Pharmakologie der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald durchgeführt.

## 2.8 Statistische Analysen

Bei allen aufgeführten Einzelergebnissen wurden mindestens drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt. Die Berechnungen und die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Software-Programm SPSS 17.0. Als statistische Tests wurden der Mann-Whitney-U-Test und der Kruskal-Wallis-Test verwendet. Die Daten wurden als Mittelwerte bzw. Mediane  $\pm$  Standardfehler angegeben und Ergebnisse mit einem  $p \leq 0,05$  wurden als statistisch signifikant gewertet.

Die Konfidenzintervalle wurden mit dem Clinical Trials Design-Programm Version 1.0 und die  $\chi^2$ -Werte wurden mit dem Programm Statcalc Version 6 berechnet.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Genotypisierung der ABCC2-Polymorphismen -24C>T, 1249G>A und 3972C>T und Bestimmung der ABCC2-Haplotypen und -Diploypen

##### 3.1.1 Genotypisierung, Haplotypen- und Diploypenbestimmung von gesunden, kaukasischen Probanden

Es wurden 335 gesunde, kaukasische Probanden im Hinblick auf die ABCC2-Polymorphismen -24C>T, 1249G>A und 3972C>T genotypisiert. Tabelle 3.1 zeigt die Allel- und Genotypfrequenzen der ABCC2-SNPs in dem Probandenkollektiv. Alle ermittelten Genotypfrequenzen befanden sich im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.

**Tabelle 3.1:** Allel- und Genotypfrequenzen der 335 gesunden, kaukasischen Probanden

ABCC2-SNP	Allel	Allel-frequenz (%)	95%-Konfidenzintervall (%)	Genotyp	Genotyp-frequenz (%)	95%-Konfidenzintervall (%)
-24C>T	C	82,5	79,5 - 85,3	CC	67,5	62,2 - 72,5
	T	17,5	14,7 - 20,6	CT	30,1	25,3 - 35,4
				TT	2,4	1,0 - 4,7
1249G>A	G	76,9	73,5 - 80,0	GG	59,1	53,6 - 64,4
	A	23,1	20,0 - 26,5	GA	35,5	30,4 - 40,9
				AA	5,4	3,2 - 8,4
3972C>T	C	67,0	63,3 - 70,1	CC	44,5	39,1 - 50,0
	T	33,0	29,4 - 36,7	CT	45,1	39,7 - 50,6
				TT	10,4	7,4 - 14,2

Mit Hilfe des PHASE Version 2.0 Programms war es möglich, die ABCC2-Haplotypen im Probandenkollektiv, die durch die Polymorphismen -24C>T, 1249G>A und 3972C>T gebildet wurden, zu bestimmen. Es konnten sechs ABCC2-Haplotypen ermittelt werden: H1, H2, H3, H9, H10 und H12. Die Nomenklatur der Haplotypen erfolgte nach Haenisch et al. 2008 [48]. In Tabelle 3.2 sind die in dem Probandenkollektiv identifizierten ABCC2-Haplotypen und ihre Frequenzen mit 95%-Konfidenzintervallen angegeben.

Die Haplotypen H1 (44,6 %) und H2 (21,6 %) kamen am häufigsten vor, gefolgt von den Haplotypen H12 mit einer Frequenz von 16,7 % und H9 mit 14,8 %. Die Haplotypen H3 und H10 wurden in diesem Probandenkollektiv nur mit Haplotypfrequenzen von 1,5 % und 0,7 % ermittelt.

**Tabelle 3.2:** ABCC2-Haplotypfrequenzen der 335 gesunden, kaukasischen Probanden. Die varianten Allele sind hervorgehoben.

Haplotyp	-24C>T	1249G>A	3972C>T	Frequenz (%)	95%-Konfidenzintervall (%)
H1	C	G	C	44,6	40,5 - 48,2
H2	C	<b>A</b>	C	21,6	19,0 - 25,4
H3	C	<b>A</b>	<b>T</b>	1,5	0,4 - 2,1
H9	C	G	<b>T</b>	14,8	12,5 - 18,1
H10	<b>T</b>	G	C	0,7	0,2 - 1,5
H12	<b>T</b>	G	<b>T</b>	16,7	14,1 - 19,9

Die sechs ABCC2-Haplotypen bildeten 15 Diplotypen. Dabei war der Diplotyp H1/H2 mit einer Frequenz von 22,1 % am häufigsten vertreten, gefolgt von H1/H12 (17,6 %), dem Wildtyp H1/H1 (17,3 %) sowie H1/H9 (13,4 %).

Die Diplotypen H1/H3, H2/H10, H3/H3, H3/H10, H9/H10 und H10/H10 kamen in diesem Probandenkollektiv nicht vor. Tabelle 3.3 zeigt die ABCC2-Diplotypen und ihre Frequenzen mit 95%-Konfidenzintervallen.

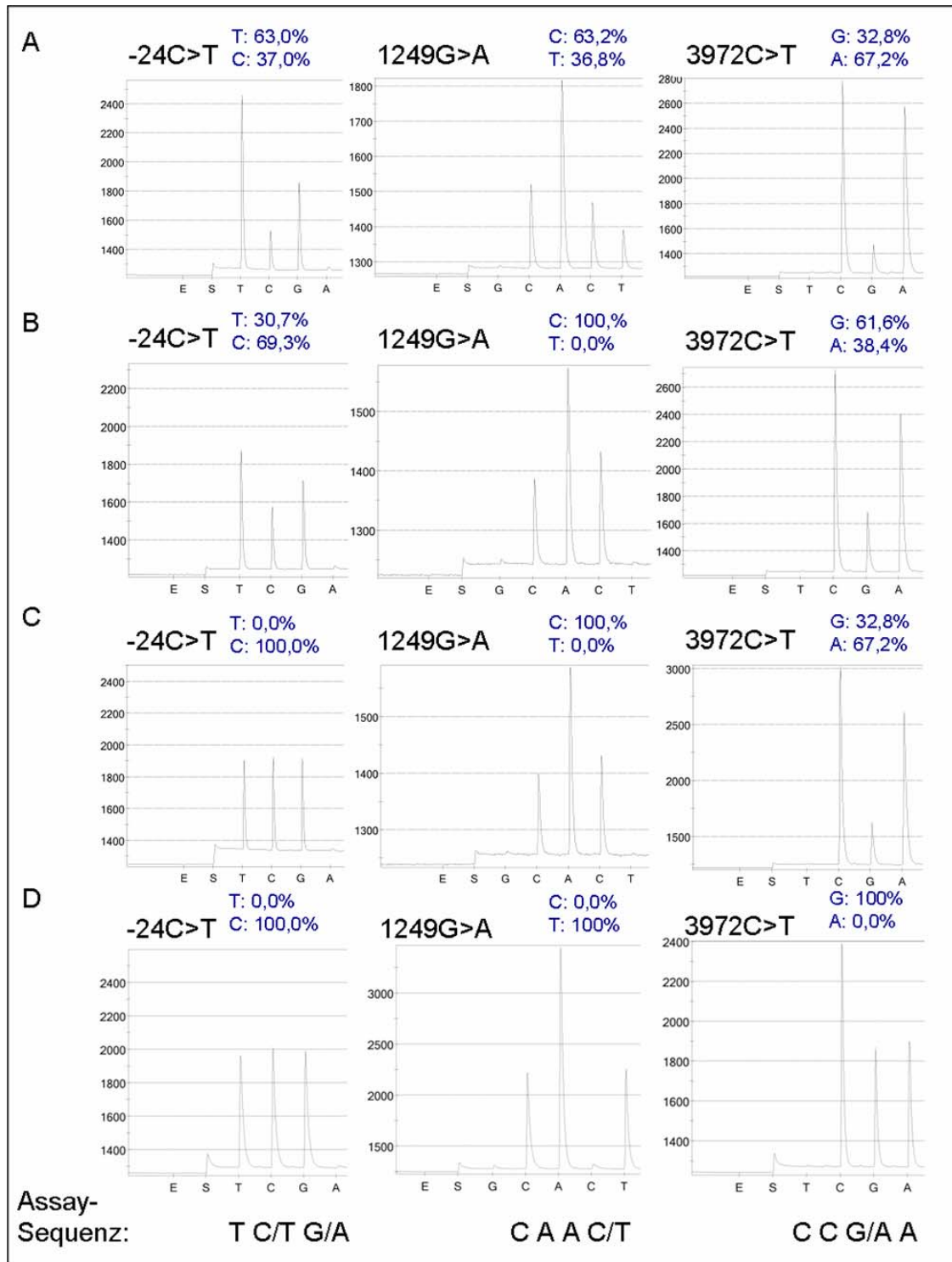
**Tabelle 3.3:** ABCC2-Diplotypfrequenzen der 335 gesunden, kaukasischen Probanden. Die homozygoten Diplotypen sind hervorgehoben.

<b>Diplotyp</b>	<b>Frequenz (%)</b>	<b>95%-Konfidenzintervall (%)</b>
<b>H1/H1</b>	<b>17,3</b>	<b>13,4 - 21,8</b>
H1/H2	22,1	17,8 - 26,9
H1/H9	13,4	10,0 - 17,6
H1/H10	0,9	0,2 - 2,6
H1/H12	17,6	13,7 - 22,1
<b>H2/H2</b>	<b>4,2</b>	<b>2,3 - 6,9</b>
H2/H3	1,2	0,3 - 3,0
H2/H9	5,7	3,5 - 8,7
H2/H12	6,9	4,4 - 10,1
<b>H9/H9</b>	<b>3,0</b>	<b>1,4 - 5,4</b>
H9/H3	0,6	0,1 - 2,1
H9/H12	4,5	2,5 - 7,3
<b>H12/H12</b>	<b>2,1</b>	<b>0,8 - 4,3</b>
H12/H3	0,3	0,01 - 1,7
H12/H10	0,3	0,01 - 1,7

### 3.1.2 Genotypisierung, Haplotypen- und Diplotypenbestimmung von Zelllinien

Die Zelllinien SK-Hep 1 (humane Leberadenokarzinomzellen), A-498 (humane Nierenkarzinomzellen), Caco-2 (humane Kolonadenokarzinomzellen) und HEK293T/17 (humane embryonale Nierenzellen) wurden bezüglich der ABCC2-Polymorphismen -24C>T, 1249G>A und 3972C>T genotypisiert. In Abbildung 3.1 sind die resultierenden Pyrogramme der Genotypisierung der SK-Hep 1-, A-498-, Caco-2- und HEK293T/17-Zellen mit Hilfe der PSQ-Technologie dargestellt.

Anschließend wurden mit dem PHASE Version 2.0 Programm die ABCC2-Haplotypen und -Diplotypen der Zelllinien bestimmt. In Tabelle 3.4 sind die ABCC2-Genotypen und -Diplotypen der Zelllinien aufgeführt.



**Abbildung 3.1:** Pyrogramme nach der Genotypisierung der Zelllinien mit der PSQ-Technologie. (A) SK-Hep 1-Zellen (B) A-498-Zellen (C) Caco-2-Zellen und (D) HEK293T/17-Zellen. Aufgrund des reversen Sequenzierprimers sind für die Polymorphismen 1249G>A und 3972C>T die jeweils komplementären Basen angegeben. Unterhalb der Pyrogramme ist die zu analysierende Sequenz der jeweiligen Assays (-24C>T, 1249G>A und 3972C>T) angegeben.

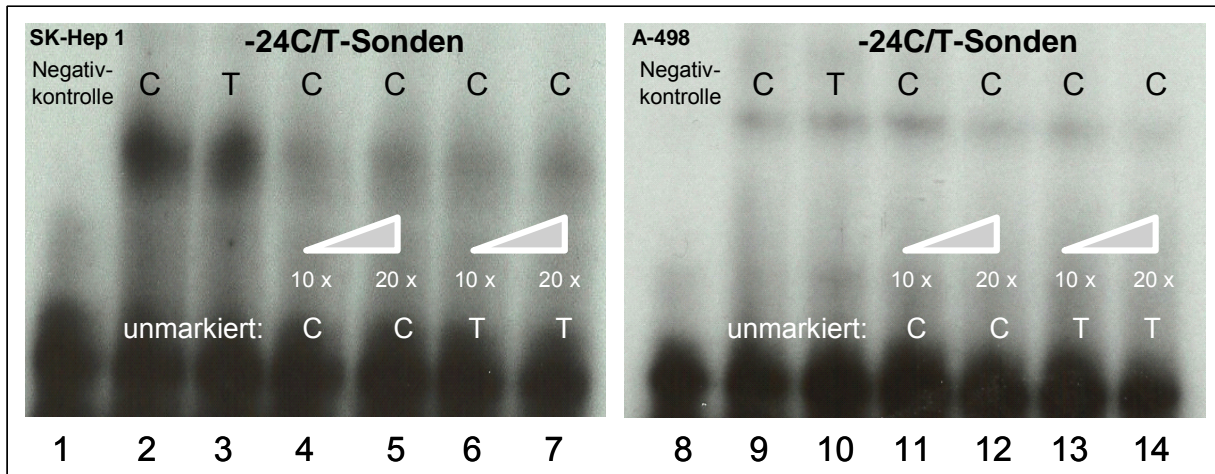
**Tabelle 3.4:** Ermittelte ABCC2-Genotypen und -Diplotypen der verwendeten Zelllinien

Zelllinie	-24C>T	1249G>A	3972C>T	Diplotyp
SK-Hep 1	CT	GA	CT	H2/H12
A-498	CT	GG	CT	H1/H12
Caco-2	CC	GG	CT	H1/H9
HEK293T/17	CC	AA	CC	H2/H2

### 3.2 Einfluss des ABCC2 -24C>T-Polymorphismus auf DNA-Protein-Interaktionen in der 5'-UTR des ABCC2-Gens

Um den Einfluss des ABCC2 -24C>T-Polymorphismus auf DNA-Protein-Interaktionen in der 5'-UTR des ABCC2-Gens zu untersuchen, wurden EMSAs (Electromobility Shift Assays) durchgeführt. Die für die EMSAs generierten radioaktiv-markierten DNA-Sonden repräsentierten 41 bp der 5'-UTR von ABCC2 ausgehend von -43 bis -3, wobei sich an der Position -24 entweder ein Cytosin oder ein Thymin befand. Diese DNA-Sonden wurden zum einen mit Kernextrakt aus der humanen Leberadenokarzinomzelllinie SK-Hep 1 und zum anderen mit Kernextrakt aus der humanen Nierenkarzinomzelllinie A-498 inkubiert.

Im resultierenden Autoradiogramm (Abbildung 3.2) zeigte sich unabhängig vom ABCC2 -24C>T-Polymorphismus sowohl bei der Inkubation der DNA-Sonden mit Kernextrakt aus SK-Hep 1-Zellen (Bahn 1-7) als auch aus A-498-Zellen (Bahn 8-14) eine DNA-Protein-Bindung. Die Konkurrenzexperimente (SK-Hep 1: Bahn 4-7; A-498: Bahn 11-14) zeigten, dass es sich bei den beobachteten DNA-Protein-Bindungen um spezifische Bindungen an die DNA-Sonden handelte, da durch ansteigende Konzentrationen an unmarkierter C-Sonde, die Bindung an die markierte C-Sonde schwächer wurde (SK-Hep 1: Bahn 2, 4 + 5; A-498: Bahn 9, 11 + 12). Bei dem Kernextrakt aus den A-498-Zellen (Bahn 11 - 14) zeigte sich im Konkurrenzexperiment nach densitometrischer Auswertung eine um etwa 10% stärkere Bindung an die unmarkierte T-Sonde, was zu einer schwächeren Bindung an die radioaktiv-markierte C-Sonde und somit zu schwächeren Banden im Autoradiogramm führte. Diese bei dem Kernextrakt aus A-498-Zellen beobachtete etwas stärkere Bindung an die T-Sonde konnte bei dem Kernextrakt aus den SK-Hep 1-Zellen nicht gezeigt werden. Hier war kein Unterschied in der DNA-Protein-Bindung abhängig vom -24C>T-Polymorphismus zu beobachten. Möglicherweise handelte es sich daher um einen gewebeabhängigen Einfluss von ABCC2 -24C>T auf die DNA-Protein-Interaktionen in der 5'-UTR von ABCC2.

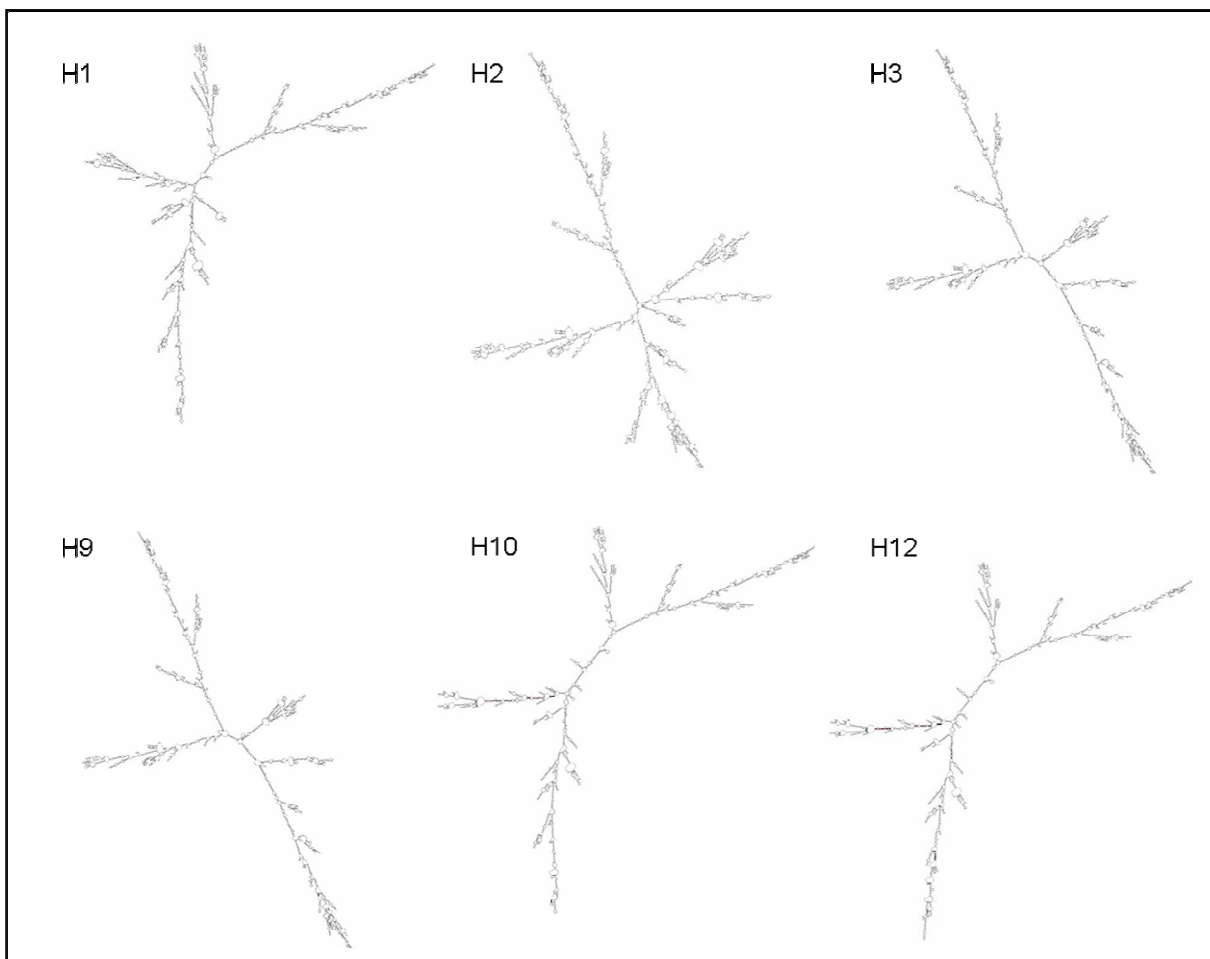


**Abbildung 3.2:** Autoradiogramme von Electromobility Shift Assays (EMSAs) mit  $^{32}\text{P}$ -markierten ABCC2 -24C- oder -24T-Sonden und Kernextrakt aus der humanen Leberadenokarzinomzelllinie SK-Hep 1 (Bahn 1-7) und der humanen Nierenkarzinomzelllinie A-498 (Bahn 8-14). Die Bahnen 4-7 (SK-Hep 1-Kernextrakt) und die Bahnen 11-14 (A-498-Kernextrakt) zeigen die Konkurrenzexperimente mit 100 ng (10 x) und 200 ng (20 x) unmarkierter -24C- bzw. -24T-Sonde.

### 3.3 Einfluss von Haplotypen auf die ABCC2-mRNA

#### 3.3.1 Einfluss von ABCC2-Haplotypen auf die mRNA-Sekundärstrukturen und die mRNA-Stabilitäten

Um zu untersuchen, ob es aufgrund der ABCC2-Haplotypen H2, H3, H9, H10 und H12 zu Veränderungen in der jeweiligen mRNA-Sekundärstruktur im Vergleich zum Wildtyp (Haplotyp H1) kommt und somit zu veränderten mRNA-Stabilitäten, wurden die mRNA-Sekundärstrukturen mit Hilfe des Mfold-Webservers [97] berechnet. Abbildung 3.3 zeigt die mRNA-Sekundärstrukturen der ABCC2-Haplotypen H1, H2, H3, H9, H10 und H12 und Tabelle 3.5 die Enthalpien der mRNA-Sekundärstrukturen der jeweiligen Haplotypen bei 37 °C. Die mRNA-Sekundärstrukturen der ABCC2-Haplotypen H10 und H12 und der Haplotypen H3 und H9 zeigten jeweils untereinander die größten strukturellen Ähnlichkeiten. Die ABCC2-Haplotypen H10 und H12 wiesen zudem die größten Gemeinsamkeiten mit dem Wildtyp (Haplotyp H1) auf. Die Haplotypen H2, H3 und H9 zeigten strukturell kaum Ähnlichkeiten zum Wildtyp (Abbildung 3.3). In Bezug auf die mRNA-Stabilitäten wies der Wildtyp (Haplotyp H1) die höchste Enthalpie und der Haplotyp H12 die geringste Enthalpie auf (Tabelle 3.5).



**Abbildung 3.3:** mRNA-Sekundärstrukturen der ABCC2-Haplotypen H1 (Wildtyp; -24C/1249G/3972C), H2 (-24C/1249A/3972C), H3 (-24C/1249A/3972T), H9 (-24C/1249G/3972T), H10 (-24T/1249G/3972C) und H12 (-24T/1249G/3972T), die mit Hilfe des Mfold-Webservers berechnet wurden.

**Tabelle 3.5:** Enthalpien der mRNA-Sekundärstrukturen der untersuchten ABCC2-Haplotypen bei 37 °C.

ABCC2-Haplotyp	Enthalpie (KJ / mol)
H1 (Wildtyp)	-5939
H2	-5958
H3	-5971
H9	-5962
H10	-6008
H12	-6033

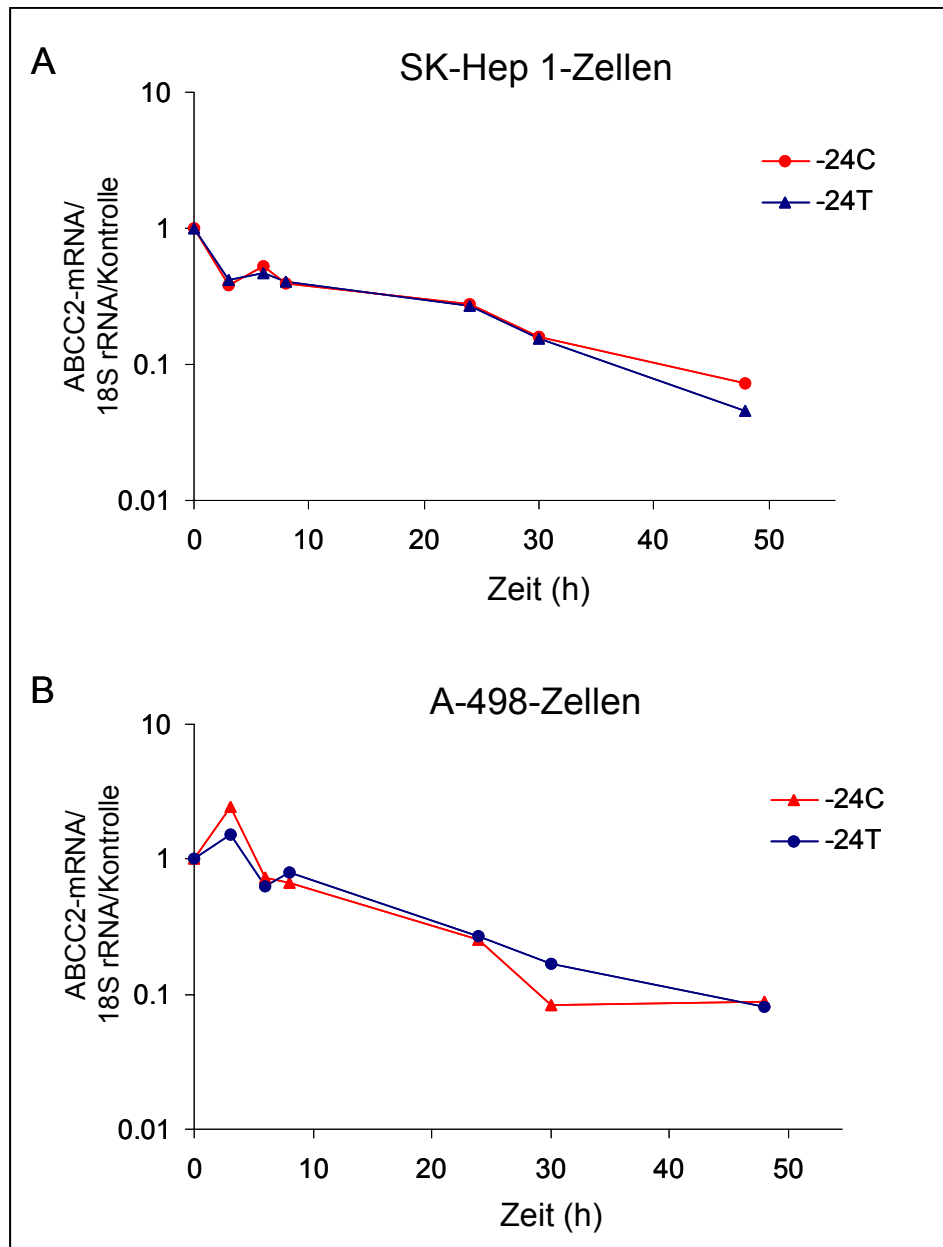


### 3.3.2 Einfluss des ABCC2 -24C>T-Polymorphismus auf die mRNA-Degradation

Es wurde untersucht, ob es abhängig vom ABCC2 -24C>T-Polymorphismus zu einer veränderten mRNA-Degradation kommt. Es wurden die Zelllinien SK-Hep 1 (Diplotyp: H2/H12) und A-498 (Diplotyp: H1/H12) ausgewählt, da diese heterozygot für den -24C>T Polymorphismus sind. Um die Spezifität der Methode zu überprüfen, wurde als Kontroll-Zelllinie Caco-2 ausgewählt. Diese Zelllinie weist den Diplotyp H1/H9 auf und ist somit homozygot -24C.

Zunächst wurden die Zellen über einen Zeitraum von 48 h mit Actinomycin D behandelt. Actinomycin D ist in der Lage an doppelsträngige DNA zu binden und somit die Enzyme der Replikation und der Transkription zu behindern. Dadurch werden keine neuen mRNA-Transkripte gebildet und es ist möglich über die Zeit die Degradation der vorhandenen mRNA zu ermitteln. Für die Messung der allel-spezifischen mRNA-Degradation wurden in einer qRT-PCR (quantitativen Real-Time PCR) unterschiedlich markierte Sonden eingesetzt, die spezifisch für ABCC2 -24C oder ABCC2 -24T waren. In einem Duplex-Lauf war es dann möglich, gleichzeitig die mRNA-Expression und somit die mRNA-Degradation beider Allele über die Zeit zu messen. Dabei hat sich gezeigt, dass die ABCC2-mRNA-Degradation nicht von dem -24C>T-Polymorphismus beeinflusst wurde (Abbildung 3.4). Die Untersuchung der mRNA-Expression nach Actinomycin D-Behandlung in Caco-2-Zellen zeigte, dass die eingesetzten Sonden für -24C und -24T zu über 95% spezifisch waren.

Anhand der Abnahme der mRNA-Expression war es möglich die Halbwertszeiten der ABCC2-Haplotypen zu berechnen. Diese waren bei den SK-Hep-1-Zellen 15,6 h für den Haplotyp H2 und 13,0 h für den Haplotyp H12. Bei den A-498-Zellen betrug die Halbwertszeit für Haplotyp H1 10,8 h und für Haplotyp H12 11,6 h.

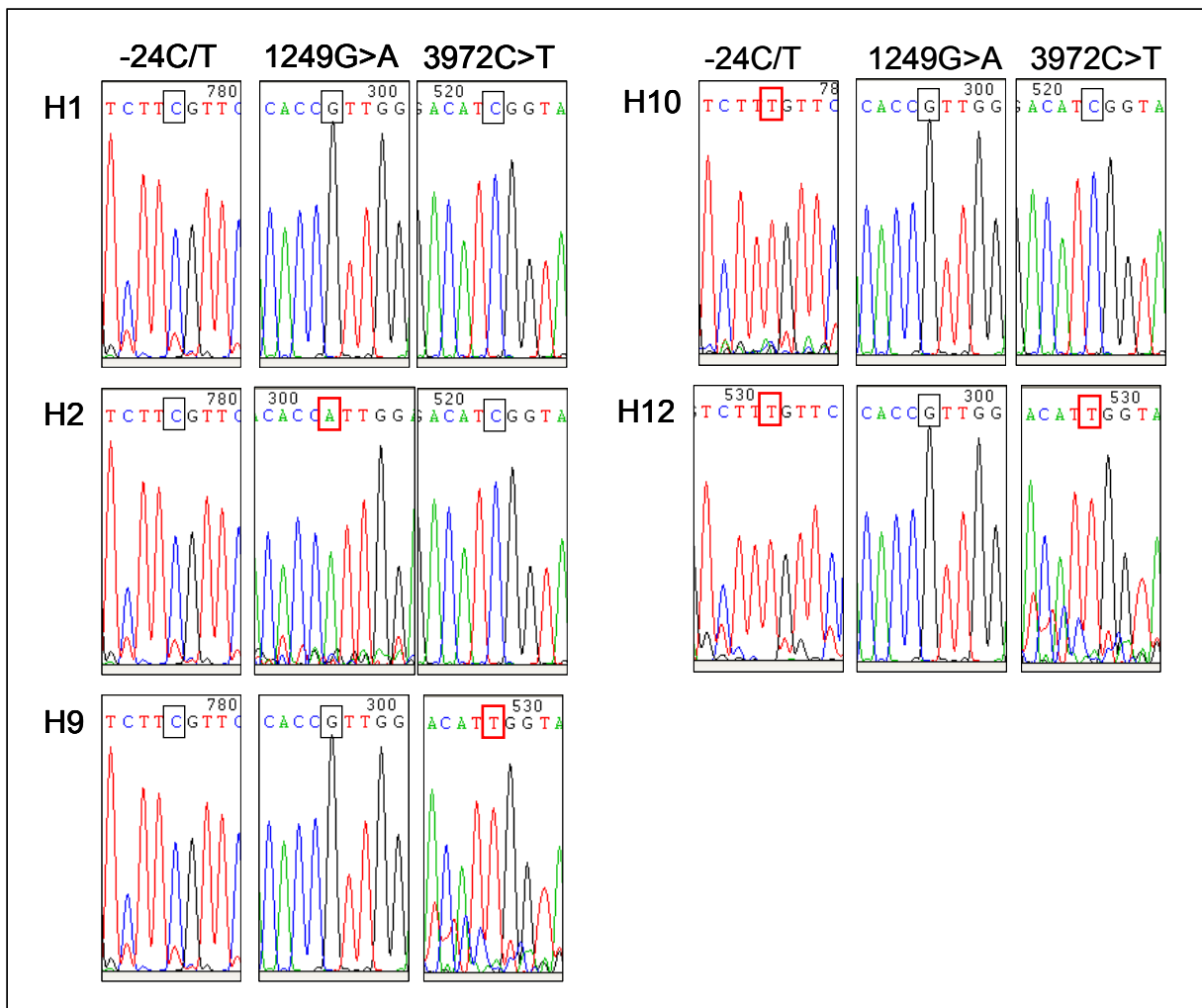


**Abbildung 3.4:** ABCC2-mRNA-Degradation in (A) SK-Hep 1- und (B) A-498-Zellen nach Behandlung mit Actinomycin D.

### 3.4 Klonierung von ABCC2-Haplotypen

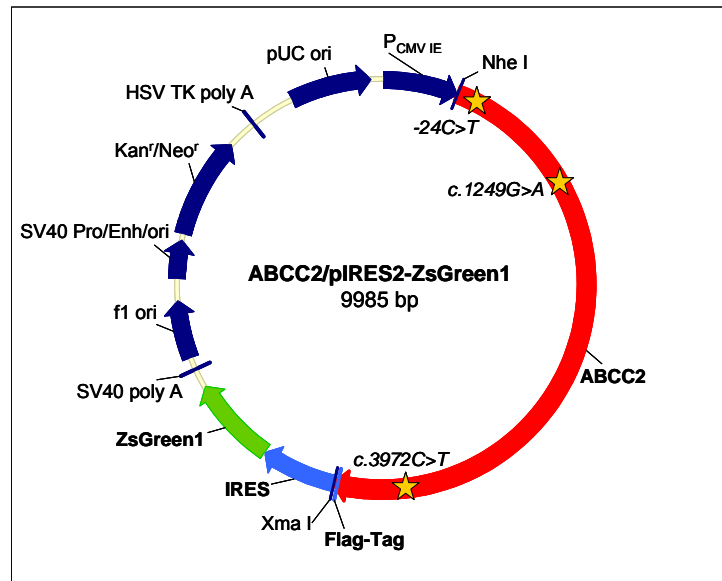
Im folgenden Absatz wurden die häufigsten Haplotypen in der kaukasischen Bevölkerung H1, H2, H9 und H12 genauer charakterisiert. Der Haplotyp H10 wurde dabei zusätzlich ausgewählt, um den Einfluss des ABCC2-Polymorphismus -24C>T genauer zu untersuchen.

Der Haplotyp H3 wurde aufgrund seiner geringen Frequenz nicht in die weiteren Untersuchungen einbezogen. Um die ABCC2-Haplotypen H1, H2, H9, H10 und H12 nun genauer charakterisieren zu können, wurden Vektorkonstrukte generiert. Zunächst wurde die 4.734 bp umfassende cDNA von ABCC2 (NCBI accession number NM000392; Stand 17.01.2007) in den Expressionsvektor pIRES2-ZsGreen1 kloniert. Ausgehend von der ABCC2-Wildtyp-Sequenz wurden dann die verschiedenen Polymorphismen -24C>T, 1249G>A und 3972C>T, die in den zu untersuchenden Haplotypen vorkommen, über eine Mutagenese eingefügt (Abbildung 3.5).



**Abbildung 3.5:** Ausschnitte der Kontrollsequenzierungen der klonierten ABCC2-Haplotypen H1, H2, H9, H10 und H12, die jeweils die Bereiche der Polymorphismen -24C>T, 1249G>A und 3972C>T darstellen.

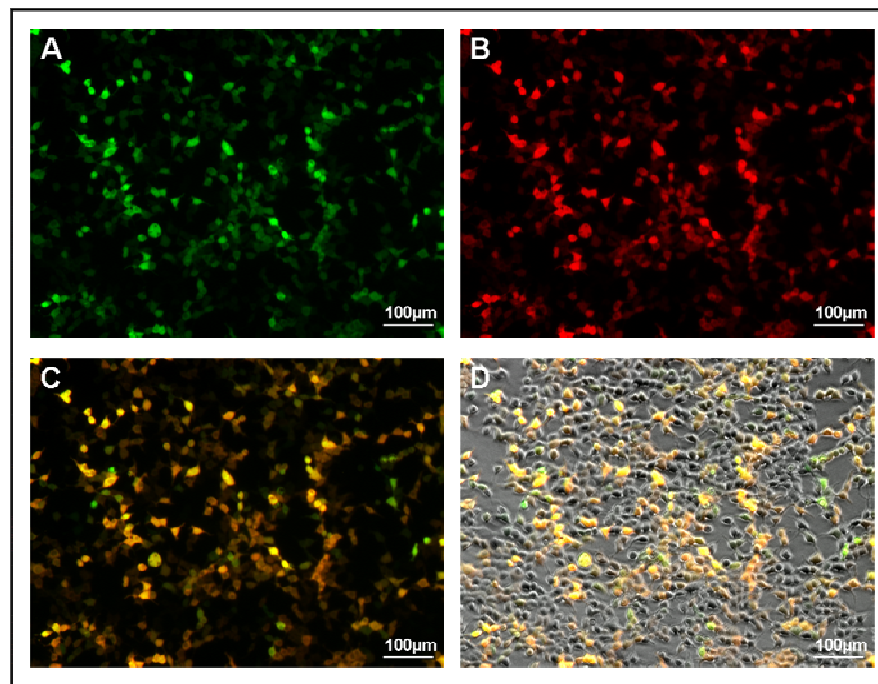
Zum spezifischen Nachweis der rekombinant exprimierten Haplotypen enthielten die klonierten Konstrukte einen Flag-Tag (Aminosäuresequenz: DYKDDDDK) am C-Terminus von ABCC2. So war es möglich im Western Blot mit einem Antikörper, der gegen den Flag-Tag gerichtet war, die rekombinant exprimierten Haplotypen von den endogenen ABCC2-Proteinen zu unterscheiden. Der verwendete pIRES2-ZsGreen1-Vektor wies direkt nach der MCS (multiple cloning site) Sequenzen für ein IRES-Element (internal ribosomal entry site) und für ZsGreen1, ein grün fluoreszierendes Protein aus der Krustenanemone (*Zoanthus spec.*) auf (Abbildung 3.6).



**Abbildung 3.6:** Vektorkarte von ABCC2/pIRES2-ZsGreen1. In rot dargestellt ist die vollständige cDNA von ABCC2, die zwischen den Restriktionsschnittstellen *Nhe* I und *Xma* I in der MCS des Vektors liegt. Die gelben Sterne symbolisieren die SNPs, die je nach Haplotyp in der Sequenz vorkommen. Am C-Terminus von ABCC2 befindet sich der Flag-Tag. Anschließend folgen Sequenzen für das IRES-Element (blau) und ZsGreen1 (grün). Die übrigen Elemente des Vektors sind in dunkelblau dargestellt: SV40 poly A = SV40-mRNA-Polyadenylierungssignal, dient der korrekten Prozessierung des 3'-Endes der bicistronischen mRNA; f1 ori = Replikationsursprung zur Produktion von Einzelstrang-DNA; SV40-ori = Replikationsursprung zur Replikation in Säugetierzellen, die das SV40-T-Antigen exprimieren; Kan<sup>R</sup> = Kanamycinresistenz in *E. coli*; pUC ori = Replikationsursprung zur Replikation in *E. coli*; P<sub>CMV IE</sub> = immediate early Promotor des Cytomegalovirus. Eine Selektion von stabil transfizierten Säugetierzellen mit G418 ist durch die Neomycin-Resistenzkassette möglich, die aus dem SV40-Promotor (SV40 Pro/Enh), der Neomycin-Resistenz (Neo<sup>R</sup>) und dem Polyadenylierungssignal des Thymidin-Kinase-Gens des *Herpes Simplex*-Virus (HSV TK poly A) besteht.

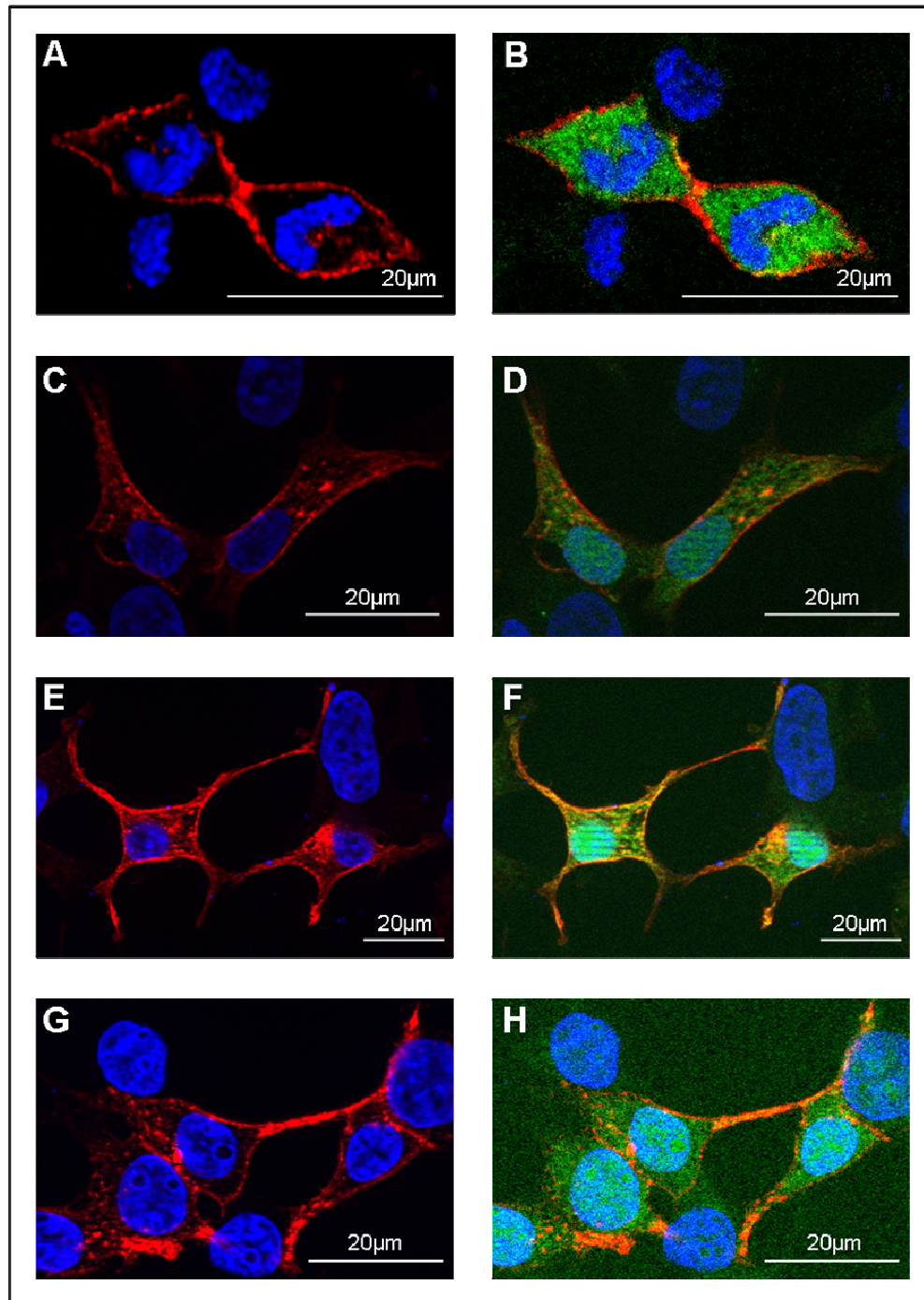
Das IRES-Element ermöglichte die Translationsinitiation innerhalb einer mRNA. Die Sequenzen des in der MCS vorliegenden ABCC2 sowie von ZsGreen1 lagen zwar auf einer einzelnen bicistronischen mRNA, wurden aber als getrennt Proteine translatiert.

Um zu gewährleisten, dass bei der Analyse der Proteinexpression der ABCC2-Haplotypen ein Einfluss der Transfektionseffizienz ausgeschlossen werden konnte, wurde bei jeder Transfektion ein zweiter Vektor (pDsRed2-C1, Takara Bio Europe/Clontech) zusammen mit dem ABCC2/pIRES2-ZsGreen1-Konstrukt transfiziert. Das auf diesem Kovektor kodierte Protein dsRed konnte im Western Blot mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen werden. Abbildung 3.7 zeigt Fluoreszenzmikroskopien von HEK293T/17-Zellen, die transient mit ABCC2/pIRES2-ZsGreen1 und pDsRed2-C1 transfiziert wurden.



**Abbildung 3.7:** Fluoreszenzmikroskopie von transient mit ABCC2/pIRES2-ZsGreen1 und pDsRed2-C1 transfizierten HEK293T/17-Zellen. Fluoreszenz von Zellen, die (A) ZsGreen1 und (B) dsRed exprimieren. (C) Überlagerung der Fluoreszenzen von ZsGreen1 und dsRed (D) zusammen mit einer durchlichtmikroskopischen Aufnahme der Zellen.

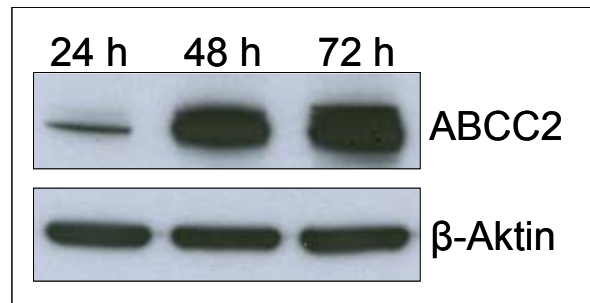
Des Weiteren wurden Immunfluoreszenzen durchgeführt, die die Integration der rekombinant exprimierten ABCC2-Proteine in die Membran von HEK293T/17-Zellen zeigen (Abbildung 3.8). Dabei war zu beobachten, dass zwar einige Proteine in die Membran integrieren aber auch ein Teil im Zytoplasma in Art von Aggregaten vorlag.



**Abbildung 3.8:** Immunfluoreszenzen von rekombinant exprimierten ABCC2/pIRES2-ZsGreen1-Konstrukten, die transient in HEK293T/17-Zellen transfiziert wurden. A, C, E und G zeigen in rot angefärbt rekombinant exprimiertes ABCC2, das über den Flag-Tag nachgewiesen wurde und in blau die Zellkerne (DAPI-Färbung). B, D, F und H zeigen zusätzlich die grüne Fluoreszenz von ZsGreen1.

### 3.5 Einfluss von Haplotypen auf die Proteinexpression von ABCC2

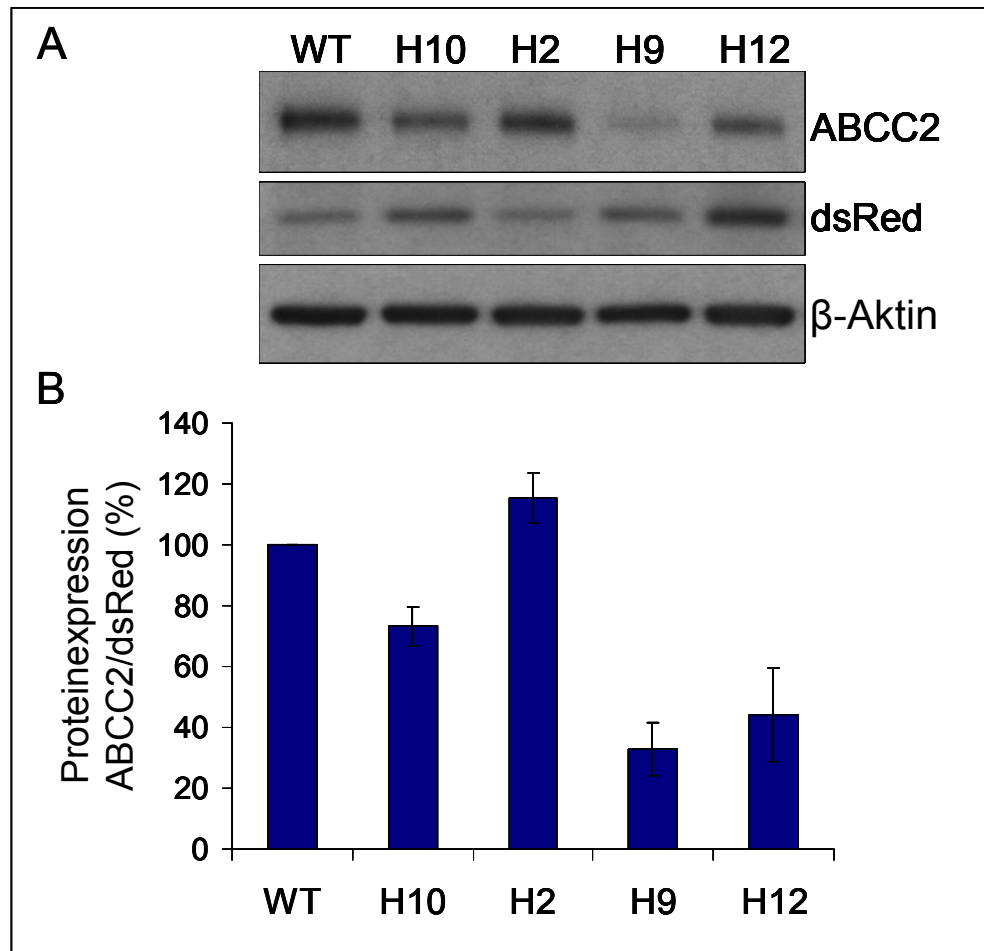
Um zu überprüfen ob die ABCC2-Haplotypen einen Einfluss auf die Proteinexpression von ABCC2 haben, wurden HEK293T/17-Zellen transient mit den jeweiligen Vektorkonstrukten transfiziert. Als Kontrolle der Transfektionseffizienz wurden pDsRed2-C1 kotransfiziert. Zunächst wurde getestet in welchem Zeitraum nach der Transfektion sich eine ausreichende Expression der rekombinanten Proteine zeigte. Daher wurden 24 h, 48 h und 72 h nach Transfektion die Proteine isoliert und im Western Blot analysiert. Abbildung 3.9 zeigt, dass die Proteinexpression nach 48 h sehr stark war und sich auch nach 72 h nur wenig veränderte. Daher wurde in allen nachfolgenden Versuchen die Proteinexpression 48 h nach der Transfektion untersucht.



**Abbildung 3.9:** Proteinexpression des ABCC2/pIRES2-ZsGreen1-Vektorkonstruktes 24 h, 48 h und 72 h nach der Transfektion. Die Proteinexpression von  $\beta$ -Aktin wurde als interner Standard genutzt.

Anschließend wurden die Proteinexpressionen der ABCC2-Haplotypen H1 (Wildtyp), H10, H2, H9 und H12 analysiert. In Abbildung 3.10 A ist ein repräsentativer Western Blot dargestellt und in Abbildung 3.10 B die densitometrische Auswertung von sieben unabhängigen Versuchen, bei denen vier verschiedene DNA-Präparationen der jeweiligen ABCC2-Konstrukte verwendet wurden. Die Haplotypen H10 (-24T/1249G/3972C;  $73.1 \pm 6.3\%$ ;  $p = 0.001$ ), H9 (-24C/1249G/3972T;  $32.7 \pm 8.8\%$ ;  $p = 0.001$ ) und H12 (-24T/1249G/3972T;  $44.0 \pm 15.5\%$ ;  $p = 0.001$ ) zeigten eine signifikant verringerte Proteinexpression im Vergleich zum Wildtyp (WT, Haplotyp H1 (-24C/1249G/3972C)). Im Gegensatz dazu war die Proteinexpression des Haplotypes H2 (-24C/1249A/3972C;  $115.2 \pm 8.2\%$ ;  $p = 0.017$ ) im Vergleich zum Wildtyp (Haplotyp H1) signifikant erhöht.

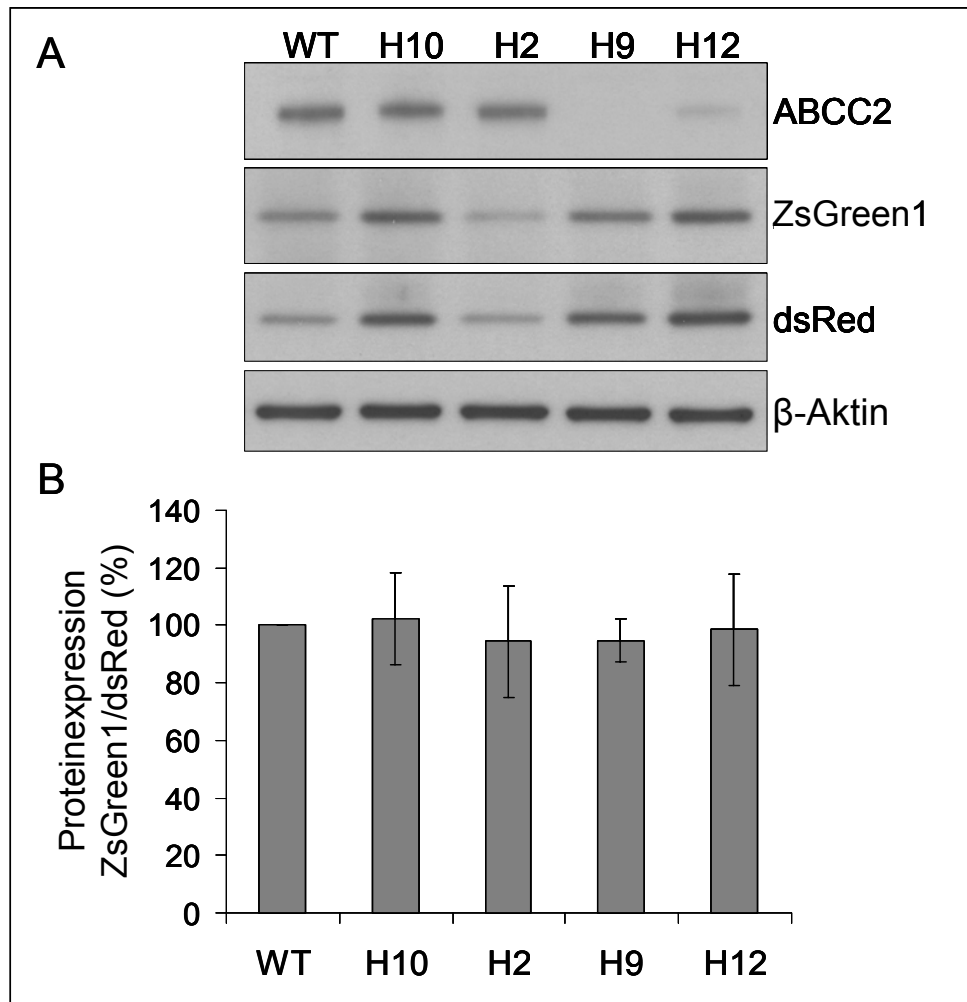




**Abbildung 3.10:** Proteinexpression der ABCC2-Haplotypen H1 (WT), H10, H2, H9 und H12 nach transienter Transfektion der Vektorkonstrukte in HEK293T/17-Zellen. (A) Repräsentativer Western Blot und (B) densitometrische Auswertung von sieben unabhängigen Versuchen. Der Vektor pDsRed2-C1 wurde als Kontrolle der Transfektionseffizienz kotransfiziert. Die Proteinexpression von  $\beta$ -Aktin wurde als interner Standard genutzt.

Der jeweilige ABCC2-Haplotyp und ZsGreen1 befanden sich auf einer bicistronischen mRNA und wurden als getrennte Proteine translatiert. Durch die Bestimmung der Proteinexpression von ZsGreen1 war es möglich indirekt auf die mRNA-Expression der ABCC2-Haplotypen zurückzuschließen. Somit konnten mit diesen Vektorkonstrukten sowohl transkriptionelle als auch posttranskriptionelle Effekte auf die Proteinexpression untersucht werden.





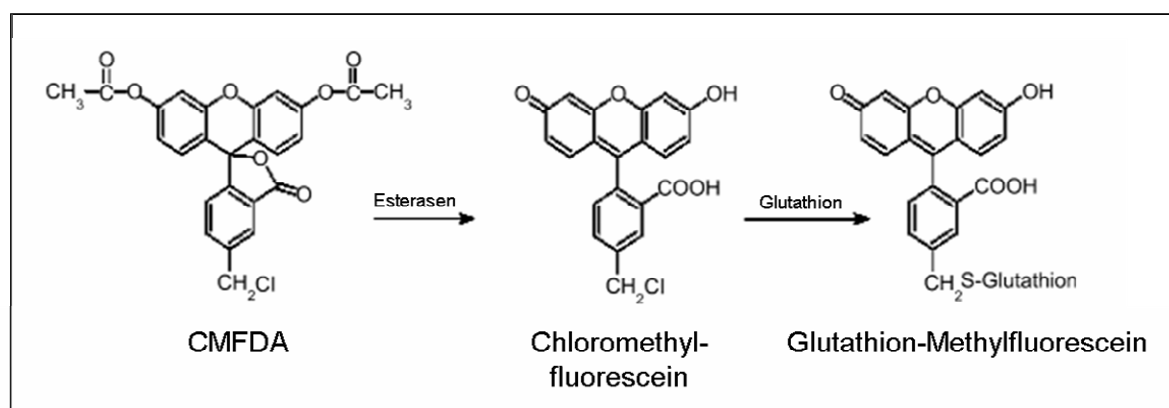
**Abbildung 3.11:** Proteinexpression von ABCC2, ZsGreen1, dsRed und  $\beta$ -Aktin in HEK293T/17-Zellen, die transient mit den Vektorkonstrukten transfiziert wurden. (A) Repräsentativer Western Blot und (B) densitometrische Auswertung von vier unabhängigen Versuchen. Der Vektor pDsRed2-C1 wurde als Kontrolle der Transfektionseffizienz kotransfiziert. Die Proteinexpression von  $\beta$ -Aktin wurde als interner Standard genutzt.

Im Gegensatz zu der haplotypenabhängigen Proteinexpression von ABCC2 kommt es bei ZsGreen1 zu keinen Unterschieden in der Proteinexpression in Abhängigkeit vom Haplotyp (H2 ( $94.3 \pm 19.3\%$ ,  $p = 1.0$ ), H9 ( $94.7 \pm 7.4\%$ ,  $p = 0.22$ ), H10 ( $102.3 \pm 16.2\%$ ,  $p = 1.0$ ), und H12 ( $98.4 \pm 19.2\%$ ,  $p = 1.0$ )). Abbildung 3.11 A zeigt einen repräsentativen Western Blot und Abbildung 3.11 B die densitometrische Auswertung von vier unabhängigen Versuchen.

### 3.6 Untersuchung der Transportaktivität von ABCC2

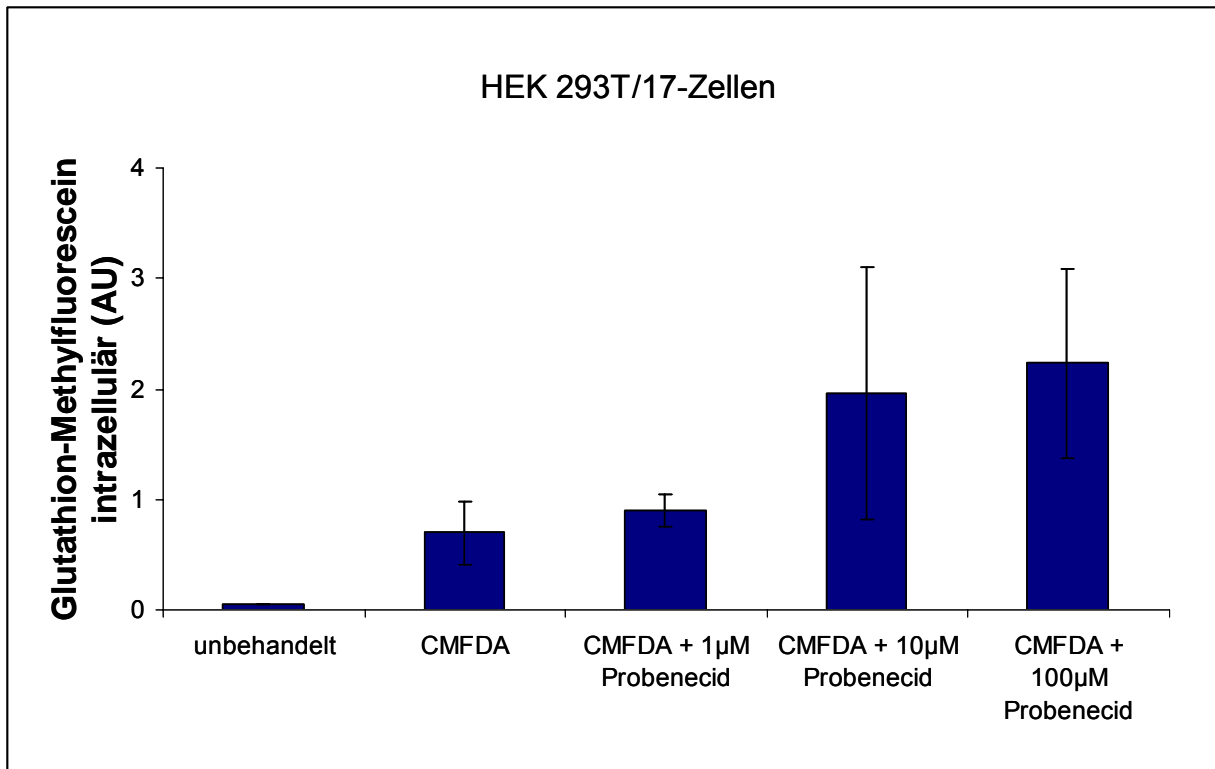
#### 3.6.1 Etablierung eines In-vitro-Transportsystems zum Nachweis der Transportaktivität von ABCC2

Die Transportaktivität von ABCC2 konnte über den Transport von Glutathion-Methylfluorescein, einem fluoreszierenden Substrat von ABCC2, untersucht werden. Glutathion-Methylfluorescein ist ein Metabolit der nicht fluoreszierenden Substanz CMFDA (5-Chloromethylfluorescein-diacetat), die die Zellmembran überwinden kann und erst intrazellulär metabolisiert wird (Abbildung 3.12).



**Abbildung 3.12:** Metabolismus von CMFDA zu Glutathion-Methylfluorescein. CMFDA ist in der Lage Zellmembranen zu überwinden und wird intrazellulär zu dem fluoreszierenden ABCC2-Substrat Glutathion-Methylfluorescein umgewandelt.

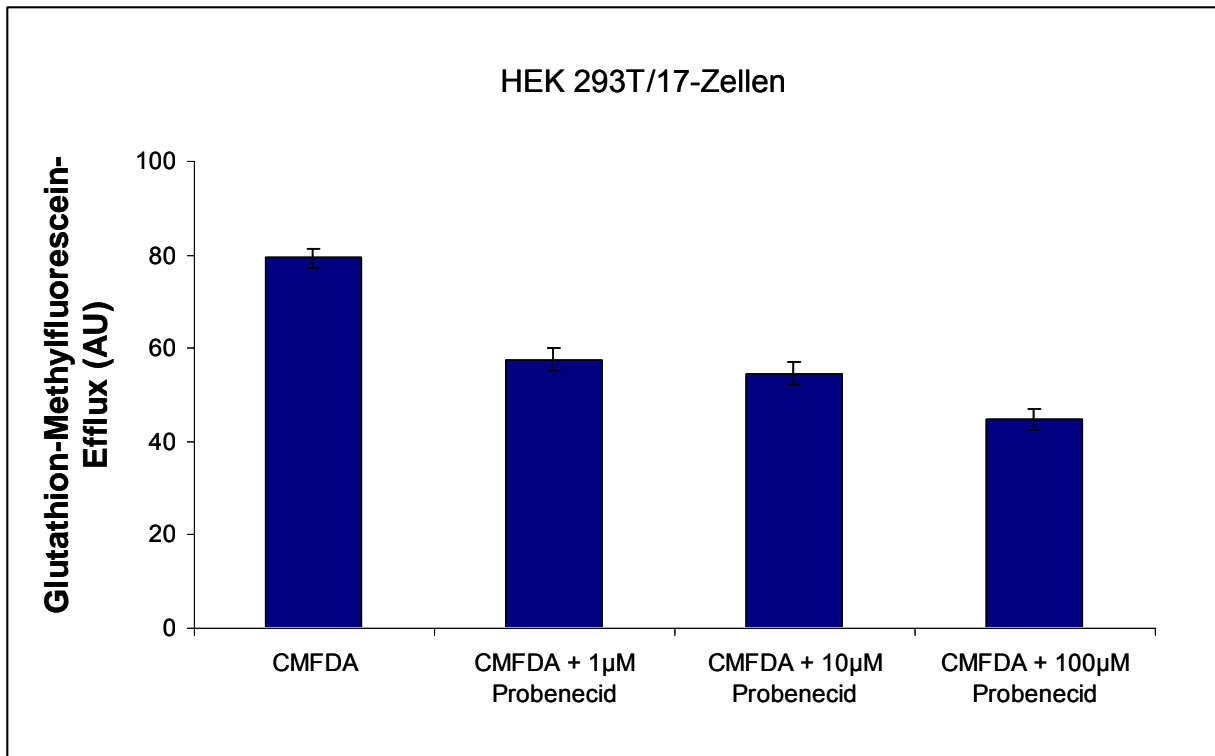
Zunächst wurden HEK293T/17-Zellen in schwarze Mehrlochplatten ausgesät und nach 48 h unter Kulturbedingungen mit CMFDA inkubiert. Nach drei Waschschrritten mit HBSS-Puffer wurde die Fluoreszenz von Glutathion-Methylfluorescein in den Zellen gemessen. Neben einer Inkubation mit CMFDA wurden zusätzlich ansteigende Konzentrationen an Probenecid, einem Inhibitor von ABCC2, zu den Zellen gegeben. Außerdem wurde in unbehandelten Zellen, zu denen kein CMFDA gegeben wurde, die Fluoreszenz gemessen. Durch die Inhibition von ABCC2 mit Probenecid ist ein deutlicher konzentrationsabhängiger Anstieg von Glutathion-Methylfluorescein in den Zellen und somit ein verringerter ABCC2-abhängiger Transport zu beobachten. Die unbehandelten Zellen, die nicht mit CMFDA inkubiert wurden, zeigten eine zu vernachlässigende Eigenfluoreszenz (Abbildung 3.13).



**Abbildung 3.13:** Messung der Fluoreszenz von Glutathion-Methylfluorescein in HEK293T/17-Zellen ohne (unbehandelt) und mit Inkubation mit CMFDA und mit ansteigenden Konzentrationen an Probenecid, einem Inhibitor des ABCC2-Transporters. AU = arbiträre Einheit.

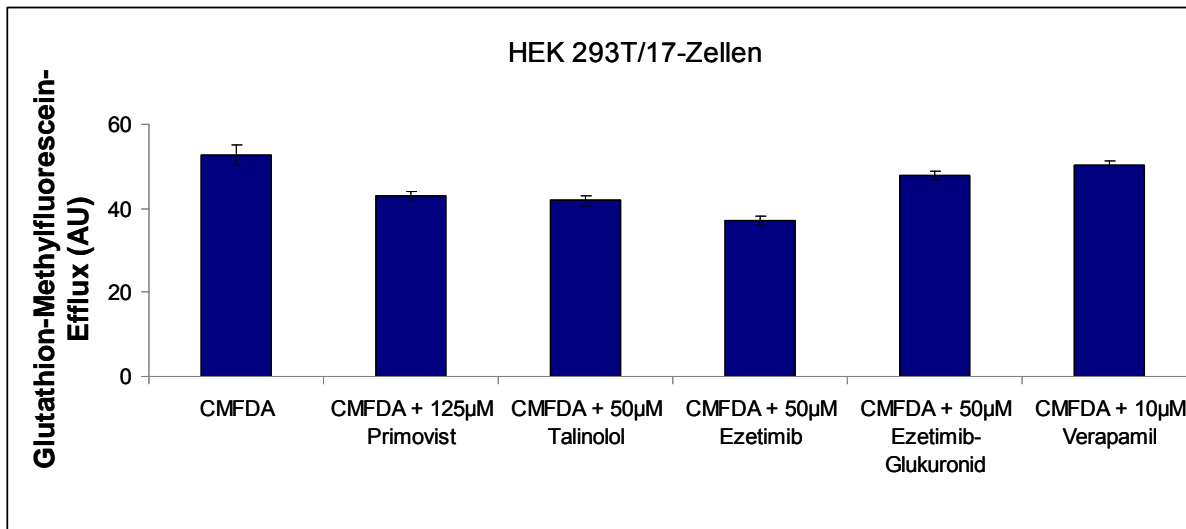
Des Weiteren wurde Glutathion-Methylfluorescein im Kulturüberstand von Zellen, die in 24-Well- oder 6-Well-Platten kultiviert und mit CMFDA inkubiert wurden, gemessen. Diese Methode hatte den Vorteil, dass von jedem Well mehrere Fluoreszenzmessungen vorgenommen werden konnten, indem der Überstand in vier bis acht Wells einer schwarzen 96-Well-Platte aufgeteilt wurde. Außerdem waren von jedem Well ausreichend Zellen für weitergehende Analysen, wie zum Beispiel der Bestimmung der Proteinexpression vorhanden. Abbildung 3.14 zeigt die Messung der Fluoreszenz von Glutathion-Methylfluorescein im Überstand (Efflux von Glutathion-Methylfluorescein) von HEK293T/17-Zellen, die zusätzlich zu CMFDA mit ansteigenden Konzentrationen an Probenecid inkubiert wurden. Wie bereits bei der Messung der intrazellulären Fluoreszenz von Glutathion-Methylfluorescein, zeigte sich auch bei der Messung im Überstand, dass durch Probenecid der Transport des Substrates konzentrationsabhängig verringert war.

Bei den folgenden Versuche wurde die Fluoreszenz von Glutathion-Methylfluorescein im Überstand bestimmt.



**Abbildung 3.14:** Messung der Fluoreszenz von Glutathion-Methylfluorescein im Überstand von HEK293T/17-Zellen nach Inkubation mit CMTDA und ansteigenden Konzentrationen an Probenecid, einem Inhibitor des ABCC2-Transporters. AU = arbiträre Einheit.

Weiterhin wurde untersucht, ob verschiedene Substrate (Primovist, Talinolol, Ezetimib, Ezetimib-Glukuronid und Verapamil) einen Einfluss auf den ABCC2-abhängigen Transport von Glutathion-Methylfluorescein haben. Daher wurden Wettbewerbsversuche mit diesen Substraten durchgeführt. Kam es zu einer verringerten Fluoreszenz von Glutathion-Methylfluorescein, deutete dies darauf hin, dass das zugesetzte Substrat mit ABCC2 interagiert und so den Transport von Glutathion-Methylfluorescein aus der Zelle behindert. Bei den verwendeten Substraten Primovist, Talinolol und Ezetimib kam es zu einer geringeren Fluoreszenz im Überstand, wobei der Einfluss von Ezetimib auf den Transport am stärksten ausgeprägt war. Verapamil und auch Ezetimib-Glukuronid schienen eher keinen Einfluss auf die Transportrate von Glutathion-Methylfluorescein durch den ABCC2-Transporter zu haben (Abbildung 3.15).



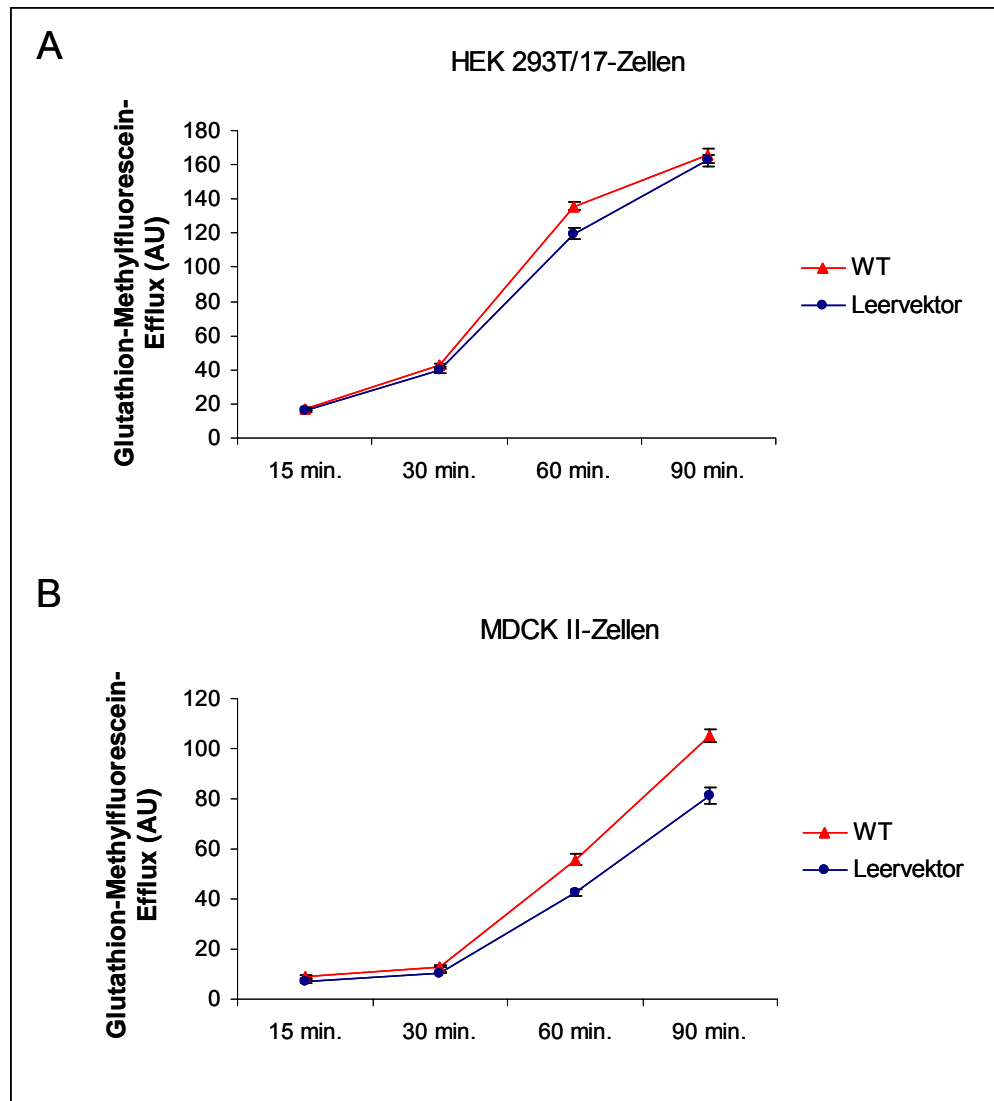
**Abbildung 3.15:** Einfluss der Substanzen Primovist, Talinolol, Ezetimib, Ezetimib-Glukuronid und Verapamil auf den ABCC2-abhängigen Efflux von Glutathion-Methylfluorescein in HEK293T/17-Zellen. AU = arbiträre Einheit.

### 3.6.2 Einfluss von Haplotypen auf die Transportaktivität von ABCC2

Für die Untersuchung der Transportaktivität der Haplotypen H2, H9, H10 und H12 im Vergleich zur Transportaktivität des Wildtyps (Haplotyp H1) wurden sowohl HEK293T/17-Zellen als auch MDCK II-Zellen verwendet. Die Zelllinien wurden jeweils mit den verschiedenen Haplotypen transient transfiziert und nach Kultivierung der Zellen für 48 h unter Kulturbedingungen wurde der Transport-Assay mit CMFDA durchgeführt. Die Messung der Fluoreszenz von Glutathion-Methylfluorescein erfolgte im Überstand der Zellen.

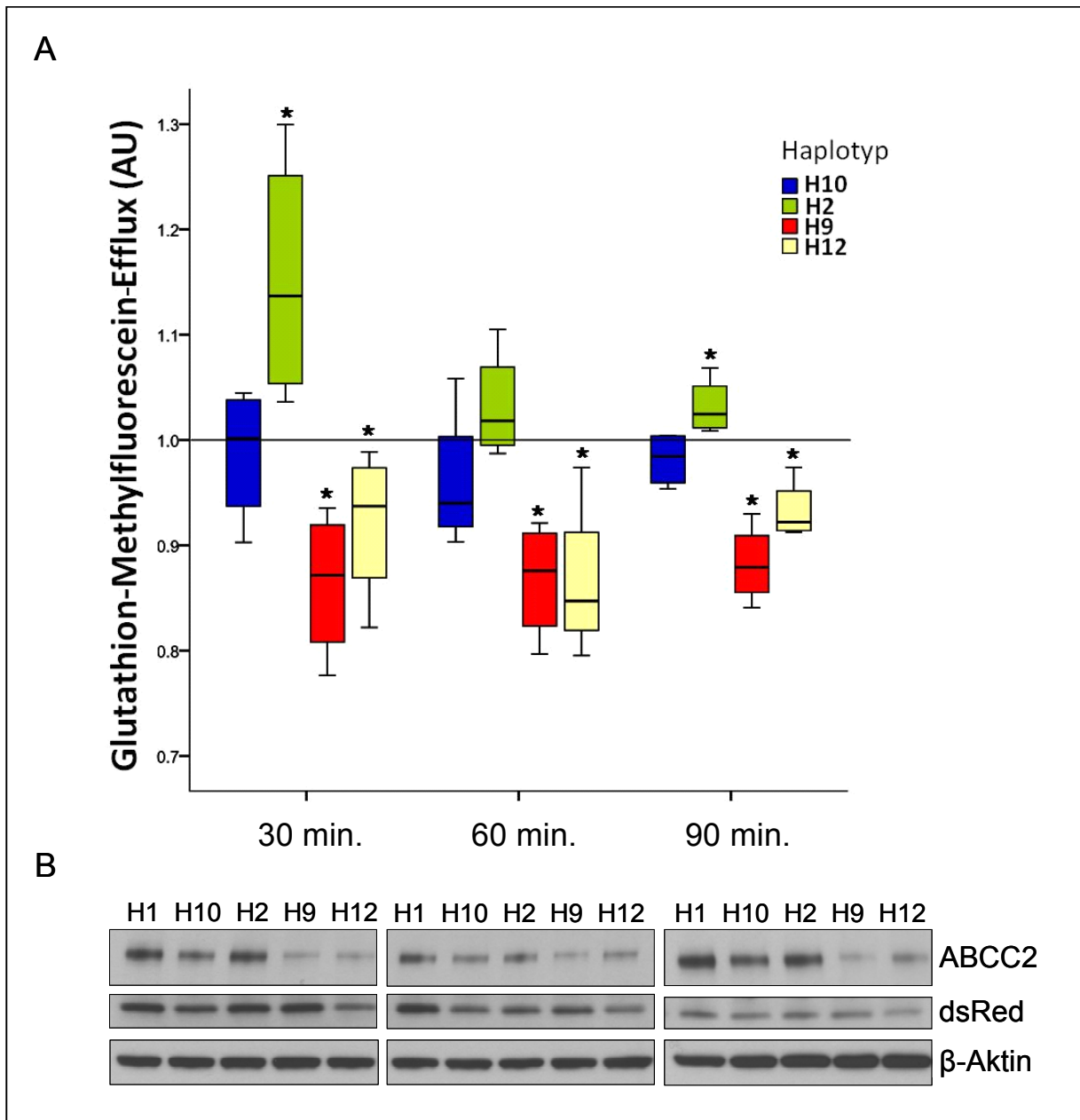
Zunächst wurde überprüft, ob die mit ABCC2 überexprimierten Zellen eine gesteigerte Transportrate von Glutathion-Methylfluorescein im Vergleich zu Kontrollzellen zeigen, die mit dem Leervektor (pIRES2-ZsGreen1) transfiziert wurden. Dies war nach einer Inkubation von 60 Minuten mit CMFDA sowohl bei HEK293T/17-Zellen als auch bei den MDCK II-Zellen zu beobachten. Allerdings war dieser Effekt bei den MDCK II-Zellen stärker ausgeprägt und erhöhte sich bei einer Inkubationszeit von 90 Minuten (Abbildung 3.16). Daher wurde für die weiteren Untersuchungen der Transportaktivität der ABCC2-Haplotypen mit transient transfizierten MDCK II-Zellen gearbeitet.

Die gesteigerte Transportaktivität der mit ABCC2 überexprimierten Zellen zeigte außerdem die funktionelle Aktivität des klonierten Transporters.



**Abbildung 3.16:** Vergleich der Transportaktivität von (A) HEK293T/17-Zellen und (B) MDCK II-Zellen, die entweder mit dem Leervektor pIRES2-ZsGreen1 oder mit dem ABCC2/pIRES2-ZsGreen1-Vektorkonstrukt (Haplotyp H1, Wildtyp) transfiziert wurden, über einen Zeitraum von 90 Minuten. AU = arbiträre Einheit.

Bei der Untersuchung der Transportaktivitäten der Haplotypen H2, H9, H10 und H12 im Vergleich zum Wildtyp (Haplotyp H1) wurden direkt nach dem Transport-Assay Proteine isoliert, um die Aktivität der Transporter auf die jeweilige Proteinexpression der rekombinant exprimierten Haplotypen zu beziehen. Abbildung 3.17 A zeigt die Transportaktivitäten der ABCC2-Haplotypen bezogen auf den Wildtyp, wobei es sich um Werte aus vier unabhängigen Versuchen handelt. Abbildung 3.17 B zeigt die dazugehörigen Proteinexpressionen in einem repräsentativen Western Blots.



**Abbildung 3.17:** (A) Transportaktivitäten der Haplotypen H10, H2, H9 und H12 im Vergleich zum Wildtyp (Haplotyp H1) in transient transfizierten MDCK II-Zellen. Statistisch signifikante Werte sind mit einem Stern gekennzeichnet. (B) Proteinexpressionen der ABCC2-Haplotypen zum jeweiligen Zeitpunkt der Fluoreszenzmessung. AU = arbiträre Einheit.

Die Haplotypen H9 und H12, die bereits bei den Untersuchungen der Proteinexpression eine signifikant verringerte Expression aufgewiesen haben, zeigten auch im Transport-Assay signifikant geringere Transportraten im Vergleich zum Haplotyp H1 (Wildtyp). Bei Haplotyp H10 war im Western Blot eine signifikant verringerte Proteinexpression zu beobachten. Im

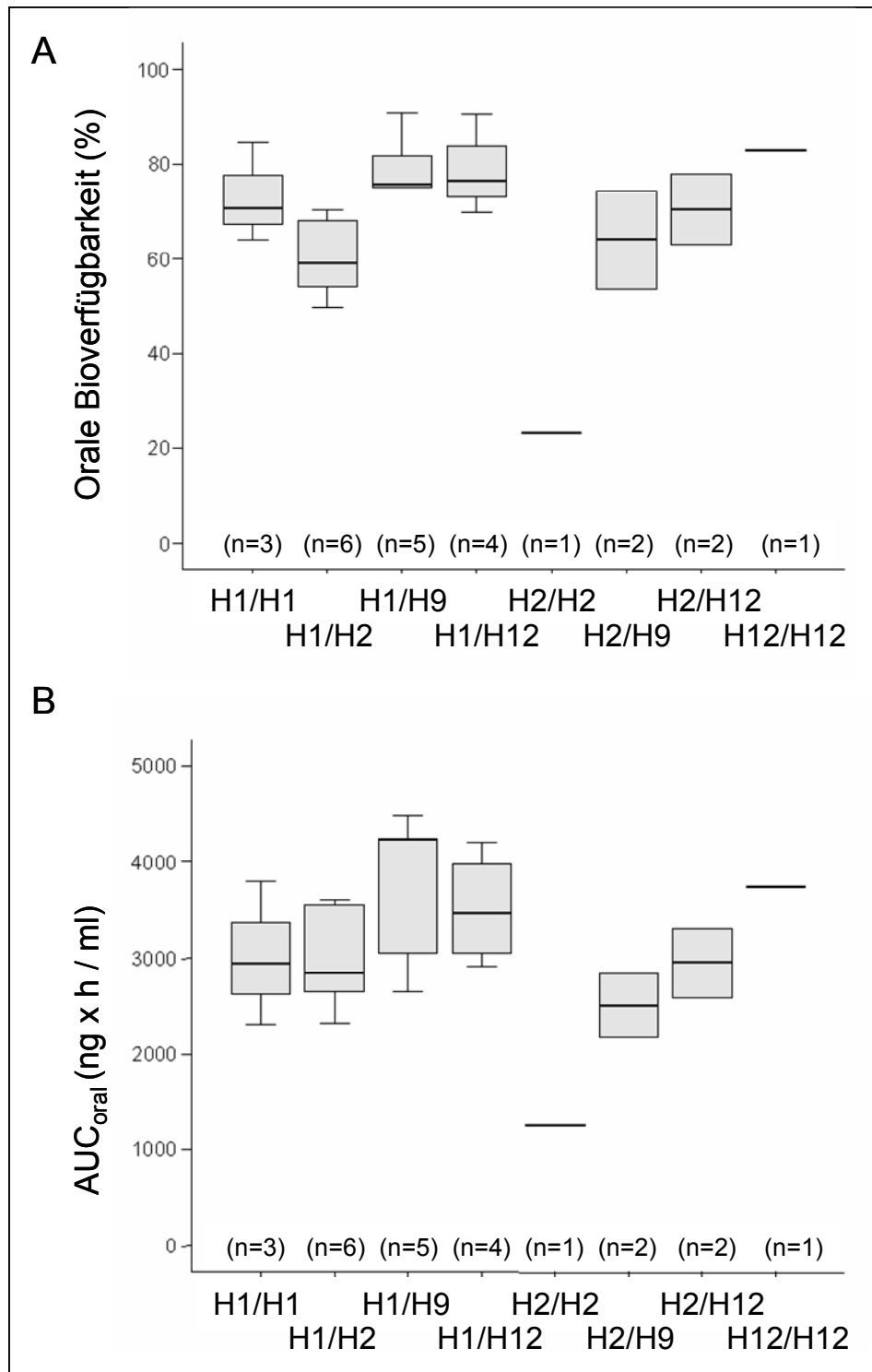
Transport-Assay war zwar tendenziell ebenfalls eine geringere Transportaktivität zu erkennen, die aber nicht signifikant verändert war. Haplotyp H2, der im Western Blot eine signifikant erhöhte Proteinexpression zeigte, wies auch bei der Untersuchung der Transportaktivität nach 30 und 90 Minuten Inkubation mit CMFDA signifikant erhöhte Transportraten im Vergleich zum Haplotyp H1 auf (Abbildung 3.17).

Bei Normalisierung der Transportaktivitäten der Haplotypen H2, H9, H10 und H12 auf die jeweiligen Proteinexpressionen hoben sich die Unterschiede in den Transportraten im Vergleich zum Wildtyp auf. So dass die Unterschiede in der Transportaktivität ausschließlich auf die haplotypenabhängigen Proteinexpressionen zurückzuführen waren.

### 3.7 Einfluss von ABCC2-Haplotypen auf die Pharmakokinetik von Talinolol

Basierend auf den Ergebnissen der Proteinexpressionen und der Transportaktivitäten der ABCC2-Haplotypen H1, H2, H9, H10 und H12 wurden pharmakokinetische Daten aus einer Studie mit dem  $\beta_1$ -Blocker Talinolol erneut analysiert [48]. Dabei wurden nur die Probanden ausgewählt, deren ABCC2-Diplotypen die Haplotypen H1, H2, H9 und H12 enthielten. Der Haplotyp H10 kam bei diesem Probandenkollektiv nicht vor. Dadurch war die Anzahl der Probanden auf 24 Personen beschränkt. Bei Diplotypen, die zumindest einen Haplotyp H2 trugen, verringerte sich sowohl die Bioverfügbarkeit als auch die  $AUC_{oral}$  im Vergleich zum Wildtyp (Haplotyp H1). Im Gegensatz dazu zeigten Diplotypen, die die Haplotypen H9 oder H12 enthielten, im Vergleich zum Wildtyp (Haplotyp H1) eine tendenziell erhöhte Bioverfügbarkeit und  $AUC_{oral}$  (Abbildung 3.18).





**Abbildung 3.18:** (A) Bioverfügbarkeit und (B) AUC<sub>oral</sub> von 24 gesunden kaukasischen Probanden nach oraler und intravenöser Gabe von Talinolol. Die Probanden wurden nach ihren ABCC2-Diplotypen ausgewählt, die aus den Haplotypen H1, H2, H9 und H12 zusammengesetzt sind.

## 4. Diskussion

Die große interindividuelle Variabilität in der Wirkung von Arzneimitteln stellt ein ernstes Problem im klinischen Alltag dar, da es zu therapeutischem Versagen oder unerwünschten Arzneimittelwirkungen kommen kann. Faktoren, die dazu beitragen sind neben Geschlecht, Alter, begleitenden Erkrankungen, Raucherstatus, Alkoholkonsum und Arzneimittelinteraktionen, zusätzlich genetische Varianten in Genen, die die Pharmakokinetik und -dynamik beeinflussen. Diese können nicht nur mit Unterschieden in der Wirkung von Arzneistoffen assoziiert sein, sondern auch Suszeptibilitätsfaktoren für Erkrankungen darstellen. Dies zeigt die Bedeutsamkeit von genetischen Polymorphismen in der Entwicklung und in der Behandlung von Erkrankungen [1;2].

Genetische Varianten sind im humanen Genom ein häufiges Phänomen. Ungefähr eine von 1000 Basenpaaren unterscheidet sich zwischen zwei Individuen und bei vielen dieser Variationen handelt es sich um SNPs [99]. Um Assoziationen von unerwünschten Arzneimittelwirkungen oder einer fehlenden Wirkung zu genetischen Varianten zu prüfen, ist es für Studien einerseits wichtig die Allelverteilung von Polymorphismen in verschiedenen Populationen zu kennen und andererseits die Funktionalität in vitro und in vivo zu prüfen. Allerdings spielen neben den Allelfrequenzen der Polymorphismen auch die Kombinationen von SNPs in den Haplotypen eine Rolle, sowie das Wissen über gelinkte Polymorphismen, z.B. zwischen der kodierenden Region und der Promotorregion des Gens [41].

Für den in dieser Arbeit untersuchten Auswärtstransporter ABCC2 sind mehrere funktionelle Varianten bekannt. Es sind bislang aber noch keine systematischen funktionellen Untersuchungen bezüglich der Haplotypenkonfiguration in vitro und in vivo durchgeführt worden.

### 4.1 Allelfrequenz der ABCC2-Polymorphismen -24C>T, 1249G>A und 3972C>T in der kaukasischen Bevölkerung

Viele verschiedene Studien konnten zeigen, dass der ethnische Hintergrund der Probanden und Patienten bei der Beurteilung der Allelfrequenzen von Polymorphismen eine Rolle spielt. In dieser Arbeit wurden die Allelfrequenzen, der in der kaukasischen Bevölkerung häufigsten Polymorphismen [48], bestimmt. Die Genotypisierung der Probanden wurde mit Hilfe der

PSQ-Technologie durchgeführt. Die verwendeten Assays wurden mit bekannten Proben und der Methode der PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) [44;48] validiert. Zusätzlich wurden von Stichproben Kontrollsequenzierungen durchgeführt, um die Genauigkeit der Assays zu überprüfen.

Die Allelfrequenzen der untersuchten ABCC2-Polymorphismen -24C>T, 1249G>A und 3972C>T wiesen Übereinstimmungen mit den bereits veröffentlichten Allelfrequenzen von anderen untersuchten kaukasischen Populationen auf [99-102]. Für den ABCC2-5'-UTR-Polymorphismus -24C>T wurde in dieser Studie eine Allelfrequenz für das variante -24T-Allel von 0,18 ermittelt, wobei andere Studien eine Allelfrequenz von 0,17 beschrieben haben [99-102]. Die berechnete Frequenz stimmte auch mit den Allelfrequenzen in chinesischen (Allelfrequenz: 0,20) [101;103] und japanischen Populationen (Allelfrequenz: 0,17) [41;50;101] überein. Allerdings wurde in afrikanischen Populationen eine signifikant geringere Allelfrequenz des -24T-Allels beobachtet, die bei 0,06 lag [101;102] (Tabelle 4.1).

Für den nicht-synonymen 1249G>A-Polymorphismus, der zu einem Aminosäureaustausch im ABCC2-Protein an Position 417 von Valin zu Isoleucin führt, liegt die in dieser Arbeit bestimmte Allelfrequenz des varianten 1249A-Allels von 0,23 ebenfalls in dem Bereich, der für kaukasische Populationen veröffentlichten Frequenz von 0,19 [99-102]. Im Gegensatz dazu wurden sowohl bei chinesischen (Allelfrequenz: 0,04) [101;103] als auch bei japanischen (Allelfrequenz: 0,11) [41;50;101] und afrikanischen Populationen (Allelfrequenz: 0,13) [101;102] signifikant geringere Allelfrequenzen für das variante 1249A-Allel identifiziert (Tabelle 4.1).

Der synonyme ABCC2-Polymorphismus 3972C>T, bei dem die Aminosäure Isoleucin an Position 1324 im Protein nicht verändert wird, zeigte in dieser Arbeit eine Allelfrequenz des varianten 3972T-Allels von 0,33. In anderen Studien, die die Allelfrequenz von 3972T in kaukasischen Populationen untersucht haben, liegt die Frequenz bei 0,35 [99-102]. Etwas geringer ist hingegen die Allelfrequenz für diesen Polymorphismus von Afrikanern mit 0,19 [101]. Chinesische und japanische Populationen zeigten dagegen signifikant geringere Allelfrequenzen von 0,05 (Chinesen) [101;103] und 0,21 (Japaner) [41;50;101] für den 3972C>T-Polymorphismus im Vergleich zu der kaukasischen Bevölkerung (Tabelle 4.1).

**Tabelle 4.1:** Allelfrequenzen der ABCC2-Polymorphismen -24C>T, 1249G>A und 3972C>T in unterschiedlichen Populationen. Die Allelfrequenzen wurden jeweils mit den in dieser Arbeit ermittelten Frequenzen der 335 gesunden, kaukasischen Probanden aus Deutschland verglichen.

Population	-24C>T		1249G>A		3972C>T	
	Frequenz	n-Zahl p-Wert	Frequenz	n-Zahl p-Wert	Frequenz	n-Zahl p-Wert
diese Studie	0,18	335	0,23	335	0,33	335
Kaukasier [99-102]	0,17	381 0,49	0,19	388 0,09	0,35	291 0,40
Afrikaner [101;102]	0,06	119 < 0,0001	0,13	119 0,0006	0,19	24 0,09
Chinesen [101;103]	0,20	141 0,37	0,04	120 < 0,0001	0,05	141 < 0,0001
Japaner [41;50;101]	0,17	584 0,46	0,11	584 < 0,0001	0,21	584 < 0,0001

Für die Bestimmung der Allelfrequenzen der unterschiedlichen Populationen wurden die in den jeweiligen Veröffentlichungen angegebenen Individuen gemeinsam betrachtet. In den jeweiligen Studien wurden nicht immer alle SNPs untersucht. Freiheitsgrad = 1.

## 4.2 DNA-Protein-Interaktionen in der 5'-UTR des ABCC2-Gens

Der ABCC2-Polymorphismus -24C>T befindet sich in der 5'-UTR des ABCC2-Gens und führte in Nierengewebe zu einer erniedrigten mRNA-Expression des ABCC2-Gens [44]. Daher stellte sich die Frage ob im Bereich von 24 Basenpaaren vor dem ATG-Startcodon eventuell Transkriptionsfaktoren oder Komplexe von Transkriptionsfaktoren binden, die die

Expression von ABCC2 beeinflussen könnten. Dies wurde mit Hilfe des Electromobility Shift Assays (EMSA) untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass es zu einer spezifischen Bindung an die DNA-Sonden kommt. Die DNA-Sonden repräsentierten 41 bp der 5'-UTR des ABCC2-Gens von der Position -43 bis -3, wobei sich an der Position -24 entweder ein Cytosin (Wildtyp-Allel) oder ein Thymin (variantes Allel) befand. Die DNA-Sonden wurden mit Kernextrakt aus zwei verschiedenen Geweben inkubiert. Zum einen handelte es sich um Kernextrakt aus der Leberadenokarzinomzelllinie SK-Hep 1 und zum anderen um Kernextrakt aus der Nierenkarzinomzelllinie A-498. Ziel dieser Untersuchungen war es herauszufinden, ob es abhängig vom -24C>T-Polymorphismus zu unterschiedlichen Bindungen von Proteinen oder Proteinkomplexen an die DNA der 5'-UTR des ABCC2-Gens kommt. Des Weiteren konnte mit den Kernextrakten aus unterschiedlichen Zelltypen ein möglicher gewebeanhängiger Einfluss der Bindung von Proteinen oder Proteinkomplexen an die 5'-UTR von ABCC2 untersucht werden.

Die Versuche haben gezeigt, dass es in der Leberadenokarzinomzelllinie SK-Hep 1 zu spezifischen Bindungen an die ABCC2-DNA-Sonden kommt, die aber nicht abhängig vom -24C>T-Polymorphismus sind. Im Gegensatz dazu zeigten Proteine des Kernextrakts aus der Nierenkarzinomzelllinie A-498 eine um etwa 10% stärkere Bindung an die -24T-Sonde.

Daher könnte es sein, dass es gewebeabhängig bei Kernextrakt aus Zellen aus Nierengewebe zu einer vom -24C>T-Polymorphismus abhängigen differentiellen Bindung von Proteinen oder Proteinkomplexen an die DNA der 5'-UTR des ABCC2-Gens kommt. Allerdings handelt es sich dabei um einen Unterschied in der Bindung des Proteins an die DNA-Sonde, der durch weitere Untersuchungen und Kontrollen verifiziert werden müsste. Des Weiteren handelt es sich beim EMSA um eine Methode, die in erster Linie eine qualitative Aussage über eine vorhandene Bindung zulässt. Die Quantifizierung dieser DNA-Protein-Bindungen ist aufgrund einer fehlenden internen Kontrolle, wie es z.B. im Western Blot durch die zusätzliche Detektion von  $\beta$ -Aktin möglich ist, schwierig.

In der Literatur gibt es keine Hinweise für mögliche Transkriptionsfaktoren oder andere Proteine, die an der Regulation von beispielsweise der Translation beteiligt sind, die an der Position -24 binden könnten.

Für die Abcc2-5'-UTR der Ratte ist die erste Bindesequenz an Position -63 bis -73 beschrieben [59]. Im Bereich der humanen 5'-UTR des ABCC2-Gens sind an den Positionen -35 bis -42 zum einen eine Konsensussequenz für CdxA [60] und von -36 bis -42 eine Konsensussequenz für BRN2 beschrieben [57]. Diese beiden Bindesequenzen liegen somit

im Bereich der für die EMSAs eingesetzten DNA-Sonden und könnten für die Bindung verantwortlich sein. Experimente mit Deletionsvarianten der DNA-Sonde und Kernextrakt aus der Leberzellkarzinomzelllinie HepG2 haben gezeigt, dass spezifische vom -24C>T-Polymorphismus unabhängige Bindungen an die DNA-Sonden (-3 bis -38 und -3 bis -33) verloren gehen [105]. Da allerdings bei dem Kernextrakt aus den A-498-Zellen ein schwacher vom -24C>T-Polymorphismus abhängiger Unterschied in der Bindung an die -24C- und an die -24T-Sonde zu beobachten war, ist es wahrscheinlich, dass eventuell noch näher am Start-Codon zumindest bei Kernextrakt aus Nierenzellen an Position -24 ein Protein oder ein Proteinkomplex bindet, der in der Literatur bisher noch nicht beschrieben wurde.

Dahingehend wäre es sicherlich sinnvoll die gewebeabhängige Regulation des ABCC2-Gens weiter zu untersuchen, um eventuell neue Transkriptionsfaktoren oder Komplexe von Transkriptionsfaktoren zu identifizieren, die an der Regulation von ABCC2 in der Niere beteiligt sein könnten [44;105]. Des Weiteren wäre es möglich, Vorhersagen von putativen Transkriptionsfaktoren aus Datenbanken, die potentielle Bindungen der Transkriptionsfaktoren HSF-2 und TCF/LEF-1 im Bereich von -24 in der ABCC2-5'-UTR vorhersagen (Genomatix MatInspector; TFSEARCH), experimentell mit Hilfe der ChIP-on-Chip-Technologie zu überprüfen. Bei dieser Technologie wird zunächst eine Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) durchgeführt. Dabei werden DNA-Sequenzen, an die die jeweiligen Proteine binden mit spezifischen Antikörpern durch Präzipitation isoliert. Anschließend ist es möglich die DNA-Fragmente aufzureinigen und z.B. auf GeneChip® Tiling Arrays von Affymetrix zu hybridisieren. Dadurch können DNA-Sequenzen, an die bestimmte Proteine binden, identifiziert werden.

### 4.3 Einfluss von ABCC2-Haplotypen auf die mRNA-Sekundärstruktur, -Stabilität und -Degradation

In einem nächsten Schritt stellte sich die Frage welchen Einfluss die mRNA-Sekundärstrukturen und die mRNA-Stabilitäten der Haplotypen H1 (-24C/1249G/3972C), H2 (-24C/1249A/3972C), H3 (-24C/1249A/3972T), H9 (-24C/1249G/3972T), H10 (-24T/1249G/3972C) und H12 (-24T/1249G/3972T) auf die Expression und Funktion von ABCC2 haben.

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass die Expression von Genen durch Unterschiede in der mRNA-Sekundärstruktur beeinflusst wird [106-108]. Beispielsweise ist

die stille Mutation im Dopamin-D2-Rezeptor 957C>T mit einer veränderten mRNA-Sekundärstruktur und dadurch mit einer stärkeren mRNA-Degradation und einer verringerten Translation assoziiert [106]. Es wurde daher untersucht, ob die ABCC2-Haplotypen H1, H2, H3, H9, H10 und H12 Unterschiede in den mRNA-Sekundärstrukturen und somit unterschiedliche Translationsaktivitäten aufweisen. Deswegen wurden In-silico-Analysen mit dem Mfold-Webserver-Programm [97] durchgeführt und die mRNA-Sekundärstrukturen und die mRNA-Stabilitäten der verschiedenen ABCC2-Haplotypen berechnet. Dabei ist zu beachten, dass das Mfold-Webserver-Programm zwar mRNA-Sekundärstrukturen in ihrer energetisch günstigsten Konformation gefaltet wiedergibt, dies allerdings nicht gewährleistet, dass es sich bei diesen Strukturen um die biologisch relevanten Konformationen der jeweiligen mRNAs handelt.

Bei diesen In-silico-Analysen zeigte sich, dass der ABCC2-Wildtyp (Haplotyp H1) die höchste Enthalpie und der Haplotyp H12 die geringste Enthalpie bei 37 °C aufwies. Es wird davon ausgegangen, dass Sekundärstrukturen mit geringeren Enthalpien thermodynamisch stabiler sind [107]. Das bedeutet, dass die mRNA-Sekundärstruktur des ABCC2-Haplotyps H12 am stabilsten ist und dies könnte zu einer geringeren Translationseffizienz führen. Es wird angenommen, dass bei stabileren Strukturen ein größerer Energieaufwand benötigt wird, um die mRNA-Sekundärstruktur für die Ribosomen zu entfalten und dies somit zu einer veränderten Translationinitiation, einer verlangsamten Ribosomen-Migration und somit einer verringerten Translationseffizienz führen kann. Dieser Zusammenhang zwischen mRNA-Sekundärstruktur bzw. mRNA-Stabilität und der Translationseffizienz wurde bereits für die humane Catechol-O-Methyltransferase beschrieben [107].

Im Gegensatz zu den Haplotypen H10 und H12 würde für die ABCC2-Haplotypen H1, H2 und H9 demnach eine höhere Translationseffizienz erwartet werden. Dies trifft zumindest für die Haplotypen H1 und H2 zu, die im Vergleich zu den Haplotypen H10 und H12 höhere Proteinexpression aufwiesen. Allerdings zeigte der Haplotyp H9 im Western Blot die geringste Proteinexpression, die mit der ermittelten Enthalpie und der daraus resultierenden mRNA-Stabilität nicht zu erklären ist.

Bei Untersuchungen des humanen Corneodesmosin-Gens wurde ein SNP identifiziert, der mit einer schnelleren mRNA-Degradation assoziiert ist [109] und auch weitere Studien zeigten einen Zusammenhang zwischen Polymorphismen des Endothelin-1- [110] bzw. ABCB1-Gens [108] und einer veränderten mRNA-Degradation. Um diesen unmittelbaren Effekt auch von ABCC2 -24C>T auf die Expression zu untersuchen, wurden selektierte

Zelllinien verwendet, die heterozygot für den -24C>T-Polymorphismus sind. Hier handelte es sich um die Leberadenokarzinomzelllinie SK-Hep 1 (Diplotyp: H2/H12) und die Nierenkarzinomzelllinie A-498 (Diplotyp: H1/H12). Nach Behandlung der Zellen über einen Zeitraum von 48 h mit dem RNA-Polymerase-Inhibitor Actinomycin D, wurde zu verschiedenen Zeitpunkten die Degradation der ABCC2-mRNA abhängig vom -24C>T-Polymorphismus ermittelt. In einem Duplex-Lauf war es mit Hilfe der qRT-PCR möglich gleichzeitig die allelspezifische mRNA-Expression mit unterschiedlich markierten Sonden für das -24C- oder -24T-Allel zu messen. Sowohl in SK-Hep 1- als auch in A-498-Zellen konnten allerdings keine vom -24C>T-Polymorphismus abhängigen Unterschiede in der mRNA-Degradation festgestellt werden.

#### 4.4 Einfluss von Haplotypen auf die Proteinexpressionen von ABCC2

Um die verschiedenen ABCC2-Haplotypen genauer charakterisieren zu können, war es zunächst notwendig ein geeignetes Expressionssystem zu wählen. In diesem Fall zeigten sich HEK293T/17-Zellen als geeignetes Zellsystem für eine ausreichende Transfektionseffizienz und somit eine geeignete Proteinexpression. Allerdings handelt es sich bei HEK293T/17-Zellen um eine embryonale Nierenzelllinie, die endogen bereits ABCC2 exprimiert, wie in Western Blots mit Proteinextrakt aus HEK293T/17-Zellen festgestellt werden konnte (Daten in dieser Arbeit nicht gezeigt). Daher wurden die rekombinanten ABCC2-Konstrukte mit einem kurzen zusätzlichen Peptid, einem so genannten Flag-Tag (Aminosäuresequenz: DYKDDDDK) am C-Terminus des Proteins exprimiert, um so in der Immunfluoreszenz und im Western Blot die endogenen von den rekombinanten ABCC2-Proteinen mit einem monoklonalen IgG1-Antikörper, der selektiv gegen den Flag-Tag gerichtet war unterscheiden zu können [111].

##### 4.4.1 Funktionelle Bedeutung der ABCC2-Haplotypen

Für Untersuchung zur Transportaktivität der ABCC2-Haplotypen zeigten sich die HEK-293T/17-Zellen jedoch als nicht geeignet, da aufgrund der ausgeprägten endogenen ABCC2-Expression der Hintergrund zu hoch war und sich die Transportaktivität der ABCC2-transfizierten Zellen nur geringfügig von der Transportaktivität der nicht-transfizierten Zellen unterschied. Daher wurde für die späteren Untersuchungen der ABCC2-Transportaktivität die Hundenierenzelllinie MDCK II gewählt, die nur eine geringe endogene Proteinexpression von



ABCC2 aufweist. Bei dieser Zelllinie zeigte sich in Vorversuchen ein größerer Unterschied zwischen endogenen und mit ABCC2-Konstrukten transfizierten Zellen.

Eine Limitation der Transfektion von membranständigen Proteinen liegt in dem Umstand begründet, dass die rekombinanten Proteine vom endoplasmatischen Retikulum an die Plasmamembran transportiert und dort als funktionsfähiges Protein integriert werden müssen [112]. Daher wurde mittels eines fluoreszierenden sekundären Antikörpers, der gegen den primären Antikörper des Flag-Tags gerichtet war, die Integration der rekombinanten ABCC2-Proteine in die Membran kontrolliert. Es zeigte sich, dass die ABCC2-Proteine in die Membran integrierten, wobei aber auch ein Teil im Zytoplasma in einer Art von Aggregaten vorlag.

Die korrekte Integration und Funktion der rekombinanten ABCC2-Proteine in der Membran der Zellen wurde durch die späteren Transportversuche unterstützt. Die transfizierten Zellen zeigten im Vergleich zu nicht-transfizierten Zellen einen deutlichen Anstieg der Transportaktivität.

Nach Transfektion der ABCC2-Haplotypen H1, H2, H9, H10 und H12 in HEK293T/17-Zellen zeigten sich deutliche Unterschiede in der Proteinexpression unter den Haplotypen. Die Haplotypen H9 (-24C/1249G/3972T), H10 (-24T/1249G/3972C) und H12 (-24T/1249G/3972T) zeigten signifikant geringere Proteinexpressionen im Vergleich zum Wildtyp H1 (-24C/1249G/3972C), wobei der Haplotyp H9 von allen untersuchten Haplotypen die geringste Proteinexpression aufwies. Im Gegensatz dazu zeigte der Haplotyp H2, der lediglich die Variante 1249A aufweist, eine signifikant erhöhte Proteinexpression im Western Blot.

#### **4.4.2 Funktionelle Bedeutung der ABCC2-Varianten**

Die Beobachtungen zur Proteinexpression stehen im Einklang mit Ergebnissen verschiedener In-vivo-Studien. Diese zeigten, dass der 1249G>A-Polymorphismus unter anderem mit einer geringeren Bioverfügbarkeit von Talinolol [48], einer erhöhten gastrointestinalen Toxizität bei der Behandlung mit dem Dihydrofolsäurereduktasehemmer Methotrexat [49], einer geringeren Bioverfügbarkeit des Topoisomerase-Inhibitors Irinotecan [50] und einem höheren Risiko für eine Tenofovir-induzierte proximale Tubulopathie [113] assoziiert ist. Im letzteren Fall wird angenommen, dass es aufgrund der höheren Aktivität des ABCC2-Transporters zu einer toxischen Konzentration des HIV-Reverse-Transkriptase-Inhibitors im Lumen des proximalen Nierentubulus kommt.

Für den ABCC2-5'-UTR-Polymorphismus -24C>T, der in den Haplotypen H10 und H12 vorkommt, wurden unter anderem eine geringere orale Clearance für Mycophenolsäure [42], eine bessere Ansprechrate auf die Therapie bei nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom [45], eine erhöhte Bioverfügbarkeit von Irinotecan [50;52;114] und eine verringerte Clearance von Methotrexat [43] beschrieben. Diese Beispiele aus verschiedenen In-vivo-Studien lassen eine verringerte Funktion des ABCC2-Transporters bei -24T-Trägern vermuten und zeigen somit eine deutliche Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus meinen In-vitro-Versuchen.

In Bezug auf -24C>T ist es denkbar, dass der Polymorphismus die Translationsinitiation bzw. die Konformation des Translationsinitiationkomplexes an der 5'-UTR der ABCC2-mRNA beeinflusst. Der Bereich der 5'-UTR ist für die Initiation der Translation wichtig [115] und Mutationen in diesem Bereich haben gezeigt, dass sie zu Veränderungen bei der Translationsinitiation führen können, indem durch die Variante die Bindung der 40S-Ribosomenuntereinheit behindert wird und sich dadurch wiederum die Translationseffizienz verringert [106]. Darüber hinaus könnte aufgrund des -24C>T-Polymorphismus die Bindung von regulatorischen RNA-bindenden-Proteinen beeinflusst werden, die wiederum im Zusammenhang mit der Translationseffizienz stehen [115].

Der -24C>T-Polymorphismus in der 5'-UTR steht mit dem synonymen 3972C>T-SNP in Exon 28 in einem Kopplungsungleichgewicht [44]. Der 3972C>T-Polymorphismus ist alleine in Haplotyp H9 und zusammen mit dem -24C>T-SNP in Haplotyp H12 enthalten. In In-vivo-Studien war der ABCC2-Polymorphismus 3972C>T ebenso wie der -24C>T-SNP mit einer geringeren Funktion des ABCC2-Transporters assoziiert. So kam es bei 3972T-Trägern zu einer geringeren Bioverfügbarkeit von Irinotecan [50;52], einer besseren Ansprechrate auf die Therapie bei nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom [45], einem vierfach erhöhten Risiko für intrahepatische Cholestase in der Schwangerschaft [116], und erhöhtem Risiko für Cholangiokarzinome [54], hepatozelluläre Karzinome [117] und Entwicklung einer hepatozelluläre Hepatitis [47]. Da es sich bei dem 3972C>T-Polymorphismus um eine synonyme Mutation im ABCC2-Protein handelt, wird von vielen Autoren argumentiert, dass die beobachteten Effekte des 3972C>T-Polymorphismus nur auf Kopplungsungleichgewichte mit anderen SNPs zurückzuführen sind. Diese Tatsache konnte in dieser Arbeit zumindest in Bezug -24C>T und 1249G>A in den In-vitro-Versuchen widerlegt werden. Haplotyp H9, der wie oben ausgeführt nur die Variante 3972T enthält, wies den stärksten Effekt auf der Ebene der Proteinexpression auf. Ein Einfluss durch ein Kopplungsungleichgewicht zwischen Polymorphismen kann in vivo aber dennoch nicht ausgeschlossen werden.

Allerdings zeigen die In-vitro-Experimente dieser Arbeit Effekte, die von den einzelnen Polymorphismen (-24C>T, 1249G>A, 3972C>T) oder im Fall von Haplotyp H12 von einer

Kombination von Polymorphismen (-24C>T und 3972C>T) verursacht werden. In den verwendeten ABCC2-Vektorkonstrukten befinden sich zum einen keine weiteren Promotor-Polymorphismen, die eine Rolle spielen können, da als Grundlage für die Vektorkonstrukte nur die kodierende Region mit einem Teil der 5'-UTR genommen wurde und zum anderen sind die Sequenzen absolut identisch mit der Ausnahme der verschiedenen zu untersuchenden Polymorphismen.

Darüber hinaus konnte in zwei Studien, die neben dem ABCC2-Polymorphismus 3972C>T auch -24C>T untersucht haben, gezeigt werden, dass ausschließlich der 3972C>T-Polymorphismus mit einem erhöhten Risiko für eine Cholestase in der Schwangerschaft [116] und einem Risiko für ein hepatozelluläres Karzinom [117] assoziiert waren. In beiden Studien wurde kein Zusammenhang mit dem -24C>T-Polymorphismus in der 5'-UTR von ABCC2 gefunden.

Kimchi-Sarfaty et al. diskutierten am Beispiel des ABC-Transporters ABCB1, dass Polymorphismen, die synonym und somit keinen Aminosäureaustausch zur Folge haben, die Proteinkonformation und die Substratspezifität beeinflussen können. Diese Studie geht davon aus, dass durch den synonymen 3435C>T-Polymorphismus im ABCB1-Gen ein selteneres Codon (von AUC zu AUU) entsteht, wodurch die Translationskinetik der mRNA sich verändert und damit die unmittelbare kotranslationale Konformation. Obwohl die Aminosäuresequenz gleich ist, können in der Folge zwei unterschiedlich gefaltete Proteine entstehen [118].

Immer mehr Studien zeigen, dass synonyme SNPs nicht unbedingt neutral sind. Studien in *Escherichia coli*, Hefen (*Saccharomyces cerevisiae*) und in *Drosophila melanogaster* haben gezeigt, dass es eine starke Korrelation zwischen der Verwendung von Codons und der Genexpression gibt [119-122]. Dieser Einfluss könnte auch für den Haplotyp H9 zutreffen, bei dem der ABCC2-Polymorphismus 3972C>T zu einem veränderten Codon für die Aminosäure Isoleucin von AUC zu AUU führt, wobei die Frequenz des Codons AUC im Vergleich zu der Frequenz von AUU beim Menschen um durchschnittlich 17,2 % niedriger ausfällt [106;123].

Der Begriff einer stillen Mutation, der synonyme Polymorphismen beschreibt stammt von der Theorie von Anfinsen [124], die besagt, dass die Aminosäuresequenz allein für die dreidimensionale Struktur und somit für die Funktion eines Proteins verantwortlich ist. Genetische und biochemische Studien haben bereits gezeigt, dass diese Ansicht zu vereinfacht ist. Es gibt eindeutige Hinweise, dass synonyme Codons nicht wahllos verwendet werden sondern bevorzugte Codons eng mit der Menge an entsprechenden tRNAs in der Zelle verbunden sind [125]. Des Weiteren haben bereits einige Studien den Zusammenhang

zwischen synonymen Polymorphismen und Erkrankungen gezeigt [125;126]. Zum Beispiel ist ein synonymer SNP im apoE-Gen mit einem erhöhten Risiko Alzheimer zu bekommen assoziiert [127]. Außerdem haben Studien gezeigt, dass Proteine die während der Translation gefaltet werden und Proteine die nach der Translation gefaltet werden unterschiedliche Strukturen ausbilden können [125;126].

Die von den ABCC2-Haplotypen beeinflussten unterschiedlichen Proteinexpressionen sind wahrscheinlich durch posttranskriptionelle Regulationsmechanismen verursacht. Durch die Bestimmung der Proteinexpression von ZsGreen1, das gemeinsam mit den jeweiligen ABCC2-Haplotypen auf einer bicistronischen mRNA liegt und als getrenntes Protein translatiert wird, war es möglich indirekt auf die Transkriptionseffizienz der ABCC2-Haplotypen zurückzuschließen. Auf diese Art und Weise konnten transkriptionelle und posttranskriptionelle Effekte in Bezug auf die Proteinexpression untersucht werden.

Im Western Blot zeigte sich im Gegensatz zu der haplotypenabhängigen Proteinexpression von ABCC2 kein Unterschied in der ZsGreen1-Proteinexpression in Abhängigkeit vom Haplotyp.

Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen wurde in humanen Leberproben gezeigt, dass der ABCC2-Polymorphismus 3972C>T keinen Einfluss auf die mRNA-Expression hat [128]. Ebenso konnte bei der duodenalen ABCC2-mRNA-Expression kein Einfluss der ABCC2-Polymorphismen -24C>T, 1249G>A und 3972C>T beobachtet werden [48]. Im Gegensatz dazu wurde in gesunden Bereichen von Nierengewebe von Nierenzellkarzinom-Patienten eine geringere ABCC2-mRNA-Expression im Zusammenhang mit -24C>T festgestellt [44]. Dies könnte darauf hinweisen, dass ähnlich wie bei den Ergebnissen des EMSAs und der möglichen DNA-Protein-Interaktionen gewebeanhängige Aspekte eine Rolle spielen. Zu beachten ist allerdings, dass in dieser Studie keine gesunden Individuen untersucht wurden, so dass ein Einfluss der Erkrankung ebenfalls eine Rolle spielen könnte [44].

Neben den bereits erwähnten posttranskriptionellen Mechanismen, wie einer veränderten Translationskinetik aufgrund von unterschiedlichen mRNA-Sekundärstrukturen, seltenen Codons oder dem Einfluss auf die Translationsinitiation, könnten noch weitere Faktoren eine Auswirkung auf die haplotypenabhängige Proteinexpression haben. So wurde beispielsweise im ABCG2-Protein, einem weiteren Mitglied der ABC-Transporterfamilie, ein Einfluss von Polymorphismen auf die Proteindegradation beschrieben, wobei es sich allerdings bei den SNPs in diesem ABC-Transporter um nicht-synonyme Polymorphismen gehandelt hat [129;130].

Ein weiterer Faktor ist die posttranslationale Regulation über das SUMOylierungs-System (SUMO - Small ubiquitin-like modifier), die für den ABCC2-Transporter bisher erst in einer Veröffentlichung beschrieben wurde [131]. Proteine des SUMOylierungs-Systems binden, ähnlich wie Ubiquitin, kovalent an Erkennungssequenzen von Proteinen, wobei allerdings SUMOylierte Proteine vor der Ubiquitylierung und der darauf folgenden Degradation geschützt werden [131;132].

Daher wäre es sehr interessant die beobachteten haplotypenabhängigen Proteinexpressionen in Bezug auf mögliche posttranslationale Mechanismen, wie beispielsweise Mechanismen der Proteindegradation und der SUMOylierung weiter zu untersuchen.

#### 4.5 Transportfunktion von ABCC2

Um die Transportaktivität des ABC-Transporters ABCC2 in intakten Zellen zu untersuchen, ist es wichtig ein geeignetes Substrat zu wählen. Bei In-vitro-Versuchen mit intakten Zellen besteht das Problem darin, dass es sich bei den ABC-Transportern um Auswärtstransporter handelt und Substrate somit von intrazellulär nach extrazellulär gepumpt werden. Für einen Versuchsansatz muss daher das Substrat zuerst in die Zelle. Aus diesem Grund werden für diese Studien hydrophobe „Pro-Drugs“ benötigt, die in der Zelle zu Anionen metabolisiert werden. Ein gutes Beispiel ist CDNB (1-Chlor-2,4-dinitrobenzol), das in der Zelle durch eine Glutathion-S-Transferase zu DNP-GS konvertiert wird [32]. Ein weiteres Substrat ist CMFDA (5-chloromethylfluorescein-diacetate), das für die Transportstudien in dieser Arbeit gewählt wurde. CMFDA liegt zunächst nicht-fluoreszierend vor und ist in der Lage die Zellmembran zu überwinden. Intrazellulär wird CMFDA zu der fluoreszierenden Substanz Glutathion-Methylfluorescein metabolisiert. Die Fluoreszenz der metabolisierten Substanz, die als Substrat für ABCC2 dient, bietet einen großen Vorteil im Nachweis der Transportaktivität [133]. Der Nachteil dieser „Pro-Drug“ ist, dass der Prozess des Metabolismus zu Substraten von ABCC2 limitiert sein kann. Daher ist es wichtig in Vorversuchen geeignete Zelllinien und Zeitpunkte für die Untersuchung der Transportaktivität von in diesem Fall unterschiedlichen ABCC2-Haplotypen zu identifizieren.

Eine weitere Möglichkeit die Transportaktivität zu untersuchen, ist der Vesikel-Transport mit Hilfe von „inside-out“-Membranvesikeln [134;135]. Um diese Membranvesikel zu erhalten

werden z.B. Insektenzellen (Sf9-Zellen, *Spodoptera frugiperda*) mit rekombinanten Baculoviren, die die jeweiligen ABC-Transporter-Haplotypen enthalten, infiziert. Aus diesen rekombinanten Insektenzellen können dann wiederum Membranvesikel mit den verschiedenen Haplotypen isoliert werden. Bei dieser Methode wird die Transportaktivität der Transporter-Haplotypen mit isolierten Membranen und nicht mit intakten Zellen untersucht. Der Vorteil bei diesem System liegt darin, dass Unterschiede in der Spezifität von unterschiedlichen Substraten genauer untersucht werden können, wie es für ABCB1 beschrieben wurde [135]. Daher ist es wichtig, je nach Zielsetzung, die jeweiligen Methoden einzusetzen. Für die generelle Untersuchung der Transportaktivität und um zu testen ob es neben den unterschiedlichen Proteinexpressionen der Haplotypen zusätzlich zu einer unterschiedlichen Transportaktivität kommt, ist das Transportsystem in intakten Zellen mit CMFDA bzw. seinem Metaboliten Glutathion-Methylfluorescein als Substrat besser geeignet. Allerdings ist es sinnvoll, in weiterführenden Studien sich den Transport von wichtigen ABCC2-Substraten in isolierten Membranvesikeln anzusehen, um zusätzlich die Substratspezifitäten im Zusammenhang mit den ABCC2-Haplotypen zu analysieren.

#### **4.5.1 Einfluss von Haplotypen auf die Transportaktivität von ABCC2 in vitro**

Um die Transportaktivität und somit die funktionellen Konsequenzen der ABCC2-Haplotypen zu untersuchen, wurden Transportversuche mit Glutathion-Methylfluorescein, dem Metaboliten von CMFDA, durchgeführt. Dabei wurde die Transportaktivität der ABCC2-Haplotypen nach transienter Transfektion der ABCC2-Vektorkonstrukte in MDCK II-Zellen über den Efflux des fluoreszierenden ABCC2-Substrates Glutathion-Methylfluorescein bestimmt. Direkt im Anschluss an die Messung der Transportaktivität der verschiedenen ABCC2-Haplotypen wurden die Proteine isoliert, um die Möglichkeit zu haben die Transportaktivität auf die Proteinexpression des jeweiligen ABCC2-Haplotyp beziehen zu können.

In Bezug auf die Transportraten der einzelnen ABCC2-Haplotypen, zeigten die Haplotypen H9 und H12, die bereits im Western Blot eine signifikant geringere Proteinexpression aufwiesen ebenfalls eine signifikant verringerte Transportaktivität. Ähnlich zu diesen Beobachtungen konnte für den ABCC2-Haplotyp H10, der im Western Blot eine signifikant geringere Proteinexpression gezeigt hatte, auch eine verringerte Transportrate beobachtet werden, die allerdings nicht signifikant verändert war. Der Haplotyp H2, der als einziger der untersuchten ABCC2-Haplotypen eine signifikant erhöhte Proteinexpression im Western Blot gezeigt hatte, wies auch bei dem Transportversuch einen signifikant gesteigerten Efflux von Glutathion-Methylfluorescein im Vergleich zum Wildtyp (Haplotyp H1) auf.

Um den Effekt der verschiedenen ABCC2-Haplotypen auf die Transportaktivität bestimmen zu können, wurden die Transportraten der einzelnen ABCC2-Haplotypen auf die jeweilige Proteinexpression normalisiert. Ist nach der Normalisierung auf den Proteingehalt die Rate zwischen dem Wildtyp (Haplotyp H1) und dem varianten Haplotyp gleich, so lässt sich daraus schließen, dass der Polymorphismus oder im Fall von Haplotyp H12 die Kombination der Polymorphismen die Transportaktivität von Glutathion-Methylfluorescein nicht beeinflusst. Dabei zeigte sich, dass sich die Transportraten der ABCC2-Haplotypen H1, H2, H9, H10 und H12 nur aufgrund der unterschiedlichen Proteinexpressionen innerhalb der Haplotypen unterscheiden und nach der Normalisierung der Transportaktivität auf die Proteinexpression kein Unterschied zwischen dem Wildtyp (Haplotyp H1) und den varianten ABCC2-Haplotypen (H2, H9, H10 und H12) zu beobachten war. Das bedeutet, dass es wahrscheinlich zu keinem zusätzlichen haplotypenabhängigen Einfluss auf die Substratspezifität und Transportaktivität kommt.

Allerdings wurde in diesen Transportversuchen Glutathion-Methylfluorescein als ABCC2-Substrat gewählt, so dass eine von ABCC2-Haplotypen abhängige unterschiedliche Substratspezifität letztlich nicht ausgeschlossen werden kann. Daher könnte es sein, dass bei der Verwendung unterschiedlicher ABCC2-Substrate eventuell mit Hilfe von Membranvesikeln aus rekombinanten Insektenzellen ein Einfluss der ABCC2-Haplotypen auf die Spezifität einzelner Substrate als zusätzlicher Faktor eine Bedeutung erlangt. Dies wäre zum Beispiel für den ABCC2-Polymorphismus 1249G>A denkbar, da diese Variante im Bereich der transmembranären Domäne 1 (TMD1) liegt und Toh et al. postulierten, dass Mutationen in diesem Bereich des Proteins, die Spezifität für Substrate verändern könnten, aber wahrscheinlich nicht die Transportaktivität beeinflussen [136].

#### **4.5.2 Einfluss von ABCC2-Haplotypen auf die Pharmakokinetik von Talinolol in vivo**

Um die Ergebnisse der haplotypenabhängigen Proteinexpression aus den In-vitro-Studien auch in vivo zu untermauern, wurden pharmakokinetische Daten aus einer Studie mit Talinolol [48] bezüglich der in der In-vitro-Studie untersuchten ABCC2-Haplotypen erneut analysiert. In dieser In-vivo-Studie mit Talinolol wurden 24 gesunde kaukasische Probanden ausgewählt, die die Haplotypen H1, H2, H9 und H12 in ihren Diplotypen enthielten. Der Haplotyp H10 war aufgrund seiner geringen Frequenz in der kaukasischen Bevölkerung bei diesen Probanden nicht vertreten. Diese Einschränkungen in der Auswahl der Probanden führten zu einer sehr niedrigen Anzahl an Individuen (n = 24). Dies war auch der Grund, dass keine signifikanten Unterschiede in der Bioverfügbarkeit und AUC<sub>oral</sub> von Talinolol innerhalb

des Probandenkollektivs beobachtet werden konnte. Allerdings unterstützen diese Daten dennoch zumindest tendenziell die Ergebnisse aus den Untersuchungen zur Proteinexpression der ABCC2-Haplotypen *in vitro*. Es wurde bei Diplotypen, die zumindest einen der Haplotypen H9 oder H12 beinhalten, die wiederum jeweils den ABCC2-Polymorphismus 3972C>T tragen, eine tendenziell erhöhte Bioverfügbarkeit und  $AUC_{oral}$  von Talinolol im Vergleich zum Wildtyp (Haplotyp H1) beobachtet. Im Gegensatz dazu zeigten Probanden, die zumindest einen Haplotyp H2 in ihrem Diplotyp aufwiesen und somit variant für den 1249G>A-Polymorphismus sind eine tendenziell erniedrigte Bioverfügbarkeit für Talinolol. Dies stimmt mit den Ergebnissen einer erhöhten Proteinexpression *in vitro* überein. Eine Limitation dieser *In-vivo*-Studie mit dem  $\beta_1$ -Blocker Talinolol lag darin, dass nur jeweils eine geringe Anzahl an Probanden homozygot für die *in vitro* untersuchten Haplotypen war. Um die Daten der haplotypenabhängigen Proteinexpressionen daher noch weiter zu untermauern, wäre es wichtig in einer prospektiven Studie die *In-vitro*-Ergebnisse mit einer geeigneten Probandenanzahl und verschiedenen endogenen und exogenen Substraten von ABCC2 zu bestätigen.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass Polymorphismen im humanen Genom zu einer großen Variabilität in der Antwort auf Arzneistoffen unter Individuen beitragen können, indem sie beispielsweise die Pharmakokinetik von Arzneistoffen ändern. Klinische Beobachtungen aus den Anfängen von 1950 ließen bereits vermuten, dass Individuen unterschiedlich auf Arzneistoffe reagieren und dass diese Unterschiede vererbbar sind [137]. Verschiedene nachfolgende Studien zeigten, dass genetische Faktoren die interindividuellen Unterschiede in der Antwort auf Arzneistoffe in Bezug auf Toxizität und Effizienz beeinflussen können [137]. Obwohl dadurch demonstriert wurde, dass Therapien, die auf die gesamte Population zugeschnitten waren, nicht immer die beste Behandlung von einzelnen Individuen widerspiegeln [138], war es schwierig die genetischen Faktoren zu identifizieren, die die interindividuellen Unterschiede verursachen [137].

Das Versprechen der Pharmakogenomik liegt darin, die Effizienz einer Therapie zu erhöhen und gleichzeitig die Toxizität zu verringern. Dieses Ziel wäre insbesondere in der Krebstherapie aufgrund der großen Toxizität und der großen Variabilität im Ansprechen auf die Zytostatika-Therapie wichtig [125]. Somit ist das Anliegen der Pharmakogenomik eine personalisierte Medizin, die auf dem jeweils individuellen Genotyp basiert.



Ein wichtiger Punkt, der bei dem Ziel einer individualisierten Therapie zu beachten ist, sind die Variabilitäten in den Frequenzen der einzelnen Polymorphismen zwischen Populationen von unterschiedlicher Abstammung aber auch zwischen Populationen untereinander [125].

Aufgrund der relativ hohen Frequenz an SNPs im humanen Genom ist die Auswahl an möglichen Polymorphismen, die einen Einfluss auf die Antwort auf Arzneistoffe haben groß. In den letzten Jahren wurde sich daher in erster Linie auf nicht-synonyme Polymorphismen konzentriert, die durch ihren Aminosäureaustausch am ehesten einen Einfluss auf die Funktion des ABCC2-Transporter haben sollten. Synonyme SNPs wurden in diesen pharmakogenomischen Studien oft vernachlässigt in der Annahme, dass sie aufgrund der stillen Mutation keinen Einfluss haben können. Allerdings wurden in den letzten Jahren auch einige Studien veröffentlicht, die einen eindeutigen Einfluss des synonymen 3972C>T-Polymorphismus im ABCC2-Gen auf beispielsweise das Risiko für Gallengangkrebs [54] oder auch ein hepatozelluläres Karzinom [117] gezeigt haben, wobei das erhöhte Risiko für ein hepatozelluläres Karzinom wahrscheinlich ausschließlich von 3972C>T verursacht wird. Des Weiteren konnte das Risiko für eine intrahepatische Cholestase in der Schwangerschaft [116] nur mit dem ABCC2-Polymorphismus 3972C>T in Verbindung gebracht werden. In dieser Arbeit konnte ebenfalls gezeigt werden, dass gerade der synonyme ABCC2-Polymorphismus 3972C>T den stärksten Einfluss auf die Proteinexpression von ABCC2 und nachfolgend auf die Transportaktivität hatte. Darüber hinaus konnten tendenziell auch die pharmakokinetischen Daten der Studie zur Bioverfügbarkeit von Talinolol den Einfluss von 3972C>T auf eine verringerte Funktion des ABCC2-Transporters bestätigen.

Das gängige Dogma hätte erwartet, dass die größten Effekte in dieser Arbeit durch den ABCC2-Polymorphismus 1249G>A beobachtet werden, der zu einem Aminosäureaustausch an Position 417 im ABCC2-Protein von Valin zu Isoleucin führt. Das überraschende Ergebnis war allerdings, dass die größten Effekte von dem synonymen 3972C>T-Polymorphismus alleine ausgingen.

Daraus lässt sich der Schluss ziehen, dass die Untersuchung der molekularen Hintergründe von Polymorphismen und insbesondere auch von synonymen Polymorphismen einen großen Beitrag liefern könnte, um die interindividuellen Unterschiede in der Bioverfügbarkeit von Arzneistoffen und von toxischen und unerwünschten Arzneimittelwirkungen zu erklären.

## 5. Zusammenfassung

Die Wirksamkeit einer Arzneimitteltherapie ist abhängig vom komplexen Zusammenspiel von verschiedenen Prozessen, die zur Verteilung und Antwort auf Arzneimittel führen. Neben den Arzneistoff-metabolisierenden Enzymen spielen die Arzneistofftransporter eine wichtige Rolle. Der Auswärtstransporter ABCC2 gehört zu der Familie der ABC-Transporter und wird vorwiegend in Geweben mit Barrierefunktion exprimiert, wie der Leber, dem Darm und der Niere. ABCC2 weist ein breites Substratspektrum von endogenen und exogenen Substanzen auf. Gemeinsam mit anderen ABC-Transportern trägt ABCC2 zum Phänotyp der „multidrug resistance“ (MDR) bei und ist in Tumorzellen oft überexprimiert. Es wird vermutet, dass genetische Varianten, wie SNPs, im ABCC2-Gen einige der interindividuellen Unterschiede in der Pharmakokinetik von Arzneistoffen erklären könnten. Einige In-vivo-Studien haben bereits einen Zusammenhang zwischen einer veränderten Funktion des ABCC2-Transporters und den Polymorphismen -24C>T in der 5'-UTR, 1249G>A, der zu einem Aminosäureaustausch im ABCC2-Protein an Position 417 von Valin zu Isoleucin führt, und der stillen Mutation 3972C>T (I1324I) beschrieben. Eingehende funktionelle Analysen auf molekularer Ebene auch unter Berücksichtigung von Haplotypen sind bislang aber nicht durchgeführt worden.

In dieser Arbeit wurde zunächst eine gesunde Kohorte kaukasischer Herkunft bezüglich der ABCC2-SNPs -24C>T, 1249G>A und 3972C>T genotypisiert. Anschließend wurde der Einfluss der genetischen ABCC2-Varianten auf DNA-Protein-Interaktionen, mRNA-Sekundärstrukturen, mRNA-Stabilitäten und die Proteinexpression in vitro und auf die Funktion in vitro sowie in vivo analysiert. Dabei zeigte sich, dass -24C>T nur einen schwachen gewebeabhängigen Einfluss auf DNA-Protein-Interaktionen und keinen signifikanten Einfluss auf die Degradation der mRNA zeigte. In transient transfizierten HEK293T/17-Zellen konnte allerdings festgestellt werden, dass die Haplotypen H9 (-24C/1249G/3972T), H10 (-24T/1249G/3972C) und H12 (-24T/1249G/3972T) eine signifikant geringere Proteinexpression im Vergleich zum Wildtyp, Haplotyp H1 (-24C/1249G/3972C), aufweisen. Im Gegensatz dazu zeigte der Haplotyp H2 (-24C/1249A/3972C) eine signifikant erhöhte Proteinexpression im Vergleich zum Wildtyp. Übereinstimmenden mit diesen Ergebnissen war auch ein Einfluss der ABCC2-Haplotypen auf die Transportraten der fluoreszierenden Substanz Glutathion-Methylfluorescein in vitro und auf die Bioverfügbarkeit von Talinolol in vivo zu beobachten.

---

---

Diese Arbeit konnte somit zeigen, dass es haplotypenabhängig zu einer veränderten Transportfunktion von ABCC2 kommt, die auf posttranskriptionelle Modifikationen der Proteinexpression und weniger auf unterschiedliche Transportraten zurückzuführen ist.

## 6. Summary

The efficacy of drug therapy follows from the complex interplay of various processes including drug disposition and response. In addition to drug metabolizing enzymes drug transporters play an important role. The transmembrane transporter ABCC2 belongs to the ABC-transporter family. It serves as an important efflux pump of endogenous and exogenous compounds and is widely expressed at barriers of mammalian tissues like liver, intestine and kidney. ABCC2 is often expressed in tumor cells and contributes to the phenomenon of drug resistance (MDR).

There is upcoming evidence that the 5'-UTR SNP -24C>T, the missense variant 1249G>A, which causes an amino acid exchange from valin to isoleucin in the ABCC2 protein at position 417 and the silent SNP 3972C>T alter the function of ABCC2. Detailed functional analyses on molecular level considering also haplotypes however, have not been performed so far.

First a healthy Caucasian population was genotyped for the ABCC2 polymorphisms -24C>T, 1249G>A and 3972C>T. Subsequently the influence of ABCC2 haplotypes on DNA-protein interactions, mRNA secondary structure, mRNA stability and protein expression were analysed in vitro as well as transport activity in vitro and in vivo. The study showed that -24C>T had minor influence on DNA-protein binding and mRNA stability did not differ significantly. In transiently transfected HEK293T/17 cells, haplotypes H9 (-24C/1249G/3972T), H10 (-24T/1249G/3972C) and H12 (-24T/1249G/3972T) had significantly lower, whereas haplotype H2 (-24C/1249A/3972C) exhibited increased protein expression compared to the wild type, haplotype H1 (-24C/1249G/3972C). This corresponded with efflux rates of the fluorescent dye glutathione-methylfluorescein in vitro and with talinolol bioavailability in vivo.

These results demonstrate a haplotype-dependent influence on transport capacity of ABCC2, which is based on post-transcriptional modification of protein expression rather than transport rates.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Cascorbi I. Role of pharmacogenetics of ATP-binding cassette transporters in the pharmacokinetics of drugs. *Pharmacol.Ther.* 2006; **112**:457-73.
2. Ho RH, Kim RB. Transporters and drug therapy: implications for drug disposition and disease. *Clin.Pharmacol.Ther.* 2005; **78**:260-77.
3. Konig 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**:377-94.
4. Nies AT, Keppler D. The apical conjugate efflux pump ABCC2 (MRP2). *Pflugers Arch.* 2007; **453**:643-59.
5. Fardel O, Jigorel E, Le Vee M, Payen L. Physiological, pharmacological and clinical features of the multidrug resistance protein 2. *Biomed.Pharmacother.* 2005; **59**:104-14.
6. 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**:175-84.
7. 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**:39617-24.
8. Zelcer N, Huisman MT, Reid G *et al.* Evidence for two interacting ligand binding sites in human multidrug resistance protein 2 (ATP binding cassette C2). *J.Biol.Chem.* 2003; **278**:23538-44.
9. Fernandez SB, Hollo Z, Kern A *et al.* Role of the N-terminal transmembrane region of the multidrug resistance protein MRP2 in routing to the apical membrane in MDCKII cells. *J.Biol.Chem.* 2002; **277**:31048-55.
10. Nies AT, Konig J, Cui Y, Brom M, Spring H, Keppler D. Structural requirements for the apical sorting of human multidrug resistance protein 2 (ABCC2). *Eur.J.Biochem.* 2002; **269**:1866-76.
11. Kikuchi S, Hata M, Fukumoto K *et al.* Radixin deficiency causes conjugated hyperbilirubinemia with loss of Mrp2 from bile canalicular membranes. *Nat.Genet.* 2002; **31**:320-5.
12. Kojima H, Nies AT, Konig J *et al.* Changes in the expression and localization of hepatocellular transporters and radixin in primary biliary cirrhosis. *J.Hepatol.* 2003; **39**:693-702.
13. Hegedus T, Sessler T, Scott R *et al.* C-terminal phosphorylation of MRP2 modulates its interaction with PDZ proteins. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 2003; **302**:454-61.

14. Kocher O, Comella N, Gilchrist A *et al.* PDZK1, a novel PDZ domain-containing protein up-regulated in carcinomas and mapped to chromosome 1q21, interacts with cMOAT (MRP2), the multidrug resistance-associated protein. *Lab Invest* 1999; **79**:1161-70.
15. Kocher O, Pal R, Roberts M, Cirovic C, Gilchrist A. Targeted disruption of the PDZK1 gene by homologous recombination. *Mol.Cell Biol.* 2003; **23**:1175-80.
16. Harris MJ, Kuwano M, Webb M, Board PG. Identification of the apical membrane-targeting signal of the multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2/MOAT). *J.Biol.Chem.* 2001; **276**:20876-81.
17. Konno T, Ebihara T, Hisaeda K *et al.* Identification of domains participating in the substrate specificity and subcellular localization of the multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2. *J.Biol.Chem.* 2003; **278**:22908-17.
18. Westlake CJ, Cole SP, Deeley RG. Role of the NH2-terminal membrane spanning domain of multidrug resistance protein 1/ABCC1 in protein processing and trafficking. *Mol.Biol.Cell* 2005; **16**:2483-92.
19. Mottino AD, Catania VA. Hepatic drug transporters and nuclear receptors: regulation by therapeutic agents. *World J.Gastroenterol.* 2008; **14**:7068-74.
20. Trauner M, Boyer JL. Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation. *Physiol Rev.* 2003; **83**:633-71.
21. Chen C, Scott D, Hanson E *et al.* Impact of Mrp2 on the biliary excretion and intestinal absorption of furosemide, probenecid, and methotrexate using Eisai hyperbilirubinemic rats. *Pharm.Res.* 2003; **20**:31-7.
22. Potschka H, Fedrowitz M, Loscher W. Multidrug resistance protein MRP2 contributes to blood-brain barrier function and restricts antiepileptic drug activity. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 2003; **306**:124-31.
23. Sandusky GE, Mintze KS, Pratt SE, Dantzig AH. Expression of multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) in normal human tissues and carcinomas using tissue microarrays. *Histopathology* 2002; **41**:65-74.
24. Zhang Y, Schuetz JD, Elmquist WF, Miller DW. Plasma membrane localization of multidrug resistance-associated protein homologs in brain capillary endothelial cells. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 2004; **311**:449-55.
25. Hong J, Lambert JD, Lee SH, Sinko PJ, Yang CS. Involvement of multidrug resistance-associated proteins in regulating cellular levels of (-)-epigallocatechin-3-gallate and its methyl metabolites. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 2003; **310**:222-7.
26. 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**:974-80.
27. Berger V, Gabriel AF, Sergent T, Trouet A, Larondelle Y, Schneider YJ. Interaction of ochratoxin A with human intestinal Caco-2 cells: possible implication of a multidrug resistance-associated protein (MRP2). *Toxicol.Lett.* 2003; **140-141**:465-76.

28. Payen L, Courtois A, Campion JP, Guillouzo A, Fardel O. Characterization and inhibition by a wide range of xenobiotics of organic anion excretion by primary human hepatocytes. *Biochem.Pharmacol.* 2000; **60**:1967-75.
29. Rebbeor JF, Connolly GC, Ballatori N. Inhibition of Mrp2- and Ycf1p-mediated transport by reducing agents: evidence for GSH transport on rat Mrp2. *Biochim.Biophys.Acta* 2002; **1559**:171-8.
30. Bakos E, Evers R, Sinko E, Varadi A, Borst P, Sarkadi B. Interactions of the human multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2 with organic anions. *Mol.Pharmacol.* 2000; **57**:760-8.
31. Van Aubel RA, Koenderink JB, Peters JG, Van Os CH, Russel FG. Mechanisms and interaction of vinblastine and reduced glutathione transport in membrane vesicles by the rabbit multidrug resistance protein Mrp2 expressed in insect cells. *Mol.Pharmacol.* 1999; **56**:714-9.
32. Borst P, Evers R, Kool M, Wijnholds J. The multidrug resistance protein family. *Biochim.Biophys.Acta* 1999; **1461**:347-57.
33. Evers R, de Haas M, Sparidans R *et al.* Vinblastine and sulfinpyrazone export by the multidrug resistance protein MRP2 is associated with glutathione export. *Br.J.Cancer* 2000; **83**:375-83.
34. 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**:155-97.
35. Jansen PL, Peters WH, Lamers WH. Hereditary chronic conjugated hyperbilirubinemia in mutant rats caused by defective hepatic anion transport. *Hepatology* 1985; **5**:573-9.
36. Hosokawa S, Tagaya O, Mikami T *et al.* A new rat mutant with chronic conjugated hyperbilirubinemia and renal glomerular lesions. *Lab Anim Sci.* 1992; **42**:27-34.
37. Takikawa H, Sano N, Narita T *et al.* Biliary excretion of bile acid conjugates in a hyperbilirubinemic mutant Sprague-Dawley rat. *Hepatology* 1991; **14**:352-60.
38. Paulusma CC, Bosma PJ, Zaman GJ *et al.* Congenital jaundice in rats with a mutation in a multidrug resistance-associated protein gene. *Science* 1996; **271**:1126-8.
39. Ito K, Suzuki H, Hirohashi T, Kume K, Shimizu T, Sugiyama Y. Molecular cloning of canalicular multispecific organic anion transporter defective in EHBR. *Am.J.Physiol* 1997; **272**:G16-G22.
40. Niemi M, Arnold KA, Backman JT *et al.* Association of genetic polymorphism in ABCC2 with hepatic multidrug resistance-associated protein 2 expression and pravastatin pharmacokinetics. *Pharmacogenet.Genomics* 2006; **16**:801-8.
41. Sai K, Saito Y, Itoda M *et al.* Genetic variations and haplotypes of ABCC2 encoding MRP2 in a Japanese population. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2008; **23**:139-47.

42. Naesens M, Kuypers DR, Verbeke K, Vanrenterghem Y. Multidrug resistance protein 2 genetic polymorphisms influence mycophenolic acid exposure in renal allograft recipients. *Transplantation* 2006; **82**:1074-84.
43. Rau T, Erney B, Gores R, Eschenhagen T, Beck J, Langer T. High-dose methotrexate in pediatric acute lymphoblastic leukemia: impact of ABCC2 polymorphisms on plasma concentrations. *Clin.Pharmacol.Ther.* 2006; **80**:468-76.
44. Haenisch S, Zimmermann U, Dazert E *et al.* Influence of polymorphisms of ABCB1 and ABCC2 on mRNA and protein expression in normal and cancerous kidney cortex. *Pharmacogenomics.J.* 2007; **7**:56-65.
45. Han JY, Lim HS, Yoo YK *et al.* Associations of ABCB1, ABCC2, and ABCG2 polymorphisms with irinotecan-pharmacokinetics and clinical outcome in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Cancer* 2007; **110**:138-47.
46. Daly AK, Aithal GP, Leathart JB, Swainsbury RA, Dang TS, Day CP. Genetic susceptibility to diclofenac-induced hepatotoxicity: contribution of UGT2B7, CYP2C8, and ABCC2 genotypes. *Gastroenterology* 2007; **132**:272-81.
47. Choi JH, Ahn BM, Yi J *et al.* MRP2 haplotypes confer differential susceptibility to toxic liver injury. *Pharmacogenet.Genomics* 2007; **17**:403-15.
48. Haenisch S, May K, Wegner D, Caliebe A, Cascorbi I, Siegmund W. Influence of genetic polymorphisms on intestinal expression and rifampicin-type induction of ABCC2 and on bioavailability of talinolol. *Pharmacogenet.Genomics* 2008; **18**:357-65.
49. Ranganathan P, Culverhouse R, Marsh S *et al.* Methotrexate (MTX) pathway gene polymorphisms and their effects on MTX toxicity in Caucasian and African American patients with rheumatoid arthritis. *J.Rheumatol.* 2008; **35**:572-9.
50. Fujita K, Nagashima F, Yamamoto W *et al.* Association of ATP-binding cassette, sub-family C, number 2 (ABCC2) genotype with pharmacokinetics of irinotecan in Japanese patients with metastatic colorectal cancer treated with irinotecan plus infusional 5-fluorouracil/leucovorin (FOLFIRI). *Biol.Pharm.Bull.* 2008; **31**:2137-42.
51. Hirouchi M, Suzuki H, Itoda M *et al.* Characterization of the cellular localization, expression level, and function of SNP variants of MRP2/ABCC2. *Pharm.Res.* 2004; **21**:742-8.
52. Innocenti F, Kroetz DL, Schuetz E *et al.* Comprehensive Pharmacogenetic Analysis of Irinotecan Neutropenia and Pharmacokinetics. *J.Clin.Oncol.* 2009.
53. Sookoian S, Castano G, Burgueno A, Gianotti TF, Pirola CJ. Association of the multidrug-resistance-associated protein gene (ABCC2) variants with intrahepatic cholestasis of pregnancy. *J.Hepatol.* 2008; **48**:125-32.
54. Hoblinger A, Grunhage F, Sauerbruch T, Lammert F. Association of the c.3972C>T Variant of the Multidrug Resistance-Associated Protein 2 Gene (MRP2/ABCC2) with Susceptibility to Bile Duct Cancer. *Digestion* 2009; **80**:36-9.



55. Meier Y, Pauli-Magnus C, Zanger UM *et al.* Interindividual variability of canalicular ATP-binding-cassette (ABC)-transporter expression in human liver. *Hepatology* 2006; **44**:62-74.
56. Scotto KW. Transcriptional regulation of ABC drug transporters. *Oncogene* 2003; **22**:7496-511.
57. 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**:1347-58.
58. Cornwell MM. The human multidrug resistance gene: sequences upstream and downstream of the initiation site influence transcription. *Cell Growth Differ.* 1990; **1**:607-15.
59. Kauffmann HM, Schrenk D. Sequence analysis and functional characterization of the 5'-flanking region of the rat multidrug resistance protein 2 (mrp2) gene. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1998; **245**:325-31.
60. Tanaka T, Uchiumi T, Hinoshita E *et al.* The human multidrug resistance protein 2 gene: functional characterization of the 5'-flanking region and expression in hepatic cells. *Hepatology* 1999; **30**:1507-12.
61. Goodwin B, Gauthier KC, Umetani M *et al.* Identification of bile acid precursors as endogenous ligands for the nuclear xenobiotic pregnane X receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2003; **100**:223-8.
62. Goodwin B, Gauthier KC, Umetani M *et al.* Identification of bile acid precursors as endogenous ligands for the nuclear xenobiotic pregnane X receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2003; **100**:223-8.
63. Kast HR, Goodwin B, Tarr PT *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**:2908-15.
64. Ruhl R, Sczech R, Landes N, Pfluger P, Kluth D, Schweigert FJ. Carotenoids and their metabolites are naturally occurring activators of gene expression via the pregnane X receptor. *Eur.J.Nutr.* 2004; **43**:336-43.
65. Shibayama Y, Ikeda R, Motoya T, Yamada K. St. John's Wort (*Hypericum perforatum*) induces overexpression of multidrug resistance protein 2 (MRP2) in rats: a 30-day ingestion study. *Food Chem.Toxicol.* 2004; **42**:995-1002.
66. Denson LA, Bohan A, Held MA, Boyer JL. Organ-specific alterations in RAR alpha:RXR alpha abundance regulate rat Mrp2 (Abcc2) expression in obstructive cholestasis. *Gastroenterology* 2002; **123**:599-607.
67. Hisaeda K, Inokuchi A, Nakamura T *et al.* Interleukin-1beta represses MRP2 gene expression through inactivation of interferon regulatory factor 3 in HepG2 cells. *Hepatology* 2004; **39**:1574-82.

68. 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**:8835-43.
69. Dietrich CG, Geier A, Salein N *et al.* Consequences of bile duct obstruction on intestinal expression and function of multidrug resistance-associated protein 2. *Gastroenterology* 2004; **126**:1044-53.
70. Geier A, Dietrich CG, Voigt S *et al.* Effects of proinflammatory cytokines on rat organic anion transporters during toxic liver injury and cholestasis. *Hepatology* 2003; **38**:345-54.
71. Nakamura J, Nishida T, Hayashi K *et al.* Kupffer cell-mediated down regulation of rat hepatic CMOAT/MRP2 gene expression. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1999; **255**:143-9.
72. Hartmann G, Cheung AK, Piquette-Miller M. Inflammatory cytokines, but not bile acids, regulate expression of murine hepatic anion transporters in endotoxemia. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 2002; **303**:273-81.
73. Kim PK, Chen J, Andrejko KM, Deutschman CS. Intraabdominal sepsis down-regulates transcription of sodium taurocholate cotransporter and multidrug resistance-associated protein in rats. *Shock* 2000; **14**:176-81.
74. Siewert E, Dietrich CG, Lammert F *et al.* Interleukin-6 regulates hepatic transporters during acute-phase response. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 2004; **322**:232-8.
75. Kauffmann HM, Pfannschmidt S, Zoller H *et al.* Influence of redox-active compounds and PXR-activators on human MRP1 and MRP2 gene expression. *Toxicology* 2002; **171**:137-46.
76. Vernhet L, Seite MP, Allain N, Guillouzo A, Fardel O. Arsenic induces expression of the multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) gene in primary rat and human hepatocytes. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 2001; **298**:234-9.
77. Vernhet L, Seite MP, Allain N, Guillouzo A, Fardel O. Arsenic induces expression of the multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) gene in primary rat and human hepatocytes. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 2001; **298**:234-9.
78. Cherrington NJ, Hartley DP, Li N, Johnson DR, Klaassen CD. Organ distribution of multidrug resistance proteins 1, 2, and 3 (Mrp1, 2, and 3) mRNA and hepatic induction of Mrp3 by constitutive androstane receptor activators in rats. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 2002; **300**:97-104.
79. Bock KW, Eckle T, Ouzzine M, Fournel-Gigleux S. Coordinate induction by antioxidants of UDP-glucuronosyltransferase UGT1A6 and the apical conjugate export pump MRP2 (multidrug resistance protein 2) in Caco-2 cells. *Biochem.Pharmacol.* 2000; **59**:467-70.
80. Kauffmann HM, Keppler D, Kartenbeck J, Schrenk D. Induction of cMrp/cMoat gene expression by cisplatin, 2-acetylaminofluorene, or cycloheximide in rat hepatocytes. *Hepatology* 1997; **26**:980-5.

81. Sekine S, Ito K, Horie T. Oxidative stress and Mrp2 internalization. *Free Radic.Biol.Med.* 2006; **40**:2166-74.
82. Sekine S, Ito K, Horie T. Canalicular Mrp2 localization is reversibly regulated by the intracellular redox status. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol* 2008; **295**:G1035-G1041.
83. Misra S, Ujhazy P, Gatmaitan Z, Varticovski L, Arias IM. The role of phosphoinositide 3-kinase in taurocholate-induced trafficking of ATP-dependent canalicular transporters in rat liver. *J.Biol.Chem.* 1998; **273**:26638-44.
84. Beuers U, Bilzer M, Chittattu A *et al.* Tauroursodeoxycholic acid inserts the apical conjugate export pump, Mrp2, into canalicular membranes and stimulates organic anion secretion by protein kinase C-dependent mechanisms in cholestatic rat liver. *Hepatology* 2001; **33**:1206-16.
85. Roelofsen H, Soroka CJ, Keppler D, Boyer JL. Cyclic AMP stimulates sorting of the canalicular organic anion transporter (Mrp2/cMoat) to the apical domain in hepatocyte couplets. *J.Cell Sci.* 1998; **111 ( Pt 8)**:1137-45.
86. Kubitz R, Huth C, Schmitt M, Horbach A, Kullak-Ublick G, Haussinger D. Protein kinase C-dependent distribution of the multidrug resistance protein 2 from the canalicular to the basolateral membrane in human HepG2 cells. *Hepatology* 2001; **34**:340-50.
87. Gatmaitan ZC, Nies AT, Arias IM. Regulation and translocation of ATP-dependent apical membrane proteins in rat liver. *Am.J.Physiol* 1997; **272**:G1041-G1049.
88. Zollner G, Fickert P, Zenz R *et al.* Hepatobiliary transporter expression in percutaneous liver biopsies of patients with cholestatic liver diseases. *Hepatology* 2001; **33**:633-46.
89. Shoda J, Kano M, Oda K *et al.* The expression levels of plasma membrane transporters in the cholestatic liver of patients undergoing biliary drainage and their association with the impairment of biliary secretory function. *Am.J.Gastroenterol.* 2001; **96**:3368-78.
90. Yamada T, Arai T, Nagino M *et al.* Impaired expression of hepatic multidrug resistance protein 2 is associated with posthepatectomy hyperbilirubinemia in patients with biliary cancer. *Langenbecks Arch.Surg.* 2005; **390**:421-9.
91. Kullak-Ublick GA, Baretton GB, Oswald M, Renner EL, Paumgartner G, Beuers U. Expression of the hepatocyte canalicular multidrug resistance protein (MRP2) in primary biliary cirrhosis. *Hepatol.Res.* 2002; **23**:78-82.
92. 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**:701-10.
93. Pan YZ, Morris ME, Yu AM. MicroRNA-328 negatively regulates the expression of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in human cancer cells. *Mol.Pharmacol.* 2009; **75**:1374-9.

94. Zhu H, Wu H, Liu X *et al.* Role of MicroRNA miR-27a and miR-451 in the regulation of MDR1/P-glycoprotein expression in human cancer cells. *Biochem.Pharmacol.* 2008; **76**:582-8.
95. Garzon R, Calin GA, Croce CM. MicroRNAs in Cancer. *Annu.Rev.Med.* 2009; **60**:167-79.
96. Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 1979; **7**:1513-23.
97. Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* 2003; **31**:3406-15.
98. 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**:248-54.
99. Bosch TM, Doodeman VD, Smits PH, Meijerman I, Schellens JH, Beijnen JH. Pharmacogenetic screening for polymorphisms in drug-metabolizing enzymes and drug transporters in a Dutch population. *Mol.Diagn.Ther.* 2006; **10**:175-85.
100. de Jong FA, Scott-Horton TJ, Kroetz DL *et al.* Irinotecan-induced diarrhea: functional significance of the polymorphic ABCC2 transporter protein. *Clin.Pharmacol.Ther.* 2007; **81**:42-9.
101. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=717620](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=717620), [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=2273697](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=2273697), and [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=3740066](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=3740066). Reference SNP Cluster Report. 2009.
102. Ranganathan P, Culverhouse R, Marsh S *et al.* Single nucleotide polymorphism profiling across the methotrexate pathway in normal subjects and patients with rheumatoid arthritis. *Pharmacogenomics.* 2004; **5**:559-69.
103. Ho WF, Koo SH, Yee JY, Lee JD. Genetic variations of the ABCC2 gene in the Chinese, Malay, and Indian populations of Singapore. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2008; **23**:385-91.
104. Itoda M, Saito Y, Soyama A *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**:363-4.
105. Haenisch, S. Funktionelle Bedeutung genetischer Polymorphismen der Membrantransporter ABCB1 und ABCC2 im Nierenzellkarzinomgewebe. 2006.
106. Duan J, Wainwright MS, Comeron JM *et al.* Synonymous mutations in the human dopamine receptor D2 (DRD2) affect mRNA stability and synthesis of the receptor. *Hum.Mol.Genet.* 2003; **12**:205-16.
107. Nackley AG, Shabalina SA, Tchivileva IE *et al.* Human catechol-O-methyltransferase haplotypes modulate protein expression by altering mRNA secondary structure. *Science* 2006; **314**:1930-3.

108. 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.
109. Capon F, Allen MH, Ameen M *et al.* A synonymous SNP of the corneodesmosin gene leads to increased mRNA stability and demonstrates association with psoriasis across diverse ethnic groups. *Hum.Mol.Genet.* 2004; **13**:2361-8.
110. Popowski K, Sperker B, Kroemer HK *et al.* Functional significance of a hereditary adenine insertion variant in the 5'-UTR of the endothelin-1 gene. *Pharmacogenetics* 2003; **13**:445-51.
111. Li FQ, Mofunanya A, Harris K, Takemaru K. Chibby cooperates with 14-3-3 to regulate beta-catenin subcellular distribution and signaling activity. *J.Cell Biol.* 2008; **181**:1141-54.
112. 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**:1317-28.
113. Izzedine H, Hulot JS, Villard E *et al.* Association between ABCC2 gene haplotypes and tenofovir-induced proximal tubulopathy. *J.Infect.Dis.* 2006; **194**:1481-91.
114. Zhou Q, Sparreboom A, Tan EH *et al.* Pharmacogenetic profiling across the irinotecan pathway in Asian patients with cancer. *Br.J.Clin.Pharmacol.* 2005; **59**:415-24.
115. Day DA, Tuite MF. Post-transcriptional gene regulatory mechanisms in eukaryotes: an overview. *J.Endocrinol.* 1998; **157**:361-71.
116. Sookoian S, Castano G, Pirola CJ. Role of ABCC2 common variants in intrahepatic cholestasis of pregnancy. *World J.Gastroenterol.* 2008; **14**:2126-7.
117. Meier-Heithuis, C, Krone, B, Ehmer, U, Manns, MP, and Strassburg, CP. Analyse von Polymorphismen des cMRP2-Gens (ABCC2) von Patienten mit hepatozellulärem Karzinom (HCC). *Z Gastroenterol.* 2004.
118. Kimchi-Sarfaty C, Oh JM, Kim IW *et al.* A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science* 2007; **315**:525-8.
119. Akashi H. Gene expression and molecular evolution. *Curr.Opin.Genet.Dev.* 2001; **11**:660-6.
120. Jia M, Li Y. The relationship among gene expression, folding free energy and codon usage bias in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 2005; **579**:5333-7.
121. Sharp PM, Tuohy TM, Mosurski KR. Codon usage in yeast: cluster analysis clearly differentiates highly and lowly expressed genes. *Nucleic Acids Res.* 1986; **14**:5125-43.
122. Xie T, Ding D. The relationship between synonymous codon usage and protein structure. *FEBS Lett.* 1998; **434**:93-6.

123. Adzhubei AA, Adzhubei IA, Krasheninnikov IA, Neidle S. Non-random usage of 'degenerate' codons is related to protein three-dimensional structure. *FEBS Lett.* 1996; **399**:78-82.
124. Anfinsen CB. Principles that govern the folding of protein chains. *Science* 1973; **181**:223-30.
125. Sauna ZE, Kimchi-Sarfaty C, Ambudkar SV, Gottesman MM. Silent polymorphisms speak: how they affect pharmacogenomics and the treatment of cancer. *Cancer Res.* 2007; **67**:9609-12.
126. Komar AA. Genetics. SNPs, silent but not invisible. *Science* 2007; **315**:466-7.
127. Laws SM, Hone E, Gandy S, Martins RN. Expanding the association between the APOE gene and the risk of Alzheimer's disease: possible roles for APOE promoter polymorphisms and alterations in APOE transcription. *J.Neurochem.* 2003; **84**:1215-36.
128. Kroetz, D. L., Liu, W, Nguyen, TD, Zwecker, BM, Ramirez, J., Innocenti, F., and Ratain, M. J. 1249G>A polymorphism of ABCC2 (MRP2) is associated with altered gene expression in human liver. *Journal of Clinical Oncology.* 6-20-2006.
129. Furukawa T, Wakabayashi K, Tamura A *et al.* Major SNP (Q141K) variant of human ABC transporter ABCG2 undergoes lysosomal and proteasomal degradations. *Pharm.Res.* 2009; **26**:469-79.
130. Nakagawa H, Tamura A, Wakabayashi K *et al.* Ubiquitin-mediated proteasomal degradation of non-synonymous SNP variants of human ABC transporter ABCG2. *Biochem.J.* 2008; **411**:623-31.
131. Minami S, Ito K, Honma M *et al.* Posttranslational regulation of Abcc2 expression by SUMOylation system. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol* 2009; **296**:G406-G413.
132. Wang Z, Prelich G. Quality control of a transcriptional regulator by SUMO-targeted degradation. *Mol.Cell Biol.* 2009; **29**:1694-706.
133. Forster F, Volz A, Fricker G. Compound profiling for ABCC2 (MRP2) using a fluorescent microplate assay system. *Eur.J.Pharm.Biopharm.* 2008; **69**:396-403.
134. Heredi-Szabo K, Kis E, Molnar E, Gyorfı A, Krajcsi P. Characterization of 5(6)-carboxy-2,'7'-dichlorofluorescein transport by MRP2 and utilization of this substrate as a fluorescent surrogate for LTC4. *J.Biomol.Screen.* 2008; **13**:295-301.
135. Schaefer M, Roots I, Gerloff T. In-vitro transport characteristics discriminate wild-type ABCB1 (MDR1) from ALA893SER and ALA893THR polymorphisms. *Pharmacogenet.Genomics* 2006; **16**:855-61.
136. Toh S, Wada M, Uchiumi T *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**:739-46.
137. Evans WE, Johnson JA. Pharmacogenomics: the inherited basis for interindividual differences in drug response. *Annu.Rev.Genomics Hum.Genet.* 2001; **2**:9-39.

- 
- 
138. Haselden JN, Nicholls AW. Personalized medicine progresses. *Nat.Med.* 2006; **12**:510-1.

## 8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Doktorarbeit unterstützt haben.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. Ingolf Cascorbi für die Überlassung des Themas dieser Doktorarbeit, seine fachliche Unterstützung, konstruktive Kritik und die sehr angenehme Zusammenarbeit.

Vielen Dank an Frau Prof. Dr. Manuela Dittmar aus der Abteilung Humanbiologie des Zoologischen Instituts der Christian-Albrechts-Universität Kiel für die Übernahme des Koreferats und die damit verbundenen Mühen.

Dr. Sierk Haenisch danke ich für die gute Betreuung und Unterstützung über die ganze Zeit der Doktorarbeit.

Vielen Dank an Prof. Dr. Werner Siegmund aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie des Instituts für Pharmakologie der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald für die Bereitstellung der Substanzen für die Transportversuche.

Danke an Prof. Dr. Ulrich Kunzendorf aus der Klinik für Nieren- und Hochdruckkrankheiten des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel für die Möglichkeit der Nutzung des Zeiss Axio Imager Z1 und des AxioVision-Programm v4.5 für die Dokumentation der Immunfluoreszenzen.

Mein Dank gilt allen Mitarbeitern des Instituts für Experimentelle und Klinische Pharmakologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel, insbesondere natürlich meinen Kollegen aus der Arbeitsgruppe Pharmakogenetik & Pharmakogenomik Cornelia Remmler, Micheline Neubert, Marion Pauer, Alexander Rühmkorf, Eleonora Turrini, Dr. Denisa May, PD Dr. Dr. Mike Ufer, Jutta Finger, sowie den ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe und Wiebke Häusgen und Dr. Ruwen Böhm aus der Arbeitsgruppe Neuropharmakologie für die gute Zusammenarbeit.

Besonders herzlich möchte ich mich schließlich bei Andreas, meiner Familie und meinen Freunden für ihr Verständnis und ihre Unterstützung bedanken.



---

## 9. Lebenslauf

### Persönliche Angaben

---

Name	Sandra Lächelt
Geburtsdatum	22.05.1982
Geburtsort	Peine
Staatsangehörigkeit	deutsch
Adresse	Achterkamp 62 24106 Kiel

### Schulische Ausbildung

---

1988 - 1992	Grundschule Klein Ilsede
1992 - 1994	Orientierungsstufe Groß Ilsede
1994 - 2001	Gymnasium Groß Ilsede
Abschluss	Abitur

### Studium

---

2001 - 2006	Biologiestudium (Mikrobiologie, Genetik, Pflanzenbiologie) an der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig
2005 - 2006	Diplomarbeit am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig in der Abteilung Genregulation und Differenzierung in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Gerhard Gross zum Thema "Faktorabhängige Modifikation adulter Stammzellen zur Sehnenbildung"
seit Dezember 2006	Doktorarbeit im Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie (Prof. Dr. Dr. Ingolf Cascorbi), Universitätsklinikum Schleswig-Holstein zum Thema "Funktionelle Analyse von ABCC2-Haplotypen"

## 10. Posterbeiträge, Vorträge und Publikationen

### Posterbeiträge

**Lächelt S**, Haenisch S, Siegmund W, Cascorbi I. ABCC2 genotype frequencies and haplotypes in healthy caucasian subjects. *Drug Metab Rev.* 40; 1, 139-140 (196), 2008.

**Lächelt S**, Haenisch S, Siegmund W, Cascorbi I. ABCC2 haplotype frequencies and their functional significance on human ABCC2 protein in-vitro. *DIRAC Pharmacogenomics/genetics*, Lo-Skolen, 2008.

**Lächelt S**, Haenisch S, Rühmkorf A, Siegmund W, Cascorbi I. Influence of ABCC2 haplotypes on transcriptional and posttranscriptional gene regulation. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol.* 379; 1, 9 (10), 2009.

Haenisch S, **Lächelt S**, Schmall A, Cascorbi I. Time and concentration depending influence of IL1 $\beta$ , IL6 TNF $\alpha$ , LPS on transcriptional gene regulation of ABCC2 in-vitro. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol.* 379; 1, 9 (9), 2009.

**Lächelt S**, Haenisch S, Rühmkorf A, Cascorbi I. Characterization of ABCC2 haplotypes and their influence on transcriptional and posttranscriptional gene regulation. *EJCB.* 88; 59, (75), 2009.

Ufer M, Häsler R, Haenisch S, **Lächelt S**, Faltraco F, Sina C, Nikolaus S, Schreiber S, Cascorbi I. Decreased sigmoidal ABCB1 (P-Glycoprotein) expression in ulcerative colitis is associated with disease activity and an over-expression of innate immunity genes. *Drug Metab Rev.* 41; 1 (211), 2009.

Turrini E, Angelini S, Haenisch S, **Lächelt S**, Soverini S, Baccarani M, Martinelli G, Cantelli-Forti G, Hrelia P, Cascorbi I. Influence of genetic variants and posttranscriptional factors on imatinib transporters as determinants of the pharmacological response. *Minerva School on Pharmacogenetics: Improving the safety and efficacy of medicines*, Tel-Aviv, Israel, 2009.

**Lächelt S**, Haenisch S, Rühmkorf A, Cascorbi I. Influence of ABCC2 haplotypes on gene expression. Minerva School on Pharmacogenetics: Improving the safety and efficacy of medicines, Tel-Aviv, 2009.

**Lächelt S**, Haenisch S, Rühmkorf A, Cascorbi I. ABCC2 haplotypes and their influence on gene regulation. The Baltic Summer School, Kiel, 2009.

## Vorträge

**Lächelt S**. Influence of ABCC2 haplotypes on gene expression. Minerva School on Pharmacogenetics: Improving the safety and efficacy of medicines, Tel-Aviv, Israel, 2009.

**Lächelt S**. The influence of haplotypes on ABCC2 gene expression and transport function. 11. Jahreskongress für Klinische Pharmakologie, Heidelberg, 2009.

## Publikationen

Ufer M, Häslar R, Haenisch S, **Lächelt S**, Faltraco F, Sina C, Nikolaus S, Schreiber S, Cascorbi I. Decreased sigmoidal ABCB1 (P-Glycoprotein) expression in ulcerative colitis is associated with disease activity. Pharmacogenomics 2009. (im Druck)

**Lächelt S**, Rühmkorf A., Siegmund W, Cascorbi I, Haenisch S. Impact of ABCC2 haplotypes on transcriptional and posttranscriptional gene regulation and function. Pharmacogenomics J. (im Review)

Noack A, Häslar R, **Lächelt S**, Schmidt H, Gelhaus C, Cascorbi I, Leippe M, Janssen O, Kalthoff H, Trauzold A. MicroRNA-197 regulates Ran GTPase expression. Mol Cancer. (eingereicht)

Faltraco F, Ufer M, Haenisch S, **Lächelt S**, Häslar R, Schreiber S, Dilger K, Cascorbi I. P-glycoprotein fluorescence microscopy signal correlates with protein expression in enterocytes of healthy volunteers and clinical activity index in ulcerative colitis. J Clin Pharmacol. (eingereicht)

## 11. 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 04.12.2009

---

Sandra Lächelt